



**HAL**  
open science

# Mécanismes cellulaires et moléculaires de la susceptibilité à l'infection au cours de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

Bachirou Koné

► **To cite this version:**

Bachirou Koné. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la susceptibilité à l'infection au cours de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S028 . tel-01916088

**HAL Id: tel-01916088**

**<https://theses.hal.science/tel-01916088>**

Submitted on 8 Nov 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 DE LILLE**  
**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE**

**DOCTORAT**  
**IMMUNOLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement le 26 Septembre 2017

Par *Bachirou KONÉ*

***Mécanismes cellulaires et moléculaires de la susceptibilité à l'infection  
au cours de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)***

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Eric KIPNIS Président du jury

Madame le Docteur Cécile CHENIVESSE Examineur

Monsieur le Docteur Christophe DESMET Examineur

Madame le Docteur Isabelle COUILLIN Rapporteur

Monsieur le Professeur Richard LE NAOUR Rapporteur

Monsieur le Docteur Philippe GOSSET Directeur de Thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille  
INSERM U1019 – CNRS UMR8204 – Institut Pasteur de Lille – Université de Lille  
Equipe 12 : *Lung Infection and Innate Immunity*



**Université de Lille**

**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE**

**DOCTORAT**

**IMMUNOLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement le 26 Septembre 2017

Par *Bachirou KONÉ*

*Mécanismes cellulaires et moléculaires de la susceptibilité à l'infection  
au cours de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)*

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Eric KIPNIS	Président du jury
Madame le Docteur Isabelle COUILLIN	Rapporteur
Monsieur le Professeur Richard LE NAOUR	Rapporteur
Madame le Docteur Cécile CHENIVESSE	Examineur
Monsieur le Docteur Christophe DESMET	Examineur
Monsieur le Docteur Philippe GOSSET	Directeur de Thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

INSERM U1019 – CNRS UMR8204 – Institut Pasteur de Lille – Université de Lille

Equipe 12 : *Lung Infection and Innate Immunity*



### Remerciements

La réalisation de cette thèse n'aurait été un succès sans le soutien de toute notre équipe de recherche. Je tiens particulièrement à remercier :

Mon directeur de thèse, Dr Philippe GOSSET pour son encadrement et la pertinence de ses décisions relatives au bon déroulement de ce travail,

Dr Muriel PICHAVANT qui a su jouer officieusement le rôle de co-directeur dans tous les sens du terme,

Dr François TROTTEIN, directeur de l'équipe 12 (LI3) pour m'avoir accepté dans son équipe dans le cadre de mon master ainsi et de ce travail de thèse.

Eva VILAIN, Dr Gaëlle REMY et Gwenola KERVOAZE pour les conseils et soutiens techniques, leur disponibilité et leur encouragement qui ont été décisifs.

Dr Fahima MADOURI, Dr Magdièl PEREZ-CRUZ et « future Dr » Olivia BARADA pour leur gaiété, leur soutien moral, technique, intellectuel et leur ouverture d'esprit qui donnent envie de toujours aller de l'avant,

Les responsables de la plateforme d'imagerie cellulaire (BiCel) pour l'encadrement, les formations et la résolution des soucis techniques relatifs à la cytométrie en flux,

L'ensemble des membres de l'équipe 12 (LI3) pour m'avoir permis de réaliser mon travail de thèse dans un environnement de convivialité constructeur tant sur le plan professionnel que social,

L'ensemble des étudiants et stagiaires ayant transité dans le laboratoire pendant ce travail, qui d'une façon ou un autre ont laissé une tache indélébile dans mes souvenirs.



### Communications et productions scientifiques

#### Brevets

1. Treatment of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease by antagonism of the IL-20R. **PCT/EP2015/077365**
2. Methods and pharmaceutical compositions for the treatment of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **PCT/EP2015/081111**

#### Publications

Muriel Pichavant, Riti Sharan, Olivier Le Rouzic, Cécile Olivier, Florence Hennegrave, Gaëlle Rémy, Magdiel Pérez-Cruz, **Bachirou Koné**, Pierre Gosset, Nicolas Just, Philippe Gosset. **IL-22 Defect During Streptococcus pneumoniae Infection Triggers Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**. EBioMedicine 2, 1686–1696.

Olivier Le Rouzic, **Bachirou Koné**, Jerome Kluza, Philippe Marchetti, Florence Hennegrave, Cécile Olivier, Gwenola Kervoaze, Eva Vilain, Clémence Mordacq, Nicolas Just, Thierry Perez, Nathalie Bautin, Muriel Pichavant, Philippe Gosset. **Cigarette smoke alters the ability of human dendritic cells to promote anti-Streptococcus pneumoniae Th17 response**. Respiratory Research 2016 ; 17(1) : 94.

**Koné Bachirou**<sup>1-5\*</sup>, Magdiel Pérez-Cruz<sup>1-5\*</sup>, Rémi Porte<sup>1-5</sup>, Christophe Carnoy<sup>1-5</sup>, Pierre Gosset<sup>6</sup>, Julien Tabareau<sup>1-5</sup>, François Trottein<sup>1-5</sup>, Jean-Claude Sirard<sup>1-5</sup>, Muriel Pichavant<sup>1-5\*</sup> and Philippe Gosset<sup>1-5\*</sup>. **The Toll-Like Receptor 5 agonist flagellin prevents bacteria-induced chronic obstructive pulmonary disease exacerbations in mice**. En cours de soumission dans European Respiratory Journal (2017)

#### Congrès et séminaires

- 2014 à Bordeaux (France) - Journées de recherche respiratoire (J2R): **Implication des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 dans la susceptibilité à l'infection au cours de la BPCO**. Présentation de poster.
- 2014 à Lille (France) - Congrès conjoint de la Société Française d'Immunologie (SFI) et de l'Association Française de Cytométrie (AFC) : **IL-19, IL-20 and IL-24 cytokines modulate the function of human monocyte-derived dendritic cells**. Présentation de poster.

## Communications et productions scientifiques

- 2015 à Marseille (France) - 2nd course on dendritic cell biology - **Alteration of dendritic cell function is implicated in susceptibility to infection during COPD**. Présentation de poster.
- 2016 à Lille (France) - Journée André Verbert : **Cellular and molecular mechanisms of susceptibility to infection in COPD**. Présentation orale
- 2016 Nice (France) - Journées de recherche respiratoire (J2R): **Flagellin, a TLR5 agonist as a therapeutic in COPD exacerbation by *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae***. Présentation de poster.
- 2017 au Québec (Canada) - Biennale de l'Espace francophone de pneumologie : **Altération de la fonction des cellules dendritiques (DC) par les cytokines IL-20 (IL-19, IL-20, IL-24) : rôle potentiel dans la susceptibilité à l'infection au cours de la BPCO**. Présentation de poster.

### Résumé

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une pathologie caractérisée par des épisodes d'exacerbation, dues aux infections, responsables de sa progression. A l'heure actuelle, la BPCO est une pathologie incurable. Les traitements actuels ne permettent seulement que d'améliorer les symptômes et de réduire les risques de complication. En dépit de cela, les patient BPCO développent des exacerbations dont la fréquence augmente avec la sévérité. Proposer de nouvelles pistes thérapeutiques est nécessaire pour lutter contre ces exacerbations. Dans le laboratoire, nous avons mis en évidence un défaut de la réponse IL-17/IL-22 (cytokines essentielles dans la réponse antibactérienne pulmonaire) dans le cadre de l'exacerbation de la BPCO par des bactéries. Etant donné l'importance des cellules présentatrices d'antigène (APC) dans cette réponse, Notre hypothèse de travail serait que la susceptibilité à l'infection serait liée à une altération des APC dans la BPCO, qui, par conséquent, ne pourraient pas déclencher la réponse Th17 nécessaire à l'élimination du pathogène.

Nous avons utilisé des approches *in vivo*, *in vitro* et *ex vivo* afin de vérifier notre hypothèse de travail. D'abord, nous avons montré que les cellules mononucléées de patient BPCO présentaient un défaut de production d'IL-17 et IL-22 en réponse à *S pneumoniae*. Ensuite, nous nous sommes intéressés à la fonction des APC dans un modèle expérimental d'exacerbation de la BPCO chez la souris. Nous avons vu que les macrophages et les cellules dendritiques (DC) des souris BPCO avaient un défaut de cytokines polarisantes et d'activation des cellules T. Ces résultats sont confirmés *in vitro* sur des DC dérivées de monocytes humains (MDDC) exposées à l'extrait de fumée de cigarette. Afin de mieux comprendre le processus mis en jeu, nous avons étudié le rôle de certaines cytokines régulatrices de la famille de l'IL-10 pouvant inhiber la réponse Th17. Ces cytokines (IL-19, IL-20 et IL-24) ont montré un effet inhibiteur sur la maturation et la fonction des MDDC. Par ailleurs, le ciblage de ces cytokines permet de bloquer leur effet (*in vitro*) et d'améliorer la clairance bactérienne au cours de l'exacerbation de la BPCO par *S. pneumoniae* (*in vivo*). Enfin, nous avons utilisé la flagelline, un agoniste de TLR5 afin de restaurer la réponse IL-17 et IL-22 et de limiter le développement de l'exacerbation. Cet immunostimulant améliore l'élimination de *S. pneumoniae* dans notre modèle murin d'exacerbation, par un mécanisme impliquant l'augmentation de l'IL-22 et des peptides antimicrobiens S100A8 et S100A9.

## Résumé

Ces résultats nous ont permis de confirmer qu'il y a altération de la fonction des APC. Cette altération aurait un impact indirect sur la production d'IL-17 et d'IL-22, deux cytokines importantes dans la réponse immunitaire contre les pathogènes. Nous avons vu que non seulement la fumée de cigarette altère la maturation et la fonction des DC, mais elle induit la production des cytokines régulatrices (IL-19, IL-20 et IL-24) qui elles-mêmes inhibent la fonction des DC. Cela suggère que la fumée de cigarette peut inhiber directement la fonction des DC ou via l'induction d'une immunosuppression. Nous avons observé un effet bénéfique du ciblage des cytokines IL-20 contre l'infection, suggérant que cette approche pourra avoir des intérêts thérapeutiques. Au vu de l'amélioration de la clairance bactérienne par la flagelline, cette approche pourra également être considérée dans un contexte thérapeutique contre l'exacerbation de la BPCO. Ce travail a été principalement focalisé sur l'exacerbation de la BPCO par *Streptococcus pneumoniae*. Des tendances similaires ont été observées avec NTHi montrant un effet inhibiteur des cytokines IL-20 sur les MDDC. Il serait donc intéressant d'approfondir ces travaux dans le contexte de l'exacerbation de la BCPO par d'autres pathogènes bactériens, viraux ou fongiques.

**Mots-clés :** Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), Exacerbation, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* non typable, Flagelline, Cytokines IL-20, IL-17/22

**Cellular and molecular mechanisms of susceptibility to infections during chronic obstructive pulmonary disease (COPD)****Abstract**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by exacerbation episodes responsible of worsening the course of the disease. To date, there is no efficient therapy against these exacerbations, as patients mainly follow life management in order to limit risk factors. As the frequency of exacerbation increases with COPD severity and become life-threatening, it seems mandatory to develop new therapies to prevent these exacerbations. In our research team, a defect of IL-17 and IL-22 production (essential for lung anti-bacterial immune responses) has been reported during COPD. Because the production of these two cytokines is initiated by antigen presenting cells (APC), our working hypothesis was that the function of APC is altered during COPD exacerbation, so they are not potent to initiate IL-17 and IL-22 production.

In this PhD work, we have used *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo* approaches in order to decipher the modulation of APC function in COPD. We first confirmed that, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from COPD patients show a defective IL-17 and IL-22 production upon *S pneumoniae* infection. Then we analyzed the function of APC from a mouse experimental model of COPD exacerbation. We have found a lower capacity of COPD mice to induce these Th17 cytokines, associated to a lower production of polarizing cytokines. We confirmed these findings by working on human monocyte derived DC (MDDC) *in vitro*; showing that cigarette smoke extract (CSE) also inhibits MDDC maturation and capacity to polarize T cell upon infection. In order to highlight the mechanisms involved in this process, we focused on some IL-10 family cytokines (IL-19, IL-20 and IL-24) that could modulate Th17 response. For that, MDDC were treated with (IL-19, IL-20 and IL-24) *in vitro* and show inhibitory effect on MDDC maturation as well as their T cell polarization. Targeting these three cytokines with neutralizing antibodies prevents their effect. In addition, treating COPD mice with this neutralizing antibody improves bacterial clearance indicating a potential role of these cytokines. Finally, we managed to restore the IL-17 and IL-22 response by using flagellin, a TLR5 agonist, in order to prevent COPD exacerbation. Our data show a better control of infection following flagellin treatment, which promotes IL-22 production and antimicrobial peptides (S100A8 and S100A9).

## Abstract

Altogether, our data confirmed that APC functional alteration is involved in the defect of IL-17 and IL-22 production during COPD exacerbation. We found that cigarette smoke can directly alter APC function, or indirectly through induction of immunomodulatory cytokines such as IL-19 IL-20 and IL-24. According to the results from targeting these cytokines with neutralizing antibodies, we suggest that these neutralizing antibodies could be consider in a therapeutic approach against COPD exacerbation by *S. pneumoniae*. In addition, a therapeutic use of flagellin can be proposed as this TLR5 agonist promotes antibacterial responses. Because this work was mainly focused on *Streptococcus pneumoniae*, which is not the sole pathogen associated to COPD exacerbation, it will be important to scale these findings to other pathogen involved in COPD exacerbation, including other bacteria, viruses and fungi. In line with this suggestion, we found similar tendancies with NTHi showing an inhibitory effect of IL-20 cytokines on MDDC.

**Keywords:** Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), Exacerbation, *Streptococcus pneumoniae*, non typable *Hemophilus influenza*, Flagellin, IL-20 cytokines, IL-17/22

**Table des matières**

Remerciements .....	I
Communications et productions scientifiques.....	II
Résumé .....	IV
Abstract .....	VI
Table des matières .....	VIII
Liste des abréviations .....	XII
Liste des figures et tableaux .....	XIV
I. INTRODUCTION.....	16
1. La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) .....	1
1.1. Qu'est-ce que la bronchopneumopathie chronique obstructive ? .....	1
1.2. Diagnostic et classification de la sévérité de la BPCO .....	1
1.3. Etiologie .....	2
1.4. Physiopathologie de la BPCO.....	3
2. Exacerbations .....	4
2.1. Facteurs responsables de l'exacerbation .....	5
2.2. Conséquences des exacerbations sur l'évolution de la BPCO.....	8
2.3. Les approches thérapeutiques .....	9
3. Cellules présentatrices d'antigène (APC) .....	10
3.1. Les cellules dendritiques.....	11
3.2. Les Macrophages .....	22
3.3. Les monocytes inflammatoires .....	25
3.4. Les Lymphocytes B .....	25
4. La réponse IL-17 / IL-22.....	26
4.1. Les cytokines IL-17 et IL-22 : Familles et récepteurs .....	26

## Table des matières

4.2.	Sources et cibles des cytokines IL-17 et IL-22 .....	27
4.3.	Fonctions délétères des cytokines IL-17 et IL-22 .....	28
4.4.	Fonctions bénéfiques des cytokines IL-17 et IL-22 .....	29
4.5.	La réponse IL-17 / IL-22 dans la BPCO et son exacerbation .....	30
5.	Les cytokines régulatrices de la famille de l'IL-10 et régulation de la réponse IL-17 / IL-22 : Les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 .....	32
5.1.	Sources et cibles cellulaires .....	34
5.2.	Fonctions des cytokines IL-20 : à l'homeostasie et dans les pathologies .....	35
6.	Approche thérapeutique: Ciblage des APC par la Flagelline et réponse IL-17 / IL-22 .....	38
6.1.	Le flagelle et la flagelline .....	39
6.2.	Signalisation de la flagelline par TLR5 et NLRC4 .....	40
6.3.	Fonctions adjuvantes et immuno-modulatrices de la Flagelline .....	41
II.	OBJECTIFS .....	2
7.	Objectif 1 : Comprendre les mécanismes cellulaires responsables du défaut de production d'IL17 et d'IL-22 au cours de l'infection chez les souris BPCO .....	44
8.	Objectif 2 : Evaluer le rôle des cytokines immuno-régulatrices de la famille IL-20 (IL-19, IL-20, IL-24) sur la susceptibilité à l'infection. ....	44
9.	Objectif 3 : Etudier une approche de restauration de la réponse Th17 chez les souris BPCO infectées et limitation du développement de l'exacerbation .....	45
III.	MATERIELS & METHODES .....	46
10.	Modèles murins d'exacerbation de la BPCO par Sp et NTHi .....	46
11.	Récupération et préparation des échantillons murins .....	46
12.	Préparation des bactéries .....	47
13.	Culture cellulaire <i>Ex vivo</i> .....	47
14.	Purification des monocytes et lymphocytes humains, différenciation des monocytes en DC48	
15.	Préparation de l'extrait de fumée de cigarette (CSE) .....	48
16.	Stimulation et infection des DC, coculture avec les lymphocytes T autologues .....	49

## Table des matières

17.	Cytométrie en flux .....	50
18.	Dosage ELISA .....	51
19.	Extraction d'ARN.....	52
20.	Reverse transcription et PCR quantitative (RT-qPCR) .....	52
IV.	RESULTATS .....	54
21.	Objectif 1 : Les mécanismes cellulaires responsables du défaut de production d'IL17 et d'IL-22 au cours de l'infection chez les souris BPCO. ....	53
21.1.	Le défaut de réponse IL-17 et IL-22, et de la clairance bactérienne au cours de la BPCO impliquent une altération de la fonction des macrophages et des DC. ....	53
21.2.	L'exposition à la fumée de cigarette altère la maturation et la fonction DC <i>in vitro</i> 55	55
22.	Objectif 2 : Evaluer le rôle des cytokines immuno-régulatrices de la famille IL-20 (IL-19, IL-20, IL-24) sur la susceptibilité à l'infection. ....	57
22.1.	Contexte .....	57
22.2.	L'exposition chronique à la fumée de cigarette et l'infection bactérienne sont associées à une surexpression des cytokines IL-20.....	58
22.3.	Les anticorps neutralisants les cytokines IL-20 améliorent la réponse à <i>S. pneumoniae</i> et le score de la pathologie.....	59
22.4.	Les anticorps neutralisants les cytokines IL-20 limite le recrutement de cellules inflammatoires dans les poumons et les lavages bronchoalvéolaires. ....	62
22.5.	Les MDDC sont des sources et des cibles potentielles des cytokines IL-20 .....	64
22.6.	Impact des cytokines IL-20 sur la maturation et la fonction des MDDC .....	66
22.7.	Le ciblage des cytokines IL-20 améliore partiellement la fonction des MDDC traitées avec les cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) .....	67
22.8.	Importance de la voie STAT3 dans la signalisation des cytokines IL-20 au cours de l'infection .....	70
23.	Objectif 3 : Etudier une approche de restauration de la réponse Th17 chez les souris BPCO infectées et limitation du développement de l'exacerbation .....	72

## Table des matières

23.1.	La flagelline, agoniste TLR5, prévient l'exacerbation de la BPCO induite par <i>S. pneumoniae</i> chez la souris.....	72
V.	DISCUSSION & PERSPECTIVES .....	74
24.	Altération des APC par la fumée de cigarette.....	75
25.	Mécanismes de modulation de la fonction des DC, rôle des cytokines IL-20.....	77
26.	Approche thérapeutique par ciblage des cytokines IL-20.....	78
27.	Approche thérapeutique par utilisation d'immunostimulants.....	79
28.	Autres approches thérapeutiques .....	80
VI.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	84
VII.	ANNEXES .....	103
29.	Annexe n°1 .....	103
30.	Annexe n°2 .....	135
31.	Annexe n°3 .....	169

### Liste des abréviations

<b>APC :</b>	Cellules présentatrices d'antigène
<b>ARN :</b>	Acide rybonucléique
<b>BPCO :</b>	Bronchopneumopathie chronique obstructive
<b>CCL2 :</b>	chemokine (C-C motif) ligand 2
<b>CD :</b>	Cluster de différenciation
<b>CFU :</b>	Colony forming unit
<b>ChoP :</b>	choline binding protéines
<b>CMH :</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CMN :</b>	Cellules mononucléées
<b>CSE :</b>	Extrait de fumée de cigarettes
<b>CV :</b>	capacité vitale
<b>CXCL8/IL-8 :</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand
<b>DC :</b>	Cellules dendritiques
<b>DMSO :</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>EFS :</b>	Etablissement français du sang
<b>ELISA :</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>GAPDH:</b>	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<b>GM-CSF :</b>	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
<b>GOLD</b>	Global Initiative for Obstructive Lung Disease
<b>i.p./ i.n. :</b>	Intrapéritonéal / intranasal
<b>IFN<math>\gamma</math> :</b>	Interferon gamma
<b>Ig :</b>	immunoglobuline
<b>IL :</b>	Interleukine
<b>IPAF :</b>	ICE-Protease Activating Factor
<b>LOS :</b>	Lipooligosaccharides
<b>LPS :</b>	Lipopolysaccharide
<b>LytA :</b>	Autolysin A
<b>MMP12 :</b>	Matrix metalloproteinase-12
<b>mMRC :</b>	modified British Medical Research Concil
<b>MOI :</b>	Multiplicity of Infection
<b>NF-<math>\kappa</math>B :</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NTHi :</b>	Non-typable <i>Haemophilus influenza</i>

## Liste des abréviations

<b>OapA</b> :	Opacity-associated protein A
<b>PAFR</b> :	Platelet activating factor receptor
<b>PBS</b> :	Phosphate buffered saline
<b>PFA</b> :	Paraformaldéhyde
<b>PI3</b> :	peptidase inhibitor 3 ou Elafin
<b>PMA</b> :	Phorbol 12-myristate 13-acetate
<b>RSV</b> :	Respiratory Syncytial Virus
<b>RT-qPCR</b> :	Reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction
<b>SLPI</b> :	secretory leukoprotease inhibitor
<b>Sp1</b> :	<i>Streptococcus pneumoniae</i> sérotype 1
<b>SVF</b> :	Sérum de veau fœtal
<b>Th1/Th17</b> :	Type 1 helper T / Type 17 helper T
<b>TIMP</b> :	Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
<b>TLR2</b> :	Toll-like receptor 2
<b>TLR4</b> :	Toll-like receptor 4
<b>TNF<math>\alpha</math></b> :	Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>VEMS</b> :	Volume Expiratoire Maximal par Seconde

### Liste des figures et tableaux

#### Liste des figures

- Figure 1 :** Mécanismes physiopathologiques du développement de la BPCO.
- Figure 2 :** Facteur de virulence *Streptococcus pneumoniae*.
- Figure 3 :** Facteur de virulence de NTHi et voies de signalisation impliquées dans la réponse inflammatoire.
- Figure 4 :** Les facteurs connus ou susceptibles d'être responsables de l'exacerbation de la BPCO.
- Figure 5 :** Cycle hypothétique d'infection et d'inflammation au cours de la BPCO
- Figure 6 :** Ontologie des cellules dendritiques chez l'homme et la souris.
- Figure 7 :** Les principales sous-populations de cellules dendritiques humaines et murines.
- Figure 8 :** Les molécules de costimulation des DC et leurs ligands sur les lymphocytes T.
- Figure 9 :** Régulation l'immunité innée et adaptative par les DC.
- Figure 10 :** Rôle des DC dans la physiopathologie et la régulation de la réponse anti-infectieuse au cours de la BPCO.
- Figure 11 :** Les principales sources cellulaires d'IL-17 IL-22.
- Figure 12 :** Rôle de la réponse IL-17, IL-22 dans la défense antimicrobienne au niveau des muqueuses.
- Figure 13 :** Mécanismes de l'altération de la réponse IL-17 et la clairance bactérienne par les cytokines IL-20.
- Figure 14 :** Les récepteurs des cytokines IL-20R et leur voie de signalisation.
- Figure 15 :** Structure de la flagelline montrant les domaines d'interaction avec TLR5 et NLRC4.
- Figure 16 :** Activation de la signalisation TLR5 et NLRC4 par la flagelline.
- Figure 17 :** Répartition des lobes de poumon des souris.
- Figure 18 :** Schéma expérimental in vitro sur les MDDC humaines.
- Figure 19 :** Les cytokines IL20 sont surexprimées dans le modèle murin d'exacerbation de la BPCO.
- Figure 20 :** Le ciblage des cytokines IL-20 par des anticorps neutralisant limite l'infection bactérienne et l'inflammation associée.
- Figure 21 :** Le traitement par les anticorps neutralisants anti-IL-20RB permet un meilleur contrôle de l'influx des cellules inflammatoires dans le poumon.
- Figure 22 :** Les cytokines IL-20 et leurs récepteurs sont exprimés par les MDDC.

## Liste des Figures et Tableaux

**Figure 23 :** Les cytokines IL-20 inhibent la réponse des MDDC aux bactéries.

**Figure 24 :** Le ciblage des cytokines IL-20 par l'anti-IL-20RB lève partiellement leur effet inhibiteur en réponse à *S. pneumoniae*

**Figure 25 :** Le ciblage des chaînes de récepteur IL-20 avec par interférence d'ARN bloque l'effet des cytokines IL-20 en réponse à NTHi.

**Figure 26 :** L'inhibition de STAT3 lève partiellement l'effet des cytokines IL-20, mais inhibe également la maturation de MDDC.

### Liste des tableaux

**Tableau 1 :** *Classification GOLD.*

**Tableau 2 :** *Gènes candidats associés au développement de la BPCO.*

**Tableau 3 :** *Les sources et les cibles cellulaires des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24.*

**Tableau 4 :** *Liste des anticorps murin et fluorochromes utilisés pour la cytométrie en flux.*

**Tableau 5 :** *Liste des anticorps humains et fluorochromes utilisés pour la cytométrie en flux.*

**Tableau 6 :** *Séquences des amorces Sens et Anti-Sens utilisées en qPCR.*

**Tableau 7 :** *Les cytokines IL20 sont surexprimées dans le modèle murin d'exacerbation de la BPCO.*

# **I. INTRODUCTION**



### 1. La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

#### 1.1. Qu'est-ce que la bronchopneumopathie chronique obstructive ?

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires. Elle est caractérisée par une réduction progressive et persistante du flux respiratoire qui, contrairement à l'asthme, n'est pas totalement réversible. Ayant causé plus de 3 millions de décès dans le monde en 2015, la BPCO est en phase d'être la 4<sup>ème</sup> cause de mortalité derrière les cardiopathies ischémiques, les accidents vasculaires cérébraux et les infections respiratoires. La BPCO est également un facteur de comorbidité dans toutes ces pathologies, ainsi que le cancer du poumon qui est la 5<sup>ème</sup> cause de mortalité dans le monde (OMS, 2017). En France, la BPCO touche 3,5 millions des personnes, soit 7,5% de la population adulte, sachant que plus de 2/3 des cas ne sont pas diagnostiqués. La BPCO est donc incontestablement un problème majeur de santé publique d'autant plus qu'il n'existe aucun traitement curatif à ce jour.

#### 1.2. Diagnostic et classification de la sévérité de la BPCO

Le diagnostic de la BPCO requière une spirométrie mesurant le Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) qui est rapporté à la capacité vitale (CV). Un rapport VEMS/CV inférieur à 70% est indicateur d'une gêne respiratoire. La présence de facteurs de risque (dont le tabagisme) et des manifestations cliniques (toux et expectorations chroniques, dyspnée consécutive aux activités physiques) permet de confirmer le diagnostic.

Il existe plusieurs méthodes d'évaluation du niveau de sévérité de la BPCO. La classification la plus utilisée dans les publications scientifiques est celle de l'initiative mondiale pour la BPCO, ou GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease). Elle classe la BPCO en quatre niveaux (**Tableau 1**) selon la sévérité de la gêne de l'écoulement de l'air, après bronchodilatation. Bien que simple à mettre en œuvre dans les études cliniques, cette méthode doit être complétée par des évaluations symptomatologiques, en raison de sa faible corrélation avec celle-ci (GOLD rapport 2017, Han et al., 2013). Pour cela, les méthodes mMRC (modified British Medical Research Council), CAT (COPD Assessment Test) et SGRQ (Saint Georges Respiratory Questionnaire) permettent d'évaluer les symptômes (la toux, l'expectoration, l'essoufflement) et la qualité de vie du patient (qualité du sommeil, confort dans la réalisation des tâches quotidiennes).

**Tableau 1 :** *Classification GOLD*

Sévérité de la gêne à l'écoulement de l'air dans la BPCO (VEMS après bronchodilatation)		
GOLD 1	Légère	VEMS $\geq$ 80% de la valeur théorique
GOLD 2	Modérée	50% $\leq$ VEMS < 80% de la valeur théorique
GOLD 3	Sévère	30% $\leq$ VEMS < 50% de la valeur théorique
GOLD 4	Très sévère	VEMS < 30% de la valeur théorique

(GOLD, guide de poche pour le diagnostic, le traitement et la prévention, Rapport 2017)

### 1.3. Etiologie

Le développement de la BPCO est consécutif à l'exposition chronique aux polluants environnementaux. Ainsi, l'exposition chronique (active ou passive) à la fumée de cigarette reste le principal facteur étiologique (plus de 80% des cas) (Brashier and Kodgule, 2012). Cependant, tous les fumeurs ne développent pas la pathologie tandis qu'environ 20% des patients BPCO sont non-fumeurs, suggérant l'existence d'autres facteurs de susceptibilité. Parmi ces facteurs, une composante génétique est possible comme un déficit en  $\alpha$ 1-antitrypsine, une anti protéase permettant d'inhiber l'action de l'élastase des neutrophiles dans le poumon, qui a été identifiée comme responsable du développement et de l'exacerbation de la BPCO (Sandford et al., 1997; Silverman and Sandhaus, 2009). La survenue d'affections respiratoires dans l'enfance, une anomalie du développement pulmonaire et une senescence accélérée sont également mis en question. Par ailleurs, d'autres candidats génétiques (**Tableau 2**) dont la dérégulation pourrait augmenter la susceptibilité au développement de la BPCO ont été identifiés. Parmi ces gènes, on note des protéases (MMP9, MMP12) et des facteurs fibrosants (TGF $\beta$ ) pouvant intervenir dans le remodelage du tissu pulmonaire. Quant aux gènes impliqués dans la régulation du stress oxydatif comme la GST, la Vitamin D binding Protein (GC) et la cytokine inflammatoire TNF $\alpha$ , leur dérégulation pourrait favoriser l'inflammation et les dommages pulmonaires (Brashier and Kodgule, 2012; Morrow et al., 2017).

**Tableau 2 :** *Gènes candidats associés au développement de la BPCO*

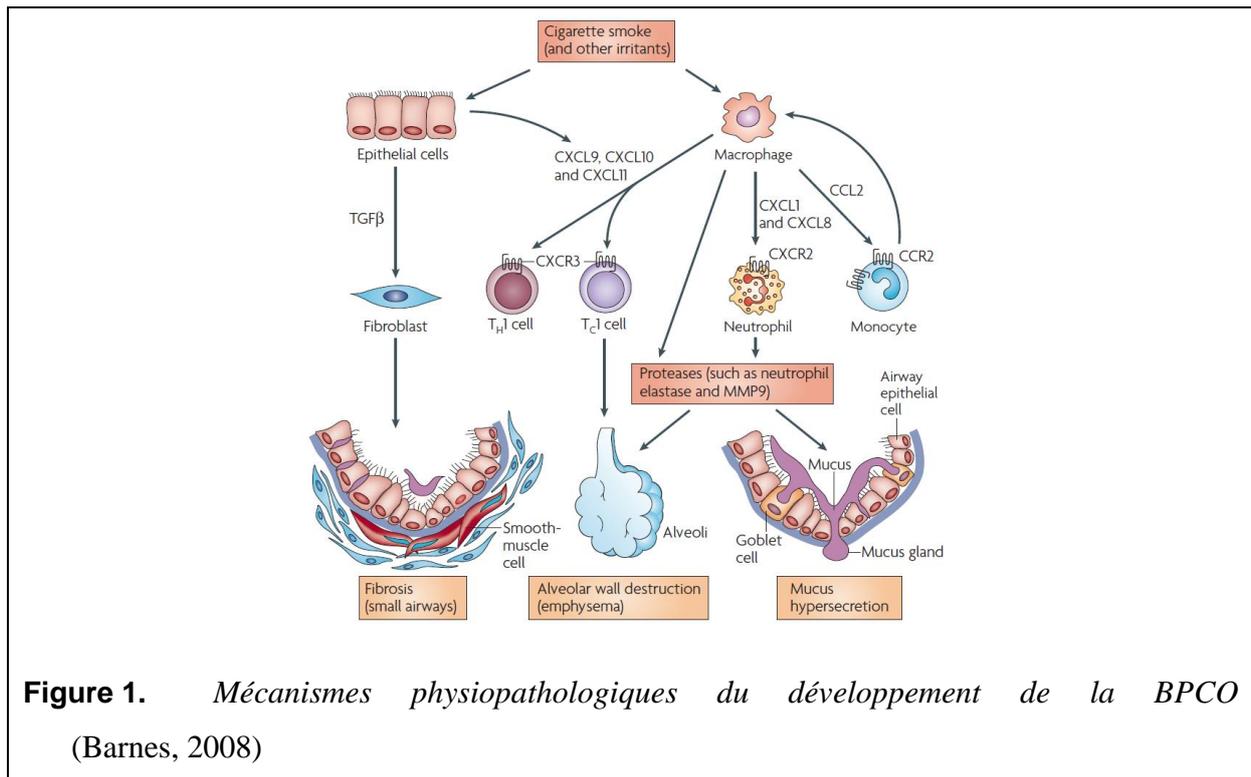
Gene	Protéine
SERPINA1	Alpha antitripsine 1
EPHX1	Microsomal epoxide hydrolase gene
GST P1	Glutathione S-transferase P1
MMP12	Matrix metalloproteinase 12
MMP9	Matrix metalloproteinase 9
TGFB1	Transforming growth factor B1
SERPINE 2	Serine protease inhibitor
CHRNA3/5	$\alpha$ -nicotinic acetylcholine receptor
HHIP	hedgehog interacting protein
BICD1	Bicaudal D Homologu 1
FAM13A	GTPase activator
HMOX1	heme oxygenase 1
Vitamin D binding protein (GC)	
ADRB2	B2-Adrenergic receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TGFB3	Transforming growth factor B3
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TGFB3	Transforming growth factor B3

#### 1.4. Physiopathologie de la BPCO

L'exposition chronique aux particules, aux gaz toxiques ou encore à la fumée de cigarette induit une réponse inflammatoire chronique des voies respiratoires. Au fil du temps, cela entraîne la mise en place des trois principaux phénomènes physiopathologiques observés chez les patients BPCO : (1) la bronchite chronique, (2) l'obstruction des voies aériennes inférieures et (3) l'emphysème pulmonaire. En effet, les particules toxiques de l'air et la fumée de cigarette vont induire la production de médiateurs pro-inflammatoires dont TNF $\alpha$ , CXCL8, leucotriène B4 et CCL2 (**Figure 1**). Ces médiateurs contribuent au recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire inné (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques (DC)) et adaptatif (lymphocytes B, T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, et T régulateurs). Cette inflammation est associée à l'hypersécrétion de mucus et à un défaut de clairance muco-ciliaire. Ces événements sont responsables de l'inflammation chronique, la toux et la production d'expectoration qui caractérisent la bronchite chronique. Ce processus est également associé à un remodelage tissulaire bronchique via la production de TGF $\beta$  (un facteur fibrosant) par les cellules épithéliales, se traduisant par l'hyperplasie du muscle lisse et

## Introduction

la métaplasie épithéliale avec augmentation de la fréquence des cellules mucipares, qui vont concourir à l'obstruction des voies aériennes inférieures. Au niveau alvéolaire, un déséquilibre de l'activité des protéases (telles que l'élastase des neutrophiles et la MMP12) et de l'activité des anti-protéases (dont PI3 (peptidase inhibitor 3), SLPI (secretory leukoprotease inhibitor) et les TIMP (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases)), va conduire à la destruction progressive des parois alvéolaires et à l'emphysème (Barnes, 1998, 2008; Hogg and Timens, 2009; Molfino and Jeffery, 2007).



**Figure 1.** Mécanismes physiopathologiques du développement de la BPCO (Barnes, 2008)

## 2. Exacerbations

Les exacerbations de la BPCO correspondent à des épisodes aigus d'aggravation des symptômes de la pathologie, entraînant une modification de la prise en charge médicale (bronchodilatateurs, antibiotiques, anti-inflammatoires, oxygénation assistée,...) conduisant parfois à une hospitalisation. Ces exacerbations marquent l'évolution de la pathologie et son entrée dans un cercle vicieux très délétère. En effet, elles accélèrent la progression de la pathologie et peuvent provoquer le décès du patient à court ou moyen terme. Ainsi, l'espérance de survie des patients BPCO ayant présenté une première exacerbation sévère est inférieure à 50% après 4 ans. Les facteurs responsables de l'exacerbation de la BPCO sont multiples. Les plus couramment rapportés sont les infections bactériennes et virales, et moins fréquemment, les polluants ou un stress.

### 2.1. Facteurs responsables de l'exacerbation

#### 2.1.1. Les bactéries

Les bactéries sont associées à l'exacerbation de la BPCO dans 25 à 50% des cas (Rosell et al., 2005). Les bactéries les plus fréquemment identifiées comme responsables de ces exacerbations regroupent *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* Non typable et *Moraxella catarrhalis*. De manière beaucoup moins fréquente, des bactéries non courantes telles que *Chlamydia pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae* sont associées à ces épisodes d'exacerbation. Selon les études et les sites géographiques d'inclusion des patients, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae* et des Entérobacteriaceae peuvent aussi être responsable d'exacerbation de la BPCO (Beaty et al., 1991; Boixeda et al., 2015; Lieberman et al., 2002; Su et al., 2015). La fréquence des pathogène varie en fonction des études. Selon les travaux de Boixeda *et al.* 2015 réalisé sur des expectorations de patients BPCO, ils identifient *Pseudomonas aeruginosa* chez 30,7% des patients ayant une culture positive pour des microorganismes potentiellement pathogènes. Cette fréquence était de 26,1% pour *Streptococcus pneumoniae*, 20,4% pour les Entérobacteriaceae, 15,9% pour *Haemophilus influenzae* et seulement 6,8% pour *Mycoplasma pneumoniae*. Quant à Soler *et al.* 1997, ils ont trouvé 33% d'*Haemophilus influenzae*, 27%, de *Pseudomonas spp.*, 12% regroupaient *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, les entérobacilles Gram-négatifs aérobiques et 9% étaient *Stenotrophomonas maltophilia*.

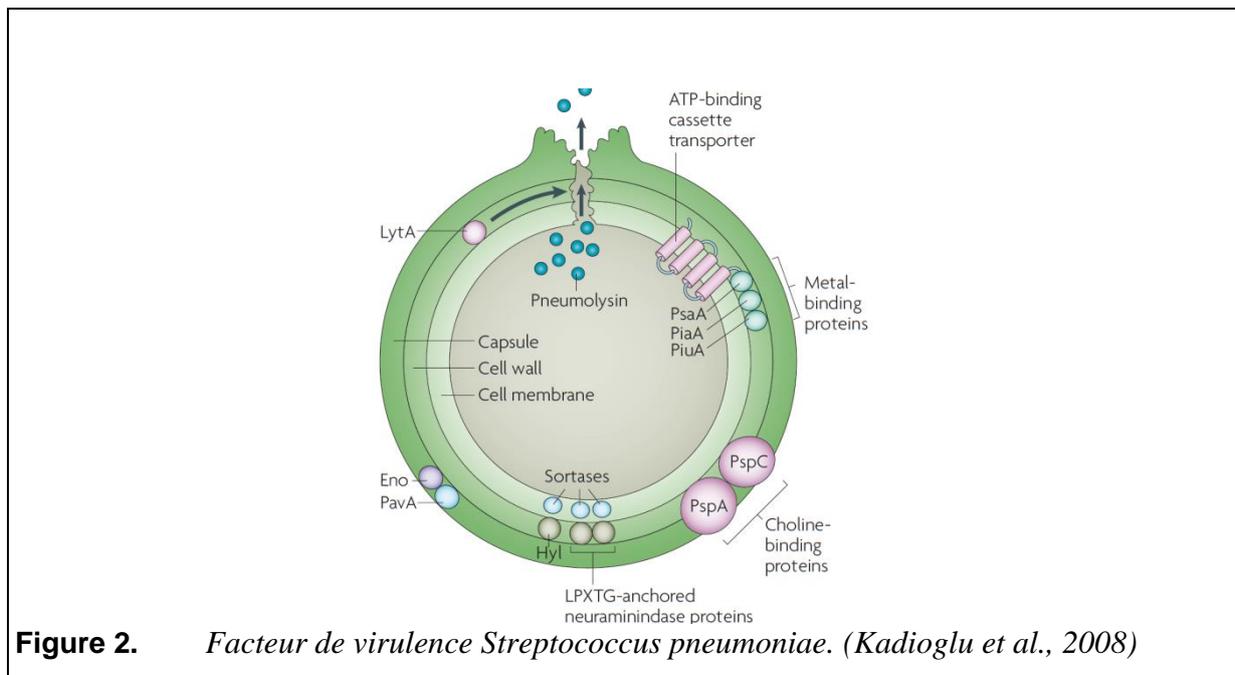
Dans ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur les deux bactéries *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae* ou *Sp*) et *Haemophilus influenzae* Non typable (NTHi).

***Streptococcus pneumoniae*** : Encore appeler pneumocoque, c'est une bactérie encapsulée, Gram positive, regroupant plus de 90 sérotypes sur la base du polysaccharide capsulaire. Elle est fréquemment isolée des voies respiratoires supérieures des sujets sains. Cependant, chez les personnes immunodéprimées, les enfants et les personnes âgées, le pneumocoque demeure un véritable problème de santé publique, particulièrement dans les pays en voie de développement. Dans ces cas, le pneumocoque est responsable de pathologies invasives dont la pneumonie, de sepsis et de méningites. *S. pneumoniae* dispose de plusieurs facteurs de virulence dont la bactérie se sert pour coloniser, échapper au système de défense et causer la pathologie (**Figure 2**). La capsule a longtemps été considérée comme le principal facteur de virulence. Cependant, de plus en plus d'études montrent l'intérêt d'autres facteurs

## Introduction

de virulence dont les ChoP (choline binding protéines), LytA (autolysin A, permettant la libération de la pneumolysine), les protéines d'ancrage, la ou les neuraminidases, qui interviennent dans l'adhésion, la colonisation des voies respiratoires en se liant aux cellules épithéliales, l'échappement à l'action des immunoglobulines et du système des compléments ou encore le passage de la barrière hématoencéphalique par transcytose (Kadioglu et al., 2008; Ricci et al., 2013).

Il n'existe pas aujourd'hui de vaccin efficace sur l'ensemble des sérotypes de Sp. Actuellement deux types de vaccin sont disponibles sur le marché, et couvrent jusqu'à 90% des souches pathogéniques courantes. L'un est basé sur les polysaccharides de la capsule, contient des polysaccharides spécifiques de 23 sérotypes. Le second vaccin combine des épitopes protéiques aux polysaccharides et est dirigé contre 13 sérotypes (CDC, 2016a; OMS, 2015; Sundberg-Kövamees et al., 2016; Vandecasteele et al., 2017).

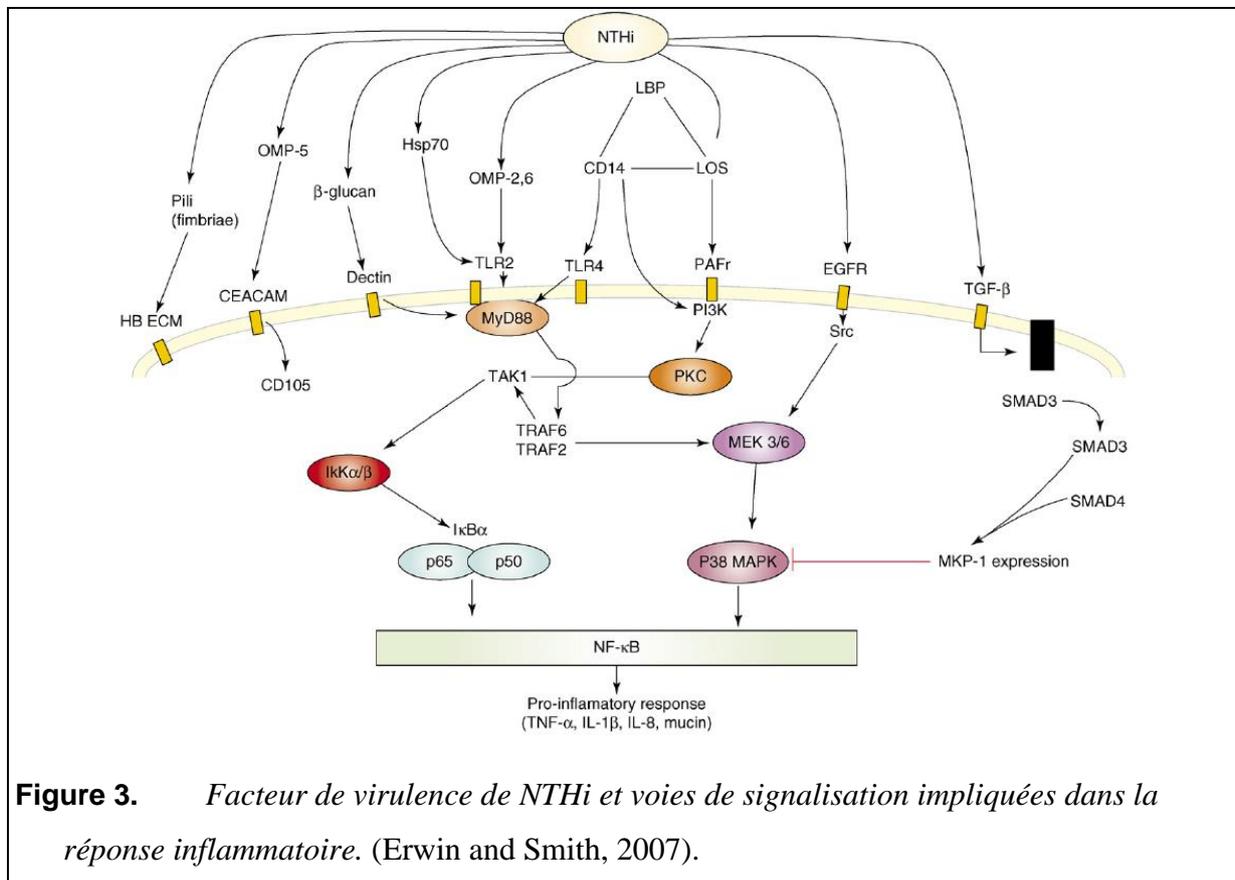


***Haemophilus influenzae* Non typable (NTHi)** : c'est une bactérie Gram négative, la seule non capsulée parmi les 7 sérotypes connus d'*Haemophilus influenzae*. Comme le pneumocoque, elle colonise fréquemment les voies nasopharyngées de sujets sains. Les personnes immunodéprimées restent les plus à risque, sont susceptibles de présenter des infections se traduisant par une pneumonie (souvent avec sepsis), une sinusite ou encore une otite moyenne. Le principal facteur de virulence de cette bactérie est sans doute sa protéase sécrétoire anti-IgA qui empêche son opsonisation par ces immunoglobulines et ainsi facilite la colonisation des voies respiratoires. Les fimbriae (pili), les Lipooligosaccharides (LOS)

## Introduction

membranaires, et l'OapA (Opacity-associated protein A) sont également des facteurs de virulence impliqués dans la colonisation des voies respiratoires, l'induction de réponses inflammatoires (ligands de TLR2, TLR4 et du récepteur pour le PAF (PAFR)) (**Figure 3**) et la translocation dans d'autres tissus (Behrouzi et al., 2017; CDC, 2016b; Erwin and Smith, 2007; Langereis and de Jonge, 2015). En effet, le recrutement de cellules inflammatoires associé à un défaut de clairance peut servir de niche pour la croissance et l'invasion bactérienne.

Le seul vaccin développé en 1990 est dirigé uniquement contre contre *Haemophilus influenzae* sérotype b (Hib). Actuellement, il n'existe aucun vaccin contre NTHi même si certains laboratoires en développent actuellement.



**Figure 3.** Facteur de virulence de NTHi et voies de signalisation impliquées dans la réponse inflammatoire. (Erwin and Smith, 2007).

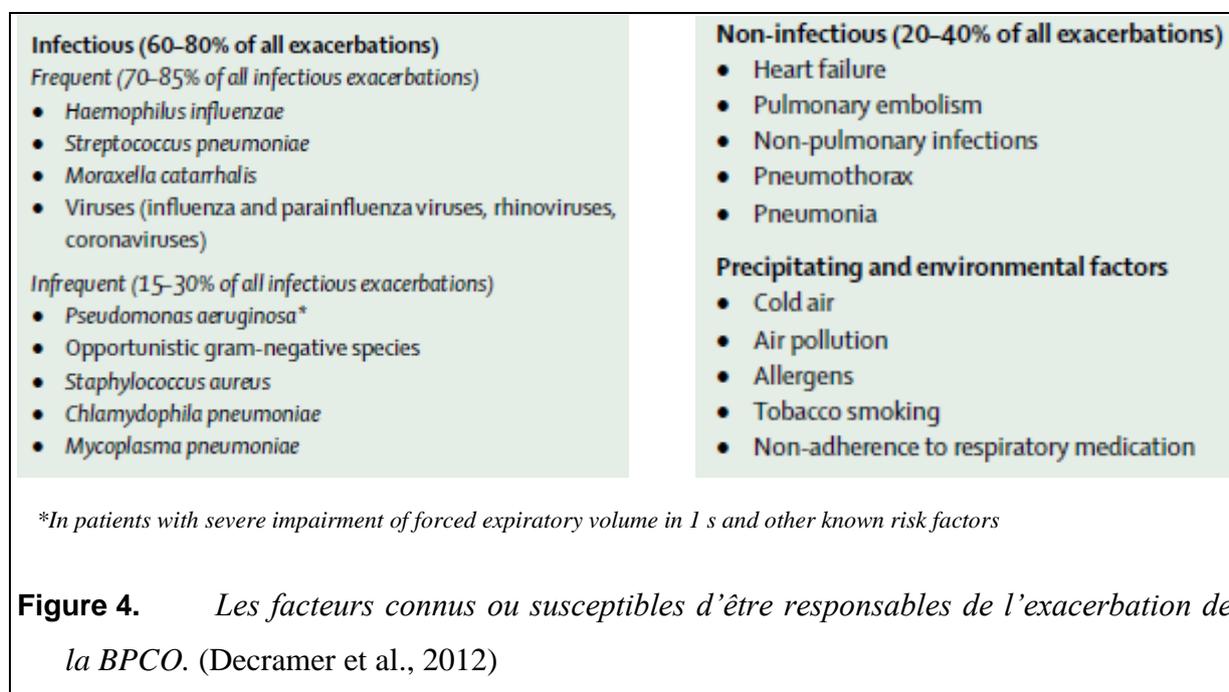
### 2.1.2. Infections virales, fongiques et autres facteurs

Les infections virales sont également fréquentes chez les sujets BPCO en raison de leur susceptibilité accrue aux infections. Souvent en coexistant avec les bactéries, les virus tels que le rhinovirus, le virus respiratoire syncytial (RSV) ou encore le virus influenza de la grippe peuvent être à l'origine de l'exacerbation de BPCO. La fréquence de détection des

virus chez des patients en cours d'exacerbation varie de 22% à 64% (Hewitt et al., 2016; Hutchinson et al., 2007; Tan et al., 2003; Yin et al., 2017).

Bien que rarement associés à l'exacerbation de la BPCO, les champignons, en particulier *Aspergillus fumigatus* peuvent coloniser les voies respiratoires des patients présentant une altération du système immunitaire. La corticothérapie qui est recommandée dans la prise en charge de l'exacerbation de la BPCO est associée à une augmentation de risque d'infection fongique. Par ailleurs, Su *et al.* montrent par étude génomique, la présence de *Candida*, *Phialosimplex*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* et *Eutypella* dans les expectorations des patients. Ils observent la présence d'*Aspergillus* de façon consistante chez la majorité des patients (Kiser et al., 2014; Su et al., 2015).

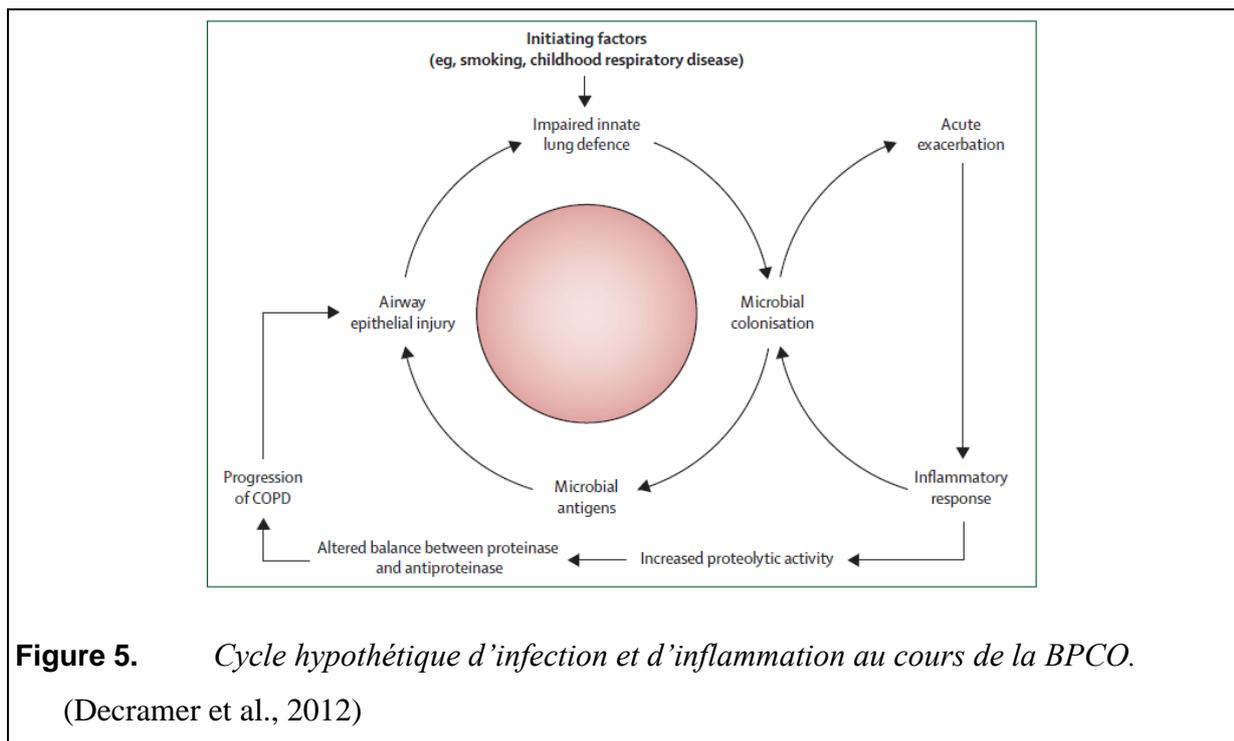
Etant donné que l'exacerbation consiste à une aggravation des symptômes de la pathologie, Decramer *et al.* suggèrent un rôle potentiel des polluants (particules et gaz toxiques ou irritants), des variations de température et les facteurs de comorbidité (attaque cardiaque, pneumonie, embolie pulmonaire, allergie...) dans l'exacerbation de la BPCO. Le **figure 4** donne une liste quasi-exhaustive de l'ensemble des facteurs connus ou potentiellement responsables de l'exacerbation de la BPCO.



### 2.2. Conséquences des exacerbations sur l'évolution de la BPCO

Les modifications tissulaires et immunitaires qui caractérisent la BPCO rendent les patients plus susceptibles aux infections et favorisent le développement des exacerbations. En effet, il est rapporté dans plusieurs études que la fumée de cigarette (ainsi que certaines

pathologies respiratoires au cours de l'enfance) altèrent le système immunitaire pulmonaire (Bai et al., 2017; Decramer et al., 2012; Qiu et al., 2017), notamment les jonctions serrées des cellules épithéliales, les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques (DC) qui sont les premières lignes de défense et essentiels pour l'initiation de l'immunité adaptative (Lugade et al., 2014; Pavord et al., 2016). Chez les patients BPCO, cette altération de l'immunité pulmonaire favorise la colonisation microbienne. L'exacerbation aiguë et la réaction inflammatoire associée vont favoriser la colonisation par d'autres microorganismes pathogènes ou opportunistes. Chaque exacerbation entraîne une amplification de l'inflammation pulmonaire mais aussi systémique et l'aggravation des caractéristiques physiopathologiques (**figure 5**). De ce fait, les épisodes d'exacerbation deviennent de plus en plus fréquents dans le temps au fur et à mesure que la BPCO devient de plus en plus sévère. Ces données expliquent la réduction de la survie sur 5 ans d'environ 80% (contre 20% de diminution chez les témoins BPCO sans exacerbation) observées chez les patients atteignant 2 exacerbations par an (Soler-Cataluña et al., 2005).



**Figure 5.** Cycle hypothétique d'infection et d'inflammation au cours de la BPCO.  
(Decramer et al., 2012)

### 2.3. Les approches thérapeutiques

A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif contre la BPCO, l'arrêt du tabac ou l'éviction des facteurs aggravants constituent les premières mesures en cas de diagnostic positif. Quant aux exacerbations, la prise en charge se fait principalement par utilisation de bronchodilatateurs avec ou sans anticholinergique, avec oxygénothérapie pour les BPCO très

sévères (GOLD 4). Les antibiotiques sont utilisés de manière systématique dans le cas d'exacerbations sévères. La prise en charge de la BPCO vise principalement à stopper sa progression et les exacerbations. Dans ce cadre, la haute autorité de santé (HAS) de France propose dans son guide de parcours de soins BPCO, une vaccination systématique anti-grippale tous les ans et pour les patients présentant des insuffisances respiratoires, une vaccination anti-pneumococcique tous les 5 ans (GOLD, 2017; HAS, 2014).

Malgré les recherches thérapeutiques sur l'exacerbation de la BPCO, les résultats restent peu concluants en terme d'efficacité (Hewitt et al., 2016). En effet, la corticothérapie proposée dans la prise en charge de la BPCO afin de réduire l'inflammation (une composante de l'exacerbation), est à forte dose, associée à une augmentation du risque de colonisation fongique ou bactérienne (Kiser et al., 2014).

Au vu des limites des vaccins anti-grippaux et pneumococciques, et de la susceptibilité accrue des patients BPCO aux infections, il demeure indispensable de mieux comprendre les mécanismes responsables de cette susceptibilité aux infections. Cela permettrait d'élaborer de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ce contexte, des travaux antérieurs du laboratoire menés sur des modèles murins d'exacerbation de la BPCO (*in vivo*) et sur des cellules humaines (*in vitro*) ont montré que la fumée de cigarette altère la fonction des cellules présentatrices d'antigène (APC) et leur capacité à induire la production d'IL-17 et d'IL-22 par les lymphocytes T conventionnels et non-conventionnels.

### 3. Cellules présentatrices d'antigène (APC)

Les cellules présentatrices d'antigène (APC) sont des cellules sentinelles de l'organisme qui vont détecter des signaux de danger ou pathogènes au contact de l'organisme. Pour cela, elles tapissent l'ensemble des muqueuses de l'organisme et elles ont pour la plupart d'entre elles, la capacité de circuler vers les organes lymphoïdes et entre ces différents sites. De plus, elles sont capables de capturer des antigènes, de les apprêter afin de les présenter à leur surface sur les molécules de CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II. On distingue deux catégories d'APC. Celles dites non-professionnelles, comprenant la plupart des cellules nucléées qui sont capable de présenter des antigènes endogènes sur les molécules de CMH de classe I et ainsi activer les lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Ce processus intervient notamment dans l'élimination des cellules endommagées lors de remaniements tissulaires ou infectées par des pathogènes intracellulaires. Les APC professionnelles quant à elles sont des phagocytes capables à la fois de présenter des molécules endogènes sur le CMH

de classe I et de présenter des antigènes d'origine exogène sur la molécule de CMH de classe II. Les APC professionnelles regroupent les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques (DC). Elles sont essentielles à l'initiation de l'immunité adaptative par activation et polarisation des lymphocytes T naïfs.

Dans le cadre de nos travaux de recherche, un focus particulier sera fait sur les DC qui ont été utilisées comme modèle expérimental *in vitro*.

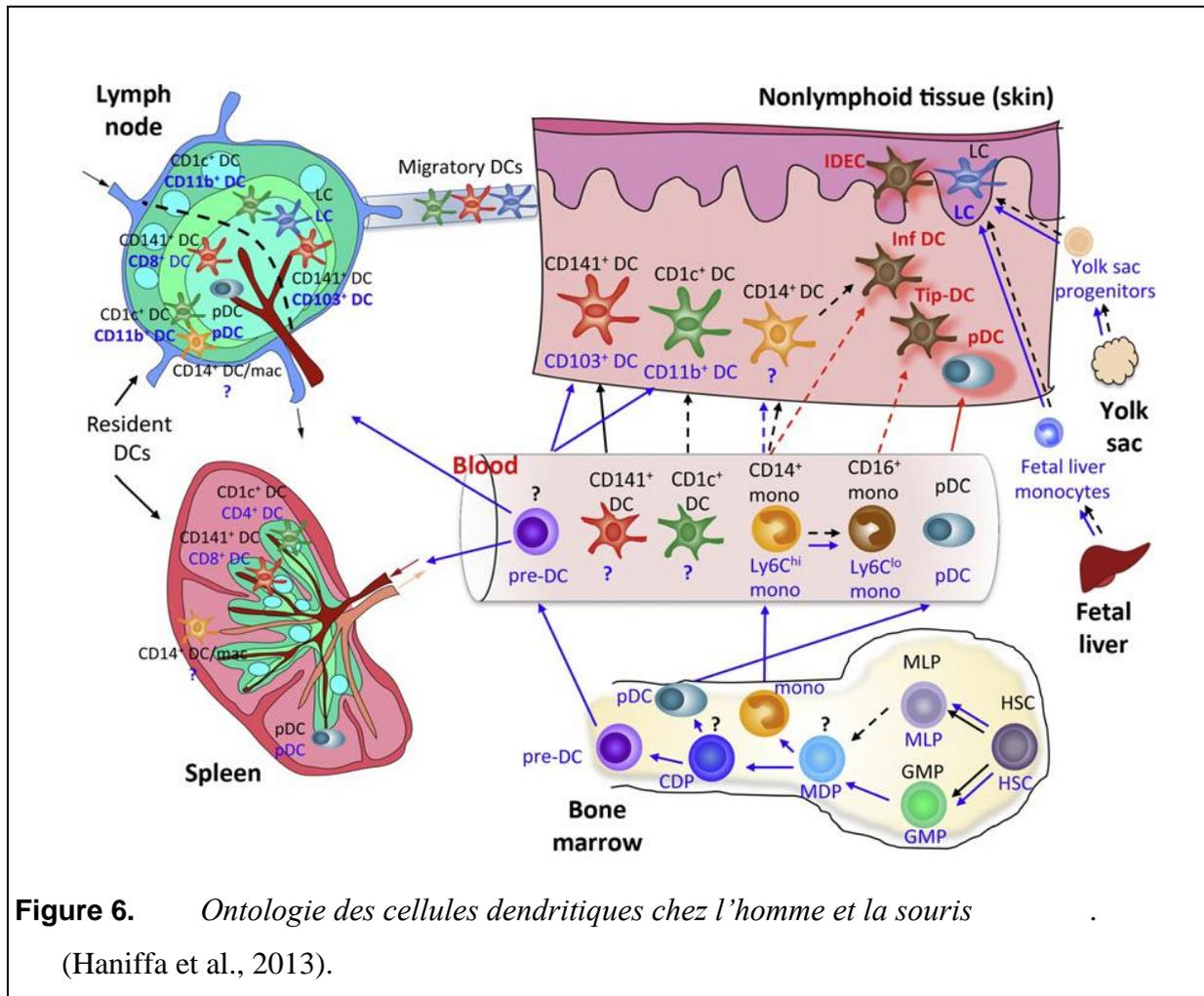
### 3.1. Les cellules dendritiques

#### 3.1.1. Les cellules dendritiques chez l'homme

Découvertes dans les années 70 par Ralph Steinman, les cellules dendritiques (DC) sont des cellules phagocytaires professionnelles ayant la particularité de présenter des antigènes exogènes à la fois associés aux molécules de CMH-II ou de CMH-I (présentation croisée). Il existe une grande diversité de DC toutes issues des mêmes progéniteurs hématopoïétiques, hormis les cellules de Langerhans (LC) qui peuvent se différencier à partir du vitellus ou des monocytes hépatiques dès la phase embryonnaire (Haniffa et al., 2013; Hoeffel et al., 2012). La **figure 6** décrit l'état des connaissances sur l'ontologie des différentes populations de DC, obtenues à partir des études réalisées chez la souris et les patients présentant des déficiences génétiques. Brièvement, dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) se différencient en précurseurs lymphoïdes MLP (mixed lymphoid progenitors) et myéloïdes GMP (Granulocyte Macrophage Progenitors) puis en précurseur des macrophages et des DC (MDP). Les monocytes issus des MDP migrent dans le sang puis vers les organes périphériques pour s'y différencier en DC présentant des profils inflammatoires. Les MDP peuvent se différencier en progéniteurs communs des DC (CDP) qui selon le contexte, vont évoluer en DC plasmacytoïdes ou en pré-DC qui achèveront leur maturation dans les tissus périphériques lymphoïdes et non lymphoïdes (Haniffa et al., 2013). Des études suggèrent que les facteurs de transcription Ikaros, PU.1, Gfi1, Id2 sont impliqués dans la différenciation des DC. La déficience de ces gènes est associée à une altération de l'hématopoïèse (Collin et al., 2013). *In vitro*, le GM-CSF, l'IL-4 et le Flt3-ligand permettent de différencier les DC à partir de progéniteurs de moelle osseuse ou de monocytes CD14<sup>+</sup> humains.

Les DC sont retrouvées dans quasiment tous les tissus. Selon leur localisation, fonction et origine, les DC sont subdivisées en plusieurs sous-populations. Chez l'homme, on distingue trois grandes sous populations qui sont les DC plasmacytoïdes (pDC), et les deux

types de DC conventionnelles (cDC) ; les cDC CD1c<sup>+</sup> et les cDC CD141<sup>+</sup> retrouvées dans le sang périphérique, la peau, les poumons et des tissus lymphoïdes. On a également des DC spécifiques de certains types tissulaire (cellules de Langerhans dans le tissu cutané, les microglies au niveau cérébral) et des DC potentiellement d'origine monocyttaire ou inflammatoire (DC CD14<sup>+</sup>, DC inflammatoire, et DC SLAN).



**Les DC plasmacytoïdes :** Contrairement aux cDC, les pDC sont dépourvues ou expriment faiblement des marqueurs myéloïdes CD11c, CD11b, CD13 et CD33. Par contre, elles expriment le CD123 (IL-3R), CD303, CD304, et sont moins fréquemment retrouvées dans les tissus à l'homéostasie. Lors d'une réponse inflammatoire, ces cellules sont fortement recrutées. Les pDC sont spécialisées dans la réponse antivirale par expression d'interférons de type 1. Elles expriment les TLR7 et TLR9 permettant de lier les acides nucléiques viraux ou de l'hôte endommagé et ainsi activer les cellules effectrices cytotoxiques. Elles peuvent aussi avoir un rôle de cellule régulatrice comme cela a été démontré dans le cadre de la réponse allergique pulmonaire (de Heer et al., 2004).

## Introduction

**Les DC conventionnelles :** Les cDC CD1c<sup>+</sup> et les cDC CD141<sup>+</sup> (ou encore cDC2) sont caractérisées par l'expression de marqueurs myéloïdes. Les cDC CD1c<sup>+</sup> sont les sous-populations de DC majoritaires dans la circulation sanguine (1% des cellules mononucléées). Elles expriment le CD1a comme les cellules de Langerhans. La présence d'une large gamme de TLR (TLR1 à 8) et d'autres PRR (Pattern Recognition Receptor) à leur surface laisse suggérer qu'elles sont aptes à reconnaître et/ou de présenter des motifs antigéniques dont le poly (IC), les lipopolysaccharides, la flagelline et R848 ou des glycoprotéines. Les cDC CD1c<sup>+</sup> ont un fort potentiel d'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, mais en comparaison aux cDC CD141<sup>+</sup>, elles ont une capacité d'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> plus faible. La fréquence des cDC CD141<sup>+</sup> est très faible dans la circulation (environ 0,1% des cellules mononucléées), cependant elles sont essentielles dans la présentation croisée d'antigènes et l'induction d'une réponse mémoire lymphocytaire CD8<sup>+</sup>. Les DC dérivées de monocytes (MDDC) *in vitro* sont également capables de présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Collin et al., 2013; Haniffa et al., 2013; Ruben et al., 2015).

**Les DC inflammatoires :** Caractérisées par la production de médiateurs inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 et IL-23), les DC inflammatoires peuvent être dérivées *in vitro* à partir de monocytes CD14<sup>+</sup> en présence du cocktail GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) et de l'IL-4. *In vivo*, des cellules phénotypiquement semblables aux DC inflammatoires sont retrouvées dans les exsudats inflammatoires. Elles expriment les marqueurs CD11c, CD1c (BDCA3), CD1a, CD206, Fc $\epsilon$ R1, SIRP $\alpha$  et sont dépourvues de CD16 et CD14. Les DC inflammatoires sont capables de stimuler les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et de présenter via le CMH I des antigènes aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

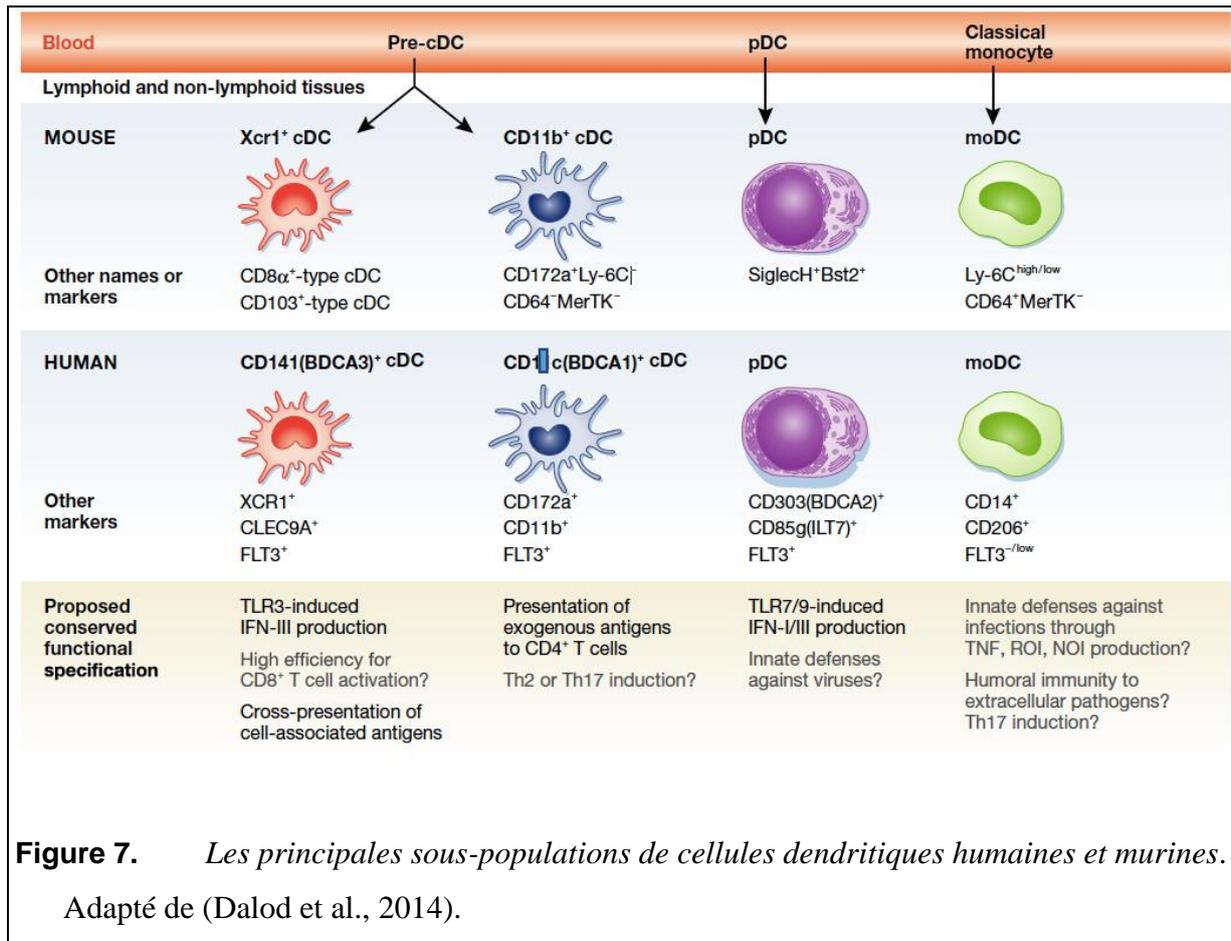
**Autres sous-populations de DC :** Parmi celles-ci, les cellules de Langerhans (LC), premières DC décrites chez l'homme, sont localisées au niveau cutané et des épithélia stratifiés desquamants. Elles présentent des caractéristiques proches des cDC CD1c<sup>+</sup> mais se distinguent par l'expression de CD207 (Langerin), de CD1a et EpCAM. Ce phénotype leur permet de s'associer et d'interagir très étroitement avec les épithélia. On a également les microglies qui sont des cellules phagocytaires localisées au niveau cérébral, souvent considérées comme des sous-populations de macrophages. Les DC CD14<sup>+</sup> sont des sous-populations de DC localisées au niveau cutané caractérisées par l'absence des marqueurs CD1c et CD141 des cDC. Ces DC présentent le potentiel de migration vers les organes lymphoïdes. Ces DC CD14<sup>+</sup> expriment à la fois des marqueurs de DC (CD209, DC-SIGN) et des marqueurs de macrophages (FXIIA, CD163). Cela rend leur identification plus difficile,

d'autant plus qu'elles peuvent acquérir le CD141 sans pour autant avoir les propriétés de cross présentation des cDC CD141<sup>+</sup>.

En raison des difficultés d'accès aux tissus humains, la plupart des études de caractérisation des DC a été menée chez la souris et rapportée aux études chez l'homme par analogie. Par conséquent, il reste des points de confusion sur les DC humaines, notamment concernant leur ontologie.

### 3.1.2. Les cellules dendritiques chez la souris

Chez les souris, on retrouve les équivalents des sous-populations de DC humaines. Les pDC murines peuvent être identifiées par la présence de SiglecH et de Bst2. Comme leurs homologues humaines, les pDC murines expriment les TLR7/9 leur permettant de reconnaître des antigènes viraux et de produire les interférons de types 1, suggérant ainsi leur rôle potentiel dans la réponse antivirale. Elles dérivent directement des progéniteurs pré-DC au niveau de la moelle osseuse et migrent dans les organes lymphoïdes secondaires. Leur infiltration dans les tissus non lymphoïdes s'opère principalement lors des réactions inflammatoires. Les cDC CD1c<sup>+</sup> et CD141<sup>+</sup> humaines correspondent aux cDC CD11b<sup>+</sup> et cDC Xcr1<sup>+</sup> (CD8a<sup>+</sup> ou CD103<sup>+</sup>) respectivement. Leur différenciation s'achève au niveau des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes à partir de pré-DC. Les DC inflammatoires d'origine monocyttaire dérivent des monocytes Ly6C<sup>+</sup> et correspondent aux DC CD14<sup>+</sup> humaines (Dalod et al., 2014; Guilliams et al., 2014; Mildner and Jung, 2014). Les cellules de Langerhans sont également présentes chez la souris, avec des spécialisations fonctionnelles similaires à celles retrouvées chez l'homme. En dehors de ces grandes sous-populations de DC, d'autres DC ont été décrites chez la souris. Les L-DC se distinguent des cDC par leur fort potentiel de présentation croisée, leur inaptitude à activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et l'absence d'expression des marqueurs classiques CD11b et CD8a (Contreras et al., 2010; Griffiths et al., 2013). Les Tip-DC présentes dans la rate et l'épiderme sont caractérisées par leur production de TNF $\alpha$  et d'iNOS, ces cellules exprimant particulièrement de la glycoprotéine MAC3. Les principales sous-populations de DC humaines et leurs équivalents murins sont résumés dans la **figure 7**.



### 3.1.3. Fonctions des cellules dendritiques

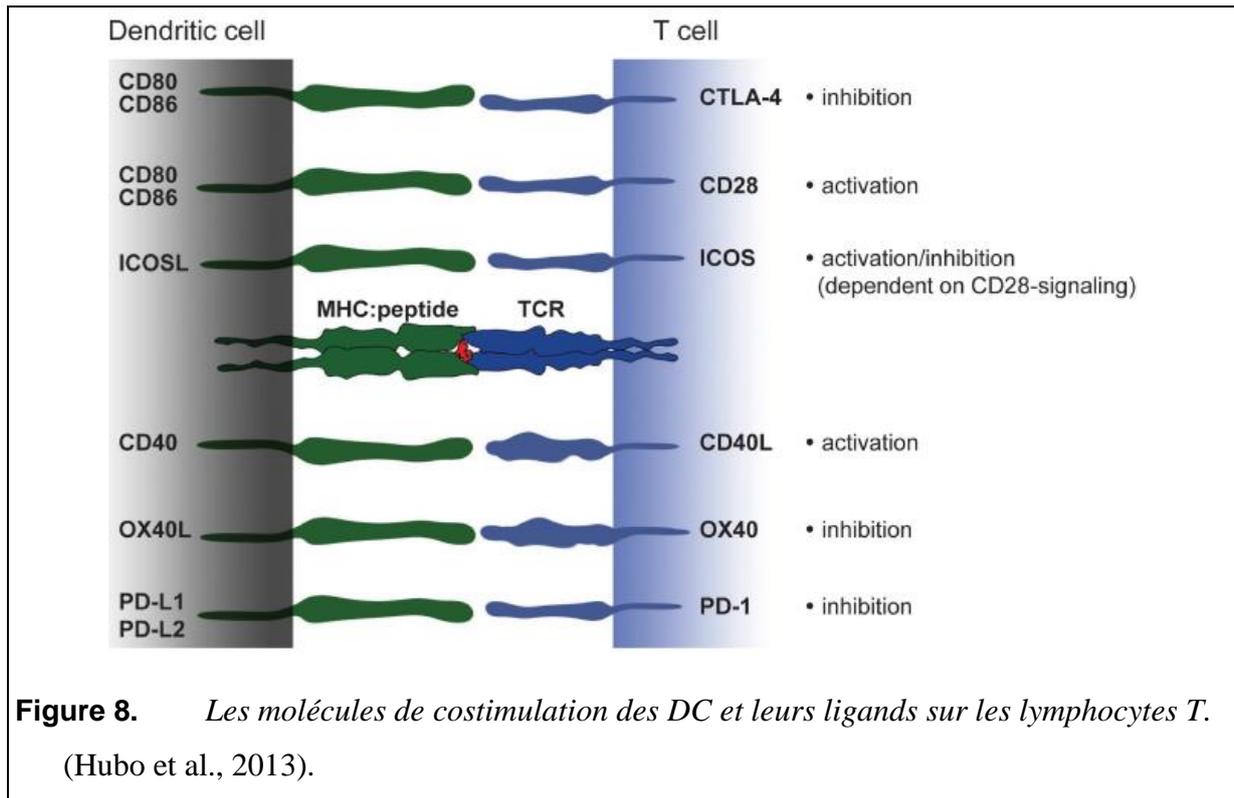
Sachant que la majorité des études de caractérisation des DC ont été réalisées chez la souris en raison des contraintes d'accès aux tissus humains, nous allons présenter les données actuellement disponibles sur les DC murines (*in vivo*) et issues des études *in vitro* sans nécessairement faire les comparaisons avec les équivalents chez l'homme.

Des DC immatures sont généralement observées au niveau périphérique et de manière transitoire. Lorsqu'elles entrent en contact avec des antigènes, il s'opère un ensemble de changements au niveau des DC qui deviennent matures. Ces changements permettent aux DC de préserver les antigènes capturés, de migrer au niveau des organes lymphoïdes et de délivrer les trois types de signaux nécessaires à une présentation d'antigène efficace, à savoir la présentation de l'antigène sur la molécule de CMH (signal 1), l'expression des molécules de costimulation (signal 2) et la production de cytokines polarisantes (signal 3). La capture d'antigènes par les DC se traduit par une diminution de la phagocytose et une surexpression du CMH et des molécules de costimulation (**Figure 8**). Les DC surexpriment également le récepteur de chimiokines CCR7 permettant leur migration vers les organes lymphoïdes guidée par un gradient de chimiokines (telles que CCL19 et CCL21). Leur maturation s'achève dans

les organes lymphoïdes où elles produisent divers cytokines et médiateurs permettant d'orienter la réponse immunitaire, vers une réponse tolérogène ou immunogène.

### Fonction d'immunotolérance :

A l'homéostasie, les DC assurent une fonction de régulation du système immunitaire qui se traduit principalement par l'induction d'une tolérance immunitaire. Cette fonction des DC est particulièrement importante au niveau du thymus où elle permet d'éviter la génération de cellules T autoréactives, et des muqueuses en limitant la survenue de réactions anaphylactiques ou l'élimination des microorganismes commensaux. Des DC apparentées aux cDC et pDC sont retrouvées au niveau du thymus (Klein et al., 2014; Oh and Shin, 2015) où elles participent activement à la sélection clonale lymphocytaire, avec les cellules épithéliales corticales et médullaires du thymus (cTEC et mTEC). En effet, les DC thymiques sont capables de capturer des autoantigènes provenant des mTEC, qu'elles expriment en surface sous le contrôle de AIRE (Auto-immune régulation) ou provenant du sang périphérique. Ces antigènes sont alors présentés aux lymphocytes T en cours de développement de manière dépendante du CMH de classe II. La possibilité que les DC capturent des antigènes du Soi dans les tissus non lymphoïdes pour ensuite migrer dans le thymus a été également démontré par le fait que des DC présentant des antigènes du Soi exclusivement exprimés dans les tissus cardiaques et cutanés sont retrouvées dans le thymus. La présentation de ces autoantigènes par les DC permet d'éliminer les clones de lymphocytes T fortement autoréactifs par apoptose et de sélectionner les clones non autoréactifs. La présentation des autoantigènes sur le CMH de classe I permet de sélectionner les clones de lymphocytes T exprimant le CD8 tandis que le CMH de classe II permet de sélectionner celles exprimant le CD4. Au niveau des muqueuses intestinales et pulmonaires, les DC émettent des prolongements cytoplasmiques pour sonder les antigènes dans la lumière et initier une réaction tolérogène ou immunogène. Bien que la fonction tolérogénique des DC soit généralement associée à leur faible niveau de maturation, certaines molécules de costimulation délivrent des signaux inhibiteurs tolérogènes aux lymphocytes T lors de la présentation d'antigènes (Hubo et al., 2013) (**Figure 8**). Les molécules de costimulation OX40L et le couple PD-L1/PD-L2 induisent un signal de tolérance lorsqu'elles se lient à leur partenaire à la surface des lymphocytes T. Par ailleurs l'interaction du couple CD86/CD80 avec CTLA-4 ou de ICOS-L avec ICOS (en présence d'une faible signalisation du CD28) induisent des signaux de tolérance. L'IL-10 et le TGF $\beta$  inhibent l'activation des lymphocytes T et selon le microenvironnement, peuvent orienter la fonction des DC vers une réponse tolérogène.



### Fonction immunogène :

#### Immunité innée :

L'induction d'une réponse immunogène par les DC est conditionnée par leur statut de maturation. Les DC présentent la particularité d'initier à la fois la réponse immunitaire innée et adaptative. Une fois leur maturation achevée, les DC expriment les molécules de costimulation et produisent des cytokines pro-inflammatoires qui permettent d'activer les cellules de l'immunité innée. Contrairement aux macrophages, la principale fonction des DC n'est pas de phagocyter et d'éliminer les antigènes notamment lors des infections, mais plutôt de promouvoir la réponse immunitaire vis-à-vis de l'agression et de définir son orientation. En effet, comme montré sur la **figure 9** qui résume les mécanismes par lesquels les DC régulent la réponse immunitaire, les DC matures produisent de l'IL-12 et l'IL-18 qui sont nécessaires à l'activation des cellules Natural Killer (NK) (Walzer et al., 2005). *In vitro* les DC dérivées de moelle osseuse secrètent également l'IL-15 qui active les NK. L'activation des cellules NK exprimant des TCR semi-invariants (iNKT) par les DC met en œuvre, en plus de l'IL-12, la molécule de CD1d une molécule apparentée au CMHI, spécialisée dans la présentation d'antigènes glycolipidiques exogènes et les molécules de costimulation (principalement le CD40 et CD86/CD80) (Keller et al., 2017). L'IL-1 $\beta$  produite par les DC est susceptible d'activer différentes sous-populations lymphocytaires et notamment, les

lymphocytes  $T\gamma\delta$  et les cellules NKT. En contexte infectieux, l'activation des lymphocytes  $T\gamma\delta$  par l'IL-1 $\beta$  induit la production d'IL-17 et joue un rôle important dans l'élimination de *Staphylococcus aureus* (Myles et al., 2013) ou du pneumocoque (C. Paget, données du labo). Les DC sont également capable d'activer les cellules lymphoïdes innées dont les ILC3 productrices d'IL-22. Ce mécanisme est impliqué dans la réponse contre *Streptococcus pneumoniae* au niveau pulmonaire (Van Maele et al., 2014) et au cours d'autres infections intestinales.

### **Immunité adaptative :**

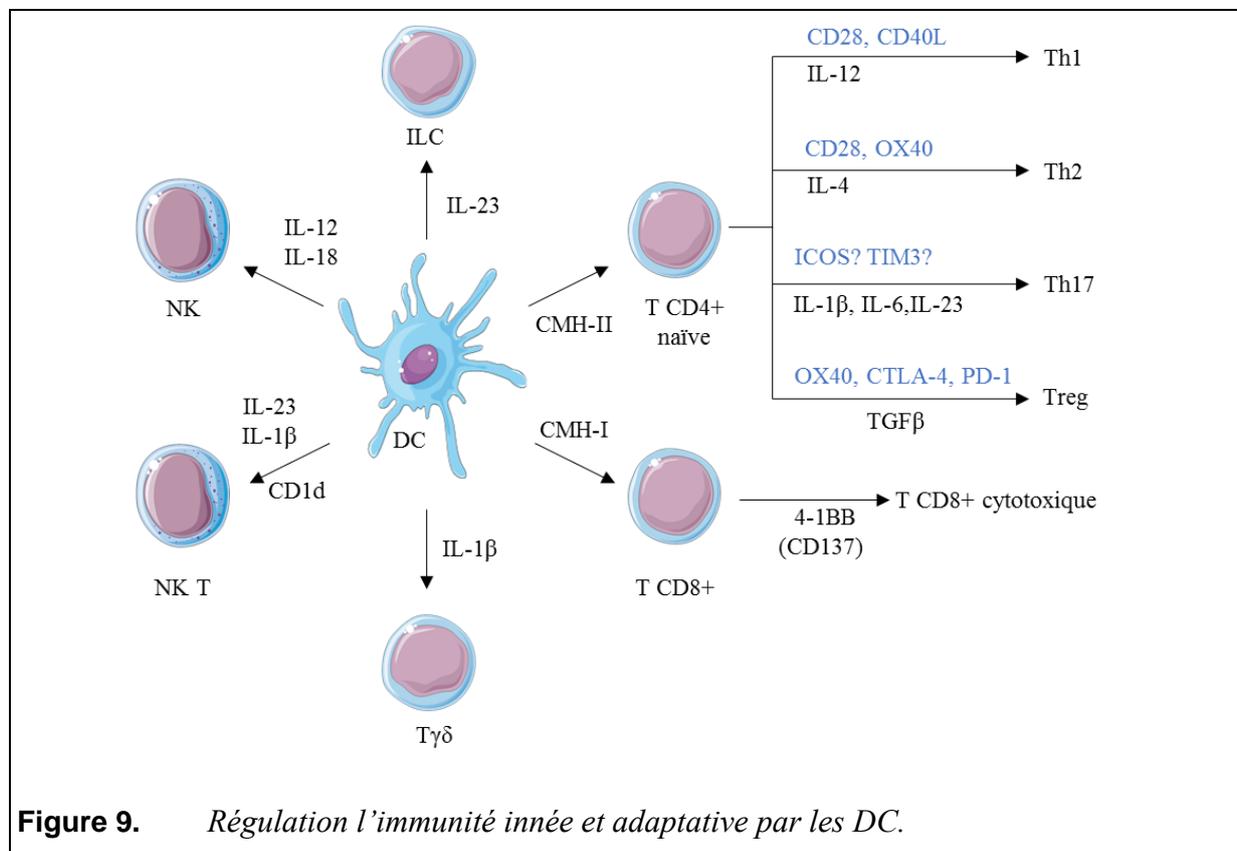
Le développement de la réponse immune adaptative par les DC repose à la fois sur la molécule de CMH (CMH de classe I ou II) sur laquelle l'antigène est présenté, les molécules de costimulation associées à cette présentation et surtout l'environnement cytokinique. L'assemblage des fragments d'antigène (épitopes) sur le CMH de classe I ou II s'effectue dans des compartiments cellulaires différents. Les antigènes endogènes sont associés au CMH de classe I au niveau des réticulum endoplasmique alors que pour le CMH de classe II, cet assemblage s'opère dans les phagolysosomes (Haniffa et al., 2013).

Les DC se distinguent des autres APC par leur capacité à réaliser une présentation croisée d'antigène exogène sur le CMH de classe I même si ces cellules, comme la plupart des cellules sont capables de dégrader les protéines endogènes présentant des anomalies au niveau des protéasomes. Généralement, les antigènes issus des cellules apoptotiques, nécrotiques ou des pathogènes sont internalisés par phagocytose ou macropinocytose, et transférés dans le cytosol (P2C, phagosomes to cytosol). Les antigènes sont ensuite pris en charge par les protéasomes et associés aux molécules de CMH de classe I par le processus habituel impliquant la machinerie TAP (transporter associated to antigen processing), la calnexin et la tapasin. Le peptide antigénique est ensuite présenté aux lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> (Cruz et al., 2017). Ce mécanisme est particulièrement important dans les réponses antivirales et contre les pathogènes intracellulaires. Les cellules T cytotoxiques activées vont induire la mort des cellules hôtes infectées et ainsi, empêcher la propagation de l'infection. Les ligands des molécules de costimulation tels que OX40 et 4-1BB (CD137) présents à la surface des TCD8<sup>+</sup>, interviennent dans leur activation par OX40L ou le TNF-SF9), respectivement (Bulfone-Paus and Bahri, 2015).

Les antigènes exogènes sont exclus du cytoplasme des DC dans les endosomes. Ils sont dégradés dans l'endosome qui fusionne avec des lysosomes pour être assemblé à la

## Introduction

molécule de CMH de classe II, par un mécanisme dépendant de l'autophagie (Blum et al., 2013; Neefjes et al., 2011). L'interaction entre le CMH de classe II présentant l'antigène et le TCR des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (signal 1) est nécessaire pour leur polarisation en cellules effectrices Th1 (produisant l'IFN- $\gamma$ ), Th2 (produisant l'IL-4 et l'IL-13), Th17 (produisant l'IL-17 et l'IL-22) ou encore Treg (produisant l'IL-10 et TGF $\beta$ ) (Münz et al., 2005). En ce qui concerne les signaux 2 et 3, la polarisation Th1 est contrôlée par la production d'IL-12 lorsqu'un signal 2 activateur est délivré aux T CD4<sup>+</sup> naïves via CD28 ou CD40L. La polarisation Th2 met en jeu l'interaction OX40L-OX40 ou CD86/CD80-CD28 en réponse aux allergènes et à certains parasites. La présence d'IL-4 dans le microenvironnement (potentiellement produite par les ILC2) est déterminante pour favoriser la polarisation Th2 en inhibant la polarisation Th1. L'interaction OX40L/OX40 oriente également la polarisation des Treg, lorsque le TGF $\beta$  est sécrété dans le microenvironnement. La délivrance des signaux tolérogéniques par l'intermédiaire de PD-1 et CTLA-4 a également été rapportée dans la polarisation Treg. Les Th17 jouent un rôle important dans la réponse antimicrobienne. Leur polarisation repose sur la présence dans le microenvironnement de l'IL-23, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, et le TGF $\beta$  également produites par les DC (Segura et al., 2013).



**Figure 9.** Régulation l'immunité innée et adaptative par les DC.

### 3.1.4. Rôle des DC dans la physiopathologie et l'exacerbation de la BPCO

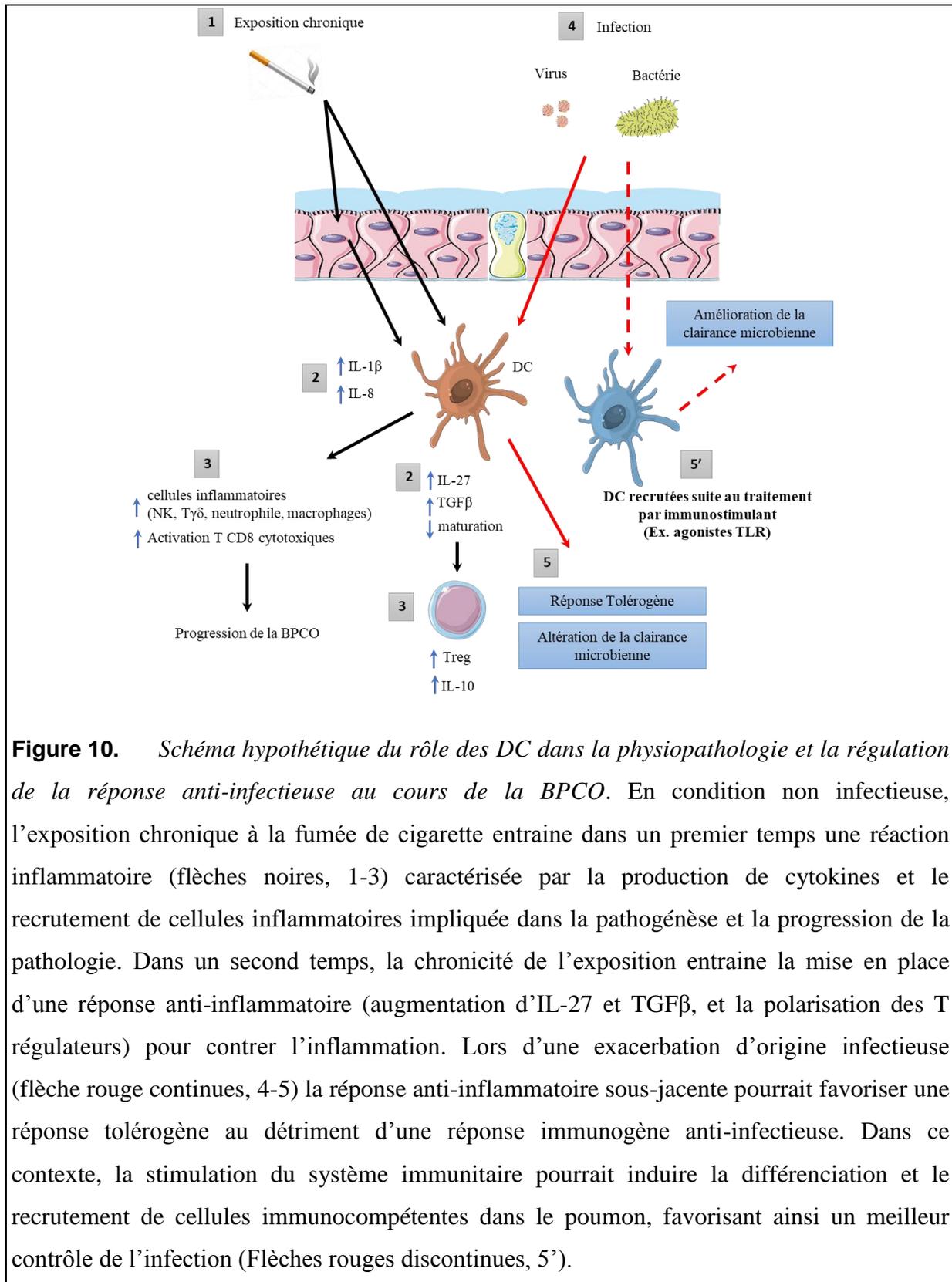
Le rôle central des DC à la fois dans l'immunité innée et adaptative n'a pas laissé les chercheurs indifférents sur leur implication dans la BPCO. En effet, les DC peuvent avoir une fonction bénéfique ou délétère dans la BPCO selon qu'on se situe dans un contexte infectieux ou non (**Figure 10**).

Au cours du développement de la BPCO, l'exposition à la fumée de cigarette entraîne une activation des cellules pulmonaires et immunitaires, y compris les DC. Les cytokines et chimiokines produites par les DC, les macrophages et les cellules épithéliales vont entretenir l'inflammation et le remodelage pulmonaire. Une augmentation du nombre de DC dans le poumon de patients BPCO a été rapportée dans plusieurs études, augmentation corrélée à la sévérité (Boehme et al., 2016; Demedts et al., 2007). Cette accumulation de DC est liée à une surexpression du CCR6, le récepteur du CCL20, chimiokine surexprimée dans le contexte de la BPCO et qui joue un rôle important dans la migration des DC (Demedts et al., 2007). De plus, ces DC sont probablement bloquées dans le poumon du fait de la réduction d'expression du CCR7 sur ces cellules qui contrôle leur déplacement vers les ganglions lymphatiques. Les travaux de Freeman et al. 2009 sur les DC provenant des biopsies pulmonaires des patients BPCO montrent aussi une forte activation des cDC et pDC (CD86, CD80, CD40 et CD83). Le niveau d'expression de CD80 corrèle positivement avec le niveau de sévérité de la BPCO et la surexpression du marqueur d'activation CD69 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Les auteurs concluent sur la polarisation des T CD4<sup>+</sup> vers un phénotype inflammatoire sans avoir exploré la réponse T CD8<sup>+</sup> cytotoxique qui pourrait y jouer un rôle (Freeman et al., 2009). Kuang et ses collaborateurs ont montré en 2016 que les souris déficientes pour la molécule de costimulation CD40 présentaient moins d'emphysème pulmonaire, ce phénomène était associé à un faible pourcentage des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Tc1) dans le poumon (Kuang et al., 2016).

En dépit de leur recrutement et activation accrue au niveau pulmonaire, les DC et les cellules immunitaires chroniquement exposées aux polluants atmosphériques, dont la fumée de cigarette, présentent une réponse immunitaire défectueuse lors d'une infection ultérieure. Nos travaux, ainsi que ceux d'autres chercheurs confirment ces observations. En effet, les DC exposées à la fumée de cigarette montrent une faible maturation lorsqu'elles sont mises en contact avec *Streptococcus pneumoniae* et sont moins efficaces dans la polarisation des cellules T naïves en cellules T effectrices (Le Rouzic et al., 2016; Liao et al., 2015; Noda et al., 2013; Pichavant et al., 2015). Les DC des fumeurs ou des patients BPCO présentent un

faible expression du CCR7 (nécessaire à la migration des DC en cours de maturation vers les organes lymphoïdes) par rapport aux sujets sains non-fumeurs (Liao et al., 2015).

L'altération de la fonction des DC dans la BPCO pourrait s'expliquer par la complexité des mécanismes mis en jeu. Comme décrit dans le chapitre sur la fonction des DC, ces cellules peuvent délivrer un signal immunogénique ou tolérogénique en fonction des molécules de costimulation mises en jeu par les lymphocytes et de leur microenvironnement. Par ailleurs, la chronicité de la réaction inflammatoire pulmonaire pourrait induire un phénomène d'anergie se traduisant soit par l'augmentation des cellules immunosuppressives (T reg, B reg, macrophages interstitiels) et/ou de médiateurs ayant les mêmes propriétés (IL-10, SOCS), soit par manque de réponse des cellules initialement répondeuses (telles que les cellules NKT) aux stimuli. Bien que l'effet inhibiteur de la réponse anti infectieuse ait été beaucoup étudié en contexte BPCO et sur les macrophages, il existe très peu de travaux permettant d'élucider l'implication des DC. Dans ce contexte, Tsoumakidou et al. ont montré en 2014 que les DC CD1c<sup>+</sup> des patients BPCO induisaient la production des cytokines tolérogéniques IL-10 et IL-27. Ces deux cytokines déjà fortement exprimées dans le lavage bronchoalveolaire (LBA) des patients BPCO sont surexprimées lors d'une infection expérimentale au rhinovirus (Tsoumakidou et al., 2014). Contrairement aux DC retrouvées dans les poumons des sujets BPCO, celles fraîchement recrutées dans le poumon suite au traitement par des stimulants exogènes (comme le facteur de croissance Flt3L) permettent de limiter l'inflammation induite par la fumée de cigarette (Givi et al., 2016). Ces DC recrutées ou stimulées avec des immunostimulants *in vitro* pourraient avoir un rôle bénéfique dans la réponse anti-bactérienne puisque en contexte non BPCO, des agonistes de TLR permettent d'améliorer la réponse antimicrobienne (Thomas et al., 2007; Zhang et al., 2014).



**Figure 10.** Schéma hypothétique du rôle des DC dans la physiopathologie et la régulation de la réponse anti-infectieuse au cours de la BPCO. En condition non infectieuse, l'exposition chronique à la fumée de cigarette entraîne dans un premier temps une réaction inflammatoire (flèches noires, 1-3) caractérisée par la production de cytokines et le recrutement de cellules inflammatoires impliquée dans la pathogénèse et la progression de la pathologie. Dans un second temps, la chronicité de l'exposition entraîne la mise en place d'une réponse anti-inflammatoire (augmentation d'IL-27 et TGF $\beta$ , et la polarisation des T régulateurs) pour contrer l'inflammation. Lors d'une exacerbation d'origine infectieuse (flèche rouge continues, 4-5) la réponse anti-inflammatoire sous-jacente pourrait favoriser une réponse tolérogène au détriment d'une réponse immunogène anti-infectieuse. Dans ce contexte, la stimulation du système immunitaire pourrait induire la différenciation et le recrutement de cellules immunocompétentes dans le poumon, favorisant ainsi un meilleur contrôle de l'infection (Flèches rouges discontinues, 5').

### 3.2. Les Macrophages

Comme leur nom l'indique (du grec « gros mangeur », makros = grand, phagein = manger), les macrophages se distinguent par leur grande activité phagocytaire. Ces cellules de

## Introduction

grande taille émettent des excroissances cytoplasmiques pour capturer les particules dangereuses (pathogènes et débris). Les macrophages résidents tissulaires se développent à partir du mésoderme lors du développement embryonnaire, puis s'auto-renouvellent continuellement au cours de la vie. Lors des réactions inflammatoires (physiologiques ou pathologiques), des macrophages peuvent se différencier à partir des monocytes recrutés dans les tissus. Ces macrophages dérivés des monocytes (Ly6C<sup>+</sup> chez la souris, CD14<sup>+</sup> chez l'homme) circulants sont issus des progéniteurs MDP (Macrophage(monocyte)/Dendritic cell progenitor) commun avec les DC (Varol et al., 2015). Ces cellules prennent différentes appellations en fonction des organes et compartiments. On distingue ainsi les cellules de Kupffer dans le foie, les macrophages alvéolaires dans le poumon, les microglies dans le cerveau (parfois considérées comme des DC). Dans la rate, les macrophages portent le nom de la région où ils se situent. Les MMM (marginal zone metallophilic macrophage, Siglec 1<sup>+</sup> MOMA1<sup>+</sup>) et les MZM (marginal zone macrophage, SIGNR1<sup>+</sup>, MARCO<sup>+</sup>) se trouvent dans la zone marginale périvasculaire, leur permettant de capturer les antigènes provenant de la circulation et de les présenter aux lymphocytes. Les RPM (red pulpe macrophage, SIRPα<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>) se trouvent dans la pulpe rouge, ils contribuent à l'élimination des globules rouges et des cellules circulantes en fin de vie. Les WPM (white pulpe macrophage, CD68<sup>+</sup>, F4/80<sup>-</sup>) se situent dans la pulpe blanche, une région principalement constituée de lymphocytes T et B. Les WPM sembleraient jouer un rôle dans l'élimination des cellules B apoptotiques au niveau du centre germinale (Borges da Silva et al., 2015; Hey and O'Neill, 2012).

Les macrophages jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie et la réparation tissulaire en éliminant les cellules apoptotiques, nécrotiques ou encore les substances toxiques (particules exogènes ou dépôts extracellulaires de l'interstitium). Les macrophages ont beaucoup été étudiés dans les réponses anti-infectieuses. En effet, ces cellules expriment une forte activité lysosomale et oxydative leur permettant de lyser les pathogènes phagocytés. De plus, l'importante activité d'autophagie (mécanisme utilisé par les cellules pour isoler des organelles cytoplasmiques dans des vésicules, afin de les éliminer ou de les recycler) permet aux macrophages d'éliminer les pathogènes qui s'évadent des phagosomes. Que ce soit à leur surface et au niveau intracellulaire, les macrophages sont équipés de nombreux récepteurs de reconnaissance des pathogènes. Les TLR (Toll-like receptor) et les NLR (Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptors) servent à détecter les PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) et DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) tandis que les FcR, les récepteurs du complément et les récepteurs d'épuration (scavengers R) permettent aux

macrophages des phagocyter les pathogènes opsonisés et les LDL (Low densite lipoprotein). La mobilisation de ces différents récepteurs va induire différents signaux dans les macrophages dont la résultante aboutira à délivrer soit des signaux pro-inflammatoires ou modulateurs. Pour exemple, la mobilisation des TLR conduit principalement à la libération de nombreux médiateurs pro-inflammatoires sous la dépendance de NF- $\kappa$ B. Dans le même temps ces signaux vont aussi permettre aux macrophages de participer à la modulation de la réponse immunitaire notamment en produisant des cytokines responsables de la polarisation des lymphocytes T (Gordon et al., 2014).

Dans ce contexte, des données récentes montrent que certaines sous-populations de macrophages se spécialisent dans une activité régulatrice comme c'est le cas pour les macrophages interstitiels. Ces macrophages se caractérisent par leur localisation (dans l'interstitium) et par leur grande capacité à produire de l'IL-10, cytokine immuno-régulatrice (Bedoret et al., 2009). Cette propriété leur permet de contrôler le développement d'un asthme expérimental en inhibant la fonction des DC. De plus, l'activation du TLR9 sur ces cellules amplifie très fortement leur production d'IL-10 et permet de bloquer une réponse allergique établie (Sabatel et al., 2017).

Le rôle des macrophages dans la physiopathologie de la BPCO est maintenant bien établi. Comme mentionné dans le chapitre sur la physiopathologie de la BPCO (1.4), l'exposition à la fumée de cigarette et à d'autres polluants va activer les macrophages (environ 90% des cellules de la lumière alvéolaire) et induire la production de médiateurs inflammatoires (IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, CCL2), des dérivés réactifs de l'oxygène et de métalloprotéases (MMP-9 et MMP-12). L'altération de l'efférocytose (phagocytose des cellules apoptotiques) par les macrophages alvéolaires contribue à l'exacerbation de l'inflammation et des dommages pulmonaires (Noda et al., 2013; Tran et al., 2016). En effet, les neutrophiles recrutés lors de l'inflammation ont une courte durée de vie (2 à 3 jours). Ces cellules apoptotiques et/ou nécrotiques doivent être éliminées avant la libération de leur contenu cytoplasmique inflammatoire (peroxydases, dérivée réactives de l'oxygène) (Hiemstra, 2013; Vlahos and Bozinovski, 2014). Les macrophages sont de loin les cellules immunitaires les plus étudiées dans l'exacerbation de la BPCO par les pathogènes en raison de leur nombre et leur potentiel de bactéricidie. Dans ce contexte, une diminution de l'expression du TLR3 (liant l'ARN double brin) a été observée sur les macrophages chez les des sujets fumeurs par rapport aux non-fumeurs, ce qui pourrait contribuer à la susceptibilité

des patients BPCO aux infections virales (Hiemstra, 2013). L'expression des autres récepteurs de reconnaissance ne semble pas être affectée.

### 3.3. Les monocytes inflammatoires

Longtemps considérées comme des cellules recrutées uniquement pour assurer le renouvellement des cellules différenciées (macrophages et DC) dans les tissus périphériques, les monocytes sont également capables de présenter des antigènes et d'activer l'immunité adaptative. Les monocytes infiltrent abondamment les sites d'inflammation guidés par un gradient de chimiokines. Cependant, Jakubzick et al. ont montré en 2013 qu'à l'homéostasie (en condition non inflammatoire) des monocytes migrent dans les organes lymphoïdes (Jakubzick et al., 2013). Au cours de cette étude, ils ont également montré lors d'un transfert de monocytes de souris GFP (*Cx3cr1<sup>gfp</sup>*), que les monocytes Ly6C<sup>+</sup> CMH-II<sup>-</sup> peuvent migrer dans le tissu cutané et devenir CMH-II<sup>+</sup> après stimulation au LPS. Ces observations confortent les études qui suggèrent que les monocytes pourraient avoir une fonction d'APC, indépendamment de leur rôle de précurseur de DC et de macrophages. Certains chercheurs affilient ces cellules Ly6C<sup>+</sup> CMH-II<sup>+</sup> aux MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) en raison de leur capacité à inhiber l'activation des lymphocytes T et des cellules NK. Cependant, cette population cellulaire est hétérogène (cellules ayant aussi des caractéristiques de neutrophiles) et elle n'a pas pu être clairement phénotypée. Il est vraisemblable qu'elle inclue différentes sous-types de cellules en cours de différenciation, parmi lesquels on pourrait trouver des macrophages interstitiels qui dérivent des monocytes (Sabatel et al., 2017). En condition BPCO, la capacité de migration des monocytes est altérée (Ravi et al., 2017). Par ailleurs, Tan et ses collaborateurs ont montré en 2016 que les monocytes de patients BPCO expriment moins d'histone déacétylase 2 (HDAC2) (Tan et al., 2016). HDAC2 a un rôle suppresseur sur de nombreux gènes de médiateurs inflammatoires des monocytes ; son inhibition contribuerait à amplifier la pathologie de la BPCO en augmentant la production de ces médiateurs.

### 3.4. Les Lymphocytes B

Le rôle principal des lymphocytes B est leur implication dans l'immunité humorale. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés par les APC activent les lymphocytes B à leur tour. Ces derniers se différencient alors en plasmocytes producteurs d'anticorps spécifiques ou en cellules mémoires. L'hypothèse que les lymphocytes B pourraient jouer le rôle d'APC part du fait qu'ils expriment le CMH de classe II de façon constitutive. En 1984, Ashwell et ses collaborateurs ont montré que des cellules B issus de la rate de souris non sensibilisées sont

capables de présenter un antigène exogène aux lymphocytes T (Ashwell et al., 1984; Chen and Jensen, 2008). Malgré les nombreuses études sur la fonction d'APC des cellules B, notamment dans le développement de traitements contre les cancers, les données en contexte BPCO sont quasi inexistantes. Dans ce contexte, les lymphocytes B sont plutôt étudiés comme marqueurs de sévérité en raison de l'accumulation de follicules lymphocytaires dans les poumons de patients BPCO. En effet, un nombre accru de tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT) a été observé chez les patients BPCO et les souris exposées à la fumée de cigarette (John-Schuster et al., 2014).

Néanmoins, ces cellules B pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de la BPCO. En effet, Seys et al. ont montré en 2015 que le facteur d'activation des lymphocytes B, BAFF (B cell-activating factor), était surexprimé dans les poumons de patient BPCO et par les cellules pulmonaires de souris exposées à la fumée de cigarette. L'utilisation d'antagoniste de BAFF a permis de réduire significativement l'inflammation induite par la fumée de cigarette chez ces souris (Seys et al., 2015). BAFF favorise également la polarisation Th1 au détriment de la polarisation Th2 (Sutherland et al., 2005). Ces observations laissent suggérer un rôle potentiel des lymphocytes B dans la physiopathologie de la BPCO.

#### 4. La réponse IL-17 / IL-22

##### 4.1. Les cytokines IL-17 et IL-22 : Familles et récepteurs

Bien que co-exprimés par certains types cellulaires et fonctionnant très souvent en synergie, l'IL-17 et l'IL-22 appartiennent à des familles de cytokine différentes. L'IL-17 qui correspond en fait à l'IL-17A fait partie de la famille des IL-17 qui comprend six cytokines incluant l'IL-17B, l'IL-17C, l'IL-17D, l'IL-17E (IL-25) et l'IL-17F, agissant par le biais de cinq récepteurs (l'IL-17RA, l'IL-17RB, l'IL-17RC, l'IL-17RD, et l'IL-17RE). Ces sous-unités s'associent en hétérodimères spécifiques de certaines de ces cytokines (Sabat et al., 2013). Parmi les cytokines IL-17, l'IL-17A et l'IL-17F ont la plus grande similarité structurale (47,8% d'identité entre les protéines matures), leurs gènes se situent sur le chromosome 6q. Ces deux cytokines IL-17 agissent par l'intermédiaire du même récepteur formé d'IL-17RA et d'IL-17RC, par conséquent elles sont souvent impliquées dans des processus biologiques semblables (Sabat et al., 2013).

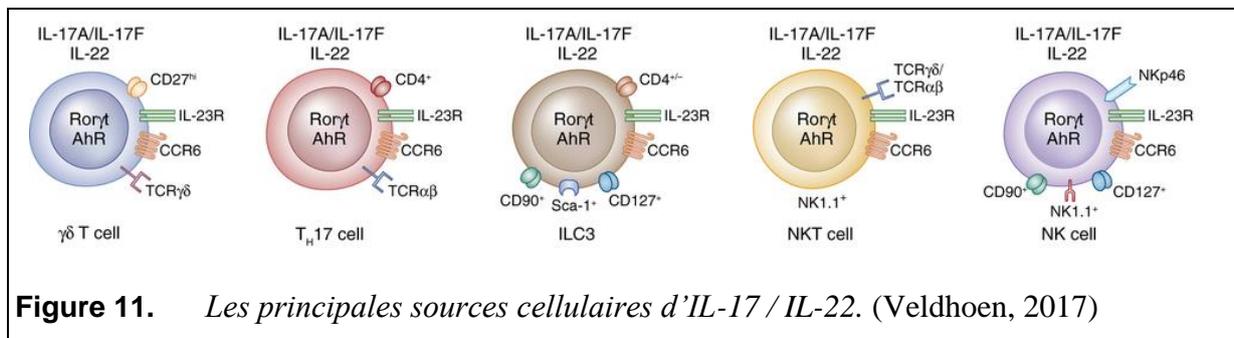
L'IL-22 fait partie de la famille des IL-10 qui comprend IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-28B, et IL-29 (IFN $\lambda$ ). Chez l'homme, les gènes de l'IL-22 et l'IL-6 se trouvent sur le chromosome 12q. En dehors de leur similarité structurale, les cytokines de

cette famille ont des fonctions assez distinctes. L'IL-22 exerce sa fonction biologique par l'intermédiaire d'un récepteur hétérodimérique formé d'IL-22R1 et d'IL-10R2. Il existe des récepteurs solubles d'IL-22 appelés IL-22BP (IL-22 binding protéine) qui jouent un rôle régulateur de la fonction de cette cytokine (Lim et al., 2016) en limitant sa liaison au récepteur cellulaire.

### 4.2. Sources et cibles des cytokines IL-17 et IL-22

#### 4.2.1. Sources cellulaires de l'immunité innée

Les cellules immunitaires innées sont des cellules dont la réponse n'est pas restreinte à un motif antigénique spécifique et qui ne nécessite pas une présentation d'un antigène par les APC. De nombreuses sources cellulaires innées d'IL-17 et d'IL-22 ont été décrites, et associées généralement aux facteurs de transcription retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) et aryl hydrocarbon receptor (AhR) (**Figure 11**). Ces cellules innées sont activées très rapidement en cas d'agression (en quelques heures), par les cytokines pro-Th17 (IL-1b, IL-6, IL-21, IL-23 et TGF $\beta$ ). Parmi les sources innées d'IL-17 et d'IL-22, les mieux décrites sont les cellules T $\gamma\delta$ , les cellules NK, les cellules NKT et les cellules lymphoïdes innées (ILC). Néanmoins, des études suggèrent que les neutrophiles et les cellules de Paneth produisent directement l'IL-17 tandis que d'autres suggèrent la production d'IL-17 et d'IL-22 par les macrophages (Busman-Sahay et al., 2015; Dyring-Andersen et al., 2017).



#### 4.2.2. Sources cellulaires de l'immunité adaptative

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> productrices d'IL-17 ont été classées en cellules Th17 depuis l'avènement du paradigme Th1 / Th2. Leur polarisation et différenciation sont gouvernées par les cytokines pro-Th17 : IL-1b, IL-6, IL-21, IL-23 et TGF $\beta$  ; et le facteur de transcription ROR $\gamma$ t (retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t). L'IL-21 est également produite par les Th17 sur lesquels elle a un effet autocrine. Contrairement aux cellules immunitaires innées, la différenciation des cellules Th17 requière leur activation (par les 3 signaux associés à la présentation d'antigène) par les cellules présentatrices d'antigène et nécessite plusieurs jours

pour sa mise en place. Les cellules Th17 ne sont pas les seules cellules adaptatives productrices d'IL-17 et d'IL-22. Les sources cellulaires de ces deux cytokines ont été largement revues ces dernières années (Busman-Sahay et al., 2015; Stockinger and Omenetti, 2017; Valeri and Raffatellu, 2016). Des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> producteurs d'IL-17 et d'IL-22 ont été décrits au cours de l'infection pulmonaire par influenza. La différenciation de ces cellules appelées Tc17 est induite par l'IL-6 et le TGFβ, et pourrait nécessiter la présence des cellules Th17. Des lymphocytes T folliculaires (Tfh) et Treg CD4<sup>+</sup> produisant l'IL-17 ont été également décrits dans l'intestin (Busman-Sahay et al., 2015).

### **4.2.3. Cellules cibles des cytokines IL-17 et IL-22**

Les récepteurs des cytokines IL-17 et IL-22 sont exprimés par les fibroblastes, les cellules épithéliales, endothéliales et les kératinocytes. Au niveau de ces cellules, la signalisation de l'IL-17 passe préférentiellement par l'activation de NFκB MAP kinase. Quant à l'IL-22, son interaction avec son récepteur membranaire induit une cascade de phosphorylation de STAT3 via la voie de signalisation JAK/STAT (Sabat et al., 2013). La finalité du signal dépendra du contexte physiopathologique et sera délétère ou bénéfique.

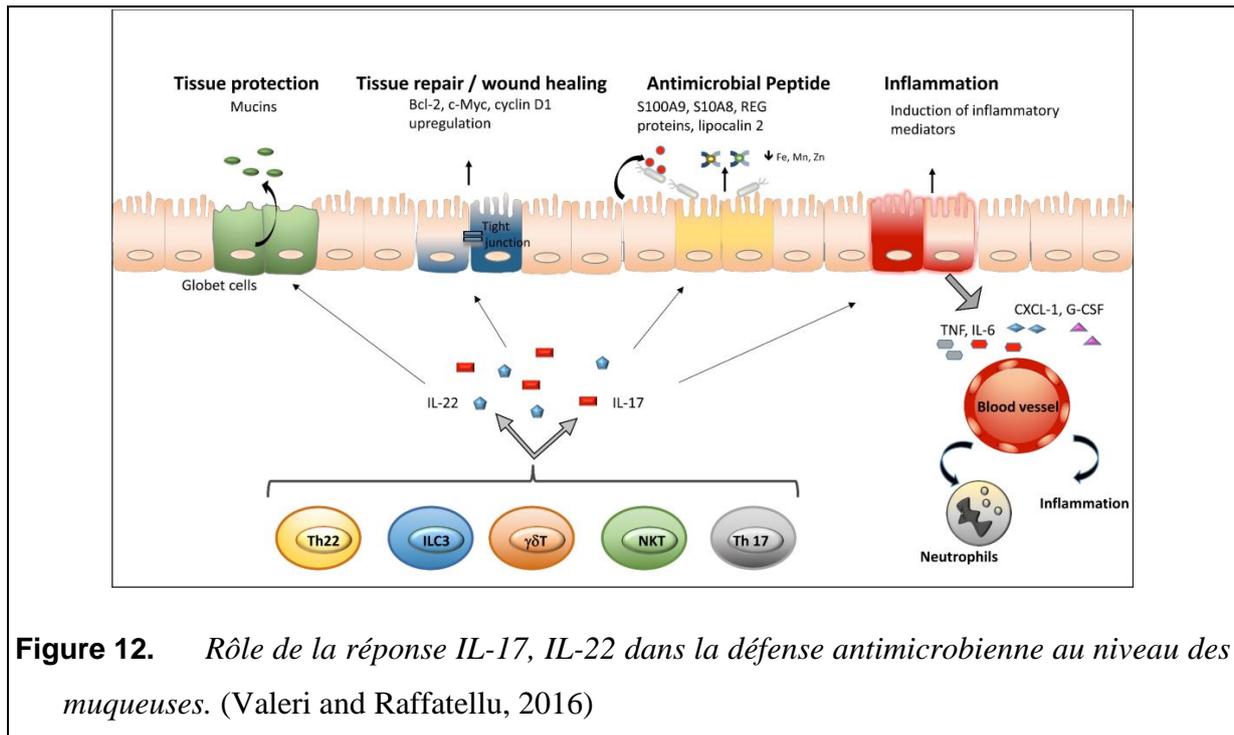
### **4.3. Fonctions délétères des cytokines IL-17 et IL-22**

L'IL-17 et l'IL-22 sont associées à des processus pathologiques inflammatoires, auto-immunitaires. L'IL-17 a une fonction principalement proinflammatoire. Elle induit la production de divers médiateurs inflammatoires impliqués dans le recrutement des neutrophiles (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8), des lymphocytes T, et d'autres cellules myéloïdes (CCL20, CCL2, CCL7) (Sabat et al., 2013). L'IL-17 est impliquée dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde, une pathologie inflammatoire auto-immune caractérisée par une infiltration de liquide et cellules inflammatoires au niveau des articulations des membres (Kotake et al., 1999; Veldhoen, 2017). Au cours de cette pathologie, l'IL-17 induit le recrutement de macrophages et de neutrophiles, et la surexpression de MMP-3, responsables de l'inflammation et la dégradation du cartilage osseux (Shui et al., 2017). Le psoriasis, une pathologie inflammatoire cutanée caractérisée par une prolifération excessive des kératinocytes, est associé à une surexpression d'IL-17 et d'IL-22 (Soderstrom et al., 2017). Ces deux cytokines interviennent dans le psoriasis par des mécanismes distincts. L'IL-17 contribue à l'exacerbation et l'entretien de l'inflammation tandis que l'IL-22 joue un rôle important dans la prolifération des kératinocytes (Martin et al., 2017; Soderstrom et al., 2017). Dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), Jiang et al. 2014 ont montré une forte expression d'IL-17 et d'IL-22, et une

augmentation de la fréquence des cellules productrices de ces cytokines dans les biopsies intestinales et les séra de patients atteints de MICI par rapport aux sujets contrôles (Jiang et al., 2014). Une autre pathologie associée à une surexpression d'IL-17 et d'IL-22 est la sclérose en plaque. Au cours de cette pathologie, des cellules autoimmunes attaquent la gaine de myéline des neurones entraînant une dégénérescence nerveuse. Les patients en phase de rechute surexpriment l'IL-22 (Muls et al., 2017) et l'IL-17 (Brucklacher-Waldert et al., 2009) par rapport à ceux en phase de rémission. Bien que le rôle des cytokines IL-17 / IL-22 dans les cancers ne soit pas encore clair, les cellules productrices sont retrouvées en plus grande fréquence dans les infiltrats tumoraux par rapport aux tissus sains. Par ailleurs, une réduction de la croissance tumorale a été observé chez des souris déficientes en IL-17 par rapport aux contrôles (Veldhoen, 2017).

#### 4.4. Fonctions bénéfiques des cytokines IL-17 et IL-22

Le rôle de ces cytokines dans la réponse immunitaire anti-infectieuse est sans doute le plus bénéfique. Comme résumé sur la **figure 12**, lors d'une infection, les cellules épithéliales et les cellules présentatrices d'antigène vont induire la production d'IL-17 et d'IL-22. En se liant à leurs récepteurs présents à la surface des cellules épithéliales, ces cytokines vont induire la production de cytokines (TNF $\alpha$ , IL-23), chimiokines (CXCL1, CCL20) et facteurs de croissance (G-CSF) favorisant le recrutement et l'activation des neutrophiles ainsi que des monocytes. Ces cellules recrutées auront une action directe sur les pathogènes en les phagocytant, ou pour les DC et macrophages dérivés de monocytes, l'initiation de la réponse adaptative. Les cytokines IL-17 et IL-22 induisent également la production de peptides antimicrobiens (S100A8, S100A9, REG (regeneration protein), lipocalin2 et les  $\beta$ -défensines) qui peuvent former des pores dans la paroi des pathogènes. Un rôle particulièrement important dans ce processus de défense contre les agresseurs est la réparation tissulaire. En effet, dans la phase de résolution de l'infection, l'IL-17 et l'IL-22 vont réguler la régénération tissulaire et l'expression des protéines de jonctions serrées (Eyerich et al., 2017). Dans ce contexte, la production de ces cytokines est importante dans l'infection par le champignon *Candida albicans* (Eyerich et al., 2008; Mear et al., 2014), par *Mycobacterium tuberculosis* (Trentini et al., 2016), *Staphylococcus aureus* (Myles et al., 2013) ou encore dans les infections pulmonaires et gastro-intestinales (Eyerich et al., 2017).



#### 4.5. La réponse IL-17 / IL-22 dans la BPCO et son exacerbation

Dans la BPCO, ces cytokines, plus spécifiquement l'IL-17, pourraient avoir un rôle dichotomique selon qu'on se situe dans un contexte infectieux ou non. La BPCO est une pathologie inflammatoire chronique dans laquelle les propriétés pro-inflammatoires de l'IL-17 pourraient s'avérer néfaste. En effet, la surexpression de l'IL-17 est associée à l'aggravation des signes pathologique de la BPCO, à savoir l'inflammation et la fibrose pulmonaire. Yanagisawa et ses collaborateurs ont montré en début 2017 que les souris déficientes pour *l'Il17ra* ou recevant des anticorps bloquants ce récepteur présentaient moins d'inflammation et de fibrose pulmonaire suite à l'exposition à la fumée de cigarette et traitement par PIC (polyinosinic:polycytidylic acid) (Yanagisawa et al., 2017). Chez des patients BPCO à l'état stable, l'expression des cytokines Th17 et des cytokines pro-Th17, ainsi que la fréquence des cellules IL-17<sup>+</sup> et IL-22<sup>+</sup> est augmentée dans les biopsies bronchiques, la lumière alvéolaire et le sang par rapport aux sujets non-fumeurs. Ces paramètres augmentent avec la sévérité de la BPCO (voir tableau 1) et sont également plus élevés chez les sujets fumeurs non BPCO en comparaison aux non-fumeurs non BPCO (Di Stefano et al., 2009; Zhang et al., 2013). Cette augmentation de réponse IL-17 et IL-22 est associé à une diminution d'IL-10 et des cellules Treg (Wang et al., 2015).

L'implication de l'IL-17 dans le développement de la BPCO a été démontrée par différentes approches expérimentales. L'IL-17 participe à la chronicité de la réaction inflammatoire

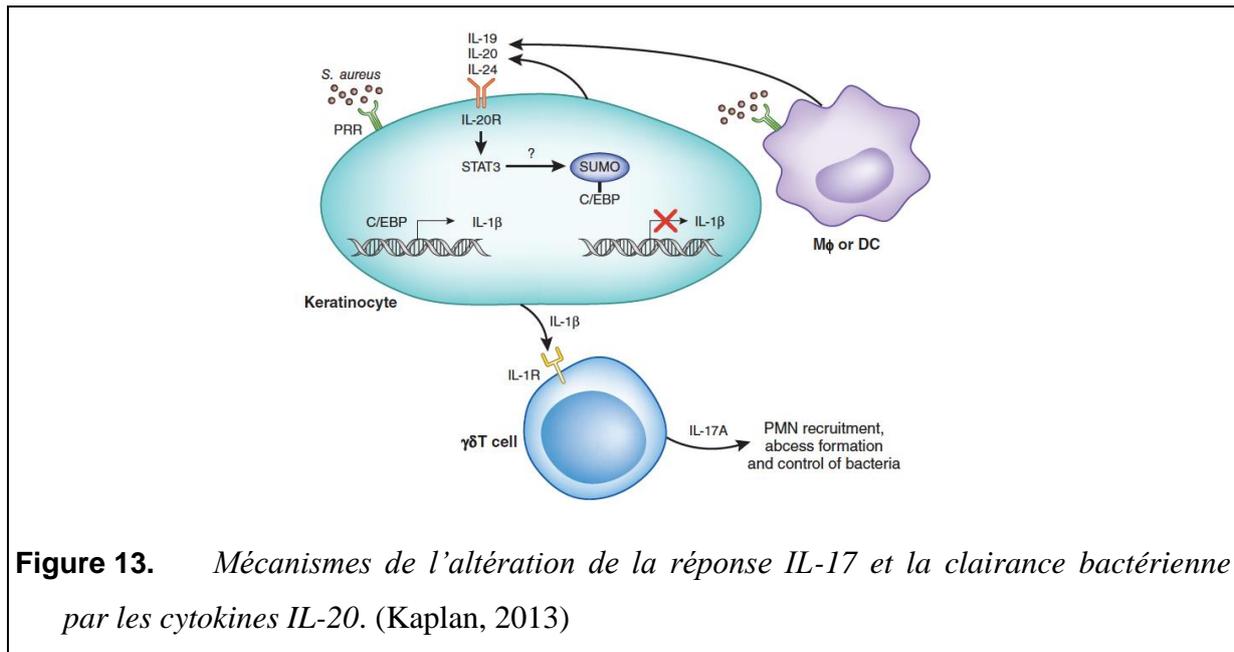
pulmonaire en médiant le recrutement et l'activation de neutrophiles et de monocytes/macrophages. Ainsi la production d'IL-17 par les NKT entraîne un recrutement de neutrophiles qui est associé à des lésions pulmonaires de type emphysémateuses (Pichavant et al, 2014). Le rôle de l'IL-22 dans le développement de l'emphysème a également été suggéré mais devrait encore être confirmé. Cela pourrait également participer à l'obstruction bronchique observée dans ce contexte (Rouzić et al., 2017).

Les données sur le rôle des cytokines IL-17 et IL-22 au cours de l'exacerbation de la BPCO par les pathogènes sont quasi inexistantes. Zou et al. ont montré en avril 2017 que l'IL-17 et la cytokine pro-Th17 étaient significativement augmentées dans les séras de patients BPCO en état d'exacerbation par rapport à ceux à l'état stable, et chez ces derniers par rapport aux contrôles non BPCO (Zou et al., 2017). Dans cette étude, les données sur la relation entre la surexpression d'IL-17 et la réponse anti-infectieuse font défaut. Les expériences de Roos et al. en 2015 sur les souris déficientes en *Il17ra* ou traitées avec des anticorps neutralisants l'IL-17 montrent une réduction du recrutement des neutrophiles, de la production d'IL-17, CXCL1 et CXCL5 suite à l'exposition à la fumée de cigarette associée ou non à l'infection par NTHi (Non typeable *Haemophilus influenzae*) (Roos et al., 2015). Aucun effet sur la charge bactérienne n'a été observé 12h ou 72h après infection. Dans cette même étude, ils observent une augmentation significative de la production d'IL-17 dans les expectorations des patients BPCO ayant une exacerbation aiguë associée à une infection par NTHi. Chez ces patients, le retour à l'état stable s'accompagne d'une diminution significative de cette production d'IL-17.

Au vu de l'importance des cytokines IL-17 et IL-22 dans la réponse antimicrobienne pulmonaire, il nous a paru crucial d'étudier le rôle de ces cytokines Th17 dans le contexte de l'exacerbation de la BPCO. Des études dans notre laboratoire sur des souris chroniquement exposées à la fumée de cigarette (modèle expérimental de la BPCO) ont montrées pour la première fois que le défaut d'IL-22 est associé au développement de l'exacerbation et détermine la clairance bactérienne vis-à-vis de Sp ou de NTHi (Sharan et al., 2017). A l'opposé, la supplémentation en IL-22 permet de rétablir la clairance bactérienne et de bloquer les altérations caractérisant l'exacerbation. A ce stade, il est maintenant important d'identifier les mécanismes responsables de ce défaut d'expression de l'IL-22.

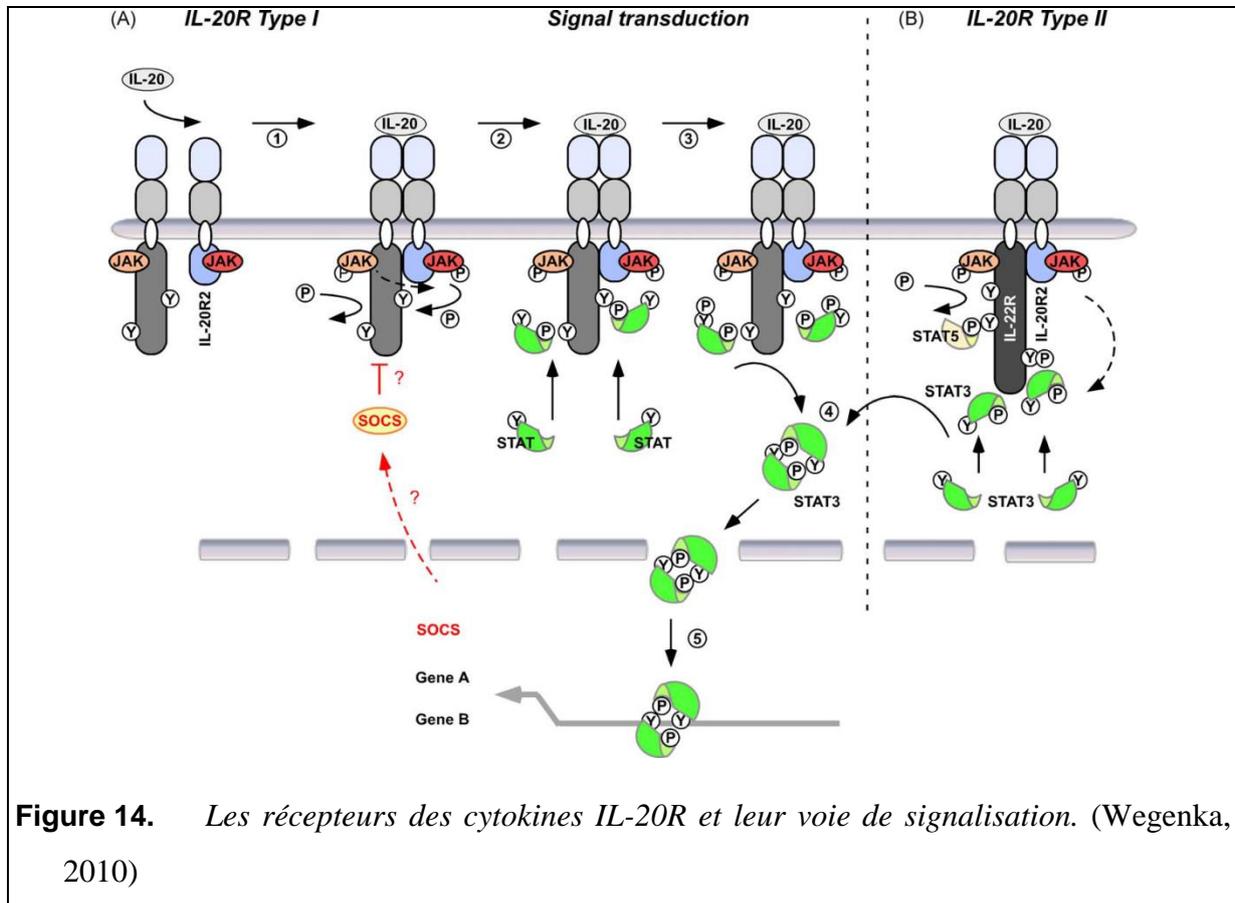
### 5. Les cytokines régulatrices de la famille de l'IL-10 et régulation de la réponse IL-17 / IL-22 : Les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24

Comme la plupart des médiateurs inflammatoires, le principal mécanisme de répression des cytokines IL-17 / IL-22 a lieu à travers l'IL-10 produite par les cellules immunorégulatrices (Treg, Breg ou APC). Cette régulation s'opère par l'inhibition du recrutement des cellules inflammatoires (monocytes, granulocytes, lymphocytes) et de la libération des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Lors d'une infection, cette répression de la réaction inflammatoire intervient au cours de la phase de résolution pour limiter les dommages tissulaires. Bien que bénéfique pour le maintien de l'intégrité tissulaire, une inhibition de la réponse inflammatoire avant ou pendant l'infection peut entraîner un retard, voire un défaut, de la réponse anti-infectieuse. En effet, Chan et ses collaborateurs ont montré en 2015 dans des modèles murins d'infection cutanée par *Staphylococcus aureus* MRSA, que la neutralisation d'IL-17 et d'IL-22 individuellement ou simultanément réduit l'inflammation se traduisant par moins de recrutement de neutrophiles Ly6G<sup>+</sup> et de lymphocytes T CD3<sup>+</sup>. Ces souris traitées présentent plus de lésions cutanées et une charge bactérienne plus importante par rapport aux contrôles (Chan et al., 2015). Au niveau pulmonaire, la déficience en IL-17 et le blocage de la signalisation IL-17 entraînent une altération de la clairance de *Staphylococcus aureus* après une primo-infection virale (Robinson et al., 2013). Des travaux de notre laboratoire ont aussi démontré le rôle important de l'IL-17 dans la clairance de Sp (Marqués et al., 2012) alors que l'IL-22 est impliquée dans l'élimination de NTHi (Sharan et al., 2017). Par ailleurs, Myles et al. ont démontré en 2013 que certaines cytokines de la famille d'IL-20 jouaient un rôle délétère dans l'infection cutanée due à *Staphylococcus aureus* (Myles et al., 2013). Dans cette étude, l'absence de signalisation de ces cytokines IL-20 via leurs récepteurs (souris IL-20RB<sup>-/-</sup> ou utilisation d'anticorps neutralisants) améliore la clairance bactérienne tandis que le traitement par des cytokines IL-20 recombinantes (notamment IL-19 et IL-24) aggrave l'infection. Les mécanismes par lesquels les cytokines IL-20 régulent la réponse IL-17 et la réponse à *S aureus* ont été schématisé par Kaplan dans la **figure 13** ci-dessous.



Les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 (anciennement appelées MDA-7) font partie de la famille de l'IL-20, elle-même faisant partie de la famille de l'IL-10. En plus de ces trois cytokines, la famille de l'IL-20 comprend également l'IL-22 et l'IL-26 (Ouyang et al., 2011). Elles sont classées dans la même famille en raison de leurs communautés structurales et de leur ciblage épithélial. L'IL-19, IL-20 et IL-24 ont en commun des récepteurs de l'IL-20 (**Figure 14**). Les gènes de ces cytokines sont localisés sur le chromosome 1q32 humain et murin (Blumberg et al., 2001). Deux types de récepteurs ont été identifiés pour ces cytokines: IL-20RA/IL-20RB d'une part et IL-22RA/IL-20RB d'autre part. Les trois cytokines sont capables de se lier au premier tandis que seules l'IL-20 et l'IL-24 peuvent se lier au second. Les récepteurs des cytokines IL-20 sont associés à des tyrosines kinases des familles JAK1 à 3 et Tyk2. L'interaction des cytokines avec leurs récepteurs induit une cascade de phosphorylation des STAT (signal transducers and activators of transcription), la dimérisation et la translocation des STAT dans le noyau et enfin l'activation des promoteurs contrôlé par STAT (Wegenka, 2010). *In vitro*, le traitement de cellules HaCaT (lignée de kératinocytes humains) et BHK (fibroblastes des hamster) par l'IL-20 induit une translocation de STAT3 (et non de STAT1) dans le noyau (Blumberg et al., 2001). L'activation de STAT5 a aussi été montrée dans des cellules endothéliales exposées à ces cytokines (Tritsaris et al., 2007). STAT3 contrôle l'expression de divers gènes parmi lesquels SOCS3 (suppressor of cytokine signaling) qui pourrait avoir un effet régulateur sur l'activation des cellules cibles et la signalisation JAK/STAT. Plus spécifiquement, SOCS3 inhibe l'activation des cellules immunitaires myéloïdes et lymphoïdes et la production de cytokines inflammatoires dont

l'IL-6, l'IL-12 et TNF $\alpha$  et de la réponse IL-17 (Carow and Rottenberg, 2014; Ding et al., 2017; Ehret et al., 2001).



**Figure 14.** Les récepteurs des cytokines IL-20R et leur voie de signalisation. (Wegenka, 2010)

### 5.1. Sources et cibles cellulaires

Les cellules immunitaires myéloïdes (monocytes et macrophages), lymphoïdes (Lymphocytes B, cellules Th2), les fibroblastes et les cellules épithéliales sont les principales sources des cytokines IL-20. Les mécanismes régulant la production des cytokines IL-20 ne sont pas totalement élucidés. Les cytokines IL-20 sont induites par des cytokines inflammatoires et des PAMPs comme le LPS. Leur expression est détectée dans différents tissus et parfois associés à des pathologies inflammatoires ou infectieuses (Rutz et al., 2014; Wegenka, 2010). Le LPS, ligands du TLR4, induit l'expression des trois cytokines (IL-19, IL-20 et IL-24) par les monocytes, *S aureus* inactivé induit l'expression d'IL-19 par les lymphocytes B tandis que les lymphocytes T stimulés avec l'anti-CD3 surexpriment l'IL-24 (Wolk et al., 2002). **Le tableau 3** liste les sources et cibles des cytokines IL-20 décrites dans la littérature, ainsi que les facteurs susceptibles de les induire.

En ce qui concerne les cibles, et à la différence de l'IL-22, les cytokines IL-20 n'agissent pas spécifiquement sur les cellules épithéliales. En effet, leurs récepteurs sont également exprimés sur les cellules endothéliales et les fibroblastes mais aussi sur les leucocytes dont les lymphocytes, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (Rutz et al., 2014).

**Tableau 3 :** *Les sources et les cibles cellulaires des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24.*

Adapté de (Rutz et al., 2014)

IL-20 subfamily cytokine	Cellular sources	Inducers of expression	Cellular targets
IL-19	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocytes</li> <li>• Keratinocytes</li> <li>• Macrophages</li> <li>• Fibroblasts</li> <li>• B cells</li> <li>• Airway epithelial cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GM-CSF</li> <li>• IL-1<math>\beta</math></li> <li>• IL-4</li> <li>• IL-13</li> <li>• IL-17</li> <li>• IL-22</li> <li>• KGF</li> <li>• LPS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keratinocytes</li> <li>• Fibroblasts</li> <li>• Monocytes</li> <li>• CD8<sup>+</sup> T cells</li> <li>• Renal tubular epithelial cells</li> </ul>
IL-20	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocytes</li> <li>• Granulocytes</li> <li>• Keratinocytes</li> <li>• DCs</li> <li>• Fibroblasts</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-1<math>\beta</math></li> <li>• IL-17</li> <li>• IL-22</li> <li>• LPS</li> <li>• TNF</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keratinocytes</li> <li>• Endothelial cells</li> <li>• Adipocytes</li> </ul>
IL-24	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocytes</li> <li>• Endothelial cells</li> <li>• Melanocytes</li> <li>• T<sub>H</sub>2 cells</li> <li>• Colonic subepithelial myofibroblasts</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-1<math>\beta</math></li> <li>• IL-17</li> <li>• IL-22</li> <li>• LPS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keratinocytes</li> <li>• Adipocytes</li> </ul>

## 5.2. Fonctions des cytokines IL-20 : à l'homeostasie et dans les pathologies

### 5.2.1. A l'homéostasie tissulaire

Malgré les nombreuses études sur le rôle de l'IL10 et de l'IL-22 à l'homéostasie tissulaire et immunitaire, les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 sont peu caractérisées. Les études sur ces trois cytokines se focalisent sur leur rôle dans la physiopathologie de maladies inflammatoires, auto-immunitaires, du cancer et quelques travaux dans les infections (Rutz et al., 2014). Néanmoins, étant donné leur potentiel à promouvoir la prolifération cellulaire (notamment l'IL-20 qui est la plus étudiée des trois) et par analogie à l'IL-22, on peut suggérer qu'elles participent au maintien de l'intégrité épithéliale et la réparation tissulaire lors de la résolution de l'inflammation (Ouyang et al., 2011). Dans les études de Sun et al. en 2013, l'IL-19 est surexprimée au niveau des sites de lésion cutanée. Les souris traitées localement avec l'IL-19 ou l'IL-20 ont une cicatrisation plus rapide par rapport aux contrôles.

*In vitro* le traitement IL-19 favorise la prolifération des cellules par induction de KGF (Keratinocyte growth factor), et la migration cellulaire (Sun et al., 2013).

Peu de données concernent l'expression des récepteurs de l'IL-20 sur les APC et leur fonction dans ce type de cellules. Une expression des deux types de récepteurs de l'IL-20 a été démontrée sur les monocytes/macrophages (Wegenka, 2010). Des effets potentiellement indirects de ces cytokines ont été rapportés dans différents contextes pathologiques (psoriasis, polyarthrite rhumatoïde, diabète et pathologies inflammatoires de l'intestin). Peu de travaux montrent cependant des effets directs. Seul un travail récent de Bech R et al (Bech et al., 2016) rapporte que l'IL-20 amplifie l'expression de molécules de costimulation (CD86) et augmente la migration de ces cellules.

### **5.2.2. Pathologies inflammatoires, prolifératives auto-immunes et infectieuses**

Les travaux sur les cytokines IL-20 s'intéressent généralement aux pathologies dans lesquelles le rôle de l'IL-22 a été démontré. En effet, le récepteur IL-22RA est commun au récepteur d'IL-22 (IL-22RA/IL-10RB) et le premier type de récepteur des cytokines IL-20 (IL-22RA/IL-20RB). En dépit de certaines similitudes fonctionnelles, les cytokines IL-20 ont des propriétés parfois opposées à celles de l'IL-22.

Dans le psoriasis, ces cytokines et leurs récepteurs sont surexprimés. Lors d'une étude clinique sur l'utilisation de l'Etanercept (un antagoniste du TNF $\alpha$ ), Wang et ses collaborateurs observent une plus forte expression des cytokines IL-20 dans les tissus psoriatiques par rapport aux régions non psoriatiques. L'utilisation de cet anti-inflammatoire réduit significativement l'expression des trois cytokines IL-20, tandis que le traitement de cellules épidermiques humaines (NHEK) avec TNF $\alpha$  et l'IL-17 augmente leur expression (Wang et al., 2012a). Ces résultats suggèrent que les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 pourraient avoir un rôle synergique avec la réponse IL-17 / IL-22 dans le développement du psoriasis.

Les cytokines IL-20 et leurs récepteurs sont également surexprimés dans la polyarthrite rhumatoïde. Dans cette pathologie, les macrophages et les fibroblastes produisent ces cytokines et induisent le recrutement d'autres cellules inflammatoires dont les neutrophiles et lymphocytes T via CCL2 et l'IL-8 qui vont exacerber l'inflammation (Persaud et al., 2016; Wegenka, 2010). Liu et al. 2016 ont montré dans un modèle expérimental de CIA (Collagen Induced Arthritis), que les concentrations des cytokines IL-20 sont augmentées dans l'infiltrat. L'utilisation d'IL-20R2-Fc (forme soluble de la sous unité commune des

récepteurs IL-20 qui reconnaît spécifiquement l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24 et qui bloque la signalisation de ces récepteurs) réduit l'inflammation et le score de la pathologie de façon similaire au TNFR2-Fc (récepteur soluble du TNF $\alpha$ ) (Liu et al., 2016).

L'IL-22RA et les cytokines IL-20 sont surexprimés dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Bien que l'implication de ces cytokines dans la physiopathologie des MICI nécessite d'avantage d'études, les souris déficientes en IL-19 présentent des colites plus sévères par rapport aux contrôles (Wegenka, 2010). Des résultats similaires ont été observés chez des patients atteints soit de maladie de Crohn, soit de colite. L'expression d'IL-19 et d'IL-24 était plus élevée chez les patients par rapport aux témoins, cette augmentation était plus marquée chez les patients présentant une forme active par rapport à ceux présentant une forme inactive de la pathologie (Fonseca-Camarillo et al., 2014). Cependant, le rôle exact de ces cytokines dans ces pathologies n'est pas précisé.

Les études sur le rôle des cytokines IL-20 dans le cancer sont contradictoires. Etant donné le potentiel de ces cytokines à induire la prolifération cellulaire et à promouvoir l'angiogenèse, on peut supposer un rôle délétère dans le cancer. Ainsi, Alexandrakis et al. 2015 montrent que la concentration d'IL-20 dans la circulation sanguine corrèle positivement avec l'expression de VEGF (vascular endothelial growth factor), b-FGF (basic-fibroblast growth factor), et de l'angiopoïétine 2 (Ang-2), ainsi qu'avec la progression de mélanome multiple (Alexandrakis et al., 2015). L'IL-20 et l'IL-20RA sont surexprimés dans les tumeurs de vessie. *In vitro*, l'IL-20 favorise la migration de lignées cellulaires du cancer de la vessie à travers l'induction de la signalisation ERK1/2, JNK, p38 MAPK, et JAK/STAT (Lee et al., 2013). Contrairement à ces observations, Li et ses collaborateurs ont rapporté un effet anticancéreux de l'IL-24 (MDA-7). Sur des modèles de cancer du sein induit chez le rat, ils observent un retard de la croissance tumorale chez les rats qui reçoivent des adénovirus exprimant l'IL-24 par rapport à ceux recevant l'adénovirus sans le gène d'IL-24. Le mécanisme de répression du cancer dans ce modèle implique la surexpression de GAS3 (growth arrest specific gene-3), un facteur anti-prolifératif qui inhibe la prolifération et l'interaction des cellules cancéreuses avec la fibronectine (Li et al., 2013). Les résultats de Ma et al. 2016 vont dans le même sens puisqu'ils observent que l'IL-24 recombinante induit l'apoptose des cellules Eca-109 (cellules du cancer de l'œsophage) et A375 (cellules de mélanome humain) *in vitro*. *In vivo*, l'injection sous cutanée de cellules exprimant l'IL-24 permet de limiter le développement tumoral en comparaison aux contrôles recevant les cellules n'exprimant pas l'IL-24, en inhibant la prolifération et l'angiogenèse (Ma et al.,

2016). On pourrait donc distinguer le rôle anti-cancéreux de l'IL-24 de celui pro-cancéreux de l'IL-19 et IL-20, sans qu'à l'heure actuelle, nous n'ayons de mécanisme précis pour expliquer cette différence.

Au cours de l'infection, l'IL-22 présente une fonction anti-microbienne car elle induit la production de peptides anti-microbiens comme les S100 et les défensines. Cela pourrait suggérer un potentiel anti-microbien des cytokines IL-19, IL20 et IL-24, car elles ont en commun le récepteur IL-22R1 qui est important dans l'induction de la signalisation de ces cytokines. De plus, l'exposition de cellules épithéliales à ces cytokines amplifie l'expression de plusieurs protéines de la famille des S100 (S100A7, S100A8, S100A9 et S100A15). Cependant, plusieurs études rapportent que la présence des trois cytokines IL-19, IL20 et IL-24 est délétère dans la réponse anti-infectieuse, comme il a été introduit au début du chapitre 5. Cependant leur implication au cours des infections respiratoires n'a pas été abordée jusqu'à maintenant. Seul un travail récent montre une surexpression de l'IL-24 induite par le virus de la grippe et un rôle de cette cytokine dans la réplication virale (Weiss et al., 2015).

L'ensemble de ces études indiquent que les cytokines IL-20 sont induites en conditions inflammatoires, et qu'elles pourraient, en cas d'infection, avoir des effets délétères. Ainsi, on peut s'interroger sur le rôle de ces cytokines dans l'exacerbation de la BPCO et la réponse IL-17 / IL-22 dans ce contexte.

### **6. Approche thérapeutique: Ciblage des APC par la Flagelline et réponse IL-17 / IL-22**

Les voies aériennes et les alvéoles pulmonaires représentent une surface extrêmement importante au contact direct avec le milieu extérieur. Pour se protéger, les muqueuses disposent de moyens mécaniques leur permettant de se protéger et d'éliminer certains composants. Ainsi ces muqueuses sécrètent en permanence du mucus, alors que l'épuration muco-ciliaire permet l'élimination des contaminants présents dans les voies aériennes. Dans le même temps, les muqueuses doivent préserver leur fonction première qui consiste à absorber ou à échanger des éléments essentiels à l'organisme depuis le milieu extérieur (échanges gazeux dans le poumon ou absorption de nutriments dans l'intestin). Les muqueuses sont par conséquent régulièrement exposées à différents types d'agresseurs extérieurs dont les microorganismes et font d'elles des portes d'entrée potentielles pour les microorganismes. Un contrôle permanent est nécessaire au niveau des muqueuses afin d'une part, de maintenir l'équilibre de sa flore locale, et d'autre part d'empêcher l'entrée des pathogènes. Les cellules épithéliales qui tapissent la surface des muqueuses expriment des récepteurs comme les PRR,

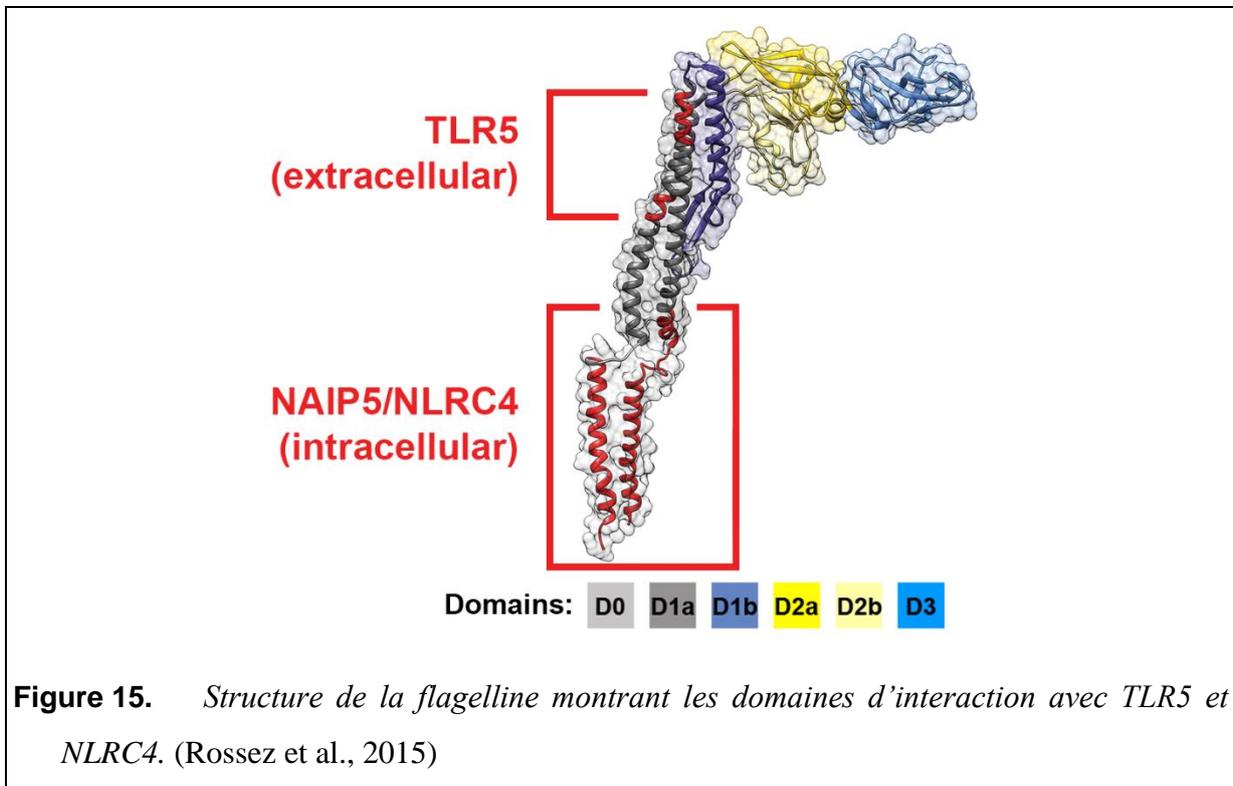
pattern-recognition receptor, leur permettant d'initier une réponse immunitaire rapide en cas d'infection. La signalisation induite par ces récepteurs, et en particulier des TLR, permet de mobiliser les acteurs de la réponse immune innée. Cette réponse très rapide et peu spécifique est susceptible de générer une première ligne de défense permettant à l'organisme de se défendre vis-à-vis de micro-organismes pathogènes. Ces dernières années de nombreux chercheurs se sont intéressés à l'utilisation des agonistes de ces PRR afin de booster le système immunitaire, notamment dans le cadre d'une approche vaccinale ou anti-infectieuse. Parmi ces agonistes PRR, la flagelline, agoniste du TLR5 (Toll-like receptor 5) a été montrée comme pouvant agir comme un bon adjuvant muqueux et également, stimuler la réponse IL-17 / IL-22, pour promouvoir une activité antimicrobienne (Van Maele et al., 2010; Zhang et al., 2014).

### 6.1. Le flagelle et la flagelline

La flagelline est le composant principal du flagelle qui est un long filament situé à la surface de certaines bactéries dites flagellées. Dans ces bactéries, le flagelle assure principalement la fonction de motilité. Le flagelle peut aussi participer à la formation de biofilms en interagissant avec les mucines à la surface des muqueuses (Zgair and Chhibber, 2011). Le flagelle contribue également à la pathogénicité des micro-organismes car il leur permet de franchir la barrière de mucus présente à la surface des muqueuses. De plus, il peut participer dans l'évasion du système immunitaire. En effet, certaines bactéries comme les *Salmonella enterica* peuvent exprimer plusieurs variétés de flagelline, leur permettant de s'adapter à leur environnement. D'autres bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* sont capables de glycosyler leur flagelline, la rendant plus stable à la dégradation et parfois empêchant leur reconnaissance par les PRR. Enfin certaines bactéries mutent et perdent leur flagelle, les rendant indétectables via le flagelle. L'ensemble de ces mécanismes renforce l'intérêt des flagellines recombinantes comme adjuvants vaccinaux ou pour stimuler le système immunitaire lors d'un traitement (Rossez et al., 2015).

La flagelline est une protéine dont la taille varie selon les bactéries entre 30 à 60kDa. Les monomères de flagelline sont synthétisés à l'intérieur de la cellule puis agencés à l'extérieur de façon hélicoïdale pour former le flagelle. La structure tridimensionnelle laisse apparaître quatre domaines distincts (D0, D1, D2, D3) suite à son repliement sous forme d'épingle à cheveux (**figure 15**). Les domaines D2 et D3 sont les domaines hypervariables. La structure tri-dimensionnelle aboutit à ce que les deux extrémités N-terminale et C-terminale se retrouvent côte à côte et constituent les domaines D0 et D1. Ces deux domaines sont bien

conservés entre les espèces et contiennent les sites de reconnaissance du TLR5 et de NLRC4 (anciennement appelé Ipaf), les deux PRR décrits comme pouvant interagir avec la flagelline (Gupta et al., 2014; Jacchieri et al., 2003; Rossez et al., 2015).

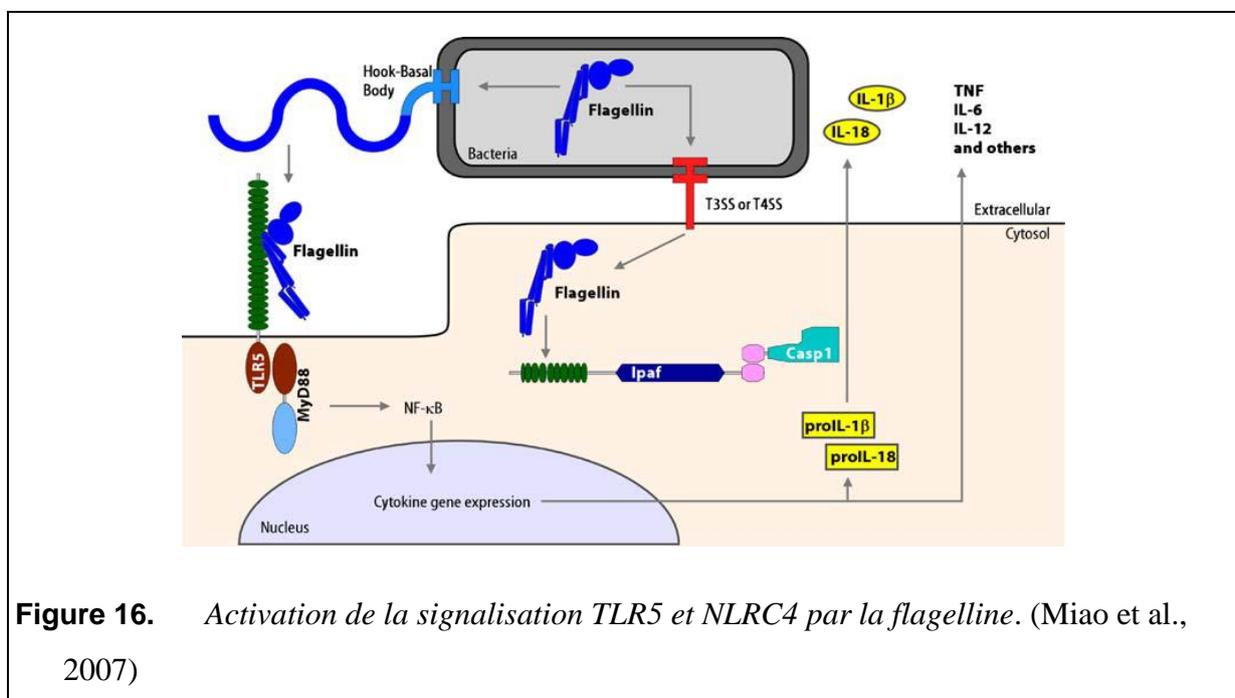


### 6.2. Signalisation de la flagelline par TLR5 et NLRC4

TLR5 (Toll-like receptor 5) et NLRC4 (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain, Leucine Rich Repeat And CARD Domain Containing 4) font partie des PRR permettant aux cellules de l'organisme de reconnaître des molécules de danger (DAMP, danger-associated molecular patterns) libérées par les cellules hôtes altérées, ou des molécules associées aux pathogènes (PAMP, pathogen-associated molecular patterns). La réponse induite par ces récepteurs est très rapide et détermine le type de réponse induite. Elle se traduit par l'activation des cellules immunitaires innées, la libération de cytokines et chimiokines inflammatoires et la production de diverses molécules à propriétés anti-microbiennes (Miao et al., 2007). Il existe une dizaine de TLR chez l'homme (une douzaine chez la souris) capables de lier des ligands extracellulaires tels que les peptidoglycanes (TLR1/TLR2), les lipoprotéines diacylées (TLR2/TLR6), les lipopolysaccharides (TLR4), et la flagelline (TLR5), ou de lier des ligands intracellulaires dans les endosomes comme l'ARN double brin (TLR3), l'ARN simple brin (TLR7/TLR8), et le CpG (TLR9). Certains TLR fonctionnent en homodimères tandis que d'autres agissent en hétérodimères comme le TLR1/2 ou le TLR2/6. Quant aux NLR, ce sont tous des récepteurs intracellulaires qui sont regroupés en deux

familles en fonction de la séquence N-terminale, les NLRC qui portent un domaine CARD (Caspase Recruitment Domain), et les NLRP qui ont un domaine Pyrin en région N-terminale. L'activation des NLR entraîne l'assemblage et l'activation de l'inflammasome qui est nécessaire pour la maturation de certaines protéines pro-inflammatoires tel que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 (Claes et al., 2015; Miao et al., 2007).

Les voies de signalisation induites par la flagelline ont été revues par Miao et ses collaborateurs (Miao et al., 2007) (**Figure 16**). Suite à l'interaction avec la flagelline, le TLR5 se dimérise et recrute MyD88. La signalisation passe par l'activation d'IRAK4, IRAK1, et TRAF6, puis la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau, après libération par I $\kappa$ B kinase. Cette signalisation active également les MAP kinases (dont p38, ERK). L'ensemble de ces voies initie l'expression de gènes pro-inflammatoires, entre autres des cytokines et des chimiokines. Les cellules épithéliales, les monocytes et les cellules dendritiques humaines expriment le TLR5 et sont capables de répondre à la flagelline. L'activation de NLRC4 entraîne une cascade d'activation et d'interaction moléculaire aboutissant à la formation de l'inflammasome, et à l'activation de la caspase-1. Caspase-1 est importante dans la maturation des cytokines inflammatoires IL-1 $\beta$  et l'IL-18, mais elle peut également induire la mort cellulaire par pyroptose (Miao et al., 2007).



### 6.3. Fonctions adjuvantes et immuno-modulatrices de la Flagelline

L'efficacité de la réponse immunitaire innée est décisive dans les infections et les thérapies visant à moduler le système immunitaire, particulièrement les vaccins. Lors des

infections, la défense innée permet à la fois de garder l'infection sous contrôle le temps de la mise en place de la réponse adaptative, mais aussi d'activer et d'orienter cette dernière. Dans les processus vaccinaux, l'induction transitoire d'une réaction inflammatoire permet le recrutement des APC, notamment les DC, afin de prendre en charge les molécules vaccinales pour une meilleure activation de l'immunité adaptative (présentation classique et présentation croisée). Dans ce cadre, de nombreuses études s'intéressent de plus en plus à l'utilisation des agonistes des récepteurs de l'immunité innée, dont les TLR. L'intérêt thérapeutique du ciblage des TLR a été largement revu dans la littérature (Baxevanis et al., 2013; Bezemer et al., 2012; Savva and Roger, 2013). A titre d'exemple, la combinaison des agonistes de TLR2 (Pam3CSK4) et de TLR3 (Poly:IC) montre que ceux-ci ont des propriétés d'adjuvant car ils activent les lymphocytes B. Cette activation se traduit par la surexpression des molécules de costimulation (CD80, CD86 et CD40), la production de TNF $\alpha$ , IL-6 et de CXCL1, et l'activation des lymphocytes T. L'utilisation de ces agonistes TLR *in vivo* lors d'une vaccination avec des antigènes de la grippe ou de l'anthrax augmente le titre d'anticorps sériques par rapport aux contrôles non vaccinés ou recevant les agonistes séparément. Utilisé seul, chaque agoniste augmente le titre d'anticorps en réponse à l'antigène de l'anthrax (Weir et al., 2017). Dans une approche de vaccination contre le cancer, Boks et al. ont montré en 2015 que les antigènes cancéreux (gp100) délivrés simultanément avec l'agoniste TLR4 (MPLA, monophosphoryl lipid A) dans des explants cutanés, induit une plus forte activation des DC CD14+, et augmente la capacité de ces cellules à activer les cellules T CD8<sup>+</sup> (Boks et al., 2015). La flagelline, agoniste du TLR5, présente également des propriétés d'adjuvant. Fougéron et al. 2015 ont montré que l'effet adjuvant de la flagelline dépend de l'interaction entre les cellules épithéliales et les cellules dendritiques. En effet, la co-administration de l'ovalbumine avec la flagelline par voie intranasale augmente le recrutement des DC dans le poumon, leur migration vers les ganglions médiastinaux et aboutit à booster la réponse anticorps spécifique (Fougéron et al., 2015).

Bien que l'activation de l'immunité innée soit généralement bénéfique voire nécessaire pour l'induction d'une défense immunitaire efficace, elle devient rapidement délétère lorsqu'elle n'est pas contrôlée. Ce phénomène est observé dans les pathologies inflammatoires chroniques dans lesquelles les effets néfastes de l'inflammation contre l'organisme lui-même deviennent prépondérants. Cela se manifeste par le développement de l'auto-immunité, l'altération des barrières physiques naturelles, ou encore l'anergie des

cellules immunitaires. Dans ce contexte, l'utilisation d'antagonistes pour bloquer l'activation continue des TLR peut s'avérer nécessaire (Savva and Roger, 2013).

Dans la BPCO, l'inflammation induite par la fumée de cigarette implique différents mécanismes et en premier lieu le stress oxydatif généré par ces composants de la fumée. Cependant, différents travaux montrent aussi la participation d'autres mécanismes impliquant la mobilisation de PRR directement par des composants présents dans la fumée ou indirectement par des signaux de dangers libérés suite à l'action du stress oxydatif. Ainsi, l'activation des PRR au niveau pulmonaire est associée au développement de la pathologie. Une surexpression de TLR4 et NOD1 au niveau bronchique a été observée chez des patients souffrant d'une BPCO modérée (GOLD I et II) ou sévère (GOLD II et IV) à l'état stable, corrélant positivement avec la colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* (Stefano et al., 2017). Le TLR9 est surexprimé dans les poumons de modèles murins de BPCO, et est associé au développement de la pathologie, puisque les souris déficientes pour TLR9 ont une fonction pulmonaire (capacité respiratoire, emphysème, compliance et élasticité tissulaire) plus altérée par rapport au contrôle (Foronjy et al., 2016). Au cours de cette étude, l'activation du TLR9 *in vitro* induit la production de protéases (MMP-2) et de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL5 et G-CSF) impliqués dans la pathogénèse de la BPCO. Ces effets adverses des TLR4 et TLR9 peuvent s'expliquer par l'abondance de leurs ligands dans l'environnement. Contrairement à ces observations, les études de Wang et ses collaborateurs sur des fumeurs non-BPCO et des patients BPCO montrent une diminution de l'expression de TLR5 chez les fumeurs non-BPCO, avec une diminution encore plus importante chez les patients BPCO (Wang et al., 2012b). A notre connaissance, il n'existe aucune étude sur le rôle de l'activation des TLR et plus particulièrement, de TLR5 au cours de l'exacerbation de la BPCO par les pathogènes.



## **II. OBJECTIFS**



## Objectifs de la thèse

Les patients BPCO présentent une susceptibilité accrue aux infections virales, bactériennes voire fongiques. Dans notre laboratoire, nous avons mis en évidence un défaut de réponse IL-17 / IL-22 par les lymphocytes au cours de l'exacerbation de la BPCO induite par les bactéries. Une altération de la fonction des APC a été rapportée suite à l'exposition à la fumée de cigarette. Actuellement, il n'existe aucun traitement efficace contre ces exacerbations dues aux microorganismes. Avec pour finalité de proposer de nouvelles approches thérapeutiques, cette thèse vise à préciser les mécanismes de cette susceptibilité aux infections en contexte BPCO et en particulier, à définir le mécanisme conduisant au défaut de réponse IL-17/IL-22.

Nos objectifs sont répartis en trois thèmes :

### **7. Objectif 1 : Comprendre les mécanismes cellulaires responsables du défaut de production d'IL17 et d'IL-22 au cours de l'infection chez les souris BPCO**

Les données antérieures du laboratoire montrent que l'infection par *S. pneumoniae* induit un recrutement des cellules lymphoïdes innées (ILC) comme les ILC3, les cellules NK, les NKT et les  $T\gamma\delta$  vers le poumon. Ces cellules étant éduquées par les APC, notamment les DC, pour produire les cytokines Th17. Dans un premier temps, nous allons évaluer les mécanismes de recrutement de ces lymphocytes innés après l'infection chez les souris « BPCO », comparativement aux souris contrôles « AIR ». Ensuite, la production des cytokines polarisantes et l'expression des molécules de costimulation aussi bien par les lymphocytes que par les APC seront analysées. En parallèle, nous allons appréhender le rôle des APC en analysant la capacité des principales sous-populations d'APC à induire l'expression de l'IL-17 et IL-22.

Ces données aboutiront à définir le mécanisme cellulaire et moléculaire responsable du défaut de réponse IL-17/ IL-22 chez les souris BPCO.

### **8. Objectif 2 : Evaluer le rôle des cytokines immuno-régulatrices de la famille IL-20 (IL-19, IL-20, IL-24) sur la susceptibilité à l'infection.**

Il a été décrit que dans un contexte infectieux, les cytokines de la famille de l'IL-20 (IL-19, IL-20, IL-24) sont capables de réprimer l'expression des cytokines Th17 et la réponse antibactérienne. Cependant leur rôle dans l'exacerbation de la BPCO demeure inconnu. Dans un premier temps, une analyse de leur expression sera effectuée dans notre modèle d'exacerbation de la BPCO par RT-qPCR. Leur rôle dans l'exacerbation sera défini en

administrant des anticorps neutralisants ces cytokines IL-20, en ciblant la sous-unité commune IL-20RB. Comme les DC constituent une cible majeure des cytokines IL-20, l'impact de ces cytokines sur la fonction des DC au cours d'une réponse anti-bactérienne sera évalué *in vitro* en utilisant des DC dérivées de monocytes humains (MDDC).

Ces données permettront d'avoir des précisions sur les mécanismes moléculaires contrôlant la susceptibilité à l'infection au cours de la BPCO.

### **9. Objectif 3 : Etudier une approche de restauration de la réponse Th17 chez les souris BPCO infectées et limitation du développement de l'exacerbation**

L'objectif de nos recherches étant de proposer de nouveaux traitements contre les exacerbations de la BPCO, l'impact d'un immunostimulant susceptible de restaurer la réponse Th17 sera mesuré. Dans notre laboratoire, la flagelline s'est avérée être efficace pour promouvoir la réponse Th17 à l'infection (Van Maele et al., 2010). Cet immunostimulant, agoniste de TLR5, sera donc étudié dans un contexte d'exacerbation de la BPCO. L'efficacité du traitement sur la limitation de l'infection et l'exacerbation de la pathologie (inflammation et remodelage pulmonaire) sera étudiée. Enfin, nous allons étudier le potentiel d'une thérapie combinant la flagelline et l'anticorps neutralisant les cytokines IL-20 (anti-IL-20RB) dans l'exacerbation de la BPCO.

### **III. MATERIELS & METHODES**



### 10. Modèles murins d'exacerbation de la BPCO par Sp et NTHi

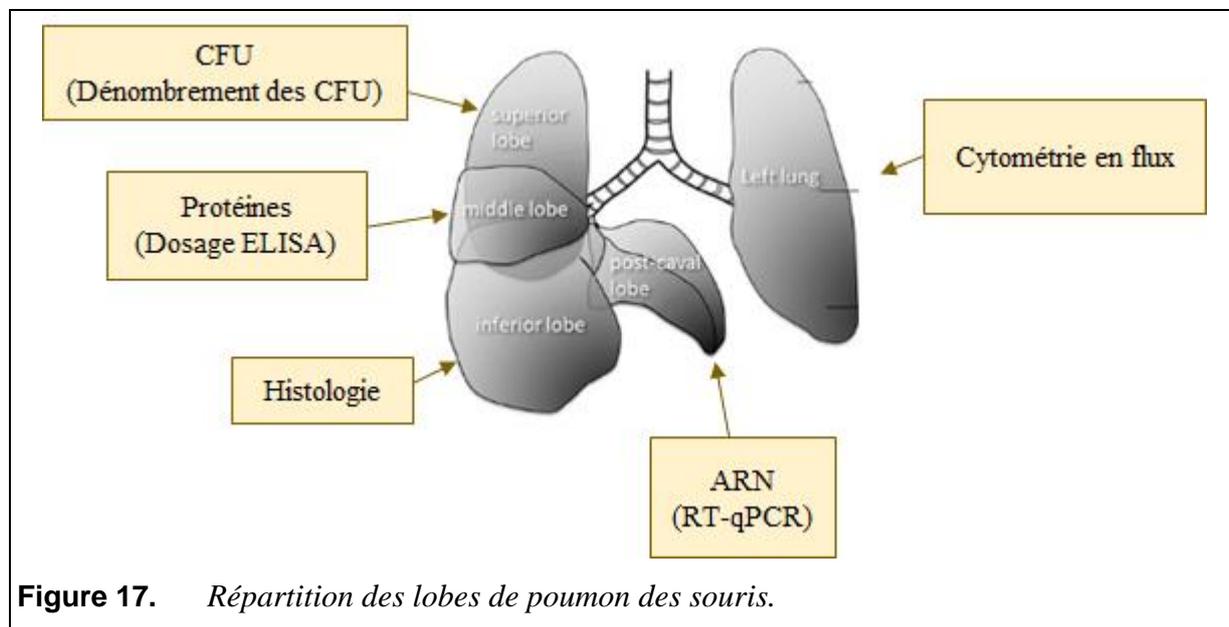
Toutes les expériences chez la souris ont été réalisées en accord avec la réglementation Européenne et française sur l'expérimentation animale. Le modèle murin de BPCO a été établi par exposition chronique à la fumée de cigarette comme décrit précédemment (Pichavant et al., 2014). Brièvement, des souris C57Bl/6 mâles sont exposées à 5 cigarettes (3R4F, University of Kentucky) par jour, 5 jours par semaine, pendant 12 semaines. Au bout de ces 12 semaines d'exposition, les souris présentent les symptômes associés à la pathologie, soit un déclin de la fonction respiratoire, une inflammation chronique et un emphysème.

Pour exacerber la BPCO, les souris reçoivent soit une dose sub-létale de  $4 \times 10^5$  CFU de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 1 (Sp1) ou  $2,5 \times 10^6$  CFU de NTHi (Non typeable *Haemophilus influenzae*) par voie intranasale après anesthésie (en i.p. par 150  $\mu$ l de solution contenant du xylazine (2.33 mg/ml, Bayer Santé, Loos, France) et de la kétamine (80 mg/ml, Merial, Lyon, France) en PBS). Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) les poumons, le sang et la rate sont récupérés à différents temps après l'infection pour analyse.

### 11. Récupération et préparation des échantillons murins

Aux temps indiqués, les souris sont sacrifiées. Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) est réalisé dans 5 fois 0,5  $\mu$ l de PBS 2% SVF. Les 2 premiers lavages sont récupérés pour le dénombrement de la charge bactérienne (comptage du nombre de CFU, par étalement sur gélose chocolat) et le dosage ELISA (surnageant). Les cellules des 5 lavages sont rassemblées pour la lyse des globules rouges et caractérisation par cytométrie en flux. Le sang est récupéré au niveau de la veine cave pour le comptage des CFU et le dosage de protéines dans le sérum. La rate est récupérée pour en PBS 2%SVF et écrasée entre deux filtres. Après lyse des globules rouges, les cellules sont analysées par cytométrie en flux, restimulées *ex vivo* avec les bactéries inactivées (1/100 de  $10^6$  CFU/ml de Sp1 ou  $10^{11}$  CFU/ml de NTHi) ou l'anti-CD3, ou utilisées pour la purification de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Les lobes de poumon sont récupérés séparément (voir **figure 17**). Le lobe destiné à la cytométrie et la culture est haché, digéré avec la collagénase IV (1mg/ml) pendant 30min au bain marie à 37°C, avec homogénéisation avec une seringue et une aiguille 18G à 15min et 30min de digestion, puis la digestion est arrêtée par dilution en PBS 2%SVF. Les cellules sont reprises et centrifugées sur gradient de percoll 30% pour éliminer les débris. Les globules rouges sont lysés, et les cellules sont soit marquées pour la cytométrie en flux, soit mises en culture pour réstimulation *ex vivo*. Le lobe CFU est pris en PBS 2%SVF, homogénéisé pour la numération bactérienne. Le lobe d'histologie est repris en PFA 4%. Les lobes ARN et protéines sont immédiatement

congelés à sec dans l'azote liquide, puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant extraction des ARNm totaux (pour RT-qPCR) et des protéines (pour dosage ELISA) respectivement.



**Figure 17.** Répartition des lobes de poumon des souris.

### 12. Préparation des bactéries

Les bactéries *Streptococcus pneumoniae*, Sp1 (isolat clinique E1586, du laboratoire national de référence, ministère de la santé, Uruguay) sont cultivées sur milieu Todd-Hewitt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) à 2% sérum de veau fœtal (SVF) jusqu'à la phase exponentielle dont la densité optique à 600nm est de 0,5 unité ( $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,5$ ), correspondant à  $10^8$  CFU/ml, à  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Les bactéries sont lavées en PBS 1x et stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  en THYB 12% glycérol pour une durée maximale de 3 mois.

Les bactéries *Haemophilus influenzae* non typable (NTHi), souche 3224A sont cultivées en milieu BHI (brain-heart infusion) supplémenté de de  $10\mu\text{g/ml}$  d'hématine et  $10\mu\text{g/ml}$  de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) jusqu'à la phase exponentielle de croissance ( $\text{D.O}_{600\text{nm}}=0,7$  à  $0,8$ ). Les bactéries sont ensuite laver en PBS 1x et stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  en BHI 10% glycérol pour une durée maximale de 3 mois.

### 13. Culture cellulaire *Ex vivo*

Afin d'évaluer la capacité des cellules pulmonaires et des splénocytes à produire les cytokines Th17 en réponse aux pathogènes,  $0,5 \times 10^6$  cellules sont mise en culture en plaques 96puits fond plat (Thermo Scientific) à  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 80% d'humidité, dans du RPMI complet (Gibco® RPMI 1640, 10% SVF, 2mM L-glutamine, 50 UI pénicilline, 50 UI

streptomycine) dans un volume final de 200µl. Les cellules sont soit incubées seules, soit avec, l'anticorps anti-CD3 (les plaques sont pré-incubées avec l'anti-CD3, lavées avant culture). Les cytokines Th17 sont dosées dans les surnageants après 72h de culture.

L'analyse de la fonction des APC triées *ex vivo* est effectuée par culture de  $2 \times 10^4$  APC seules ou avec  $10 \times 10^4$  lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (isolés à partir des rates) purifiés sur billes magnétiques MACS, dans un volume final de 200µl. La production des cytokines Th17 est mesurée dans les surnageant après 72h de culture.

### **14. Purification des monocytes et lymphocytes humains, différenciation des monocytes en DC**

Le sang total de volontaires sains (obtenu à l'EFS de Lille ou au centre de bilan de santé de l'Institut Pasteur de Lille, après consentement éclairé) est centrifugé 400g pendant 15 min à température ambiante pour éliminer les plaquettes, puis fractionné par gradient de Ficoll-paque Plus (GE Healthcare) afin de récupérer les cellules mononucléées (CMN). Des kits de billes MACS (Miltenyi Biotec) ont été utilisés pour sélectionner positivement les monocytes CD14<sup>+</sup> (billes anti-CD14) et négativement les lymphocytes T (Pan T cell isolation kit II) selon le protocole du fournisseur. Les lymphocytes sont immédiatement congelés à -80°C dans du milieu de congélation (90% SVF, 10% DMSO) pendant 7 jours. Les monocytes CD14<sup>+</sup> sont différenciés en DC dans des plaques 6 puits (Thermo Scientific™ Nunc™) pendant 6 jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 80% d'humidité, dans du RPMI complet (Gibco® RPMI 1640, 10% SVF, 2 mM L-glutamine, 50 UI pénicilline, 50 UI streptomycine), en présence de GM-CSF (25 ng/ml) et IL-4 (10 ng/ml) comme décrit par Sallusto et Lanzavecchia (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Deux tiers du milieu sont renouvelés après 3 jours d'incubation.

### **15. Préparation de l'extrait de fumée de cigarette (CSE)**

Le CSE est préparé comme décrit par Blue et Janoff (Blue and Janoff, 1978). La fumée de 2 cigarettes (3R4F, University of Kentucky) est aspirée via le filtre avec deux seringues 50 ml, et bullée dans 10 ml de milieu de base de cellules épithéliales des voies respiratoires (PromoCell). Les seringues sont rincées pour récupérer les dépôts de fumée de cigarette. L'extrait est ensuite filtré à travers un filtre de 0,22 µm (Millex®GS) et utilisé immédiatement au 1/50<sup>ième</sup> (dose optimale testée pour induire une activation cellulaire sans entraîner de mort cellulaire).

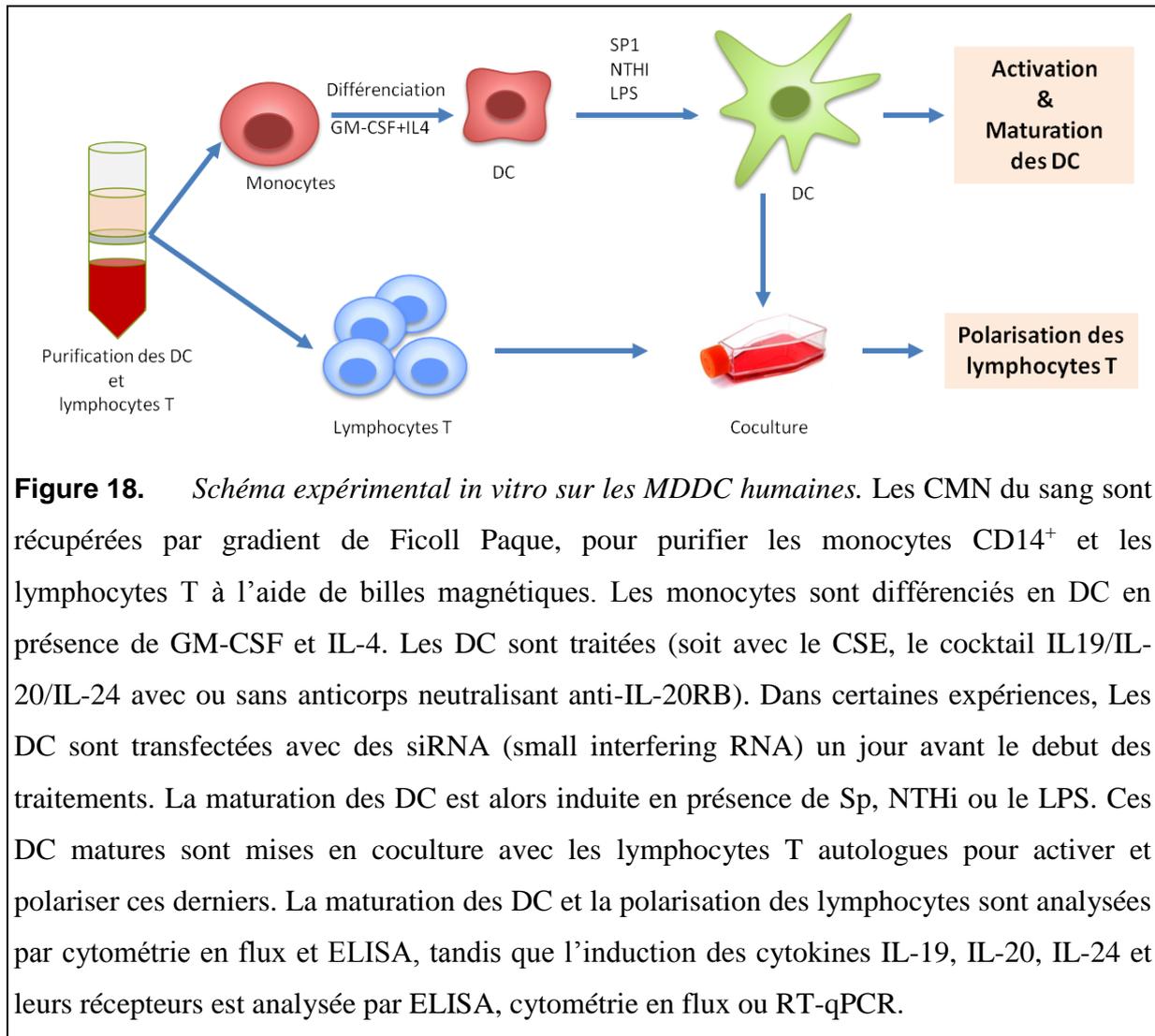
### 16. Stimulation et infection des DC, coculture avec les lymphocytes T autologues

La procédure expérimentale sur les MDDC est résumée sur la **figure 18**. A 6 jours de différenciation, les cellules sont récupérées après incubation 15min sur glace (pour décoller les cellules adhérentes), lavées, puis  $6 \times 10^5$  cellules sont réparties en plaques 24 puits (Thermo Scientific™ Nunc™) dans 600 $\mu$ l. Les cellules sont infectées avec 2 MOI (Multiplicity of infection) de Sp ou activées avec 1  $\mu$ g/ml de LPS (lipopolysaccharide de surface de *E. coli*, de type 011B4, Sigma).

Pour analyser l'effet du CSE ou des cytokines IL-20, les DC sont traitées, 3h avant infection ou activation, avec du CSE dilué au 1/50, les cytokines IL-20 20ng/ml (Peprotech), ou comme indiqué sur les figures. Dans le but de déterminer l'intérêt thérapeutique du ciblage des cytokines IL-20 dans l'infection, les DC sont soit prétraitées avec 10 $\mu$ g/ml d'anticorps neutralisant IL-20RB (eBiosciences) 15min avant traitement par cytokines IL-20, soit transfectées (lipofectamine, invitrogen) au 5<sup>ème</sup> jour de différenciation avec des si-RNA contrôles (ambion) ou spécifiques aux différentes sous-unités de récepteurs IL-20 (ambion). Afin d'étudier l'importance des voies STAT3, les DC sont prétraitées avec l'inhibiteur de STAT3 (2,5 $\mu$ M de STA-21, Santa Cruz Biotechnology).

Les DC sont soit incubées pendant 6 heures à partir du traitement CSE ou cytokines IL-20, reprises dans 500 $\mu$ l de Trizol (TRIzol™ Reagent, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) et congeler à -20°C jusqu'à l'extraction d'ARN ; soit incubées 24 h 37°C 5% CO<sub>2</sub>, 80% humidité pour permettre la maturation. Les surnageants sont récupérés et conservés à -20°C pour le dosage ELISA.

Pour la coculture, les DC activés ou infectés sont décrochées par incubation sur la glace et lavées.  $6 \times 10^4$  DC matures sont mises en coculture dans 500 $\mu$ l final, en plaques 48 puits (Thermo Scientific™ ou Sarstedt) avec  $10^6$  lymphocytes T autologues pendant 6 jours, en milieu RPMI complet à 37°C 5% CO<sub>2</sub>, 80% humidité. Les surnageants de coculture sont récupérés et conservés à -20°C jusqu'au dosage ELISA. Les cellules sont ensuite lavées et restimulées 6h avec 100nM PMA, 1  $\mu$ M ionomycine, 10  $\mu$ g/ml Bréfeldine A (BD GolgiPlug™, inhibiteur de la sécrétion des cytokines en milieu extracellulaire). La production des cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ ) et Th17 (IL-17, IL-22) est analysée par cytométrie en flux grâce à un marquage intracellulaire.



**Figure 18.** Schéma expérimental in vitro sur les MDDC humaines. Les CMN du sang sont récupérées par gradient de Ficoll Paque, pour purifier les monocytes CD14<sup>+</sup> et les lymphocytes T à l'aide de billes magnétiques. Les monocytes sont différenciés en DC en présence de GM-CSF et IL-4. Les DC sont traitées (soit avec le CSE, le cocktail IL19/IL-20/IL-24 avec ou sans anticorps neutralisant anti-IL-20RB). Dans certaines expériences, Les DC sont transfectées avec des siRNA (small interfering RNA) un jour avant le début des traitements. La maturation des DC est alors induite en présence de Sp, NTHi ou le LPS. Ces DC matures sont mises en coculture avec les lymphocytes T autologues pour activer et polariser ces derniers. La maturation des DC et la polarisation des lymphocytes sont analysées par cytométrie en flux et ELISA, tandis que l'induction des cytokines IL-19, IL-20, IL-24 et leurs récepteurs est analysée par ELISA, cytométrie en flux ou RT-qPCR.

## 17. Cytométrie en flux

Pour le marquage extracellulaire, les cellules reprises dans du PBS 2% SVF sont incubées avec les cocktails (voir **tableaux 4 et 5**) d'anticorps pendant 30 min à 4°C à l'abri de la lumière, puis lavées une fois avant de les fixer avec du PBS 0,25% paraformaldéhyde (PFA). Le marquage intracellulaire est effectué avec le kit CytoFix/CytoPerm de BD selon le protocole du fournisseur. Après marquage extracellulaire et fixation, les cellules sont perméabilisées et incubées avec les anticorps (voir **tableaux 5**) ou isotypes contrôles pendant 30 min à 4°C à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées deux fois dans du tampon PermWash, puis resuspendues dans du PBS 0,25% PFA. L'acquisition est réalisée sur le cytomètre en flux BD LSR Fortessa™, les données sont analysées avec le logiciel Flowjo (FlowJo™ software v7.6.5 (Stanford, CA, USA)).

**Tableau 4 :** Liste des anticorps murin et fluorochromes utilisés pour la cytométrie en flux.

Anticorps APC	Anticorps Lymphocytes
FITC-Iab	FITC-NK1.1
PE-F4/80	PE-TET
PerCP-Cy5.5-CD103	PerCP-Cy5.5-TCRgd
PE-Cy7-CD11c	APC-CD25
APC-CCR2	AF700-CD69
AF700-CD86	APC-Cy7-CD4
APC-H7-Ly6G	V450-TCRb
V450-CD11b	V500-CD8
V500-CD45	BV605CD45
BV570-Ly6C	

**Tableau 5 :** Liste des anticorps humains et fluorochromes utilisés pour la cytométrie en flux.

Anticorps	
AF700-CD4	FITC-IFN $\gamma$
APC-CD40	PE-CCR7
APC-CD83	PE-CD80
APC-H7-CD45	PE-Cy5.5-HLA-DR
APC-IL-17	PE-IL-22
FITC-B7H1	V450-CD3
FITC-CD86	V500-CD8

### 18. Dosage ELISA

Les cytokines sont dosées suivant les protocoles des fournisseurs. Les kits de dosage humains hTNF $\alpha$ , hIL-1 $\beta$ , hIL-12p70, hIL-6, hIL-23 hIFN $\gamma$  et hIL-17, et murin mIL-1 $\beta$ , sont de chez eBiosciences. Les kits humains hIL-19, hIL-24, hIL-8 et hIL-22 et murins TNF $\alpha$  et CXCL1 sont de chez R&D System. La révélation a été faite par colorimétrie avec HRP-TMB, et la différence d'absorbance 450 nm - 570 nm est mesurée avec le lecteur de plaque (Thermo Scientific Multiskan FC).

### 19. Extraction d'ARN

Les ARN totaux des DC humaines et des poumons de souris sont repris dans du trizol et extraits à température ambiante avec 100 µl de chloroforme 3 min, précipités 10 min avec 250µl d'alcool isopropylique 90%, lavés avec de l'éthanol 75%, séchés à l'air et repris dans 30µl d'eau. L'ARN est quantifié par spectrophotométrie (NanoVue™, GE healthcare life sciences) à 260 nm. Afin d'estimer la pureté de l'ARN, le ratio 260/280 nm est mesuré. 2 µl d'ARN sont également fait migrer sur gel d'agarose à 0.8% contenant 5 µl de Redsafe nucleic acid staining solution (Interchim).

### 20. Reverse transcription et PCR quantitative (RT-qPCR)

1µg d'ARN purifié a été transcrit en ADN complémentaire (cDNA) avec le kit Applied Biosystem suivant les consignes du fournisseur, dans 10 µl de volume réactionnel. Le cDNA est dilué 15 fois, et amplifié par 40 cycles avec le kit Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), en présence d'amorces Sens et Anti-Sens (**Tableau 6**). La β-actine et la GAPDH ont été utilisées comme gènes de références pour les cDNA humains et murins respectivement.

**Tableau 6 :** Séquences des amorces Sens et Anti-Sens utilisées en qPCR.

	Primers humains	
	Sens	Anti-Sens
hβ- Actine	5'-TCCTCACCTGAAGTACCCCA-3'	5'-AGCCACACGCAGCTCATTGT-3'
hIL-19	5'- ATCCAAGCTAAGGACACCTTCC-3'	5'- GTCACGCAGCACACATCTAAG-3'
hIL-20	5'- TTTTCTGAGATACGGGGCAGT-3'	5'- GTCTTAGCAAATGGCGCAGGA-3'
hIL-24	5'- CAACTGCAACCCAGTCAAGAAA-3'	5'- TGCTCTCCGGAATAGCAGAAA-3'
hIL-22Ra	5'-TCTTCCATGACCTGTTCTACCA-3'	5'- CTCTGCTTCCCTCCAAGGT-3'
hIL-20Ra	5'-CCCCAGTTTGAGTTCCTTGT-3'	5'-GAATACCCCCACTCCTCACC-3'
hIL-20Rb	5'-CAACATGAAGCATCTCTTGA-3'	5'- CACCTCCACACATTCTGTCT-3'
	Primers murins	
mGAPDH	5'- TGCCCAGAACATCATCCCTG-3'	5'- TCAGATCCACGACGGACACA-3'
mIL-19	5'-CTCCTGGGCATGACGTTGATT -3'	5'- GCATGGCTCTCTTGATCTCGT -3'
mIL-20	5'- TCTTGCCTTTGGACTGTTCTCC-3'	5'- GTTTGCAGTAATCACACAGCTTC-3'
mIL-24	5'- AGAACCAGCCACCTTCACAC-3'	5'- GTGTTGAAGAAAGGGCCAGT-3'



## **IV. RESULTATS**



### **21. Objectif 1 : Les mécanismes cellulaires responsables du défaut de production d'IL17 et d'IL-22 au cours de l'infection chez les souris BPCO.**

#### **21.1. Le défaut de réponse IL-17 et IL-22, et de la clairance bactérienne au cours de la BPCO impliquent une altération de la fonction des macrophages et des DC.**

(Voir annexe n°1 pour plus de détail)

Une altération des mécanismes de défense a été rapportée dans la BPCO en mettant en évidence notamment des altérations de la réponse immune innée et adaptative. En particulier, une anomalie de la barrière épithéliale, une hyper-sécrétion de mucus et un défaut de phagocytose par les macrophages alvéolaires ont été mis en évidence au cours de la BPCO. Le système immunitaire est quant à lui soumis à une activation chronique (en particulier des LcT et des ILC) due à l'inflammation persistant dans le poumon. Cette activation chronique pourrait être à l'origine d'une désensibilisation de ces cellules notamment vis à vis des bactéries. L'IL-17 et l'IL-22 sont 2 cytokines préalablement impliquées dans le développement de la BPCO (Pichavant et al., 2014) et qui jouent également un rôle clé dans la défense anti-bactérienne, en particulier vis à vis de *S. pneumoniae*. Nous formulons l'hypothèse que la production de ces cytokines en réponse à Sp serait défectueuse, un défaut de production potentiellement due à une altération de la fonction des APC. Pour cela, des souris BPCO (exposées chroniquement à la fumée de cigarette) sont infectées avec la bactérie et comparées aux contrôles exposées à l'air ambiant. Avant d'étudier la régulation et l'importance de la réponse IL17 et IL-22 dans l'exacerbation de BPCO par l'infection, nous avons confirmé que notre modèle expérimental d'exacerbation de la BPCO par *S. pneumoniae* est également associé à une susceptibilité à l'infection, caractérisée par un défaut d'élimination de la bactérie. Pendant que les contrôles survivent à la dose de  $5 \times 10^5$  CFU, cette dose est létale au bout de 6 jours pour les souris BPCO, qui ne survivent qu'à  $5 \times 10^4$  CFU, avec un retard de clairance bactérienne et une bactériémie par rapport aux contrôles. Après avoir analysé la réponse IL-17/IL-22, nous avons mesurée la fonction des APC pulmonaires (macrophages alvéolaires et DC) dans ce contexte d'exacerbation de la BPCO.

Enfin, la réponse cytokinique à un challenge bactérien des cellules mononucléées périphériques (CMN) de patients BPCO a été évaluée *in vitro* en comparaison avec des sujets fumeurs et des sujets non-fumeurs sans pathologie déclarée. Pour cela, les CMN de ces

différents donneurs sont infectées avec *S. pneumoniae* (MOI = 2). La production des cytokines pro-Th17 et Th17 est mesurée dans le surnageant de culture.

### Principaux résultats

L'évaluation de la réponse inflammatoire et de la production d'IL-17 et d'IL-22 chez les souris BPCO montre que de façon générale, l'infection est associée à une exacerbation de l'inflammation, notamment à un influx de neutrophile dans les poumons et les LBA. L'analyse de la production d'IL-17 et IL-22 montre un défaut de production de ces cytokines dans le LBA et par les cellules pulmonaires, mais aussi par les cellules innées telles que les ILC, les cellules NK et NKT.

Afin de comprendre les mécanismes de cette altération de réponse IL-17 et IL-22, la capacité des principales populations d'APC pulmonaires à induire ces cytokines a été étudiée. Pour cela, nous avons isolé (par cytométrie en flux) chez des souris « AIR » et « BPCO » infectées, les macrophages et les DC. La production des cytokines pro-Th17 a été analysée dans les surnageants de culture *ex-vivo*. L'expression de molécules de costimulation a également été mesurée par cytométrie. Contrairement aux souris contrôles, les macrophages et les DC des souris BPCO présentent *ex-vivo* un défaut de production de cytokines pro-Th17 (IL-1 $\beta$  et IL-23). Aucun changement significatif n'a été observé lors de l'analyse des molécules de costimulation. L'analyse de la fonction de ces cellules issues de souris infectées par *S. pneumoniae* a permis de confirmer que les macrophages et les DC pulmonaires de souris chroniquement exposées à la fumées de cigarette ont une capacité altérée à activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, se traduisant par leur incapacité à activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *ex-vivo*.

Ces données ont été validées chez des patients BPCO, en comparaison aux sujets fumeurs et non-fumeurs. En effet, les cellules mononucléées (CMN) des patients BPCO présentent un défaut de production d'IL-1 $\beta$ , d'IL-23, d'IL-17 et d'IL-22 lorsqu'elles sont infectées par *S. pneumoniae* contrairement aux fumeurs et/ou non-fumeurs.

Ces résultats montrent que la fonction des cellules présentatrices d'antigènes, en particulier les macrophages et les DC, est altérée dans la BPCO et que ce phénomène serait, au moins en partie responsable du défaut de réponse IL-17 et IL-22 au cours de l'exacerbation de la BPCO.

### 21.2. L'exposition à la fumée de cigarette altère la maturation et la fonction DC *in vitro*

(Voir annexe n°2 pour plus de détail)

La fumée de cigarette est le principal facteur étiologique de la BPCO (environ 80%). Ce polluant atmosphérique comporte plus de 4000 composés chimiques dont environ 250 sont reconnus comme dangereux (WHO, 2017) et est susceptible de moduler la réponse immunitaire. Parmi les mécanismes de modulation de la réponse immunitaire par la fumée de cigarette, il y a l'altération de la phagocytose (Noda et al., 2013), le stress oxydatif dus aux dérivées réactives de l'oxygène et la modulation du niveau d'activation des cellules immunitaires (Qiu et al., 2017). Nous nous sommes donc intéressés à l'effet d'un contact direct avec la fumée de cigarette sur la réponse des DC à un challenge bactérien *in vitro*, en travaillant sur les DC dérivées de monocytes humaines (MDDC). La maturation et la fonction des MDDC ont été étudiées, ainsi que l'importance du stress oxydatif, l'endocytose des bactéries et la bactéricidie, suite à l'exposition à la fumée de cigarette.

Le contact des MDDC avec l'extrait de fumée de cigarette (CSE) se traduit par une altération de leur maturation en réponse à *S. pneumoniae*. En comparaison aux MDDC non traitées, celles traitées avec le CSE montrent une expression plus faible de molécules de costimulation (CD83, CD86, CD80, CD40 et CD54) et produisent moins de cytokines pro-Th1 (IL-12, TNF $\alpha$ ) et pro-Th17 (IL-6 et IL-23). Lorsque ces MDDC exposées au CSE sont mises en coculture avec les lymphocytes T, elles ont une capacité réduite d'activation et de polarisation des lymphocytes T. Par ailleurs, la supplémentation des MDDC exposées à la fumée de cigarette avec l'IL-12 et l'IL-23 lors de la coculture avec les cellules T, améliore leur capacité à induire la production de cytokines Th1 et Th17 respectivement ; indiquant le rôle au moins partiel de ces cytokines dans l'altération de la réponse antibactérienne par la fumée de cigarette. Cette altération de la fonction des MDDC n'était pas due au stress oxydatif généré par la fumée de cigarette, puisque l'utilisation d'inhibiteur du stress oxydatif aussi bien au niveau cytoplasmique qu'au niveau mitochondrial ne permet pas de restaurer la fonction des MDDC traitées avec le CSE. Enfin, l'analyse de l'endocytose et de la bactéricidie des MDDC traitées avec le CSE montre que la phagocytose des bactéries est augmentée tandis que la bactéricide tend à être diminuée.

Ces résultats montrent que la fumée de cigarette cible directement les DC, sur lesquelles, elle inhibe la réponse antibactérienne en inhibant leur maturation, et leur fonction

## **Résultats : Objectif 1**

(induction de réponse Th17 et fonction bactéricide). Ces données confirment le rôle direct de la fumée de cigarette dans l'altération de la réponse immunitaire chez les sujets fumeurs et potentiellement au cours de la BCPO. L'utilisation d'antioxydants initialement présentés comme de nouvelles approches thérapeutiques dans la BPCO ne permet pas de bloquer cet effet du CSE.

### 22. Objectif 2 : Evaluer le rôle des cytokines immuno-régulatrices de la famille IL-20 (IL-19, IL-20, IL-24) sur la susceptibilité à l'infection.

#### 22.1. Contexte

La BPCO est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes. Le tabagisme est le facteur de risque principal de développer une BPCO. La progression de la pathologie est liée en premier lieu, à la poursuite de l'exposition tabagique et secondairement, à la survenue d'exacerbations. Les infections sont responsables de 80% des épisodes d'exacerbation, particulièrement les infections bactériennes responsables de 50% de ces épisodes (Christensen et al., 2008; Kim et al., 2008). En utilisant notre modèle d'exacerbation de la BPCO par *S. pneumoniae*, nous avons analysé le rôle des altérations de la réponse immune innée dans la susceptibilité à l'infection. Cela nous a permis de mettre en évidence un défaut de production d'IL-17 et d'IL-22 en réponse à l'infection (brevet # EP 13305916.2). Ce déficit participe au défaut de clairance de la bactérie puisque ces cytokines participent au recrutement pulmonaire de polynucléaires neutrophiles, à la production de peptides anti-microbiens et à la régénération de l'épithélium respiratoire (Ivanov et al., 2012, 2013; Lu et al., 2008; Marqués et al., 2012; Zhang et al., 2009). Ce défaut de réponse est lié à une altération de la fonction des APC pulmonaires. Notre deuxième objectif secondaire est maintenant d'identifier des facteurs susceptibles de bloquer le développement de la réponse IL-17/IL-22 et en particulier la capacité des APC à induire cette réponse cytokinique.

En parallèle avec cette observation, il a été décrit que les cytokines de la famille de l'IL-20 (IL-19, IL-20, IL-24) sont capables de réprimer l'expression des cytokines Th17 et la réponse antibactérienne dans un modèle d'infection cutanée à *Staphylococcus aureus*. Cette action est due à un défaut de production d'IL-1 $\beta$  (une cytokine pro-Th17) par les kératinocytes (Myles et al., 2013). Cependant leur rôle dans les infections respiratoires bactériennes ou au cours de l'exacerbation de la BPCO demeure inconnu. Ces cytokines très proches structurellement de l'IL-22, ont pour principales cibles l'épithélium mais également, les cellules myelo-monocytaires. Des travaux récents montrent qu'elles expriment toutes ou une partie de ces cytokines, que les récepteurs de ces cytokines sont présents sur les DC et les macrophages et qu'elles peuvent moduler la fonction des DC, en particulier leur migration (Bech et al., 2016). Dans un premier temps, une analyse de leur expression sera effectuée dans notre modèle d'exacerbation de la BPCO par RT-qPCR. Leur rôle dans l'exacerbation sera défini en administrant des anticorps neutralisants la fonction de ces cytokines IL-20, en

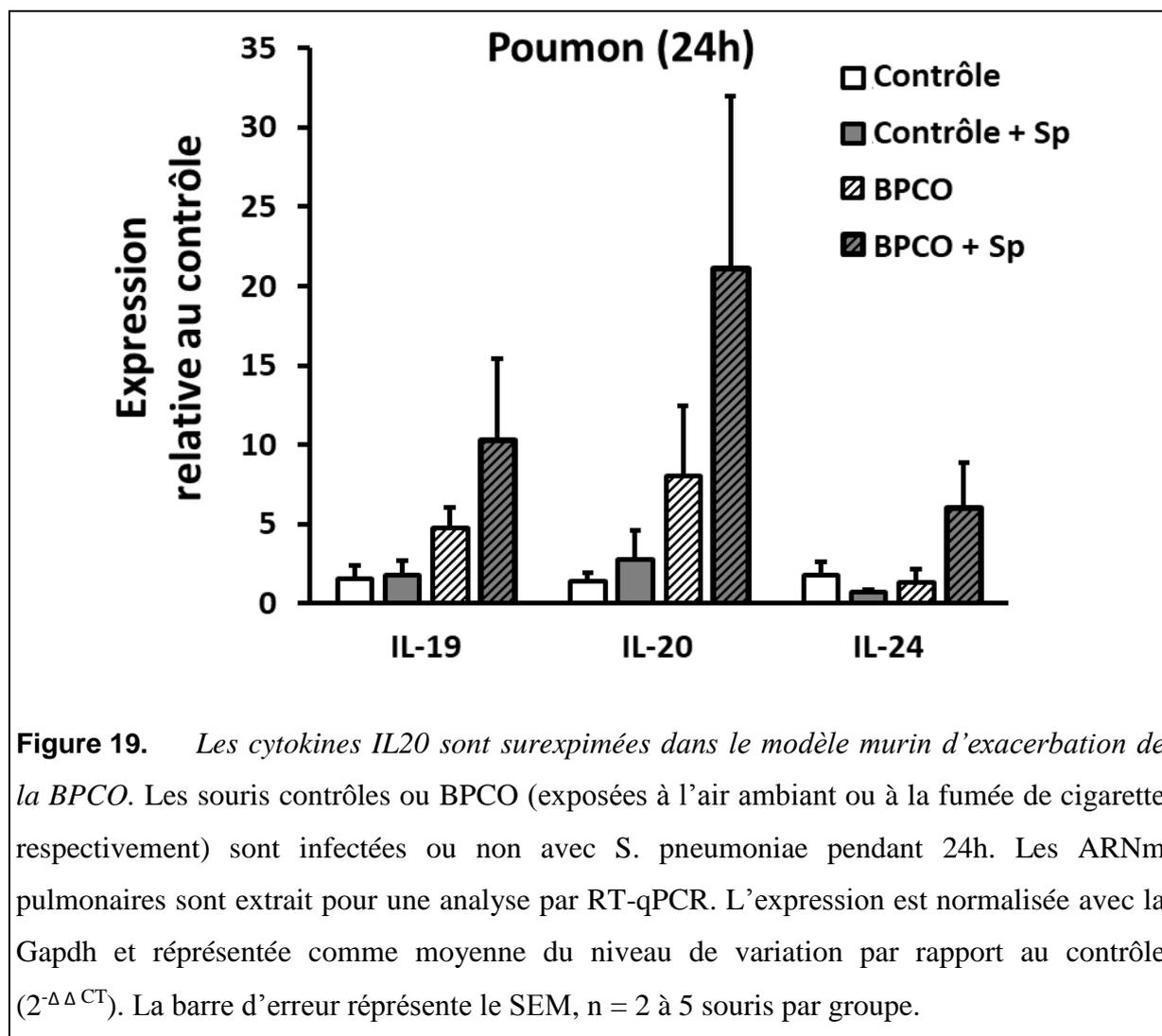
ciblant la sous unité IL-20RB commune aux 2 types de récepteur. Comme les DC constituent une cible potentielle des cytokines IL-20, l'impact de ces cytokines sur la fonction des DC au cours d'une réponse anti-bactérienne sera évalué *in vitro* en utilisant des DC dérivées de monocytes humains (MDDC). Nous analyserons l'expression des cytokines IL-20 et leurs récepteurs par ces MDDC suite à l'exposition à l'extrait de fumée de cigarette (CSE) et ou à des bactéries *S. pneumoniae* et NTHi. Nous étudierons ensuite l'effet d'un prétraitement des MDDC avec ces cytokines sur leur maturation (production de cytokines polarisantes pro-Th17 et pro-Th1, expression de molécules de costimulation), et leur capacité à polariser une réponse Th1 ou Th17 dans des lymphocytes T naïfs. Enfin, nous nous intéresserons aux voies de signalisation de ces cytokines, notamment la voie STAT3, en utilisant un inhibiteur de cette voie.

Ces données permettront d'avoir des précisions sur les mécanismes moléculaires contrôlant la susceptibilité à l'infection au cours de la BPCO et, potentiellement, de pouvoir proposer de nouvelles approches thérapeutiques dans ce contexte.

### **22.2. L'exposition chronique à la fumée de cigarette et l'infection bactérienne sont associées à une surexpression des cytokines IL-20**

Les cytokines IL-20 sont surexprimées dans les pathologies inflammatoires et infectieuses. Nous avons donc commencé par évaluer l'expression de ces cytokines dans notre modèle de souris BPCO en base et au cours d'une infection par *S. pneumoniae*, en comparaison aux souris contrôles exposées à l'air ambiante. La quantification des ARNm totaux pulmonaires montre que les souris BPCO (chroniquement exposées à la fumée de cigarette) ont une expression d'IL-19 et d'IL-20 élevé en base (**Figure 19**). Suite à l'infection. Une faible augmentation des ARNm d'IL-20 est également observer dans les poumons de souris contrôles infectées (avec la dose de  $4 \times 10^5$  CFU, sub-létale pour les souris BPCO). Lorsqu'on utilise cette dose sub-létale pour exacerber la pathologie chez les souris BPCO, on observe un effet cumulatif de la BPCO et de l'infection sur l'expression d'IL-19 et d'IL-20, ainsi qu'une surexpression d'IL-24. Des études réalisées dans le cadre d'un autre projet de thèse dans le laboratoire montrent que les récepteurs IL-20RA, IL-20RB et IL-22RA des cytokines IL-20 sont toutes exprimés au niveau pulmonaire (données non montrées). L'analyse après infection montre que l'expression de l'IL-20RB dans l'épithélium respiratoire est augmentée dans ce contexte alors les deux autres chaînes ne sont pas modulées.

Ces premiers résultats montrent que comme rapporté dans la littérature pour d'autres pathologies inflammatoires (psoriasis, arthrite rhumatoïde) et infectieuses (infections cutanées), les cytokines IL-20 sont sur exprimées dans la BPCO. L'effet cumulatif de l'infection bactérienne laisse suggérer une implication de ces cytokines dans l'exacerbation de la BPCO.



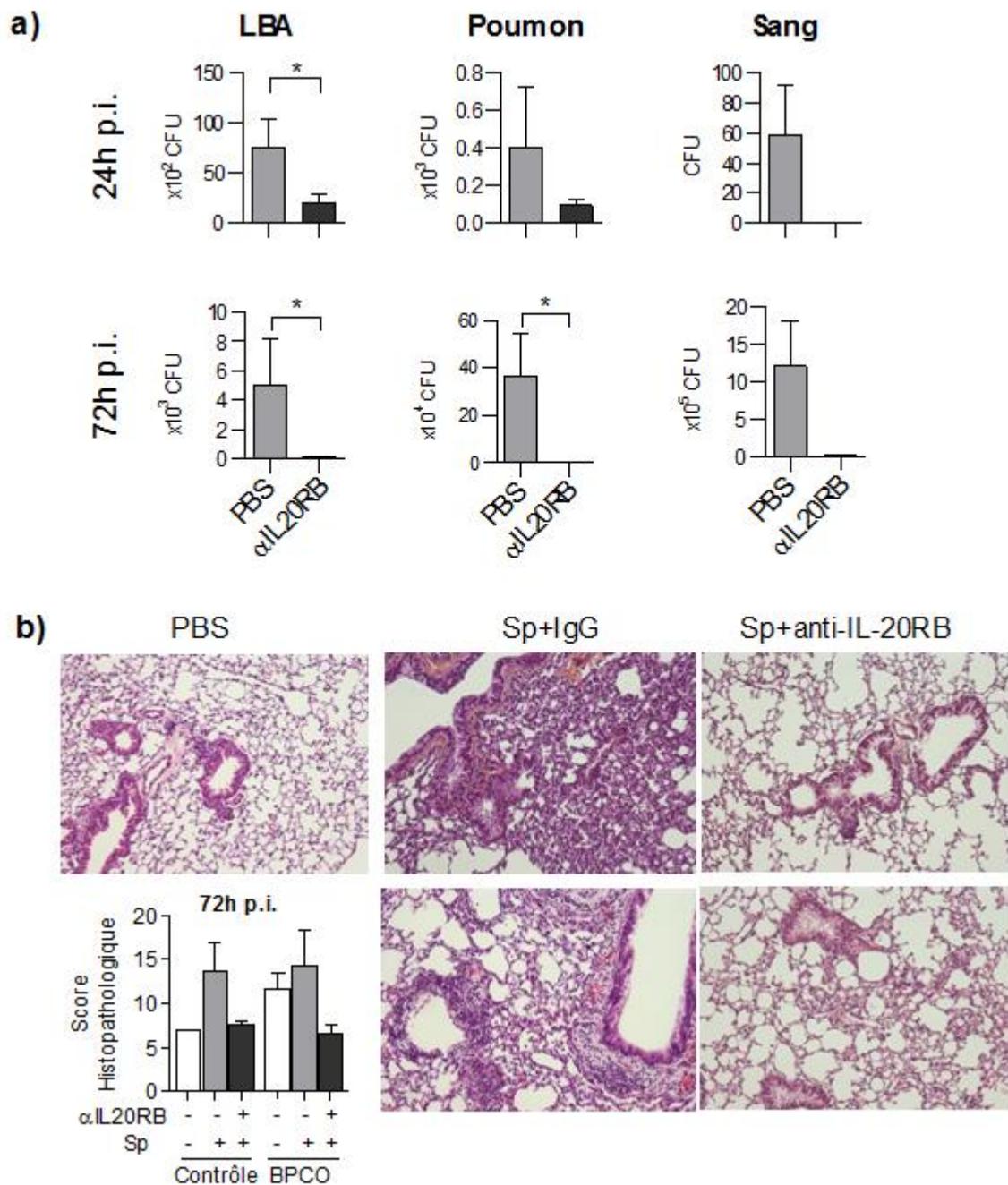
### 22.3. Les anticorps neutralisants les cytokines IL-20 améliorent la réponse à *S. pneumoniae* et le score de la pathologie

Actuellement, il n'existe aucun traitement efficace contre les exacerbations de la BPCO par les pathogènes. Notre objectif principal est d'élaborer de nouvelles approches thérapeutiques contre ces exacerbations de la BPCO. Dans notre modèle murin d'exacerbation de la BPCO, nous avons ciblé les récepteurs des cytokines IL-20 dans le but de lever l'effet inhibiteurs qu'elles pourraient avoir dans ce contexte. Pour ce faire, les souris reçoivent par voie intrapéritonéale des anticorps neutralisant ant-IL-20RB ou un anticorps contrôle, 24h

## Résultats : Objectif 2

avant l'infection. La charge bactérienne, l'inflammation et la dynamique des populations cellulaires sont analysées dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA) et le tissu pulmonaire. La dissémination des bactéries dans le sang est également évaluée. Comme le montre la **figure 20a**, le traitement des souris BPCO avec l'anticorps neutralisant s'accompagne d'un meilleur contrôle de l'infection se traduisant par une réduction significative de la charge bactérienne dans le LBA (24h et 72h après infection) et dans le poumon (72h après infection). La réduction de la charge bactérienne observée dans le poumon à 24h n'est pas significative en raison de la faible translocation des bactéries. L'analyse de la dissémination des bactéries dans le sang montre que l'anti-IL-20RB tend à réduire également cette dissémination bactérienne dans le sang (non significatif). Une étude histologique a été réalisée sur des coupes de tissu pulmonaire afin d'estimer la sévérité des altérations pulmonaires consécutives à l'infection par *S. pneumoniae*. Le traitement anti-IL-20RB limite l'infiltration cellulaire et l'altération pulmonaire due à l'infection (**Figure 20b** coupes histologiques), se traduisant par un score histologique significativement plus faible (**Figure 20b**).

L'effet protecteur des anticorps neutralisant les cytokines IL-20 contre l'infection bactérienne montre que ces cytokines potentialisent l'infection et l'utilisation de ces anticorps neutralisant pourrait s'avérer intéressante dans une approche thérapeutique contre l'exacerbation de la BPCO.



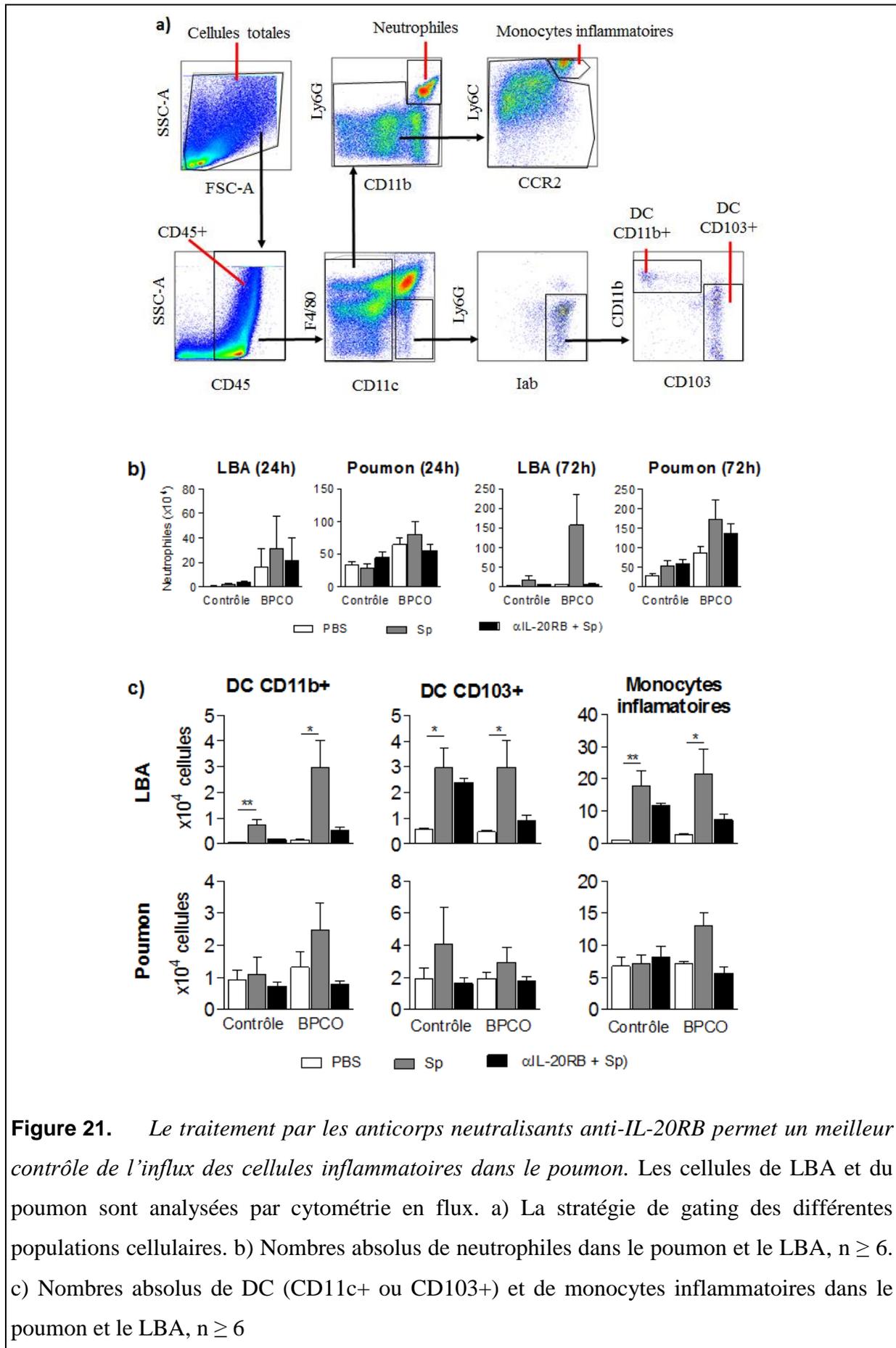
**Figure 20.** *Le ciblage des cytokines IL-20 par des anticorps neutralisant limite l'infection bactérienne et l'inflammation associée.* a) Analyse de la charge bactérienne chez les souris BPCO (n ≥ 6), b) analyse histologique chez les souris BCPO, avec scoring de la sévérité du remodelage pulmonaire (histogrammes au coin inférieur gauche, n = 3) par rapport au contrôles.

### 22.4. Les anticorps neutralisants les cytokines IL-20 limite le recrutement de cellules inflammatoires dans les poumons et les lavages bronchoalvéolaires.

L'exacerbation de la BPCO est associée à un influx important de cellules inflammatoires, notamment de neutrophiles et de cellules myélo-monocytaires ne permettant pas l'élimination des bactéries. Les neutrophiles, bien qu'important dans l'élimination des bactéries (Marqués et al., 2012), produisent des protéases et des dérivées réactives de l'oxygène qui peuvent altérer le tissu pulmonaire et la défense immunitaire (Guillon et al., 2015) lorsque leur recrutement n'est pas rapidement contrôlé. Nous avons analysé l'impact du traitement anti-IL-20RB sur la dynamique des neutrophiles, des DC (résidentes pulmonaires et inflammatoires) et des monocytes inflammatoires dans les poumons et les LBA 72h et/ou 24h après infection. Les fréquences des populations cellulaires sont déterminées par cytométrie en flux selon la stratégie de gating indiquée sur la **figure 21a**, puis rapportées au comptage cellulaire sous microscope pour la détermination du nombre cellulaire. Sur les cellules immunitaires CD45<sup>+</sup>, les neutrophiles sont identifiés comme des cellules exprimant Ly6G, CD11b et négative pour CD11c. Les DC F4/80<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> Iab<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> sont subdivisées en CD1013<sup>+</sup> (DC épithéliales, résidentes) et DC CD11b<sup>+</sup> (DC inflammatoires). Quant aux monocytes inflammatoires, ils sont identifiés après exclusion des neutrophiles, par l'expression de Ly6C et CCR2. Comme attendu, l'infection par *S. pneumoniae* (Sp) des souris BPCO augmente le nombre total de cellules et le nombre absolu des neutrophiles dans le LBA et le poumon (**figure 21b**). Le pré-traitement des souris BPCO avec l'anticorps anti-IL-20RB inhibe significativement le recrutement des neutrophiles dans le LBA (à 72h) et dans le poumon (à 24h) alors qu'aucun effet n'est observé chez les souris contrôles.

L'infection par Sp augmente également le recrutement des APC dans le LBA et de manière non significative dans le poumon 24h après l'infection. En particulier le nombre de cDC1 (DC CD103<sup>+</sup>), des cDC2 (DCCD11b<sup>+</sup>) et de monocytes inflammatoires est augmenté dans le poumon des souris BPCO. Le pré-traitement avec l'anticorps anti-IL-20RB inhibe complètement ce recrutement cellulaire à la fois dans le LBA et le poumon.

Ces données montrent que ce traitement permet de lever complètement le recrutement de cellules inflammatoires dans le poumon conjointement à l'augmentation de la clairance bactérienne. Elles confortent notre hypothèse sur l'implication potentielle des cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) dans les mécanismes de susceptibilité à l'infection au cours de la BCPO. Par conséquent, nous nous sommes intéressés à l'effet de ces cytokines sur les cellules dendritiques *in vitro*.

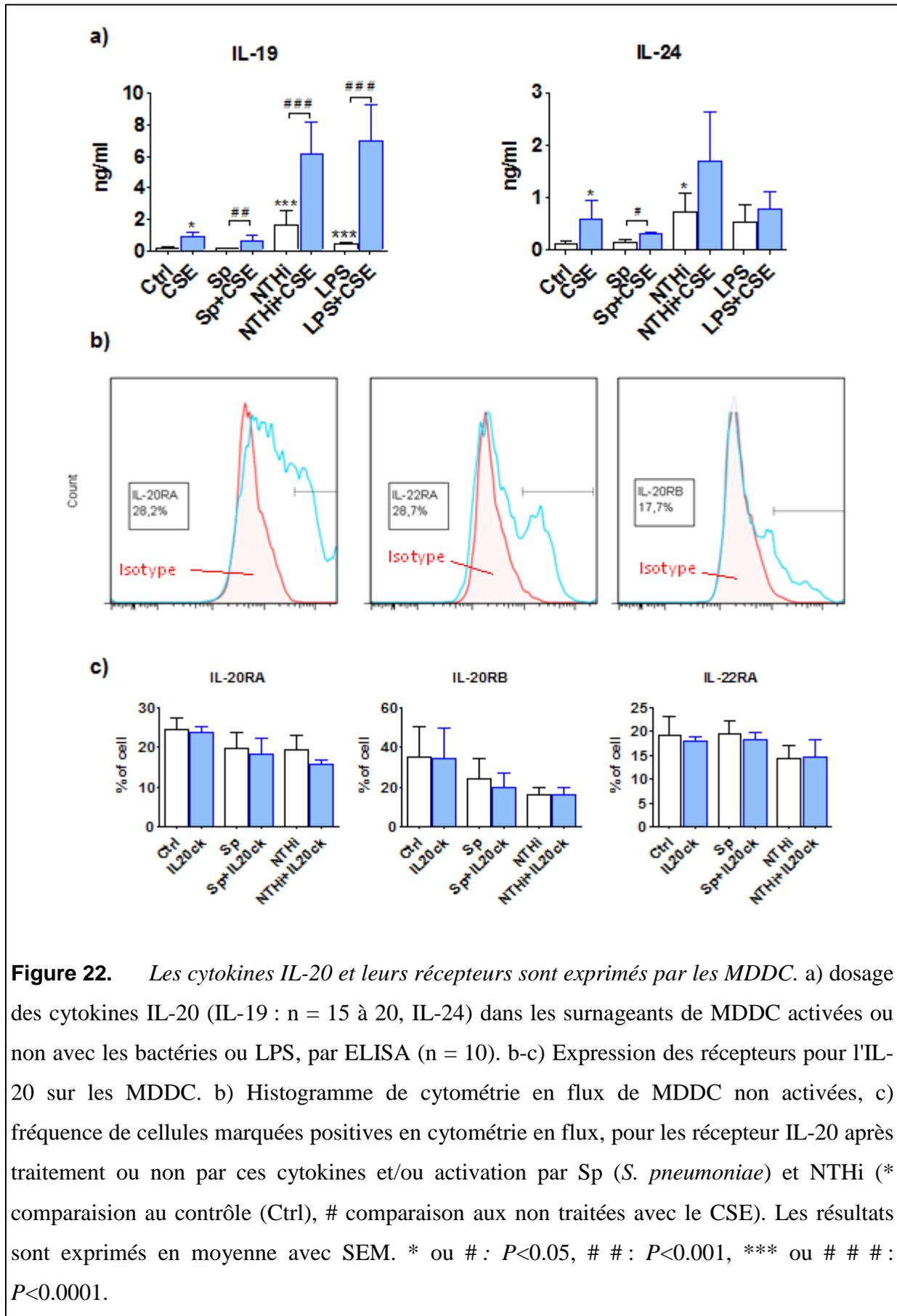


**Figure 21.** Le traitement par les anticorps neutralisants anti-IL-20RB permet un meilleur contrôle de l'influx des cellules inflammatoires dans le poumon. Les cellules de LBA et du poumon sont analysées par cytométrie en flux. a) La stratégie de gating des différentes populations cellulaires. b) Nombres absolus de neutrophiles dans le poumon et le LBA,  $n \geq 6$ . c) Nombres absolus de DC (CD11c+ ou CD103+) et de monocytes inflammatoires dans le poumon et le LBA,  $n \geq 6$

### 22.5. Les MDDC sont des sources et des cibles potentielles des cytokines IL-20

Dans la littérature, l'expression l'IL-20 a été montrée dans les monocytes et les cellules dendritiques après stimulation avec des cytokines, facteurs de croissance ou encore des agonistes de TLR (Bech et al., 2016; Decramer et al., 2012). Par ailleurs l'expression des récepteurs des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24, comme l'IL-22 est principalement associée aux cellules épithéliales et aux fibroblastes. Cependant des données parfois contradictoires suggèrent leur expression sur les cellules myélo-monocytaires. Afin de vérifier l'expression de ces cytokines IL-20 et de leurs récepteurs par les DC dérivées de monocytes humaines *in vitro*, des cellules non traitées ou traitées avec l'extrait de fumée de cigarettes (CSE), sont infectées avec les bactéries ou activées avec LPS puis récupérées après 24h pour le dosage des cytokines par ELISA et l'analyse de l'expression des récepteurs par cytométrie en flux. Comme on l'observe sur la **figure 22a**, l'exposition au CSE, l'infection par NTHi ou l'activation par LPS augment la production d'IL-19, et l'IL-24. La quantification des ARNm par RT-qPCR montre également l'induction d'une surexpression de l'IL-20 par le CSE (données non montrée). On observe un effet cumulatif du CSE avec les bactéries ou le LPS sur la production de ces trois cytokines. Nous nous sommes ensuite interrogés si les DC sont des cibles potentielles des cytokines IL-20 en plus des cellules épithéliales. Pour cela, l'expression des récepteurs IL-20RA, IL-20RB et IL-22RA a été analysées à la surface des MDDC en fin de différenciation. Les MDDC expriment les trois sous unités de récepteurs IL-20 tel qu'on l'observe sur la **figure 22b** montrant les histogrammes de cytométrie, le marquage avec les anticorps ciblant les récepteurs IL-20 s'accompagne d'un décalage des courbes (fond clair) par rapport aux contrôles isotypiques (fond coloré). Environ 28% des MDDC sont positives pour IL-20RA et IL-22RA tandis que cette fréquence est plus faible pour IL-20RB, soit (17%). L'exposition aux cytokines IL-20 ne modifie pas le pourcentage de cellules positives alors que l'infection par NTHi et dans un moindre mesure par Sp diminue le pourcentage de cellules IL-20RA<sup>+</sup> et surtout IL-20RB<sup>+</sup> (**figure 22c**).

Ces résultats confirment que non seulement que les DC sont des cellules productrices des cytokines IL-20, mais qu'elles sont également des cibles dont la fonction peut être potentiellement modulée par ces cytokines. De manière intéressante, l'expression de ces récepteurs semble diminuée en condition infectieuse.



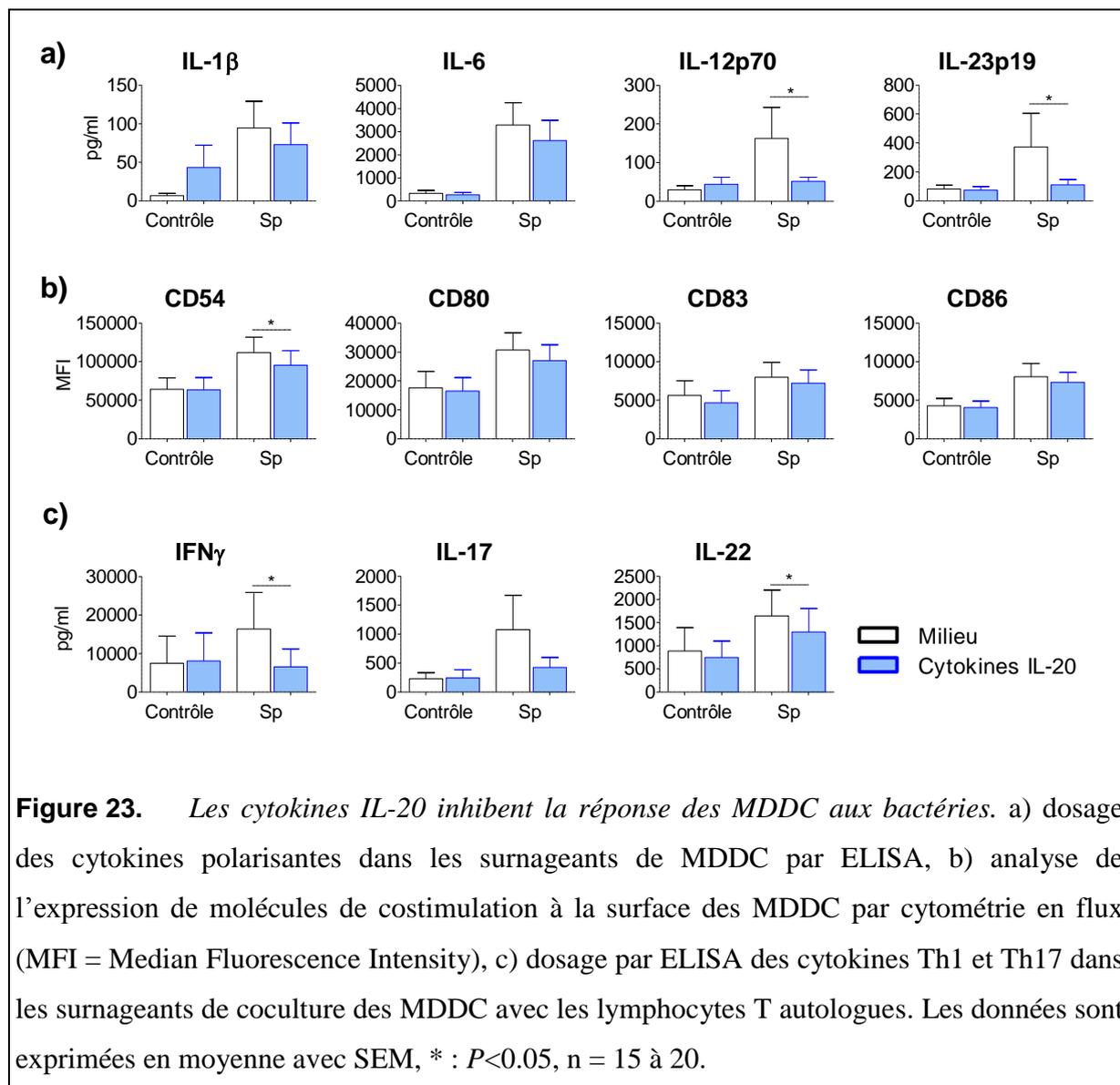
**Figure 22.** Les cytokines IL-20 et leurs récepteurs sont exprimés par les MDDC. a) dosage des cytokines IL-20 (IL-19 : n = 15 à 20, IL-24) dans les surnageants de MDDC activées ou non avec les bactéries ou LPS, par ELISA (n = 10). b-c) Expression des récepteurs pour l'IL-20 sur les MDDC. b) Histogramme de cytométrie en flux de MDDC non activées, c) fréquence de cellules marquées positives en cytométrie en flux, pour les récepteur IL-20 après traitement ou non par ces cytokines et/ou activation par Sp (*S. pneumoniae*) et NTHi (\* comparaison au contrôle (Ctrl), # comparaison aux non traitées avec le CSE). Les résultats sont exprimés en moyenne avec SEM. \* ou # :  $P < 0.05$ , ## :  $P < 0.001$ , \*\*\* ou ### :  $P < 0.0001$ .

### 22.6. Impact des cytokines IL-20 sur la maturation et la fonction des MDDC

Pour induire une réponse immune effectrice et antibactérienne, les DC doivent passer d'un stade « immature » caractérisé par une faible expression des molécules de costimulation, une faible production de cytokines et une forte activité phagocytaire, à un stade de DC « mature ». Les DC entrent dans cette phase de maturation lorsqu'elles sont en contact avec un stimulus (ligand des PRR, cytokines) ou un environnement inflammatoire. L'impact des cytokines IL-20 dans ce processus de maturation des DC a été analysé sur des MDDC. Les MDDC sont traitées avec un cocktail équimolaire des cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24, 20ng/ml chacune) 3h avant infection par *S pneumoniae* (Sp). La production des cytokines polarisantes est mesurée dans les surnageants de culture et l'expression des molécules de costimulation est analysée par cytométrie en flux après 24h. Par rapport aux contrôles non traités, le traitement des MDDC par les cytokines IL-20 inhibe la production de cytokines polarisantes, notamment les cytokines IL-12 (pro-Th1) et l'IL-23 (pro-Th17), avec des tendances similaires (non significatives) pour l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 (**figure 23a**). En parallèle, les données de cytométrie montrent une diminution de l'intensité de fluorescence (MFI) pour les molécules de costimulation suite au traitement par les cytokines IL-20, cette diminution est statistiquement significative pour CD54 (**figure 23b**). La capacité des MDDC après traitement par les cytokines IL-20, à induire une réponse T a été étudiée par coculture avec les lymphocytes T autologues pendant 6 jours. Par rapport aux contrôles, les MDDC traitées avec les cytokines IL-20 ont une altération de leur capacité à activer les lymphocytes T et à induire la production de cytokines Th1 (IFN $\gamma$ ) et Th17 (IL-22) (**Figure 23c**). Une tendance à la réduction (non significative) de la production d'IL-17 à également été observé.

Des expériences préliminaires montrent que des résultats similaires sont obtenus avec le traitement par chacune des cytokines IL-20 sur les MDDC (données non montrées).

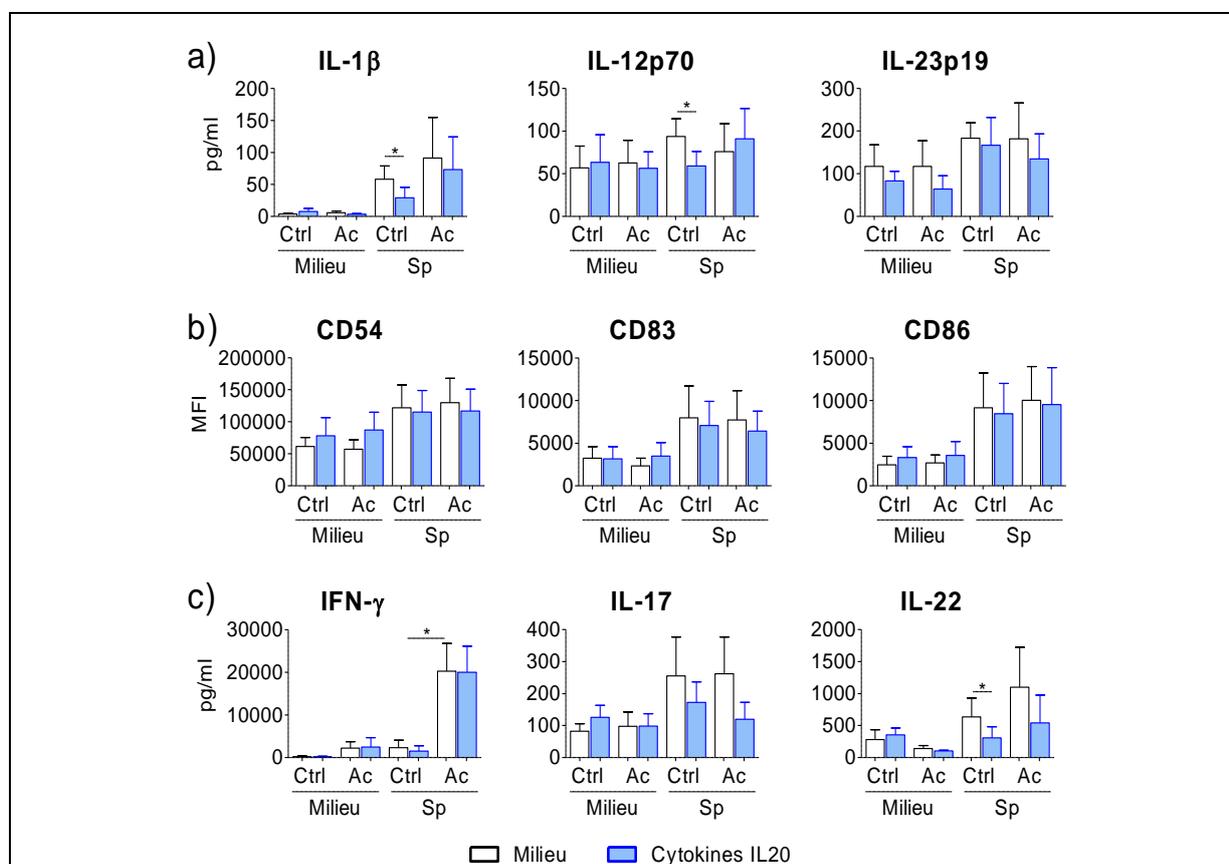
A la lumière de ces observations, on peut suggérer que les cytokines IL-20, plus spécifiquement IL-19, IL-20 et IL-24 altèrent la maturation et la fonction des DC lors d'une infection par *S. pneumoniae*. Ce phénomène pourrait jouer un rôle délétère dans les infections par cette bactérie, notamment dans les exacerbations de la BPCO ; et ouvre des perspectives quant à l'intérêt thérapeutique du ciblage de ces cytokines.



### 22.7. Le ciblage des cytokines IL-20 améliore partiellement la fonction des MDDC traitées avec les cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24)

Les recherches sur l'implication des cytokines IL-20 dans l'infection se focalisent principalement sur l'IL-22, qui présente plutôt un rôle bénéfique dans la réponse anti-infectieuse. En ce qui concerne les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24, les données sont quasi inexistantes. Cependant, il a été montré que ces trois cytokines inhibent la réponse à *Staphylococcus aureus* au cours d'une infection cutanée. Le ciblage de ces cytokines avec des anticorps neutralisant IL-20RB a permis d'améliorer la réponse antibactérienne (Myles et al., 2013). A notre connaissance, il n'existe aucune donnée dans la littérature concernant le ciblage de ces trois cytokines au cours d'une infection par *Streptococcus pneumoniae*. Nous avons donc analysé l'importance du ciblage des cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) dans ce contexte. Les MDDC sont prétraitées avec l'anticorps neutralisant IL-20RB 15min avant le

traitement par les trois cytokines IL-20. Après 24h de maturation, la production de cytokines polarisantes dans le surnageant de culture et l'expression des molécules de costimulation ont été analysées. Bien que nous ayons des tendances (faible nombre d'échantillon, n=8), le blocage de l'IL-20RB n'améliore pas significativement la production de cytokines polarisantes et l'expression de molécules de costimulation (**Figures 24a et b**). Néanmoins, l'analyse fonctionnelle par coculture avec les lymphocytes T autologues montre que l'anticorps neutralisant améliore la fonction des MDDC et potentialise la production de cytokine Th1 (IFN $\gamma$ ) tout en bloquant l'effet inhibiteur des cytokines IL-20 sur ce paramètre. La même tendance est observée pour la production d'IL-22 (**Figures 24c**). Des données similaires sont obtenues après activation par NTHi (données non montrées).

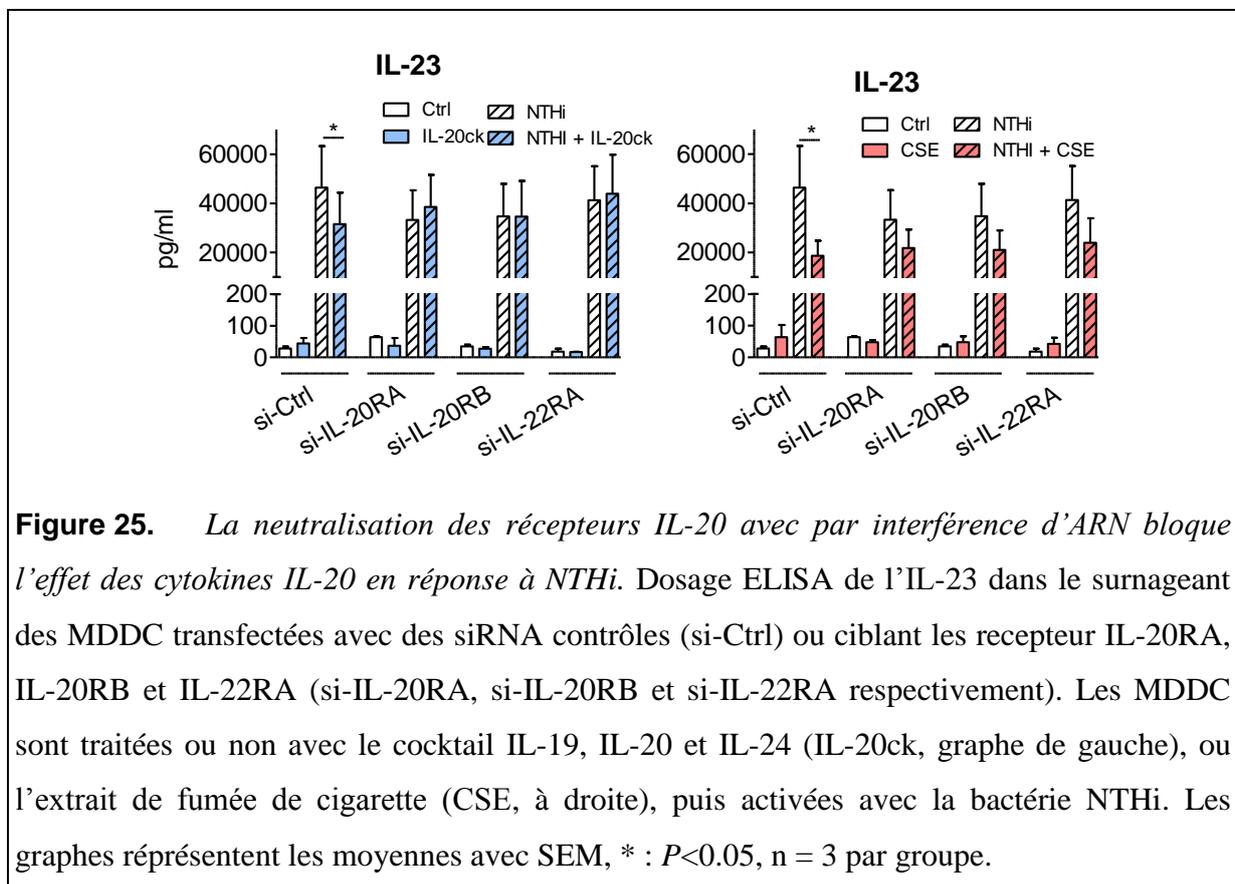


**Figure 24.** Le blocage des récepteurs pour les cytokines IL-20 par l'anti-IL-20RB lève partiellement leur effet inhibiteur en réponse à *S. pneumoniae*. a) dosage des cytokines polarisantes dans les surnageants de MDDC par ELISA (Ctrl = contrôle; Ac:anticorps neutralisant le récepteur IL-20RB), b) analyse de l'expression des molécules de costimulation par cytométrie en flux (MFI = Median Fluorescence Intensity), c) dosage par ELISA des cytokines Th1 et Th17 dans les surnageants de coculture des MDDC avec les lymphocytes T autologues. Les données sont exprimées en moyenne avec SEM, \* :  $P < 0.05$ , n = 5 à 8.

## Résultats : Objectif 2

Afin de préciser le rôle des différentes chaînes intervenant dans la composition des 2 récepteurs pour l'IL-20, nous avons testé l'inhibition de l'expression de chacune des 3 chaînes identifiées (IL-20RA, IL-20RB et IL-22RA) par l'interférence à ARN. Ces cellules ont ensuite été activées par Sp1 et NTHi en présence d'extrait de fumée de cigarette (CSE) ou de cytokines IL-20. Les données montrent que l'exposition aux cytokines IL-20 ou au CSE des MDDC traitées avec le siRNA contrôle (siR Ctrl) inhibe la production de cytokines pro-Th1 et pro-Th17 comme illustré pour l'IL-23 sur la **figure 25**. Le pré-traitement des MDDC avec les siRNA dirigés contre les 3 chaînes lève complètement l'effet des cytokines IL-20 et partiellement celui du CSE.

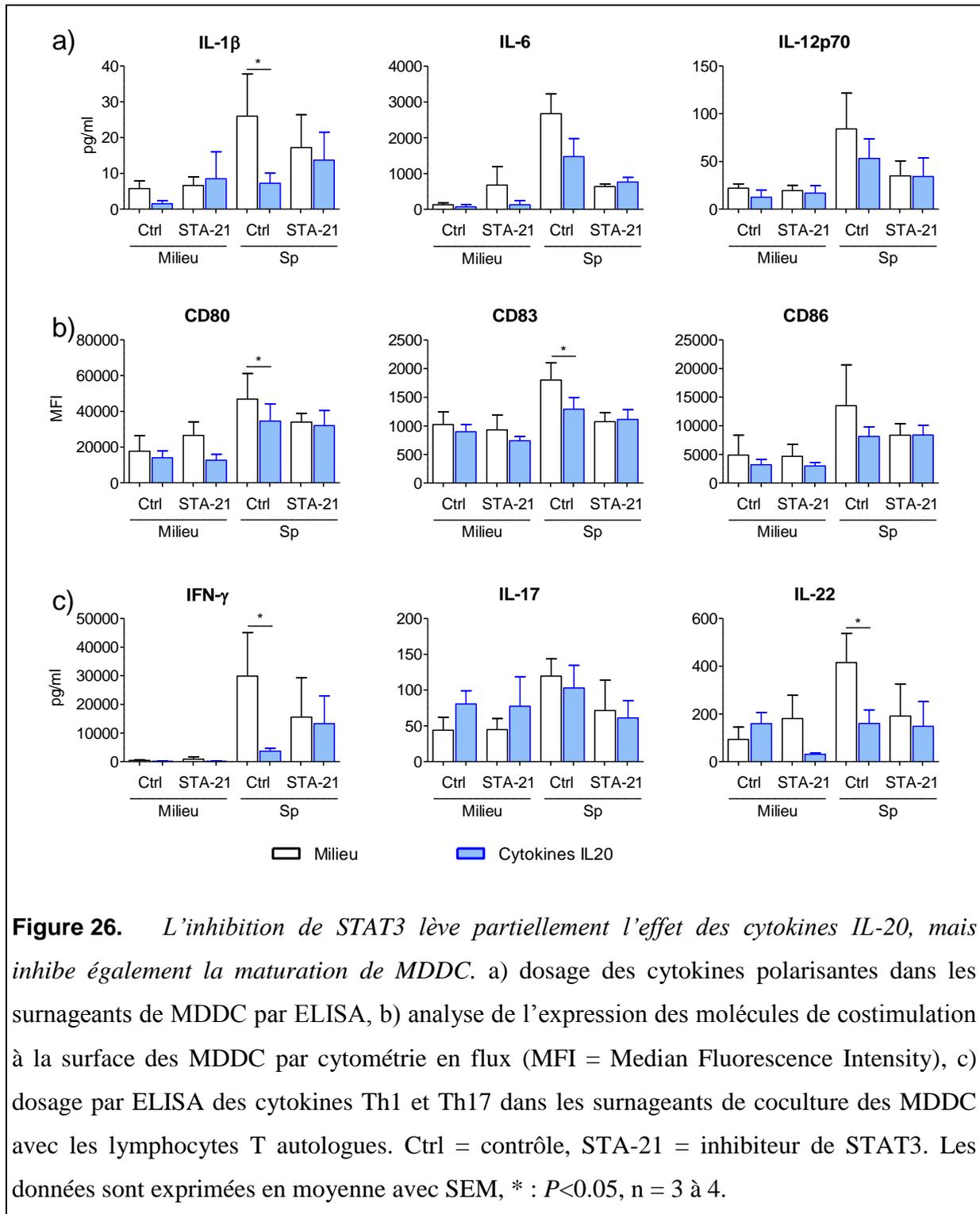
Malgré la faible modulation de la maturation des MDDC par l'anticorps neutralisant IL-20RB, cet anticorps améliore partiellement la fonction de ces cellules, notamment en potentialisant la réponse Th1. L'inhibition de l'expression des 3 chaînes participant aux récepteurs de l'IL-20 bloquent l'effet des cytokines IL-20 mais aussi celui du CSE, suggérant que l'effet du CSE sur les DC pourrait au moins en partie être dû à la production des cytokines IL-20. Ceci confirme la complexité de la signalisation des cytokines IL-20 et l'implication des 2 types de récepteurs connus dans l'inhibition de la réponse anti-infectieuse des DC induite par l'IL-20 et/ou le CSE.



### 22.8. Importance de la voie STAT3 dans la signalisation des cytokines IL-20 au cours de l'infection

Au cours des études ayant contribué à la découverte et la caractérisation de l'IL-20, le groupe de Chandrasekher a montré que la signalisation de l'IL-20 (qui lie les deux complexes IL-20RA/IL-20RB et 22RA/IL-20RB) via ses récepteurs implique l'activation spécifique et la translocation de STAT3 dans le noyau (Blumberg et al., 2001; Parrish-Novak et al., 2002). Comme il a été montré que la déficience en STAT3 permettait de bloquer l'effet des cytokines IL-20 au cours de l'infection (Myles et al., 2013), nous avons testé l'importance de cette voie de signalisation dans l'effet des cytokines IL-19 IL-20 et IL-24. Les MDDC sont prétraitées avec l'inhibiteur spécifique de STAT3 (STA-21), qui empêche la dimérisation des STAT3 phosphorylés et par conséquent bloque la transduction de signal. Après traitement par les cytokines IL-20, les MDDC sont infectées avec *S. pneumoniae* et leur maturation ainsi que leur fonction sont étudiées comment indiqué précédemment. Tel qu'on l'observe sur la **figure 26**, l'inhibition de STAT3 en absence de cytokines IL-20 s'accompagne d'une altération de la maturation des MDDC. En effet, la signalisation JAK/STAT est importante dans de nombreuses voies d'activation cellulaire parmi lesquelles l'IL-6, l'IL-12 et la réponse Th17 (Cai et al., 2015; Seif et al., 2017). Cependant, l'inhibiteur de la voie STAT3 semble empêcher l'effet inhibiteur des cytokines IL-20 sur l'IL-1 $\beta$  et l'induction de l'IFN- $\gamma$  puisque l'on note une absence de différence en présence de STA-21 (Sp + STA-21) contrairement aux données en absence de cet inhibiteur (Sp). Des données similaires sont obtenues pour l'expression de CD80 et CD83 et une tendance similaire est observée pour l'IL-6 et l'IL-12p70. Comme attendu, l'addition des IL-20 inhibent la capacité des MDDC à induire une réponse IFN $\gamma$  et IL-22 après activation par Sp alors qu'en présence de STA-21, aucun effet inhibiteur des cytokines n'est décelé.

L'utilisation d'inhibiteur de la voie de signalisation STAT3 montre que cette voie est potentiellement impliquée dans la signalisation des cytokines IL-20, cependant l'utilisation d'autres approches méthodologiques telle que la phosphocytométrie ou le western blot sont en cours pour valider l'induction de l'activation de STAT3 dans les MDDC suite au traitement par les cytokines IL-20.



**Figure 26.** *L'inhibition de STAT3 lève partiellement l'effet des cytokines IL-20, mais inhibe également la maturation de MDDC.* a) dosage des cytokines polarisantes dans les surnageants de MDDC par ELISA, b) analyse de l'expression des molécules de costimulation à la surface des MDDC par cytométrie en flux (MFI = Median Fluorescence Intensity), c) dosage par ELISA des cytokines Th1 et Th17 dans les surnageants de coculture des MDDC avec les lymphocytes T autologues. Ctrl = contrôle, STA-21 = inhibiteur de STAT3. Les données sont exprimées en moyenne avec SEM, \* :  $P < 0.05$ ,  $n = 3$  à 4.



### 23. Objectif 3 : Etudier une approche de restauration de la réponse Th17 chez les souris BPCO infectées et limitation du développement de l'exacerbation

#### 23.1. La flagelline, agoniste TLR5, prévient l'exacerbation de la BPCO induite par *S. pneumoniae* chez la souris.

(Voir annexes n°3 pour plus de détail)

L'objectif de nos recherches étant de proposer de nouveaux traitements contre les exacerbations de la BPCO, nous avons étudié l'impact d'un immunostimulant susceptible de restaurer la réponse Th17. Dans notre laboratoire, la flagelline s'est avéré être efficace pour promouvoir la réponse Th17 à l'infection et de bloquer les conséquences létales de cette infection chez la souris contrôle (Van Maele et al., 2010). Cet immunostimulant, agoniste de TLR5 a donc été étudié dans un contexte d'exacerbation de la BPCO. L'efficacité du traitement sur la limitation de l'infection et l'exacerbation de la pathologie (inflammation et remodelage pulmonaire) a été étudiée dans une approche préventive. Enfin, nous avons testé dans un contexte curatif en raison de la colonisation fréquente des patient BPCO par les bactéries.

Afin d'étudier l'intérêt thérapeutique de la flagelline dans l'exacerbation de la BPCO par *S. pneumoniae*, les souris reçoivent de la flagelline par voie systémique (i.p.) au moment de l'infection (par voie intranasale) avec la dose sub létale de  $4 \times 10^5$  CFU. L'évaluation des charges bactériennes confirme nos résultats précédents montrant une susceptibilité des souris BPCO à l'infection. Le traitement par la flagelline s'accompagne d'une diminution significative des charges bactériennes dans les LBA et les poumons, tel que déterminé à 24h et 72h après infection par numération bactérienne, aussi bien chez les souris contrôles (exposés à l'air ambiant) que chez les BPCO (exposition chronique à la fumée de cigarette). L'implication de la voie IL-17 / IL-22 dans l'effet protecteur de la flagelline a été explorée par dosage de ces cytokines dans les LBA, lysats pulmonaires et par les cellules pulmonaires restimulées *ex vivo*. Cet immunostimulant augmente la production d'IL-22 dans le LBA 72h après infection, et par les cellules pulmonaires après restimulation par l'anti-CD3. La flagelline n'augmente pas l'IL-22 dans le lysat pulmonaire 24h ou 72h après infection. Quant à l'IL-17, excepté une augmentation chez les cellules des souris contrôles restimulées, aucune augmentation significative n'est observée. Une augmentation modérée des cytokines pro-Th17 a également été observée.

## Résultats : Objectif 3

Nous nous sommes ensuite intéressés aux conséquences de ce traitement sur l'intégrité du poumon et la réponse inflammatoire par histologie. Les résultats montrent une exacerbation de l'inflammation et des dommages pulmonaires plus importants chez les souris non traitées, notamment à 72h post-infection ; tandis que l'administration de la flagelline limite ces altérations. L'analyse du recrutement cellulaire dans le poumon et le LBA par cytométrie en flux montre que la flagelline induit un recrutement des neutrophiles dans les poumons et LBA 24h après infection. Cependant, la diminution de la charge bactérienne s'accompagne d'une réduction de la neutrophilie (dans le poumon) ainsi que des lymphocytes T (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>), des macrophages et des DC à 72h après infection.

Sachant que l'effet antibactérien des cytokines Th17 fait intervenir la production des peptides antimicrobiens, nous avons quantifié l'expression et la production de ceux-ci par RT-qPCR et ELISA respectivement, dans le poumon et le LBA à 24h post-infection. On observe une augmentation des transcrits de S100A8 dans le poumon à 24h ainsi que les protéines de S100A8 et S100A9 dans le LBA 72h après l'infection.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'effet thérapeutique de la flagelline dans une approche curative. Pour cela, les souris BPCO reçoivent la flagelline 6h après infection par *S. pneumoniae*. Comme l'approche préventive, l'administration de la flagelline plusieurs heures après l'infection améliore toujours la clairance bactérienne, aussi bien dans le LBA que dans le poumon. Le traitement curatif est également associé à une augmentation de la production des peptides antimicrobiens S100A9 dans le LBA.

En résumé, l'utilisation de la flagelline (agoniste du TLR5) pour stimuler le système immunitaire s'avère bénéfique dans le contrôle de l'exacerbation de la BCPO par *S. pneumoniae*. Ce traitement permet de promouvoir la production d'IL-22 et des peptides antimicrobiens S100A8 et S100A9. Ces résultats, comme le ciblage des cytokines IL-20, ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques contre les exacerbations de la BPCO.

## **V. DISCUSSION & PERSPECTIVES**



## Discussion et perspectives

A l'issu de cette thèse, nous avons montré que le défaut de production d'IL-17 et IL-22 dans les souris BPCO en réponse aux infections bactériennes est déterminant pour contrôler la charge bactérienne et l'inflammation et implique une altération fonctionnelle des macrophages et des cellules dendritiques. Nous avons confirmé que la BPCO est associée à un défaut de réponse d'IL-17 et d'IL-22 au cours de l'infection à la fois sur des cellules mononucléées du sang périphérique de patients BPCO et chez des souris BPCO (exposées chroniquement à la fumée de cigarette). Ce défaut de réponse fait aussi intervenir un effet direct de la fumée de cigarette sur des cellules dendritiques dérivées de monocytes.

Cette altération de la réponse IL-17 / IL-22 s'opère à plusieurs niveaux. Nos études sur les souris BPCO montrent que malgré l'inflammation de base dans la BPCO (neutrophilie, afflux de monocytes / macrophages / DC et cytokines inflammatoires), il y a une susceptibilité accrue aux infections par rapport aux souris contrôles. Nos données montrent que les macrophages et les DC pulmonaires de souris BPCO triés par cytométrie en flux présentent un défaut de production de cytokines polarisantes pro-Th17 (IL-1 $\beta$  et IL-23), et ont une capacité altérée à induire une réponse IL-17 par des cellules TCD4<sup>+</sup> (Pichavant et *al.*, 2015). *In vitro*, l'exposition des DC dérivées de monocytes (MDDC) de donneurs sains à l'extrait de fumée de cigarette (CSE) s'accompagne d'une inhibition de leur maturation et de leur capacité à activer les lymphocytes T autologues en réponse à *S. pneumoniae*. En effet, le CSE inhibe l'expression des molécules de costimulation (CD86, CD80, CD83, CD54, CD40) et la production de cytokines polarisantes pro-Th1 (TNF $\alpha$ , IL-12) et pro-Th17 (IL-6, IL-23). Cela se traduit par une inhibition de leur capacité à induire la production de cytokines Th1 (IFN $\gamma$ ) et Th17 (IL-22). L'effet du CSE sur les MDDC ne semble pas dû au stress oxydatif généré puisque l'inhibition de ce stress cytoplasmique ou mitochondrial n'améliore pas la fonction de ces cellules. De plus, l'exposition au CSE semble altérer la fonction bactéricide des MDDC même s'il ne module pas l'expression des molécules de CMH de classe II (Le Rouzic et *al.*, 2016).

Afin de préciser les mécanismes contrôlant la fonction de ces APC au cours de la BPCO, nous nous sommes intéressés aux voies de régulation de la maturation des APC. Les cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) qui sont surexprimées suite à l'exposition à la fumée de cigarette et dans le modèle expérimental d'exacerbation de la BCPO pourraient impacter directement ou non les APC. Nos résultats sur les MDDC montrent que ces cellules sont à la fois des sources et des cibles potentielles des cytokines IL-20 puisqu'elles expriment les récepteurs. Les cytokines IL-20 ont un effet inhibiteur sur la maturation et la fonction des

MDDC en réponse à *S. pneumoniae* se traduisant par une réduction de l'expression de molécules de costimulation, de la production de cytokines polarisantes et de leur capacité à induire une réponse IFN- $\gamma$  et IL-22. Le blocage de la fonction des cytokines IL-20 avec un anticorps neutralisant ou par interférence d'ARN lève partiellement leur effet inhibiteur sur les MDDC. Nos données révèlent également que l'effet de ces cytokines fait intervenir la signalisation impliquant la voie STAT3.

Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique du ciblage de ces cytokines IL-20 dans l'exacerbation de la BPCO, nous avons utilisé un anticorps neutralisant anti IL-20RB. Cet anticorps accélère la clairance bactérienne et limite l'inflammation. Cependant, nous n'avons pas observé de modulation significative de la réponse Th17 *in vivo* avec cet anticorps, même s'il affecte nettement la mobilisation des APC dans le poumon. Enfin, dans le but de stimuler la production de cytokines Th17 et de limiter l'exacerbation de la BPCO, nous avons utilisé la flagelline, un agoniste de TLR5, chez des souris BPCO infectées avec *S. pneumoniae*. Cet agoniste de TLR5 améliore la réponse antibactérienne, réduit l'inflammation et les dommages pulmonaires consécutifs à l'infection. Le mécanisme pourrait impliquer la réponse IL-22, mais est surtout médié par une surexpression des peptides antimicrobiens S100A8 et S100A9.

### 24. Altération des APC par la fumée de cigarette

La physiopathologie de la BPCO implique une inflammation chronique avec un infiltrat comprenant des cellules immunitaires telles que les neutrophiles, des monocytes/macrophages, les lymphocytes NK, NKT, T $\gamma\delta$  et les DC par rapport aux sujets sains (Barnes, 2008; Demedts et al., 2007). Chez des sujets sains, tous ces types cellulaires contribuent à l'élimination des pathogènes en cas d'infection. Cependant, les patients BPCO sont plus susceptibles aux infections, ce qui engendre des exacerbations et la progression de la pathologie. Les réponses IL-17 / IL-22 sont très importantes dans l'élimination des bactéries, notamment à *S. pneumoniae* (Marqués et al., 2012). Ces cytokines sont impliquées dans le recrutement des neutrophiles, la production de peptides antimicrobiens qui ont des effets directs dans l'élimination des bactéries, et la régénération tissulaire qui maintient l'intégrité des barrières biologiques. Dans ce travail, nous avons montré que le défaut de réponse IL-17 et IL-22 lors de l'infection à *S. pneumoniae* est associé à un défaut de maturation et un défaut fonctionnel des APC pulmonaires (macrophages et DC). En effet, les macrophages et les DC pulmonaires de souris exposées à la fumée de cigarette ont un défaut de production de cytokines pro-Th17 et d'induction de la réponse Th17. *In vitro*, l'exposition des DC dérivées

## Discussion et perspectives

de monocytes humains à la fumée de cigarette ou avec les cytokines IL-20, ont également un défaut de maturation et sont également incapables de promouvoir la réponse Th17 en réponse à *S. pneumoniae* (Pichavant et al., 2015). Ces données vont dans le même sens que les études précédentes sur des biopsies pulmonaires (Liao et al., 2015) et des DC dérivées de la moelle osseuse de souris (Mortaz et al., 2009) qui montrent un défaut de maturation des DC suite à l'exposition à la fumée de cigarette et une altération de la fonction de ces DC qui sont moins efficaces à induire la prolifération des cellules TCD4<sup>+</sup>. La fumée de cigarette semble avoir un effet variable sur les cellules immunitaires selon le modèle expérimental, le type cellule et la pathologie (Qiu et al., 2017). En effet, nos résultats et d'autres chercheurs montrent que l'exposition des souris à la fumée de cigarette *in vivo* augmente l'expression de certaines molécules de costimulation (CD86) par les DC et les macrophages (notamment les macrophages alvéolaires) (Robays et al., 2009). Malgré cette surexpression de molécules de costimulation, ces cellules restent inefficaces dans leur activité antibactérienne car leurs capacités phagocytaires et/ou bactéricides sont altérées. Au vu de ces données, on peut s'interroger sur la pertinence des approches expérimentales (*in vivo* versus *in vitro*). Les modèles d'exposition *in vivo* sont basés sur des expositions chroniques durant plusieurs semaines. Cela peut permettre la mise en place de plusieurs mécanismes régulateurs dont la production d'IL-10, une cytokine immunosuppressive, par les cellules innées, voire la polarisation des cellules adaptatives régulatrices. Par ailleurs, dans le modèle *in vivo*, la participation des cellules épithéliales est à prendre en compte car elles sont capables de répondre à un contact direct à la fumée de cigarette et de libérer des alarmines comme l'IL-33, susceptibles de moduler le système immunitaire et les DC. Il serait donc important d'analyser le dialogue entre l'épithélium et les APC pulmonaires dans des approches mécanistiques afin d'élucider davantage la modulation de la réponse anti-infectieuse par la fumée de cigarette. Des approches de coculture à interface air/liquide couramment utilisées pour étudier les cellules épithéliales *in vitro*, permettraient d'étudier l'impact de l'exposition à la fumée à la fois au niveau des cellules épithéliales et des APC. Les cellules épithéliales pourraient être analysées pour la production d'alarmines (IL-33, TSLP, HMGB1), de chimiokines (CCL20) et de facteurs de croissance (GM-CSF) qui participeraient respectivement à l'activation, le recrutement et la survie des APC. Un focus sera fait sur la maturation (molécules de costimulation, cytokines polarisantes) et la fonction (phagocytose) de ces derniers.

Le modèle *in vitro*, quant à lui, correspond à des DC dérivées de monocytes qui ne sont pas représentatives de l'ensemble des sous-populations de DC présentes dans le poumon. Afin de

compléter ces travaux sur les MDDC et les DC triées, il conviendrait d'utiliser d'autres modèles *in vitro* tels que les DC dérivées de la moelle osseuse à l'aide de flt3-L (qui permet de générer des populations hétérogènes de DC conventionnelles et plasmacytoïdes). Le modèle *in vitro*, bien que trop simpliste vis-à-vis de la complexité de l'organisme reste incontournable pour tester l'effet direct de certains polluants ou médiateurs et leurs effets sur le dialogue cellule à cellule.

### 25. Mécanismes de modulation de la fonction des DC, rôle des cytokines IL-20

Les cytokines IL-20 font partie de la famille de l'IL-10 et ont été montrées pour avoir un effet régulateur sur la fonction des APC (Bech et al., 2016). Dans ce travail nous avons vu que ces cytokines et leurs récepteurs sont exprimés par les DC dérivées de monocytes humains (MDDC). L'expression de tout ou partie de ces cytokines a déjà été montré dans les APC. Quant à l'expression des récepteurs par les APC, les données sont assez contradictoires (Bech et al., 2016; Wolk et al., 2008). Nous avons montré que les cytokines IL-20 sont surexprimées dans les poumons des souris chroniquement exposées à la fumée de cigarette. De plus, nos résultats prouvent que ces cytokines sont susceptibles d'inhiber la maturation et la fonction des MDDC en réponse à *S. pneumoniae*. Un effet délétère de ces cytokines a été montré avec d'autres pathogènes, entre autres l'infection cutanée par *Staphylococcus aureus* chez la souris (Myles et al., 2013) et des filarioses (Anuradha et al., 2016). Contrairement à nos résultats, les travaux de Bech et coll. (Bech et al., 2016) sur un modèle *in vitro* de MDDC mimant l'environnement cutané, montre que les cytokines IL-20 (notamment l'IL-20) augmentent l'expression de CD86 à la dose non physiologique de 500ng/ml soit 25 fois la dose que nous avons utilisé. En plus les cytokines sont utilisées séparément dans cette étude tandis que nous avons utilisé un cocktail des trois cytokines. Néanmoins, nos données préliminaires en cours montrent que le traitement par les cytokines isolées donne des résultats similaires à l'effet des trois cytokines.

Dans le but de vérifier que ces cytokines sont capables d'interagir avec leurs récepteurs d'induire une signalisation dans les MDDC, nous avons utilisé différentes approches afin d'empêcher leur interaction avec les récepteurs (anticorps neutralisants anti-IL-20RB, siRNA) ou l'induction de signalisation intracellulaire (inhibiteur de la voie STAT3). Nos résultats indiquent que les cytokines IL-20 induisent un signal régulateur sur la maturation au niveau des MDDC. Cette étude étant une première dans ce contexte, il est nécessaire d'utiliser des approches complémentaires permettant de mettre en évidence l'interaction de

ces cytokines avec leur récepteur (co-immunoprécipitation, analyse de colocalisation par microscopie ou cytométrie couplée à la microscopie), et la transduction de signal (analyse de la phosphorylation de STAT3 par cytométrie ou western blot, ou de la translocation nucléaire par microscopie). Les travaux de Bech et *al.* (Bech et al., 2016) montrent une activation de p38 (voie des MAP kinases) par les cytokines IL-20, laissant suggérer que ces cytokines peuvent activer d'autres voies de signalisation en dehors de STAT3. Cependant, nos premiers tests avec des inhibiteurs d'ERK et de p38 (MAPK-1 et -2) ne montrent pas d'effets significatifs sur l'effet des cytokines IL-20, soulignant l'hypothèse selon laquelle l'effet observé par Bech et *al.* n'est pas spécifique de ces cytokines. Une approche transcriptomique est actuellement envisagée, ce qui devrait nous permettre de définir si ces voies sont bien mobilisées dans ce contexte. Cela nous permettra par ailleurs de visualiser l'implication d'autres voies de signalisation ou encore d'autres voies biologiques (entre autres : métabolisme, cycle cellulaire, transport cellulaire, phagocytose, régulation génétique).

### **26. Approche thérapeutique par ciblage des cytokines IL-20**

Il n'existe aucun traitement permettant de prévenir et de contrôler les conséquences des exacerbations de la BPCO. La survenue de ces exacerbations est décisive dans le cours de la pathologie, puisqu'environ 50% des patients BPCO ayant fait au moins une exacerbation sévère meurent dans les 4ans qui suivent. Après avoir constaté que les cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) sont surexprimées en condition BPCO, nous avons évalué le potentiel thérapeutique du ciblage des cytokines IL-20 à l'aide d'anticorps neutralisant anti-IL-20RB, dans une approche préventive. Ce traitement a permis un meilleur contrôle de l'infection dans notre modèle murin d'exacerbation de la BPCO par *S. pneumoniae*, avec une limitation de l'inflammation due aux bactéries (dépôt de brevet PCT/EP2015/077365). Ces cytokines sont généralement associées à des pathologies inflammatoires et autoimmunes (psoriasis, arthrite rhumatoïde, ostéoporose) et les cancers. De ce fait, leur ciblage thérapeutique vise généralement à lever l'inflammation ou à inhiber la progression du cancer (Hsu and Chang, 2014; Liu et al., 2016). Parmi les rares études sur l'implication des cytokines IL-20 dans la réponse anti-infectieuse, les travaux d'Anuradha et Myles (Anuradha et al., 2016; Myles et al., 2013) vont dans le même sens que le nôtre, montrant respectivement un effet délétère de ces cytokines dans la filariose (épidémie de *Wuchereria bancrofti*) et l'infection cutanée à *Staphylococcus aureus* (chez la souris), avec une répression de la réponse Th17. Nos données *in vivo* ne semblent pas clairement démontrer que l'effet de ces cytokines implique la modulation de la réponse IL-17 ou IL-22 bien que *in vitro*, l'effet sur les MDDC semble aller

dans ce sens. Un effet sur la production d'IFN- $\gamma$  pourrait être aussi impliqué dans cette observation. Il nous faut également prendre en compte l'impact de ce traitement sur l'épithélium respiratoire qui est une cible majeure des cytokines IL-20. Sur ces cellules, elles modulent la production de peptides anti-microbiens et la production de chimiokines, notamment.

Quoique prometteur, ce travail requière des études complémentaires avant toute application en clinique. En effet, les mécanismes de régulation de la réponse anti-infectieuse des cytokines IL-20 ne sont pas élucidés. Des études transcriptomiques sont actuellement en cours sur les tissus et les APC (DC, macrophages, monocytes inflammatoires) pulmonaires des souris BPCO infectées ou non, traitées ou non avec l'anticorps anti-IL-20RB. D'autres études en cours visent aussi à analyser l'effet curatif versus l'effet préventif de ce traitement. Nos premières données montrent que cet anticorps est capable de limiter l'infection de façon curative. Nous voudrions aussi définir l'impact de ce traitement sur la réponse immune adaptative et potentiellement sur la prévention d'une récurrence de l'exacerbation chez les patients BPCO. Si c'est le cas, cela permettrait de bloquer le cercle vicieux de l'exacerbation dans ce contexte. De plus, l'importance de la voie d'administration (locale ou systémique) sera prise en compte qui devrait permettre de cibler préférentiellement les cellules de structure pulmonaires (l'épithélium) par opposition à un ciblage des cellules immunitaires par voie systémique. Les voies de signalisation en cause (dans un premier temps, la voie STAT3) seront ciblées pour des études plus poussées à la fois dans notre modèle murin de BPCO comme sur des cellules isolées de patients BPCO.

### **27. Approche thérapeutique par utilisation d'immunostimulants**

Etant donné la mise en évidence d'un défaut de réponse IL-17 et IL-22 au cours de l'infection, par les cellules mononucléées de patients BPCO et dans notre modèle murin d'exacerbation de la BPCO, il nous a semblé nécessaire d'explorer des approches thérapeutiques visant à restaurer la production de ces deux cytokines et ainsi à limiter le développement des exacerbations.

Dans notre laboratoire, la flagelline s'est avérée intéressante pour induire ces cytokines de façon TLR5-dépendante et au cours d'une infection par *S. pneumoniae* chez des souris non BPCO (Van Maele et al., 2010, 2014). Nous avons donc évalué le potentiel de la flagelline à promouvoir la réponse IL-17 et IL-22 dans notre modèle d'exacerbation de la BPCO par ce pathogène. Nos résultats montrent que cet agoniste du TLR5 permet d'augmenter la

production d'IL-22 dans le LBA, et par les cellules pulmonaires stimulées *ex vivo*. De façon intéressante, l'administration préventive et curative de la flagelline par voie systémique (intrapéritonéale) améliore la clairance de *S. pneumoniae* (dépôt de brevet PCT/EP2015/081111). La flagelline augmente la production des peptides antimicrobiens S100A8 et S100A9 qui pourraient avoir un rôle dans le contrôle de l'infection par *S. pneumoniae* (Filippo et al., 2014; Raquil et al., 2008). Nous avons également observé une diminution de la mobilisation des DC qui pourrait s'expliquer par une migration vers les organes lymphoïdes. Nous avons des expériences en cours afin d'analyser la dynamique des populations cellulaires dans les ganglions médiastinaux. Ces travaux seront complétés avec des données de cellules isolées de patients BPCO. Pour cela, les cellules mononuclées du sang périphérique et des expectorations de patients BPCO seront stimulées *in vitro* avec la flagelline avant infection par *S. pneumoniae*. Ces études sur les cellules de donneurs BPCO permettra de valider s'il est possible de transposer ce traitement chez l'homme en clinique. Nous avons des travaux en cours visant à combiner le ciblage des cytokines IL-20 et l'utilisation de la flagelline afin de déterminer s'il existe un effet synergique en bloquant une voie régulatrice et en ajoutant un immunostimulant sur la réponse anti-infectieuse et l'exacerbation de la pathologie.

### 28. Autres approches thérapeutiques

Dans la prise en charge des patients BPCO, les directives actuelles au niveau national et international visent à vacciner les patients à risque contre les infections courantes comme la grippe et les pneumocoques. Les vaccins actuellement disponibles ne sont efficaces que sur une partie de ces pathogènes. Par ailleurs, les virus grippaux et les pneumocoques sont loin d'être les seuls pathogènes à l'origine des exacerbations de la BPCO. L'altération des défenses immunitaires chez les patients BPCO les rendent susceptibles même à des microorganismes dont la colonisation est souvent sans manifestation clinique dont NTHi. Le potentiel thérapeutique de nos deux approches pourra être envisagé dans une application plus générale (sans cibler un pathogène en particulier) et nos premières données suggèrent que ces traitements sont aussi efficaces vis à vis de NTHi.

Il a été montré que la flagelline présente des effets adjuvants qui impliquent la participation des DC (Fougeron et al., 2015). Il serait donc envisageable d'inclure la flagelline dans les formulations vaccinales destinées aux patients BPCO afin de stimuler le système immunitaire. L'évaluation de la faisabilité d'une telle approche devra être réalisée dans notre

## Discussion et perspectives

modèle murin de BPCO. Dans ce modèle, différentes voies d'administration du vaccin et de la flagelline devront être testées.

Les exacerbations de la BPCO sont associées à la colonisation des voies respiratoires par les bactéries. Une étude complémentaire pourra porter sur la capacité de l'anti-IL-20RB à prévenir la colonisation bactérienne et donc à prévenir le développement des exacerbations. Pour se faire, il sera nécessaire d'établir un modèle de colonisation bactérienne des voies respiratoires qui a déjà été montré pour *S. pneumoniae*. Dans ce modèle, les souris seront traitées avec l'anticorps neutralisant anti-IL-20RB avant et/ou pendant la période de colonisation bactérienne, et comparées à des souris infectées avec des souches bactériennes mutantes pour les facteurs d'adhésion et ou de colonisation.

Une autre application thérapeutique à évaluer dans nos deux approches concerne leur association avec des antibiothérapies. Actuellement, les patients BPCO en cours d'exacerbation sont systématiquement mis sous antibiothérapie. Des données récentes montrent l'intérêt d'associer un immunostimulant avec ce type de traitement ce qui permet de renforcer l'effet de l'antibiothérapie et potentiellement de prévenir le développement de résistances (Porte et al., 2015). Afin de vérifier la compatibilité voire la complémentarité de ces traitements dans notre modèle murin d'exacerbation, ces souris seront traitées avec de faibles doses d'antibiotiques puis recevront l'anti-IL-20RB et/ou la flagelline. Une approche de ce type a déjà été réalisée avec la flagelline, dans le cadre d'une infection léthale par *S. pneumoniae* ou d'une surinfection bactérienne après une primo-infection par le virus de la grippe. La combinaison des deux traitements permettait d'améliorer l'effet de l'antibiotique (Porte et al., 2015).

Dans ce travail de doctorat, nous avons montré que le défaut de réponse IL-17 et IL-22 au cours de l'exacerbation de la BPCO par les bactéries (*S. pneumoniae*) fait intervenir une altération de la maturation des DC directement par la fumée de cigarette (Figure 2) ou indirectement via l'induction de cytokines IL-20. En effet, ces deux traitements inhibent l'expression des molécules de costimulation et la production de cytokines polarisantes pro-Th17 et pro-Th1 par les DC, ainsi que leur fonction d'activation et de polarisation des lymphocytes T naïfs. Cette démonstration nous a conduit à tester l'intérêt thérapeutique de cette découverte puisque la supplémentation en IL-22 permet de bloquer l'exacerbation de la BPCO. Nos données montrent que le ciblage des cytokines IL-20 avec des anticorps neutralisants anti-IL-20RB, ou la stimulation du système immunitaire avec la flagelline (agoniste de TLR5) sont des approches thérapeutiques contre l'exacerbation de la BPCO, aussi bien dans des approches préventives que curatives. Ces deux traitements sont associées une amélioration de la clairance de *Streptococcus pneumoniae* et une limitation de l'inflammation pulmonaire. Etant donné que l'effet de la flagelline semble impliquer une activation des APC au niveau systémique, ce mécanisme reste à étudier dans le cas des anticorps anti-IL-20RB.

Au delà de l'intérêt thérapeutique, il est indispensable d'approfondir ce travail par des études mécanistiques plus poussées sur le mode d'action de ces traitements, entre autre les organes et cellules directement ciblées, et les voies de signalisation mise en jeux. Par ailleurs, une analyse de la compatibilité avec l'antibiothérapie est indispensable puisque l'utilisation de cette antibiothérapie est courante dans les exacerbations d'origine bactérienne. Enfin, des études complémentaires sur l'intérêt thérapeutique de l'anticorps anti-IL-20RB et de la flagelline sont nécessaires sur des donneurs BPCO avant d'envisager toute étude clinique chez l'homme



## **VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## Références bibliographiques

Alexandrakis, M.G., Pappa, C.A., Kokonozaki, M., Boula, A., Vyzoukaki, R., Staphylaki, D., Papadopoulou, A., Androulakis, N., Tsirakis, G., and Sfiridaki, A. (2015). Circulating serum levels of IL-20 in multiple myeloma patients: its significance in angiogenesis and disease activity. *Med. Oncol.* 32, 42.

Anuradha, R., Munisankar, S., Dolla, C., Kumaran, P., Nutman, T.B., and Babu, S. (2016). Modulation of CD4+ and CD8+ T-Cell Function by Interleukin 19 and Interleukin 24 During Filarial Infections. *J. Infect. Dis.* 213, 811–815.

Ashwell, J.D., DeFranco, A.L., Paul, W.E., and Schwartz, R.H. (1984). Antigen presentation by resting B cells. Radiosensitivity of the antigen-presentation function and two distinct pathways of T cell activation. *J. Exp. Med.* 159, 881–905.

Bai, X., Stitzel, J.A., Bai, A., Zambrano, C.A., Phillips, M., Marrack, P., and Chan, E.D. (2017). Nicotine Impairs Macrophage Control of Mycobacterium tuberculosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*

Barnes, P.J. (1998). Chronic obstructive pulmonary disease: new opportunities for drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 415–423.

Barnes, P.J. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 183–192.

Baxevanis, C.N., Voutsas, I.F., and Tsitsilonis, O.E. (2013). Toll-like receptor agonists: current status and future perspective on their utility as adjuvants in improving anticancer vaccination strategies. *Immunotherapy* 5, 497–511.

Beatty, C.D., Grayston, J.T., Wang, S.-P., Kuo, C.-C., Reto, C.S., and Martin, T.R. (1991). Chlamydia pneumoniae, Strain TWAR, Infection in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 1408–1410.

Bech, R., Jalilian, B., Agger, R., Iversen, L., Erlandsen, M., Otkjaer, K., Johansen, C., Paludan, S.R., Rosenberg, C.A., Kragballe, K., et al. (2016). Interleukin 20 regulates dendritic cell migration and expression of co-stimulatory molecules. *Mol. Cell. Ther.* 4, 1.

## Références bibliographiques

- Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., et al. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 3723–3738.
- Behrouzi, A., Vaziri, F., Rahimi-Jamnani, F., Afrough, P., Rahbar, M., Satarian, F., and Siadat, S.D. (2017). Vaccine Candidates against Nontypeable *Haemophilus influenzae*: a Review. *Iran. Biomed. J.* *21*, 69–76.
- Bezemer, G.F.G., Sagar, S., Bergenhenegouwen, J. van, Georgiou, N.A., Garssen, J., Kraneveld, A.D., and Folkerts, G. (2012). Dual Role of Toll-Like Receptors in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol. Rev.* *64*, 337–358.
- Blue, M.L., and Janoff, A. (1978). Possible mechanisms of emphysema in cigarette smokers. Release of elastase from human polymorphonuclear leukocytes by cigarette smoke condensate in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* *117*, 317–325.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 443–473.
- Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W., Grossmann, A., Brender, T., Carollo, S., Eagan, M., Foster, D., Haldeman, B.A., Hammond, A., et al. (2001). Interleukin 20. *Cell* *104*, 9–19.
- Boehme, S.A., Franz-Bacon, K., Ludka, J., DiTirro, D.N., Ly, T.W., and Bacon, K.B. (2016). MAP3K19 Is Overexpressed in COPD and Is a Central Mediator of Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation and Lower Airway Destruction. *PLOS ONE* *11*, e0167169.
- Boixeda, R., Almagro, P., Díez-Manglano, J., Cabrera, F.J., Recio, J., Martín-Garrido, I., and Soriano, J.B. (2015). Bacterial flora in the sputum and comorbidity in patients with acute exacerbations of COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* *10*, 2581–2591.
- Boks, M.A., Bruijns, S.C.M., Ambrosini, M., Kalay, H., van Bloois, L., Storm, G., Gruijl, T. de, and van Kooyk, Y. (2015). In situ Delivery of Tumor Antigen– and Adjuvant-Loaded Liposomes Boosts Antigen-Specific T-Cell Responses by Human Dermal Dendritic Cells. *J. Invest. Dermatol.* *135*, 2697–2704.

## Références bibliographiques

- Borges da Silva, H., Fonseca, R., Pereira, R.M., Cassado, A.D.A., Álvarez, J.M., and D'Império Lima, M.R. (2015). Splenic Macrophage Subsets and Their Function during Blood-Borne Infections. *Front. Immunol.* 6, 480.
- Brashier, B.B., and Kodgule, R. (2012). Risk factors and pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Assoc Physicians India* 60, 17–21.
- Brucklacher-Waldert, V., Stuermer, K., Kolster, M., Wolthausen, J., and Tolosa, E. (2009). Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 132, 3329–3341.
- Bulfone-Paus, S., and Bahri, R. (2015). Mast Cells as Regulators of T Cell Responses. *Front. Immunol.* 6.
- Busman-Sahay, K.O., Walrath, T., Huber, S., and O'Connor, W. (2015). Cytokine crowdsourcing: multicellular production of TH17-associated cytokines. *J. Leukoc. Biol.* 97, 499–510.
- Cai, B., Cai, J., Luo, Y., Chen, C., and Zhang, S. (2015). The Specific Roles of JAK/STAT Signaling Pathway in Sepsis. *Inflammation* 38, 1599–1608.
- Carow, B., and Rottenberg, M.E. (2014). SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Front. Immunol.* 5.
- CDC (2016a). Pneumococcal Vaccination | CDC.
- CDC (2016b). Haemophilus influenzae | Hib | Clinical Features | CDC.
- Chan, L.C., Chaili, S., Filler, S.G., Barr, K., Wang, H., Kupferwasser, D., Edwards, J.E., Jr, Xiong, Y.Q., Ibrahim, A.S., et al. (2015). Nonredundant Roles of Interleukin-17A (IL-17A) and IL-22 in Murine Host Defense against Cutaneous and Hematogenous Infection Due to Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Infect. Immun.* 83, 4427.
- Chen, X., and Jensen, P.E. (2008). The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 56, 77.
- Christensen, P.J., Preston, A.M., Ling, T., Du, M., Fields, W.B., Curtis, J.L., and Beck, J.M. (2008). Pneumocystis murina Infection and Cigarette Smoke Exposure Interact To Cause

## Références bibliographiques

Increased Organism Burden, Development of Airspace Enlargement, and Pulmonary Inflammation in Mice. *Infect. Immun.* 76, 3481–3490.

Claes, A.-K., Zhou, J.Y., and Philpott, D.J. (2015). NOD-Like Receptors: Guardians of Intestinal Mucosal Barriers. *Physiology* 30, 241–250.

Collin, M., McGovern, N., and Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140, 22–30.

Contreras, V., Urien, C., Guiton, R., Alexandre, Y., Manh, T.-P.V., Andrieu, T., Crozat, K., Jouneau, L., Bertho, N., Epardaud, M., et al. (2010). Existence of CD8 $\alpha$ -Like Dendritic Cells with a Conserved Functional Specialization and a Common Molecular Signature in Distant Mammalian Species. *J. Immunol.* 185, 3313–3325.

Cruz, F.M., Colbert, J.D., Merino, E., Kriegsman, B.A., and Rock, K.L. (2017). The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 35, 149–176.

Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B., and Lawrence, T. (2014). Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* 33, 1104.

Decramer, M., Janssens, W., and Miravittles, M. (2012). Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet Lond. Engl.* 379, 1341–1351.

Demedts, I.K., Bracke, K.R., Van Pottelberge, G., Testelmans, D., Verleden, G.M., Vermassen, F.E., Joos, G.F., and Brusselle, G.G. (2007). Accumulation of Dendritic Cells and Increased CCL20 Levels in the Airways of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 998–1005.

Di Stefano, A., Caramori, G., Gnemmi, I., Contoli, M., Vicari, C., Capelli, A., Magno, F., D'Anna, S.E., Zanini, A., Brun, P., et al. (2009). T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin. Exp. Immunol.* 157, 316–324.

Ding, F.-M., Liao, R.-M., Chen, Y.-Q., Xie, G.-G., Zhang, P.-Y., Shao, P., and Zhang, M. (2017). Upregulation of SOCS3 in lung CD4<sup>+</sup> T cells in a mouse model of chronic PA lung

## Références bibliographiques

infection and suppression of Th17-mediated neutrophil recruitment in exogenous SOCS3 transfer in vitro. *Mol. Med. Rep.* *16*, 778–786.

Dyring-Andersen, B., Velte Honoré, T., Madelung, A., Bzorek, M., Simonsen, S., Clemmensen, S.N., Clark, R.A., Borregaard, N., and Skov, L. (2017). IL-17A and IL-22 producing neutrophils in psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* n/a-n/a.

Ehret, G.B., Reichenbach, P., Schindler, U., Horvath, C.M., Fritz, S., Nabholz, M., and Bucher, P. (2001). DNA Binding Specificity of Different STAT Proteins COMPARISON OF IN VITRO SPECIFICITY WITH NATURAL TARGET SITES. *J. Biol. Chem.* *276*, 6675–6688.

Erwin, A.L., and Smith, A.L. (2007). Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol.* *15*, 355–362.

Eyerich, K., Foerster, S., Rombold, S., Seidl, H.-P., Behrendt, H., Hofmann, H., Ring, J., and Traidl-Hoffmann, C. (2008). Patients with Chronic Mucocutaneous Candidiasis Exhibit Reduced Production of Th17-Associated Cytokines IL-17 and IL-22. *J. Invest. Dermatol.* *128*, 2640–2645.

Eyerich, K., Dimartino, V., and Cavani, A. (2017). IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. *Eur. J. Immunol.* *47*, 607–614.

Filippo, K.D., Neill, D.R., Mathies, M., Bangert, M., McNeill, E., Kadioglu, A., and Hogg, N. (2014). A new protective role for S100A9 in regulation of neutrophil recruitment during invasive pneumococcal pneumonia. *FASEB J.* *28*, 3600–3608.

Fonseca-Camarillo, G., Furuzawa-Carballeda, J., Granados, J., and Yamamoto-Furusho, J.K. (2014). Expression of interleukin (IL)-19 and IL-24 in inflammatory bowel disease patients: a cross-sectional study. *Clin. Exp. Immunol.* *177*, 64–75.

Foronjy, R.F., Salathe, M.A., Dabo, A.J., Baumlin, N., Cummins, N., Eden, E., and Geraghty, P. (2016). TLR9 expression is required for the development of cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *311*, L154–L166.

Fougeron, D., Van Maele, L., Songhet, P., Cayet, D., Hot, D., Van Rooijen, N., Mollenkopf, H.-J., Hardt, W.-D., Benecke, A.G., and Sirard, J.-C. (2015). Indirect Toll-like receptor 5-

## Références bibliographiques

mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract. *Vaccine* 33, 3331–3341.

Freeman, C.M., Martinez, F.J., Han, M.K., Ames, T.M., Chensue, S.W., Todt, J.C., Arenberg, D.A., Meldrum, C.A., Getty, C., McCloskey, L., et al. (2009). Lung Dendritic Cell Expression of Maturation Molecules Increases with Worsening Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 1179–1188.

Givi, M.E., Akbari, P., Boon, L., Puzovic, V.S., Bezemer, G.F.G., Ricciardolo, F.L.M., Folkerts, G., Redegeld, F.A., and Mortaz, E. (2016). Dendritic cells inversely regulate airway inflammation in cigarette smoke-exposed mice. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 310, L95–L102.

GOLD (2017). GOLD 2017 Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD.

Gordon, S., Plüddemann, A., and Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.* 262, 36–55.

Griffiths, K.L., Tan, J.K.H., and O'Neill, H.C. (2013). Investigation into the prevalence of a novel dendritic-like cell subset in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* 17, 1608–1618.

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 571–578.

Guillon, A., Jouan, Y., Brea, D., Gueugnon, F., Dalloneau, E., Baranek, T., Henry, C., Morello, E., Renauld, J.-C., Pichavant, M., et al. (2015). Neutrophil proteases alter the interleukin-22-receptor-dependent lung antimicrobial defence. *Eur. Respir. J.* 46, 771–782.

Gupta, S.K., Bajwa, P., Deb, R., Chellappa, M.M., and Dey, S. (2014). Flagellin A Toll-Like Receptor 5 Agonist as an Adjuvant in Chicken Vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.* CVI 21, 261.

Han, M.K., Muellerova, H., Curran-Everett, D., Dransfield, M.T., Washko, G.R., Regan, E.A., Bowler, R.P., Beaty, T.H., Hokanson, J.E., Lynch, D.A., et al. (2013). GOLD 2011

## Références bibliographiques

disease severity classification in COPDGene: a prospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* *1*, 43–50.

Haniffa, M., Collin, M., and Ginhoux, F. (2013). Ontogeny and Functional Specialization of Dendritic Cells in Human and Mouse. *Adv. Immunol.* *120*, 1–49.

HAS (2014). [guide\\_parcours\\_de\\_soins\\_bpco\\_finale.pdf](#).

de Heer, H.J., Hammad, H., Soullié, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M.A.M., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004). Essential Role of Lung Plasmacytoid Dendritic Cells in Preventing Asthmatic Reactions to Harmless Inhaled Antigen. *J. Exp. Med.* *200*, 89–98.

Hewitt, R., Farne, H., Ritchie, A., Luke, E., Johnston, S.L., and Mallia, P. (2016). The role of viral infections in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Ther. Adv. Respir. Dis.* *10*, 158–174.

Hey, Y.Y., and O’Neill, H.C. (2012). Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function. *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 2611–2619.

Hiemstra, P.S. (2013). Altered Macrophage Function in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann. Am. Thorac. Soc.* *10*, S180–S185.

Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac–derived macrophages. *J. Exp. Med.* *209*, 1167–1181.

Hogg, J.C., and Timens, W. (2009). The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu. Rev. Pathol.* *4*, 435–459.

Hsu, Y.-H., and Chang, M.-S. (2014). The therapeutic potential of anti-interleukin-20 monoclonal antibody. *Cell Transplant.* *23*, 631–639.

Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tüttenberg, A., Steinbrink, K., and Jonuleit, H. (2013). Costimulatory Molecules on Immunogenic Versus Tolerogenic Human Dendritic Cells. *Front. Immunol.* *4*.

## Références bibliographiques

Hutchinson, A.F., Ghimire, A.K., Thompson, M.A., Black, J.F., Brand, C.A., Lowe, A.J., Smallwood, D.M., Vlahos, R., Bozinovski, S., Brown, G.V., et al. (2007). A community-based, time-matched, case-control study of respiratory viruses and exacerbations of COPD. *Respir. Med.* *101*, 2472–2481.

Ivanov, S., Fontaine, J., Paget, C., Fernandez, E.M., Maele, L.V., Renneson, J., Maillet, I., Wolf, N.M., Rial, A., Léger, H., et al. (2012). Key Role for Respiratory CD103+ Dendritic Cells, IFN- $\gamma$ , and IL-17 in Protection Against *Streptococcus pneumoniae* Infection in Response to  $\alpha$ -Galactosylceramide. *J. Infect. Dis.* *206*, 723–734.

Ivanov, S., Renneson, J., Fontaine, J., Barthelemy, A., Paget, C., Fernandez, E.M., Blanc, F., De Trez, C., Van Maele, L., Dumoutier, L., et al. (2013). Interleukin-22 reduces lung inflammation during influenza A virus infection and protects against secondary bacterial infection. *J. Virol.* *87*, 6911–6924.

Jacchieri, S.G., Torquato, R., and Brentani, R.R. (2003). Structural Study of Binding of Flagellin by Toll-Like Receptor 5. *J. Bacteriol.* *185*, 4243–4247.

Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity* *39*, 599–610.

Jiang, W., Su, J., Zhang, X., Cheng, X., Zhou, J., Shi, R., and Zhang, H. (2014). Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Res.* *63*, 943–950.

John-Schuster, G., Hager, K., Conlon, T.M., Irmeler, M., Beckers, J., Eickelberg, O., and Yildirim, A.Ö. (2014). Cigarette smoke-induced iBALT mediates macrophage activation in a B cell-dependent manner in COPD. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *307*, L692–L706.

Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 288–301.

## Références bibliographiques

- Kaplan, D.H. (2013). The IL-20 cytokine subfamily: bad guys in host defense? *Nat. Immunol.* *14*, 774–775.
- Keller, C.W., Freigang, S., and Lünemann, J.D. (2017). Reciprocal Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer T Cells: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Front. Immunol.* *8*.
- Kim, E.Y., Battaile, J.T., Patel, A.C., You, Y., Agapov, E., Grayson, M.H., Benoit, L.A., Byers, D.E., Alevy, Y., Tucker, J., et al. (2008). Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat. Med.* *14*, 633–640.
- Kiser, T.H., Allen, R.R., Valuck, R.J., Moss, M., and Vandivier, R.W. (2014). Outcomes Associated with Corticosteroid Dosage in Critically Ill Patients with Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *189*, 1052–1064.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 377–391.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M.T., et al. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* *103*, 1345–1352.
- Kuang, L.-J., Deng, T.-T., Wang, Q., Qiu, S.-L., Liang, Y., He, Z.-Y., Zhang, J.-Q., Bai, J., Li, M.-H., Deng, J.-M., et al. (2016). Dendritic cells induce Tc1 cell differentiation via the CD40/CD40L pathway in mice after exposure to cigarette smoke. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *311*, L581–L589.
- Langereis, J.D., and de Jonge, M.I. (2015). Invasive Disease Caused by Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Emerg. Infect. Dis.* *21*, 1711–1718.
- Le Rouzic, O., Koné, B., Kluza, J., Marchetti, P., Hennegrave, F., Olivier, C., Kervoaze, G., Vilain, E., Mordacq, C., Just, N., et al. (2016). Cigarette smoke alters the ability of human dendritic cells to promote anti-*Streptococcus pneumoniae* Th17 response. *Respir. Res.* *17*, 94.

## Références bibliographiques

- Lee, S.-J., Cho, S.-C., Lee, E.-J., Kim, S., Lee, S.-B., Lim, J.-H., Choi, Y.H., Kim, W.-J., and Moon, S.-K. (2013). Interleukin-20 Promotes Migration of Bladder Cancer Cells through Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)-mediated MMP-9 Protein Expression Leading to Nuclear Factor (NF- $\kappa$ B) Activation by Inducing the Up-regulation of p21WAF1 Protein Expression. *J. Biol. Chem.* 288, 5539.
- Li, Y.-J., Liu, G., Li, Y., Vecchiarelli-Federico, L.M., Liu, J.C., Zacksenhaus, E., Shan, S.W., Yang, B.B., Li, Q., Dash, R., et al. (2013). *mda-7/IL-24* Expression Inhibits Breast Cancer through Upregulation of Growth Arrest-Specific Gene 3 (*gas3*) and Disruption of  $\beta$ 1 Integrin Function. *Mol. Cancer Res.* 11, 593–603.
- Liao, S.-X., Ding, T., Rao, X.-M., Sun, D.-S., Sun, P.-P., Wang, Y.-J., Fu, D.-D., Liu, X.-L., and Ou-Yang, Y. (2015). Cigarette smoke affects dendritic cell maturation in the small airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mol. Med. Rep.* 11, 219–225.
- Lieberman, D., Lieberman, D., Ben-Yaakov, M., Shmarkov, O., Gelfer, Y., Varshavsky, R., Ohana, B., Lazarovich, Z., and Boldur, I. (2002). Serological evidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in acute exacerbation of COPD. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44, 1–6.
- Lim, C., Hong, M., and Savan, R. (2016). Human IL-22 binding protein isoforms act as a rheostat for IL-22 signaling. *Sci Signal* 9, ra95-ra95.
- Liu, X., Zhou, H., Huang, X., Cui, J., Long, T., Xu, Y., Liu, H., Yu, R., Zhao, R., Luo, G., et al. (2016). A Broad Blockade of Signaling from the IL-20 Family of Cytokines Potently Attenuates Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol.* 197, 3029–3037.
- Lu, Y.-J., Gross, J., Bogaert, D., Finn, A., Bagrade, L., Zhang, Q., Kolls, J.K., Srivastava, A., Lundgren, A., Forte, S., et al. (2008). Interleukin-17A Mediates Acquired Immunity to Pneumococcal Colonization. *PLoS Pathog* 4, e1000159.
- Lugade, A.A., Bogner, P.N., Thatcher, T.H., Sime, P.J., Phipps, R.P., and Thanavala, Y. (2014). Cigarette Smoke Exposure Exacerbates Lung Inflammation and Compromises Immunity to Bacterial Infection. *J. Immunol.* 192, 5226–5235.
- Ma, Q., Ma, Q., Jin, B., Jin, B., Zhang, Y., Zhang, Y., Shi, Y., Shi, Y., Zhang, C., Zhang, C., et al. (2016). Secreted recombinant human IL-24 protein inhibits the proliferation of

## Références bibliographiques

esophageal squamous cell carcinoma Eca-109 cells in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* 35, 2681–2690.

Marqués, J.M., Rial, A., Muñoz, N., Pellay, F.-X., Van Maele, L., Léger, H., Camou, T., Sirard, J.-C., Benecke, A., and Chabalgoity, J.A. (2012). Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity. *Immunobiology* 217, 420–429.

Martin, J.C., Wolk, K., Bériou, G., Abidi, A., Witte-Händel, E., Louvet, C., Kokolakis, G., Drujont, L., Dumoutier, L., Renaud, J.-C., et al. (2017). Limited Presence of IL-22 Binding Protein, a Natural IL-22 Inhibitor, Strengthens Psoriatic Skin Inflammation. *J. Immunol.* 198, 3671–3678.

Mear, J.B., Gosset, P., Kipnis, E., Faure, E., Dessein, R., Jawhara, S., Fradin, C., Faure, K., Poulain, D., Sendid, B., et al. (2014). *Candida albicans* Airway Exposure Primes the Lung Innate Immune Response against *Pseudomonas aeruginosa* Infection through Innate Lymphoid Cell Recruitment and Interleukin-22-Associated Mucosal Response. *Infect. Immun.* 82, 306.

Miao, E.A., Andersen-Nissen, E., Warren, S.E., and Aderem, A. (2007). TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin. Immunopathol.* 29, 275–288.

Mildner, A., and Jung, S. (2014). Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity* 40, 642–656.

Molfino, N.A., and Jeffery, P.K. (2007). Chronic obstructive pulmonary disease: Histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 20, 462–472.

Morrow, J.D., Zhou, X., Lao, T., Jiang, Z., DeMeo, D.L., Cho, M.H., Qiu, W., Cloonan, S., Pinto-Plata, V., Celli, B., et al. (2017). Functional interactors of three genome-wide association study genes are differentially expressed in severe chronic obstructive pulmonary disease lung tissue. *Sci. Rep.* 7, 44232.

Mortaz, E., Kraneveld, A.D., Smit, J.J., Kool, M., Lambrecht, B.N., Kunkel, S.L., Lukacs, N.W., Nijkamp, F.P., and Folkerts, G. (2009). Effect of Cigarette Smoke Extract on Dendritic Cells and Their Impact on T-Cell Proliferation. *PLOS ONE* 4, e4946.

## Références bibliographiques

Muls, N., Nasr, Z., Dang, H.A., Sindic, C., and Pesch, V. van (2017). IL-22, GM-CSF and IL-17 in peripheral CD4+ T cell subpopulations during multiple sclerosis relapses and remission. Impact of corticosteroid therapy. *PLOS ONE* 12, e0173780.

Münz, C., Steinman, R.M., and Fujii, S. (2005). Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 202, 203.

Myles, I.A., Fontecilla, N.M., Valdez, P.A., Vithayathil, P.J., Naik, S., Belkaid, Y., Ouyang, W., and Datta, S.K. (2013). Signaling via the IL-20 receptor inhibits cutaneous production of IL-1 $\beta$  and IL-17A to promote infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Immunol.* 14, 804–811.

Neefjes, J., Jongma, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 823–836.

Noda, N., Matsumoto, K., Fukuyama, S., Asai, Y., Kitajima, H., Seki, N., Matsunaga, Y., Kan-o, K., Moriwaki, A., Morimoto, K., et al. (2013). Cigarette smoke impairs phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages via inhibition of the histone deacetylase/Rac/CD9 pathways. *Int. Immunol.* 25, 643–650.

Oh, J., and Shin, J.-S. (2015). The Role of Dendritic Cells in Central Tolerance. *Immune Netw.* 15, 111–120.

OMS (2015). WHO | Pneumococcal Disease.

OMS (2017). OMS | Les 10 principales causes de mortalité.

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 71–109.

Parrish-Novak, J., Xu, W., Brender, T., Yao, L., Jones, C., West, J., Brandt, C., Jelinek, L., Madden, K., McKernan, P.A., et al. (2002). Interleukins 19, 20, and 24 Signal through Two Distinct Receptor Complexes DIFFERENCES IN RECEPTOR-LIGAND INTERACTIONS MEDiate UNIQUE BIOLOGICAL FUNCTIONS. *J. Biol. Chem.* 277, 47517–47523.

## Références bibliographiques

Pavord, I.D., Jones, P.W., Burgel, P.-R., and Rabe, K.F. (2016). Exacerbations of COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* *11*, 21.

Persaud, L., Jesus, D.D., Brannigan, O., Richiez-Paredes, M., Huaman, J., Alvarado, G., Riker, L., Mendez, G., Dejoie, J., and Sauane, M. (2016). Mechanism of Action and Applications of Interleukin 24 in Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.

Pichavant, M., Rémy, G., Bekaert, S., Le Rouzic, O., Kervoaze, G., Vilain, E., Just, N., Tillie-Leblond, I., Trottein, F., Cataldo, D., et al. (2014). Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunol.* *7*, 568–578.

Pichavant, M., Sharan, R., Le Rouzic, O., Olivier, C., Hennegrave, F., Rémy, G., Pérez-Cruz, M., Koné, B., Gosset, P., Just, N., et al. (2015). IL-22 Defect During *Streptococcus pneumoniae* Infection Triggers Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *EBioMedicine* *2*, 1686–1696.

Porte, R., Fougeron, D., Muñoz-Wolf, N., Tabareau, J., Georgel, A.-F., Wallet, F., Paget, C., Trottein, F., Chabalgoity, J.A., Carnoy, C., et al. (2015). A Toll-Like Receptor 5 Agonist Improves the Efficacy of Antibiotics in Treatment of Primary and Influenza Virus-Associated Pneumococcal Mouse Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 6064–6072.

Qiu, F., Liang, C.-L., Liu, H., Zeng, Y.-Q., Hou, S., Huang, S., Lai, X., and Dai, Z. (2017). Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget* *8*, 268.

Raquil, M.-A., Anceriz, N., Rouleau, P., and Tessier, P.A. (2008). Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 3366–3374.

Ravi, A.K., Plumb, J., Gaskell, R., Mason, S., Broome, C.S., Booth, G., Catley, M., Vestbo, J., and Singh, D. (2017). COPD monocytes demonstrate impaired migratory ability. *Respir. Res.* *18*, 90.

Ricci, S., Gerlini, A., Pammolli, A., Chiavolini, D., Braione, V., Tripodi, S.A., Colombari, B., Blasi, E., Oggioni, M.R., Peppoloni, S., et al. (2013). Contribution of different pneumococcal virulence factors to experimental meningitis in mice. *BMC Infect. Dis.* *13*, 444.

## Références bibliographiques

- Robays, L.J., Lanckacker, E.A., Moerloose, K.B., Maes, T., Bracke, K.R., Brusselle, G.G., Joos, G.F., and Vermaelen, K.Y. (2009). Concomitant Inhalation of Cigarette Smoke and Aerosolized Protein Activates Airway Dendritic Cells and Induces Allergic Airway Inflammation in a TLR-Independent Way. *J. Immunol.* *183*, 2758–2766.
- Robinson, K.M., Choi, S.M., McHugh, K.J., Mandalapu, S., Enelow, R.I., Kolls, J.K., and Alcorn, J.F. (2013). Influenza A Exacerbates *Staphylococcus aureus* Pneumonia by Attenuating IL-1 $\beta$  Production in Mice. *J. Immunol.* *191*, 5153–5159.
- Roos, A.B., Sethi, S., Nikota, J., Wrona, C.T., Dorrington, M.G., Sandén, C., Bauer, C.M.T., Shen, P., Bowdish, D., Stevenson, C.S., et al. (2015). IL-17A and the Promotion of Neutrophilia in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *192*, 428–437.
- Rosell, A., Monsó, E., Soler, N., Torres, F., Angrill, J., Riise, G., Zalacaín, R., Morera, J., and Torres, A. (2005). Microbiologic Determinants of Exacerbation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Arch. Intern. Med.* *165*, 891–897.
- Rossez, Y., Wolfson, E.B., Holmes, A., Gally, D.L., and Holden, N.J. (2015). Bacterial Flagella: Twist and Stick, or Dodge across the Kingdoms. *PLOS Pathog.* *11*, e1004483.
- Rouzic, O.L., Pichavant, M., Frealde, E., Guillon, A., Si-Tahar, M., and Gosset, P. (2017). Th17 cytokines: novel potential therapeutic targets for COPD pathogenesis and exacerbations. *Eur. Respir. J.* *50*, 1602434.
- Ruben, J.M., Bontkes, H.J., Westers, T.M., Hooijberg, E., Ossenkoppele, G.J., de Gruijl, T.D., and van de Loosdrecht, A.A. (2015). Differential capacity of human interleukin-4 and interferon- $\alpha$  monocyte-derived dendritic cells for cross-presentation of free versus cell-associated antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* *64*, 1419–1427.
- Rutz, S., Wang, X., and Ouyang, W. (2014). The IL-20 subfamily of cytokines — from host defence to tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 783–795.
- Sabat, R., Witte, E., Witte, K., and Wolk, K. (2013). IL-22 and IL-17: An Overview. In *IL-17, IL-22 and Their Producing Cells: Role in Inflammation and Autoimmunity*, V. Quesniaux, B. Ryffel, and F. Padova, eds. (Basel: Springer Basel), pp. 11–35.

## Références bibliographiques

Sabatel, C., Radermecker, C., Fievez, L., Paulissen, G., Chakarov, S., Fernandes, C., Olivier, S., Toussaint, M., Pirottin, D., Xiao, X., et al. (2017). Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity* 46, 457–473.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109–1118.

Sandford, A.J., Weir, T.D., and Pare, P.D. (1997). Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 10, 1380–1391.

Savva, A., and Roger, T. (2013). Targeting Toll-Like Receptors: Promising Therapeutic Strategies for the Management of Sepsis-Associated Pathology and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 4.

Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013). Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* 38, 336–348.

Seif, F., Khoshmirsafa, M., Aazami, H., Mohsenzadegan, M., Sedighi, G., and Bahar, M. (2017). The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun. Signal.* 15, 23.

Seys, L.J.M., Verhamme, F.M., Schinwald, A., Hammad, H., Cunoosamy, D.M., Bantsimba-Malanda, C., Sabirsh, A., McCall, E., Flavell, L., Herbst, R., et al. (2015). Role of B Cell-Activating Factor in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 192, 706–718.

Sharan, R., Perez-Cruz, M., Kervoaze, G., Gosset, P., Weynants, V., Godfroid, F., Hermand, P., Trottein, F., Pichavant, M., and Gosset, P. (2017). Interleukin-22 protects against non-typeable *Haemophilus influenzae* infection: alteration during chronic obstructive pulmonary disease. *Mucosal Immunol.* 10, 139–149.

## Références bibliographiques

- Shui, X.-L., Lin, W., Mao, C.-W., Feng, Y.-Z., Kong, J.-Z., and Chen, S.-M. (2017). Blockade of IL-17 alleviated inflammation in rat arthritis and MMP-13 expression. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* *21*, 2329–2337.
- Silverman, E.K., and Sandhaus, R.A. (2009). Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2749–2757.
- Soderstrom, C., Berstein, G., Zhang, W., Valdez, H., Fitz, L., Kuhn, M., and Fraser, S. (2017). Ultra-Sensitive Measurement of IL-17A and IL-17F in Psoriasis Patient Serum and Skin. *AAPS J.* *19*, 1218–1222.
- Soler-Cataluña, J.J., Martínez-García, M.Á., Sánchez, P.R., Salcedo, E., Navarro, M., and Ochoa, R. (2005). Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* *60*, 925–931.
- Stefano, A.D., Ricciardolo, F.L.M., Caramori, G., Adcock, I.M., Chung, K.F., Barnes, P.J., Brun, P., Leonardi, A., Andò, F., Vallese, D., et al. (2017). Bronchial inflammation and bacterial load in stable COPD is associated with TLR4 overexpression. *Eur. Respir. J.* *49*, 1602006.
- Stockinger, B., and Omenetti, S. (2017). The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat. Rev. Immunol.* *advance online publication*.
- Su, J., Liu, H., Tan, X., Ji, Y., Jiang, Y., Prabhakar, M., Rong, Z., Zhou, H., and Zhang, G. (2015). Sputum Bacterial and Fungal Dynamics during Exacerbations of Severe COPD. *PLoS ONE* *10*.
- Sun, D.-P., Yeh, C.-H., So, E., Wang, L.-Y., Wei, T.-S., Chang, M.-S., and Hsing, C.-H. (2013). Interleukin (IL)-19 promoted skin wound healing by increasing fibroblast keratinocyte growth factor expression. *Cytokine* *62*, 360–368.
- Sundberg-Kövamees, M., Grunewald, J., and Wahlström, J. (2016). Immune cell activation and cytokine release after stimulation of whole blood with pneumococcal C-polysaccharide and capsular polysaccharides. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* *52*, 1–8.

## Références bibliographiques

- Sutherland, A.P.R., Ng, L.G., Fletcher, C.A., Shum, B., Newton, R.A., Grey, S.T., Rolph, M.S., Mackay, F., and Mackay, C.R. (2005). BAFF Augments Certain Th1-Associated Inflammatory Responses. *J. Immunol.* *174*, 5537–5544.
- Tan, C., Xuan, L., Cao, S., Yu, G., Hou, Q., and Wang, H. (2016). Decreased Histone Deacetylase 2 (HDAC2) in Peripheral Blood Monocytes (PBMCs) of COPD Patients. *PLOS ONE* *11*, e0147380.
- Tan, W.C., Xiang, X., Qiu, D., Ng, T.P., Lam, S.F., and Hegele, R.G. (2003). Epidemiology of respiratory viruses in patients hospitalized with near-fatal asthma, acute exacerbations of asthma, or chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Med.* *115*, 272–277.
- Thomas, A., Laxton, C., Rodman, J., Myangar, N., Horscroft, N., and Parkinson, T. (2007). Investigating Toll-Like Receptor Agonists for Potential To Treat Hepatitis C Virus Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 2969–2978.
- Tran, H.B., Barnawi, J., Ween, M., Hamon, R., Roscioli, E., Hodge, G., Reynolds, P.N., Pitson, S.M., Davies, L.T., Haberberger, R., et al. (2016). Cigarette smoke inhibits efferocytosis via deregulation of sphingosine kinase signaling: reversal with exogenous S1P and the S1P analogue FTY720. *J. Leukoc. Biol.* *100*, 195–202.
- Trentini, M.M., Oliveira, F.M. de, Kipnis, A., and Junqueira-Kipnis, A.P. (2016). The Role of Neutrophils in the Induction of Specific Th1 and Th17 during Vaccination against Tuberculosis. *Front. Microbiol.* *7*.
- Tritsaris, K., Myren, M., Ditlev, S.B., Hübschmann, M.V., Blom, I. van der, Hansen, A.J., Olsen, U.B., Cao, R., Zhang, J., Jia, T., et al. (2007). IL-20 is an arteriogenic cytokine that remodels collateral networks and improves functions of ischemic hind limbs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 15364–15369.
- Tsoumakidou, M., Tousa, S., Semitekolou, M., Panagiotou, P., Panagiotou, A., Morianos, I., Litsiou, E., Trochoutsou, A.I., Konstantinou, M., Potaris, K., et al. (2014). Tolerogenic signaling by pulmonary CD1c+ dendritic cells induces regulatory T cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease by IL-27/IL-10/inducible costimulator ligand. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 944–954.e8.

## Références bibliographiques

- Valeri, M., and Raffatellu, M. (2016). Cytokines IL-17 and IL-22 in the host response to infection. *Pathog. Dis.* 74.
- Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Songhet, P., Dumoutier, L., Ferrero, I., Janot, L., Erard, F., Bertout, J., Leger, H., et al. (2010). TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 1177–1185.
- Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Ivanov, S., Porte, R., Deruy, E., Chabalgoity, J.A., Renaud, J.-C., Eberl, G., Benecke, A.G., et al. (2014). Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J. Infect. Dis.* 210, 493–503.
- Vandecasteele, S.J., De Bacquer, D., Caluwe, R., Ombelet, S., and Van Vlem, B. (2017). Immunogenicity and safety of the 13-valent Pneumococcal Conjugate vaccine in 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine naïve and pre-immunized patients under treatment with chronic haemodialysis: a longitudinal quasi-experimental phase IV study. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*
- Varol, C., Mildner, A., and Jung, S. (2015). Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 643–675.
- Veldhoen, M. (2017). Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat. Immunol.* 18, 612–621.
- Vlahos, R., and Bozinovski, S. (2014). Role of Alveolar Macrophages in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front. Immunol.* 5.
- Walzer, T., Dalod, M., Vivier, E., and Zitvogel, L. (2005). Natural killer cell–dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5, S49–S59.
- Wang, F., Smith, N., Maier, L., Xia, W., Hammerberg, C., Chubb, H., Chen, C., Riblett, M., Johnston, A., Gudjonsson, J. e., et al. (2012a). Etanercept suppresses regenerative hyperplasia in psoriasis by acutely downregulating epidermal expression of interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24. *Br. J. Dermatol.* 167, 92–102.

## Références bibliographiques

- Wang, H., Ying, H., Wang, S., Gu, X., Weng, Y., Peng, W., Xia, D., and Yu, W. (2015). Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Respir. J.* 9, 330–341.
- Wang, R., Ahmed, J., Wang, G., Hassan, I., Strulovici-Barel, Y., Salit, J., Mezey, J.G., and Crystal, R.G. (2012b). Airway epithelial expression of TLR5 is downregulated in healthy smokers and smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 2217–2225.
- Wegenka, U.M. (2010). IL-20: Biological functions mediated through two types of receptor complexes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 353–363.
- Weir, G.M., Karkada, M., Hoskin, D., Stanford, M.M., MacDonald, L., Mansour, M., and Liwski, R.S. (2017). Combination of poly I:C and Pam3CSK4 enhances activation of B cells in vitro and boosts antibody responses to protein vaccines in vivo. *PLOS ONE* 12, e0180073.
- Weiss, R., Laengle, J., Sachet, M., Shurygina, A.-P., Kiselev, O., Egorov, A., and Bergmann, M. (2015). Interleukin-24 inhibits influenza A virus replication in vitro through induction of toll-like receptor 3 dependent apoptosis. *Antiviral Res.* 123, 93–104.
- WHO (2017). Tobacco.
- Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K., and Sabat, R. (2002). Cutting Edge: Immune Cells as Sources and Targets of the IL-10 Family Members? *J. Immunol.* 168, 5397–5402.
- Wolk, K., Witte, K., Witte, E., Proesch, S., Schulze-Tanzil, G., Nasilowska, K., Thilo, J., Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.-D., et al. (2008). Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1181–1193.
- Yanagisawa, H., Hashimoto, M., Minagawa, S., Takasaka, N., Ma, R., Moermans, C., Ito, S., Araya, J., Budelsky, A., Goodsell, A., et al. (2017). Role of IL-17A in murine models of COPD airway disease. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 312, L122–L130.
- Yin, T., Zhu, Z., Mei, Z., Feng, J., Zhang, W., He, Y., Shi, J., Qian, L., Liu, Y., Huang, Q., et al. (2017). Analysis of viral infection and biomarkers in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Respir. J.* n/a-n/a.

## Références bibliographiques

- Zgair, A.K., and Chhibber, S. (2011). Adhesion of *Stenotrophomonas maltophilia* to mouse tracheal mucus is mediated through flagella. *J. Med. Microbiol.* *60*, 1032–1037.
- Zhang, B., Chassaing, B., Shi, Z., Uchiyama, R., Zhang, Z., Denning, T.L., Crawford, S.E., Pruijssers, A.J., Iskarpatyoti, J.A., Estes, M.K., et al. (2014). Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4–mediated production of IL-22 and IL-18. *Science* *346*, 861–865.
- Zhang, L., Cheng, Z., Liu, W., and Wu, K. (2013). Expression of Interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in Serum and Sputum of Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* *10*, 459–465.
- Zhang, Z., Clarke, T.B., and Weiser, J.N. (2009). Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 1899.
- Zhou, H., and Kobzik, L. (2007). Effect of concentrated ambient particles on macrophage phagocytosis and killing of *Streptococcus pneumoniae*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *36*, 460–465.
- Zou, Y., Chen, X., Liu, J., Zhou, D.B., Kuang, X., Xiao, J., Yu, Q., Lu, X., Li, W., Xie, B., et al. (2017). Serum IL-1 $\beta$  and IL-17 levels in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* *12*, 1247–1254.

## **VII. ANNEXES**



29. Annexe n°1

**IL-22 Defect during *Streptococcus pneumoniae* Infection Triggers  
Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**

Muriel Pichavant, PhD<sup>1,2,3,4,5</sup>, Riti Sharan, PhD<sup>1,2,3,4,5</sup>, Olivier Le Rouzic, MD<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Cécile Olivier, MD<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Florence Hennegrave, MD<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Gaëlle Rémy, PhD<sup>1,2,3,4,5</sup>, Magdiel Pérez-Cruz, PhD<sup>1,2,3,4,5</sup>, **Bachirou Koné**, MSc<sup>1,2,3,4,5</sup>, Pierre Gosset, MD<sup>7</sup>, Nicolas Just, MD<sup>8</sup>, Philippe Gosset, PhD<sup>1,2,3,4,5</sup>

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

<sup>2</sup> Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France;

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

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

<sup>5</sup> Institut Fédératif de Recherche 142, F-59019 Lille, France;

<sup>6</sup> Service de Pneumologie, Hôpital Calmette, CHRU, Lille, France ;

<sup>7</sup> Service d'Anatomo-pathologie, Hôpital Saint Vincent de Paul, Lille, France ;

<sup>8</sup> Service de Pneumologie, Hôpital Victor Provo, Roubaix, France.

Corresponding author:

Muriel Pichavant, PhD, Inserm U1019, Team 8 “Lung infection and innate immunity”, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex France, Phone: +33 3 20 87 79 65, [muriel.pichavant@pasteur-lille.fr](mailto:muriel.pichavant@pasteur-lille.fr)

**Keywords:** Chronic obstructive pulmonary disease; innate immunity; bacterial infection; IL-22

**Article publié dans EBioMedicine 2 (2015) 1686-1696**

**Abstract**

*Background:* Progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is linked to episodes of exacerbations caused by bacterial infections due to *Streptococcus pneumoniae*. Our objective was to identify during COPD, factors of susceptibility to bacterial infections among cytokine network and their role in COPD exacerbations.

*Methods:* *Streptococcus pneumoniae* was used to sub-lethally challenge mice chronically exposed to air or cigarette smoke (CS) and to stimulate peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-smokers, smokers and COPD patients. The immune response and the cytokine production were evaluated.

*Results:* Delayed clearance of the bacteria and stronger lung inflammation observed in infected CS-exposed mice was associated with an altered production of IL-17 and IL-22 by innate immune cells. This defect was related to a reduced production of IL-1 $\beta$  and IL-23 by antigen presenting cells. Importantly, supplementation with recombinant IL-22 restored bacterial clearance in CS-exposed mice and limited lung alteration. In contrast with non-smokers, blood NK and NKT cells from COPD patients failed to increase IL-17 and IL-22 levels in response to *S. pneumoniae*, in association with a defect in IL-1 $\beta$  and IL-23 secretion.

*Conclusion:* This study identified IL-17 and IL-22 as susceptibility factors in COPD exacerbation. Therefore targeting such cytokines could represent a potent strategy to control COPD exacerbation.

## Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) remains a major cause of morbidity and mortality worldwide. This will be the third cause of deaths worldwide in 2020 according to the WHO. COPD is a lung disorder characterized by progressive and irreversible airflow limitation. Cigarette smoking is a primary risk factor for the development of COPD, although other factors, including pollution and genetic determinants, have been described. Cigarette smoke (CS) chronically triggers inflammatory processes, which ultimately alter pulmonary barrier functions and reduce immune defense mechanisms, thus leading to increased susceptibility to respiratory infections (1-5).

Such infections further alter the clinical status of COPD patients thereby indirectly causing extensive morbidity and mortality (4). Acute exacerbation of COPD patients is associated with a greater decline in lung function, enhanced edema as well as airway and systemic inflammation (1). Among major bacterial species causing COPD exacerbation are *Streptococcus pneumoniae*, non-typeable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* (6). Cigarette smoking is associated with diminished antibacterial immune responses and delayed clearance of microbial agents (7). However, it is not well understood how these alterations are controlled during COPD and why COPD patients are more susceptible to infections (5). Considering the increasing prevalence of COPD, there is an urgent need to better understand mechanisms leading to exacerbation in COPD patients in order to propose novel therapeutics (2).

Among the factors orchestrating the anti-bacterial response, Th17 cytokines, including interleukin (IL)-17 and IL-22, play a major role (8, 9). These cytokines are produced by various cells of the adaptive and innate immune system. These include conventional T lymphocytes, natural killer (NK) cells, non-conventional T cells (such as  $\gamma\delta$  T cells, NKT cells and invariant mucosal-associated T (MAIT) cells) and type 3 innate lymphoid cells (ILC3). Production of Th17 cytokines is strongly dependent on IL-1 $\beta$ , IL-23 and IL-6 secretion by antigen presenting cells (APC) (10, 11). Anti-bacterial effects of Th17 cytokines comprise the induction of antimicrobial peptides and neutrophil chemoattractants by airway epithelial cells (12, 13). Both IL-17 and IL-22 amplify the granulopoiesis by increasing the expression of G-CSF. In addition, IL-22 plays a central role in the maintenance of the epithelium integrity by limiting cellular apoptosis and by favoring repair/regeneration processes (14).

Since Th17 cytokines play major functions in the control of bacterial, including pneumococcal, outgrowth, we hypothesized that their production upon respiratory bacterial challenge could be altered in the context of COPD. Indeed, our data indicate a default in Th17 cytokine production, especially IL-22, in response to *S. pneumoniae* in a mouse model of COPD induced by chronic CS exposure (15) and ex vivo in COPD patients. This reduced response was associated with diminished production of Th17 cytokine inducing factors by pulmonary APC. Remarkably, administration of recombinant IL-22 in CS-exposed mice just before the bacterial challenge resulted in accelerated pneumococcal clearance and lowered pulmonary inflammation. Thus, targeting Th17 cytokines might be valuable to limit COPD exacerbation due to bacterial infections.

## Material and Methods

### Mice

Six- to eight-week-old male wild-type (WT) C57BL/6 (H-2Db) mice were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). All animal work conformed to the guidelines of Animal Care and Use Committee from Nord Pas-de-Calais (agreement no. AF 16/20090). Mice were exposed to CS (5 cig/day, 5 days/week) during 12 weeks as previously described in order to generate a COPD-like disease (13), or ambient air as control. Six to ten mice were used per group and per experiment. Experiments were repeated at least 3 times.

### Patients with COPD

Peripheral blood was collected in stable COPD patients (n = 12), in smokers (without COPD, n=13)) and in non-smoker healthy controls (n =14) (CPP 2008-A00690-55) (see Table 1). Written informed consent was received from participants prior to inclusion in the study, according ethics committee on human experimentations. COPD patients at steady state included subjects with a GOLD score between 2 and 4 and did not received oral corticosteroids.

**Table 1:** Characteristics of COPD patients, smokers and non-smoker subjects.

Group	Nb	Sexe (M/F)	Age	Smoking (Pack.year)	FEV1 %	PO2	BODE	Inhaled corticosteroid
COPD	12	11 / 1	59.2 ± 17.1	57 ± 5.9	51.3 ± 4.1	77.1 ± 6.6	3.1 ± 0.5	4
Smokers	14	11 / 3	43.9 ± 4.7	37.6 ± 5.2	94.7 ± 1.3	ND	ND	0
Non smokers	14	10 / 4	45.5 ± 5.7	0	95.3 ± 3.5	ND	ND	0

COPD patients included subjects with a gold score between 2 and 4 and are matched for age and sex with controls. FEV1%, predicted amount as a percentage of the forced expiratory lung volume in one second; PO2, partial pressure of oxygen; BODE: Bode index combining Body mass index, airflow obstruction, dyspnea and exercise (6 minutes walk test). Results were expressed as mean ±SEM. ND: not determined.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified on Ficoll Paque gradient (GE healthcare). Cells ( $3 \times 10^6$  in 1ml) were cultured in RPMI1640 (GIBCO, Invitrogen Corporation) supplemented with 10% FCS, 200 U/ml penicillin/streptomycin (PS) and then exposed to *S. pneumoniae* (Sp, MOI=2) or to phytohemagglutinin (1  $\mu$ g/ml) (PHA, Difco) as a positive control. After 90 min, antibiotics were added to stop bacteria growth and supernatants were collected 24h later. Cell viability was not affected. Some cells were incubated with brefeldin A (10  $\mu$ g/ml, Sigma) for 4h and used for intracellular staining of cytokines.

### Reagents and Antibodies

Monoclonal antibodies (mAbs) against mouse CD3 (APC-conjugated), CD5 (FITC-conjugated), NK1.1 (PerCp-Cy5.5-conjugated), TCR- $\beta$  (V450-conjugated), CD25 (APC-conjugated), CD69 (Alexa700-conjugated), CD11b (V450-conjugated), Ly-6G (APC-Cy7-conjugated), CD8 (V500-conjugated), CD4 (APC-conjugated), CD103 (PE-conjugated), CD11c (APC-conjugated), CD45 (Q-dot605-conjugated), F4/80 (PerCP-Cy5.5-conjugated), Siglec F (PE-conjugated), CD64 (APC-conjugated), CD86 (PE-conjugated), CD40 (PE-conjugated), I-Ab (FITC-conjugated), IFN- $\gamma$  (PE-conjugated), IL-17 (APC-conjugated), CD11c (PE-Cy7-conjugated), F4/80 (PerCP-Cy5.5-conjugated), CD11b (V450-conjugated) and CD103 (PE-conjugated) and isotype controls were purchased from Biolegend (Le Pont de Claix, France). mAbs against human CD were also used including anti-CD11c, CD14, CD19, CD20 (PE-CF594-conjugated), CD117, TCR $\gamma\delta$  (V450-conjugated), CD4, CD3 (Alexa-700 conjugated), CD8, CD127 (V500 conjugated), CD196, CD3 (BV605 conjugated), CD25, CD86 (APC-conjugated), CD56, V $\alpha$ 7.2 (PerCP-Cy5.5 conjugated), TCR V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18, CD161 (PE-Cy7 conjugated) and CD45 (APC-H7 conjugated) (BD Biosciences, Biolegend and Myltenyi Biotech) as well as the Alexa488 anti-IFN- $\gamma$ , Alexa647 anti-IL-17 (BD Biosciences) and PE anti-IL-22 antibodies (e-Biosciences) and the isotype controls. 3R4F research cigarettes were purchased from University of Kentucky (USA) and used to induce COPD like symptoms (15). Gating strategy for flow cytometry analysis of Th17 producing cells is depicted in supplemental Figure 5.

### Primers

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

**Table 2:** Primer sequences for qRT-PCR in mice.

Primers	Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	TGCCCAGAACATCATCCCTG	TCAGATCCACGACGGACACA
<i>DefB2</i>	AAAGTATTGGATACGAAGCAGAACTTG	GGAGGACAAATGGCTCTGACA
<i>DefB3</i>	TGAGGAAAGGAGGCAGATGCT	GGAAGTCCACAAGTCCCAATC
<i>Cathelicidin</i>	CAGAGCGGCAGCTACCTGAG	TCACCACCCCTGTTCCTT
<i>s100a9</i>	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT	TGTCATTTATGAGGGCTTCATTT
<i>Il-1b</i>	TCCCAACTGGTACATCAGCA	ACACGGATTCCATGGTGAAGTC
<i>Il-6</i>	AGCCTCCGACTTGTGAAGTG	CTGATGCTGGTGACAACCAC
<i>Il-12p40</i>	GACCCTGCCATTGAACTGGC	CAACGTTGCATCCTAGGATCG
<i>Il-23p19</i>	CACCAGCGGGACATATGAA	CCTTGTGGGTCCACAACCAT

### Infection by *Streptococcus pneumoniae* and bacterial counts

Mice were inoculated by the intranasal route with a clinical isolate of Sp serotype 1 described elsewhere (16). Mice were anesthetized and administered intranasally with  $5 \times 10^4$  or  $5 \times 10^5$  Colony-forming units (CFU) in 50  $\mu$ l. Mice were daily monitored for illness and mortality up to 7 days. Bacterial burden in the broncho-alveolar lavages (BAL), lungs and blood was measured by plating samples onto chocolate plates. CFU were enumerated 24 hours later. In some experiments, CS-exposed and air mice received recombinant murine IL-22 (1 $\mu$ g/ mouse; Myltenyi Biotech) by intranasal route 24h before Sp challenge.

### Assessment of airway inflammation

Mice were sacrificed for sampling BAL, lungs, spleen and blood. Total cell numbers per BAL was determined. For histopathology, lungs were fixed by inflation and immersion in paraformaldehyde (PFA; 4%) and embedded in paraffin. To evaluate airway inflammation, lung sections (4- $\mu$ m thick) were stained by hematoxylin & eosin.

Pulmonary cells from air or CS-exposed mice were prepared as previously described (19) and were analyzed by flow cytometry. To analyze cytokine profiles, pulmonary cell suspensions were incubated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 20 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) for 3 h. Cells were then stained with appropriate extracellular markers, fixed, permeabilized (BD Cytotfix/cytoperm, BD Bioscience), and incubated with PE-conjugated mAb against IL-22 (eBiosciences) and Alexa Fluor 647-conjugated mAb against IL-17 (Biolegend), or control rat IgG1 mAb. Cells were acquired on a Fortessa cytometer (Becton Dickinson), and analyzed using the FlowJo software.

Cytokine production was analyzed in total lung cells. For this,  $5 \times 10^5$  lung cells were seeded on 96-well plates coated or not with anti-CD3 Ab (eBiosciences). Forty-eight hours later, supernatants were collected and analyzed for IFN- $\gamma$ , IL-17, and IL-22 concentration by ELISA (R&D Systems).

### **Cell sorting and cocultures**

Pulmonary cells from Air or CS-exposed mice were prepared as previously described (19) and were analyzed by flow cytometry on FACS Aria (Becton Dickinson). CD45<sup>+</sup> Siglec F<sup>+</sup> alveolar macrophages (AM) and CD45<sup>+</sup> Siglec F<sup>-</sup> Ia<sup>+</sup> CD64<sup>+</sup> DC were sorted (purity > 98%). Splenic CD4<sup>+</sup> T cells were purified from Air mice using magnetic microbeads (Mytenyi Biotech).

Sorted AM and DC were cultured with CD4<sup>+</sup> T cells in RPMI 10% FCS, with the ratio 1/10. Supernatants were collected 48 hours later to evaluate IL-17 and IL-22 levels by ELISA.

### **Statistical analysis**

All the experiments were repeated at least 3 times with 6-10 mice per group. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Samples were simply randomized and blindly assigned to the different groups. No data have been excluded. The statistical significance of differences between experimental groups was calculated by a one-way ANOVA with a Bonferroni post-test or an unpaired Student t test (GraphPad, San Diego, CA). The possibility to use these parametric tests was assessed by checking if the population is Gaussian and the variance is equal (Bartlett's test). Results with a p value <0.05 were considered significant.

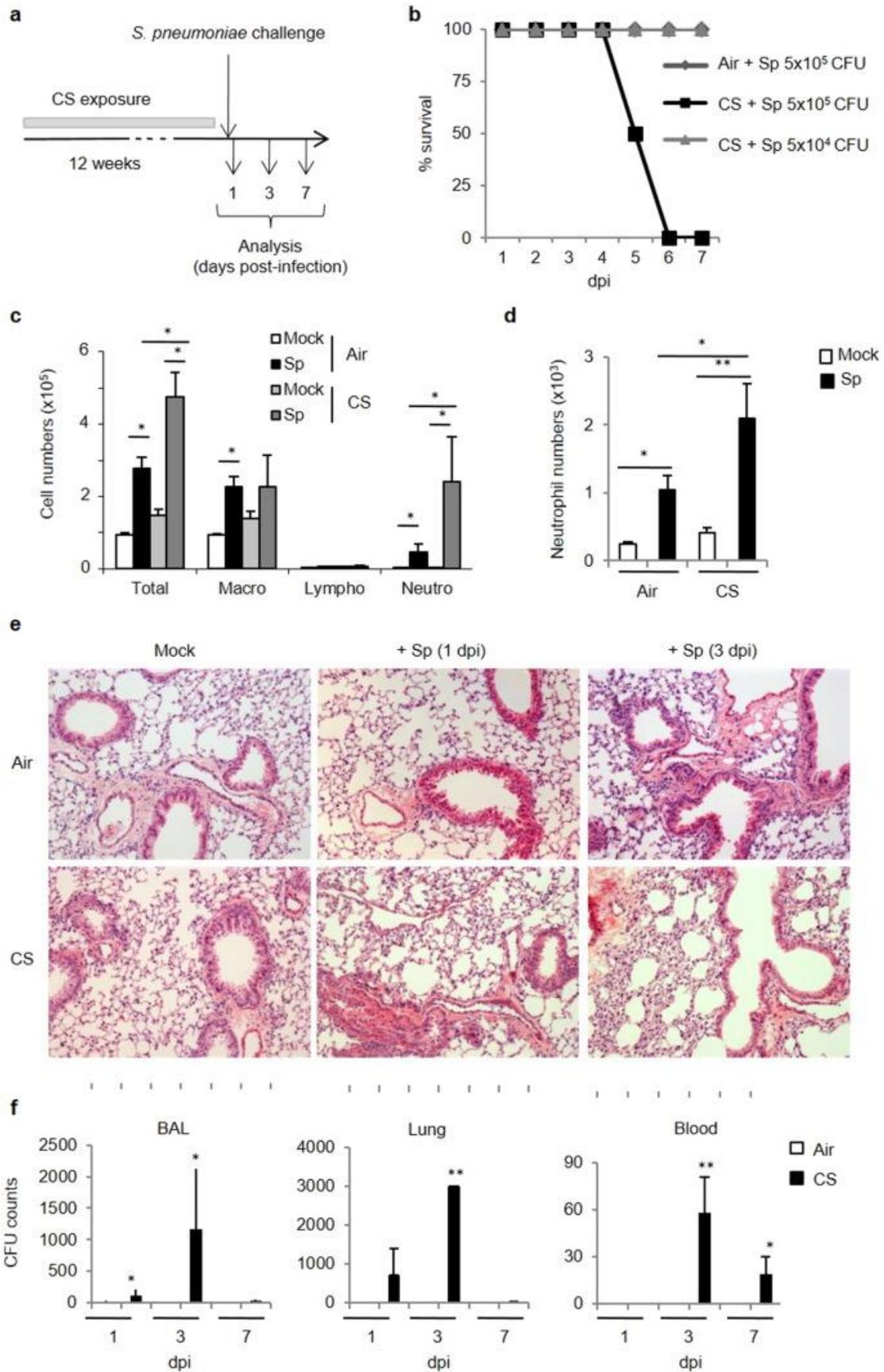
## Results

CS-exposed mice display delayed bacterial clearance and exacerbated inflammation upon *S. pneumoniae* challenge

An experimental model of COPD exacerbation was established in mice chronically exposed to CS using Sp as the trigger (see Figure 1a). Whereas all air mice survived when infected with  $5 \times 10^5$  CFU, all CS-exposed mice died within a week. Thus, CS-exposed mice are more susceptible to pneumococcal infection. In contrast, after administration of  $5 \times 10^4$  CFU per mouse, both air and CS-exposed mice survived (Figure 1b) and allowed the analysis of airway inflammation, remodeling and immune response.

Relative to air mice, infection was associated with enhanced cellular recruitment (particularly neutrophils) in the BAL and the lungs of CS-exposed mice (Figure 1c-d). Histological examination of lung tissues showed that inflammatory infiltrates mainly located in peribronchial areas and alveolar spaces (Figure 1e). Moreover, a large thickening of the alveolar walls was observed in CS-exposed animal mice. In air mice challenged with bacteria, lung inflammation was nearly resolved 3 days post-infection (dpi). Enhanced pulmonary inflammatory response in CS-exposed mice was associated with a higher bacterial load that peaked at 3dpi whilst no bacteria were detected in air mice (Figure 1e). No bacteria was found in the lungs at 7 dpi. Finally, systemic pneumococcal dissemination peaked at 3 dpi to decline at 7 dpi. This enhanced susceptibility of CS-exposed to Sp was associated to a restricted defect in anti-microbial peptides, namely for cathelicidin, whereas levels of DefB -2 and -3 and s100a9 transcripts were similarly increased in air and CS-exposed (supplemental Figure 1).

These data demonstrated that chronic exposure to CS leads to delayed clearance of Sp, an effect associated with enhanced pulmonary inflammation.



**Figure 1- CS-exposed mice are more susceptible to *S. pneumoniae*.**

Mice were chronically exposed to air or CS (5 cigarettes/day, 5 days/week) over a period of 12 weeks to develop symptoms associated to COPD. Mice were then intranasally challenged with *S. pneumoniae* (Sp) to induce COPD exacerbation or with PBS (Mock) as a control (a). Survival of air and CS-exposed mice was monitored for a week after challenge with  $5 \times 10^4$  or  $5 \times 10^5$  CFU of Sp or Mock (b). Absolute numbers of total cells, macrophages, lymphocytes and neutrophils were determined in BAL fluids (c). Neutrophils identified as CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> were analyzed in lung tissues 24 h after infection (d). Histological changes were evaluated on lung sections either at 1 or 3 dpi ( $5 \times 10^4$  CFU) (e). CFU counts were evaluated in the BAL, lung tissues and blood at 1, 3 and 7 dpi (f). Data represent as mean  $\pm$  SEM (n= 48-80 mice per group). \*:  $p < 0.05$  or \*\*:  $p < 0.01$  (one-way ANOVA test).

**CS-exposed mice display a reduced production of Th17 cytokines in response to *S. pneumoniae***

To investigate mechanisms involved in enhanced susceptibility to pneumococcal infection in CS-exposed mice, IL-17 and IL-22 production was quantified. Challenge with Sp significantly enhanced IL-17 and IL-22 levels in BAL (Figure 2a) and lung lysates (data not shown) of air mice. In marked contrast, Sp infection failed to do so in mice previously exposed to CS (Figure 2a). Whilst IL-17 remained undetectable in the serum after Sp challenge, IL-22 increase was detected in air, but not CS-exposed, animals (Figure 2b). IFN- $\gamma$  levels failed also to increase in the BAL of CS-exposed mice after Sp challenge (supplemental Figure 2a). Anti-CD3 restimulation of pulmonary cells induced large amounts of IL-17 whatever the animal group and a tendency to higher concentration was observed in CS-exposed mice (Figure 2c), as well as IFN- $\gamma$  (supplemental Figure 2b). In contrast, upon CD3 restimulation, pulmonary cells from CS-exposed animals had a much lower ability to release IL-22. Collectively, CS-exposed mice have a lower capacity to produce Th17-type cytokines upon pneumococcal challenge.

We next focused on Th17 cytokine producing cells. Infection with Sp enhanced the number, as well as the activation status (CD69 expression), of conventional T lymphocytes and NKT cells within lung tissues of air, but not CS-exposed mice (supplementary Figure 2c). A tendency towards an enhanced number of NK cells was noticed in both animals groups upon pneumococcal challenge whilst the number of  $\gamma\delta$  T cells and Lin-negative cells remained constant (supplemental Figure 2c and data not shown). Pneumococcal challenge of air mice resulted in higher frequencies of IL-17- and IL-22-producing conventional T cells, NK cells,

NKT-like cells,  $\gamma\delta$  T cells and Lin-negative cells (Figure 2d-e and not shown). In contrast, chronic exposure to CS dramatically reduced the percentages of pulmonary IL-17-producing NK and NKT-like cells, but not conventional T cells,  $\gamma\delta$  T cells and Lin-negative cells observed after Sp challenge (Figure 2d-e and data not shown). Percentages of IL-22-producing conventional T cells, NK cells, NKT-like cells and Lin-negative cells were also significantly diminished in infected CS-exposed mice, relative to air mice.

Hence, upon pneumococcal challenge, chronic exposure to CS leads to defective production of Th17-type cytokines by conventional T cells and innate immune cells.

### **CS exposure alters the function of pulmonary APC**

We next hypothesized that pulmonary APC could be impacted by CS exposure to lower the activation of innate and conventional T cells to bacteria. Indeed, we and others previously reported that chronic exposure to CS alters pulmonary APC phenotype and functions (15, 17). Exposure to a sub-lethal dose of Sp triggered phenotypic maturation of pulmonary APC, including alveolar macrophages (AM) and dendritic cells (DC) (CD86 and II<sup>+</sup> MHC; data not shown). To analyze their ability to promote Th17 cytokine production, levels of polarizing cytokines including IL-1 $\beta$  and IL-23 were evaluated first in lung lysates (Figure 3a) and secondary in isolated pulmonary APC (Figure 3b and supplemental Figure 3). Pneumococcal challenge strongly induced mRNA levels of Il-1b and Il-23p19 in air but not in CS-exposed mice (Figure 3a). Sp infection also induced mRNA levels of Il-1b, Il-6, Il-23p19, but not Il-12p40, in sorted lung DC and slightly increased the expression of Il-1b and Il-12p40 transcripts in sorted AM from air mice (supplemental Figure 3). In CS-exposed mice, a defect in Il-1b and Il-12p40 expression was observed in AM, whereas the expression of Il-23p19 mRNA was undetectable in lung DC. At the protein level, IL-1 $\beta$  and IL-23 secretion was increased in supernatants of AM and DC from infected air mice, but not in cells from CS-exposed mice (Figure 3b).

To evaluate the capacity of these sorted APC to activate T cells, lung DC and AM were cultured with isolated splenic CD4<sup>+</sup> T cells from air mice. In these conditions, IL-22 was always undetectable (data not shown). AM (Figure 3c) and DC (Figure 3d) sorted from infected air mice induced significant increase in IL-17 production by CD4<sup>+</sup> T cells, whereas antigen-presenting cells from CS-exposed mice were unable to do so.

These data suggested that the defect in the Th17 response to Sp is associated with an altered function of pulmonary APC.

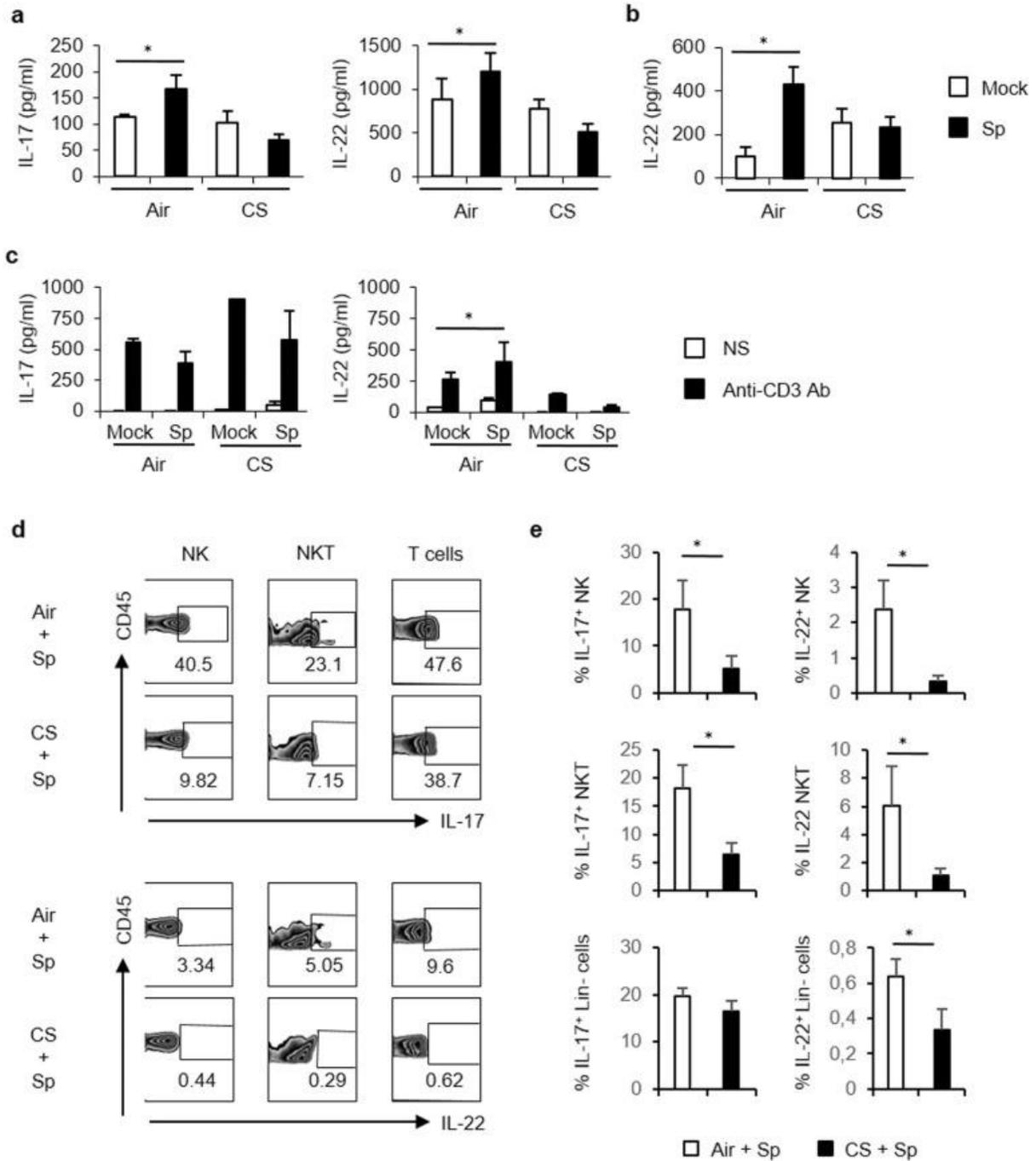
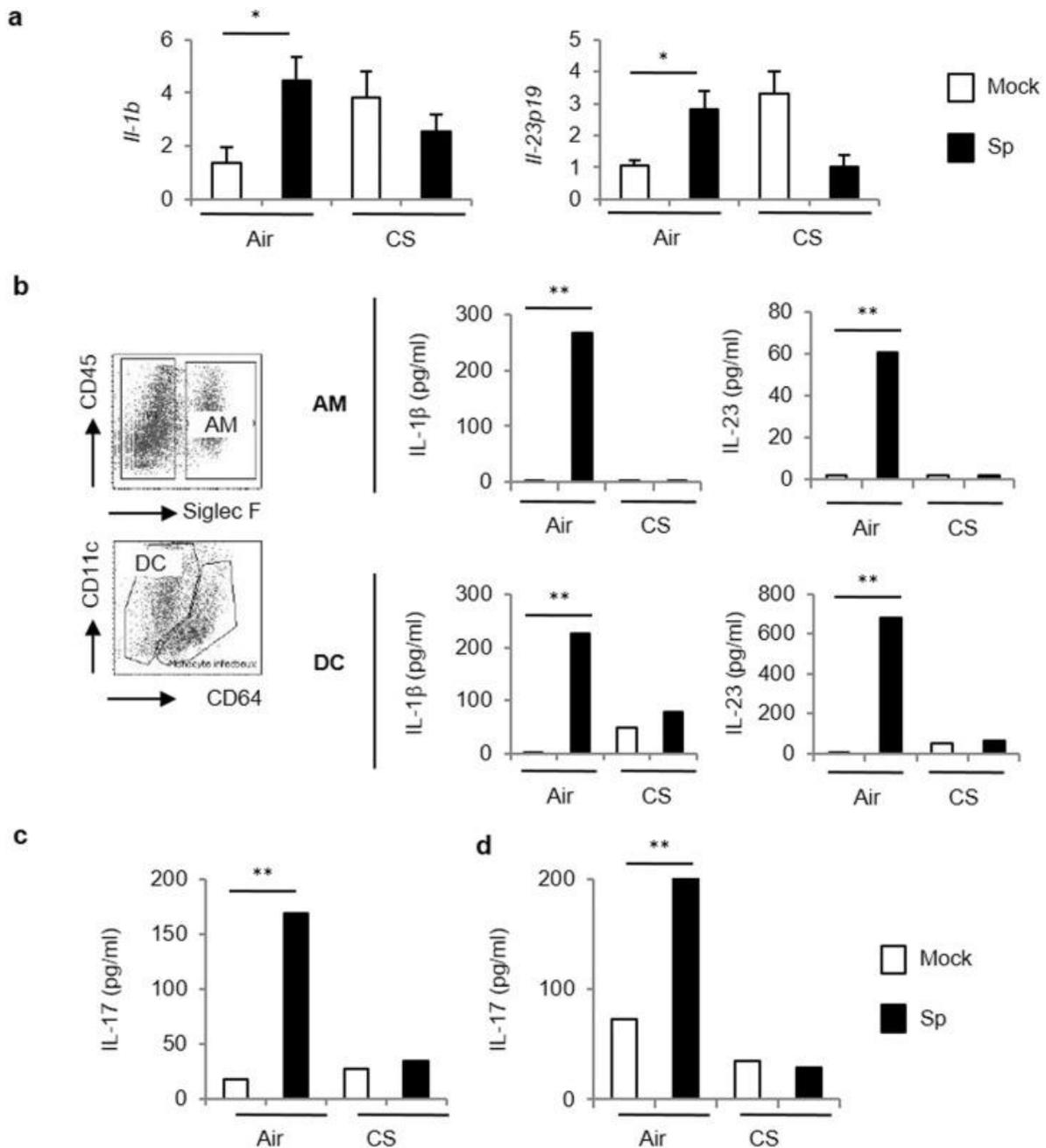


Figure 2- CS-exposed mice exhibit a defective immune response to *S. pneumoniae*.

Mice were chronically exposed to air or CS over a period of 12 weeks and then intranasally challenged with  $5 \times 10^4$  CFU of *S. pneumoniae* (Sp) or with PBS (Mock). IL-17 and IL-22 levels were evaluated in BAL fluids (a), blood (b) and in the supernatants of restimulated pulmonary cells without (NS) or with anti-CD3 Ab (c). IL-17 and IL-22 producing cells were identified by intracellular staining among pulmonary NK cells (CD45+ TCR $\beta$ - NK1.1+), NKT-like cells (CD45+ TCR $\beta$ + NK1.1+), T cells (CD45+ TCR $\beta$ + NK1.1-) and Lin-negative cells (CD45+ CD3- CD11c- CD11b- CD45Rb- NK1.1- CD90.2+ CCR6+) cells (d and e). We have reported representative dot blot of the selected sub-populations and percentages of cytokine+ cells among the respective cell population are represented (c). The mean percentage of IL-17+ and IL-22+ cells was calculated for NK, NKT and Lin- cells (d). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n= 48-80 mice per group). One representative experiment out of three independent ones is shown concerning intracellular staining. \*: p<0.05 vs controls (one-way ANOVA test).



**Figure 3- CS-exposed mice exhibited a defective response of pulmonary APC to *S. pneumoniae*.**

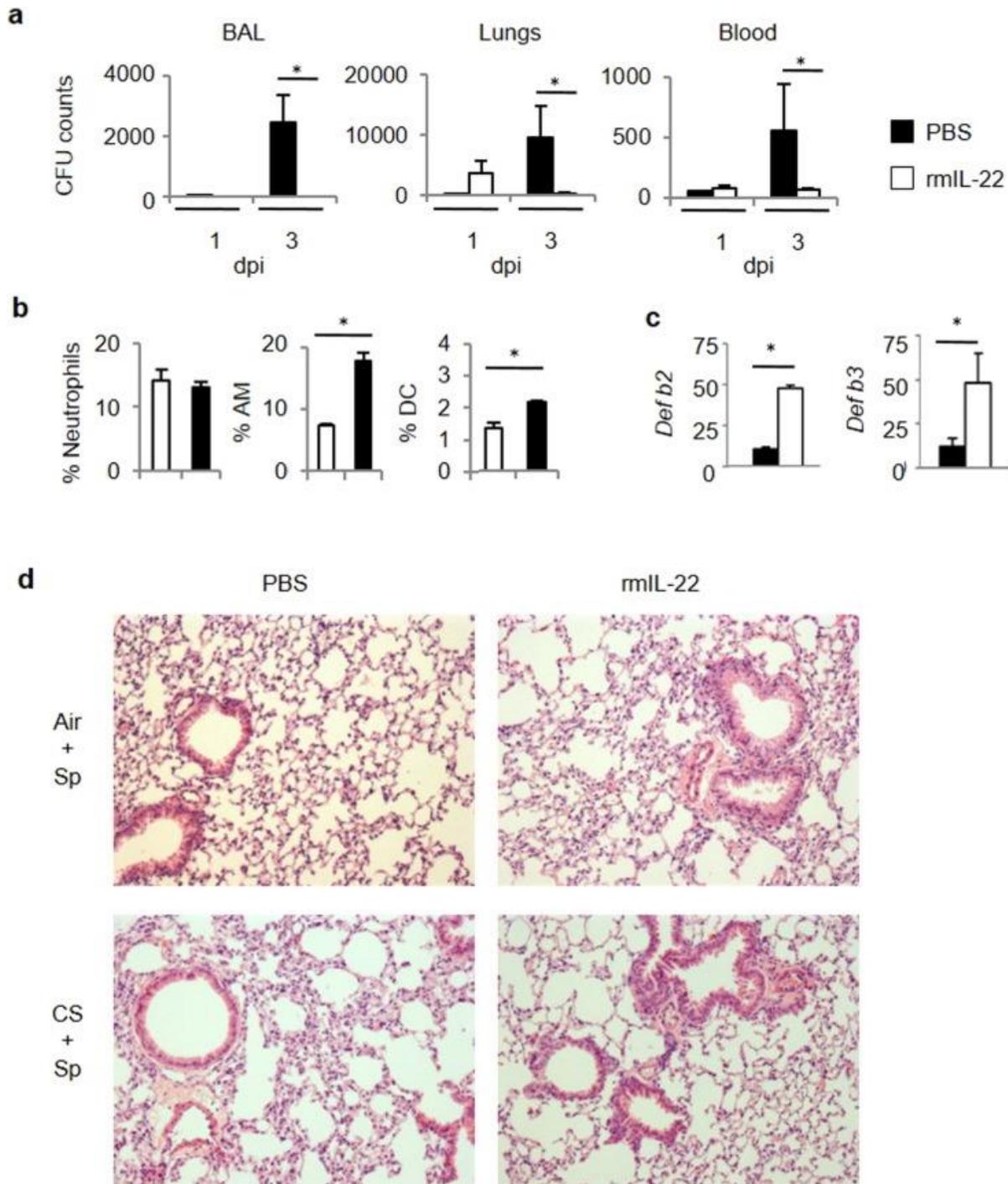
Mice were chronically exposed to air or CS over a period of 12 weeks and then intranasally challenged with  $5 \times 10^4$  CFU of *S. pneumoniae* (Sp) or with PBS (Mock). IL-1b and IL-23 mRNA levels were measured in lung tissues 24h post-infection (a). CD45<sup>+</sup> Siglec F<sup>+</sup> AM and CD11c<sup>+</sup> Ia<sup>+</sup> CD64<sup>+</sup> DC were sorted by flow cytometry 24 hours post-infection. IL-1β and IL-23 levels were evaluated by ELISA in supernatants 24 hours later (b). Cocultures were performed between sorted AM (c) or DC (d) and splenic CD4<sup>+</sup> T cells purified from air mice. Supernatants were

collected 48 hours later and levels of IL-17 were evaluated by ELISA. Data represent mean  $\pm$  SEM (n=6-10 mice per group per experiment). One representative experiment out of three ones is shown concerning cell sorting and cocultures with T cells.

### **Exogenous IL-22 protects CS-exposed mice from *S. pneumoniae* infection**

Since IL-17 and IL-22 production is ablated in CS-exposed mice, we questioned whether IL-17 and IL-22 supplementation by means of intranasal treatment could improve the outcome of pneumococcal infection in CS-exposed mice. We have previously demonstrated that IL-17 was critical in the development of COPD in a mouse model and higher in COPD patients than in controls (15). Therefore, exogenous IL-17 could have some deleterious effects during COPD exacerbations. We therefore tested the effect of exogenous IL-22 in the early control of Sp outgrowth and lung inflammation. Administration of recombinant IL-22 prior to bacterial challenge strongly reduced bacterial outgrowth in the lungs and dissemination outside the lungs (Figure 4a). While treatment with IL-22 had no effect on neutrophil recruitment within the lungs, it enhanced the number of activated AM and DC in CS-exposed mice (Figure 4b and supplemental Figure 4a), other well-known effector cells against pneumococcus. This process was also associated with an increased mobilization of NK and NKT cells in the lungs of infected COPD mice (supplemental Figure 4b). Of interest, administration of IL-22 resulted in enhanced levels of transcripts encoding defensin  $\beta$ 2 (Defb2) and defensin  $\beta$ 3 (Defb3) (Figure 4c), both anti-microbial peptides playing a role in Sp clearance. Finally, IL-22 treatment also strongly reduced the lung lesions associated with Sp infection, namely the thickening of the alveolar walls and the inflammatory infiltrate in CS-exposed animals (Figure 4d). This improved clearance of Sp in CS-exposed mice was also associated with higher IL-17 and IFN- $\gamma$  production by lung cells (supplemental Figure 4c).

Together, recombinant IL-22 administration can compensate for the lack of Th17-associated cytokines in CS-exposed mice to restore anti-pneumococcal defenses.



**Figure 4- Exogenous IL-22 improves the clearance of *S. pneumoniae* in CS-exposed mice.**

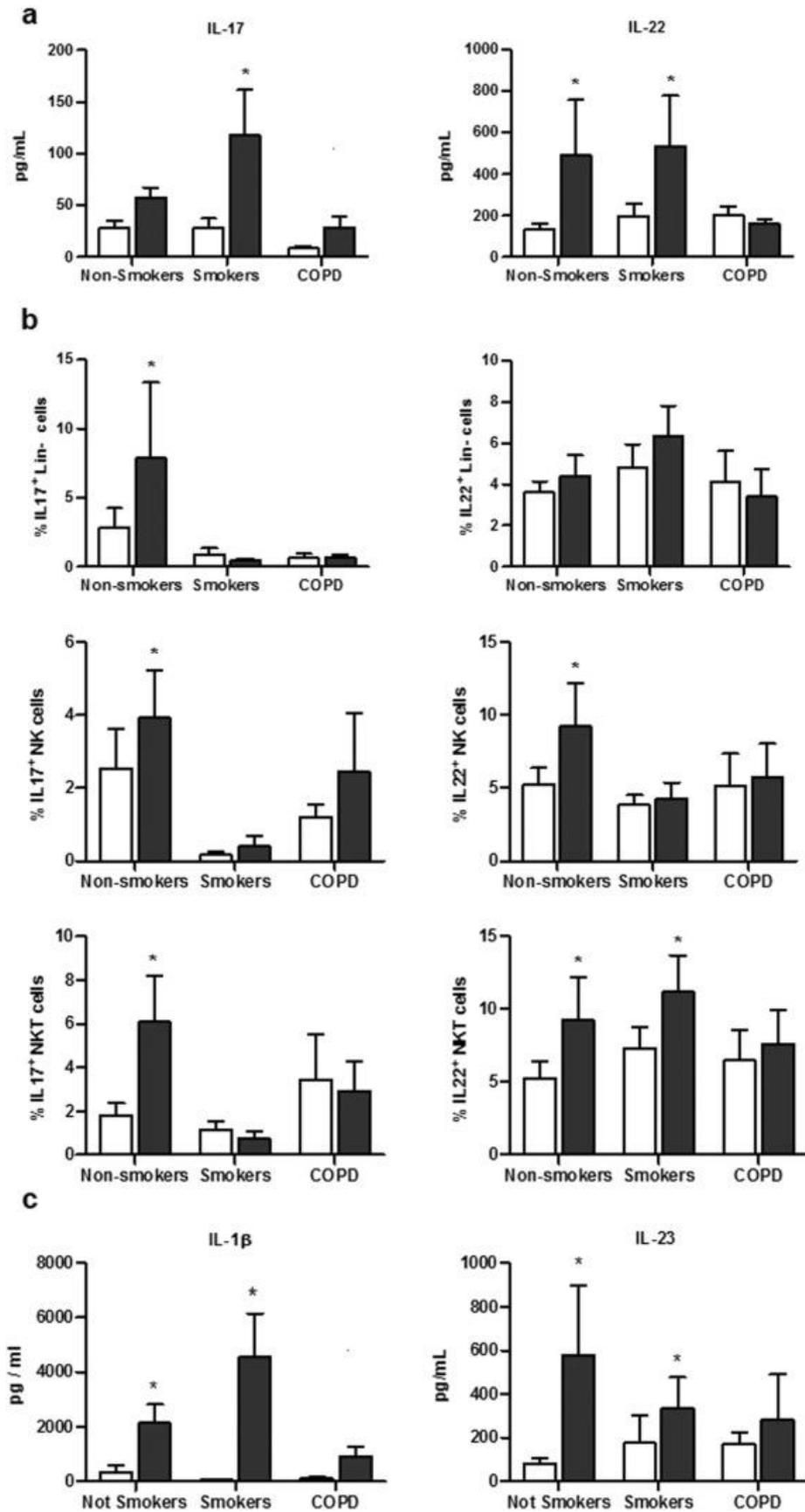
Mice were chronically exposed to air or CS over a period of 12 weeks and then intranasally challenged with  $5 \times 10^4$  CFU of *S. pneumoniae* (Sp) or with PBS (Mock). Recombinant murine IL-22 was intranasally administered the day before Sp infection. CFU counts were evaluated in BAL, lung tissues and blood (a). Percentages of neutrophils (identified as CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> Ly6G<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>), AM and DC among CD45<sup>+</sup> cells were analyzed in lung tissues from infected

CS-exposed mice treated or not with rmIL-22 (b). Anti-microbial peptide mRNA levels were analyzed in lung tissues 3 dpi (c). Histological changes were evaluated at 3 dpi (d). Data represent mean  $\pm$  SEM (n= 24-40 mice per group). \*:  $p < 0.05$  vs controls (one-way ANOVA test).

### **COPD patients showed impaired Th17 cytokine production in response to *S. pneumoniae***

To evaluate whether COPD status modulates the response to Sp, PBMC were isolated from 3 different groups: non-smoker healthy controls, smokers and COPD patients, and were stimulated with Sp. Levels of IL-17 and IL-22 were evaluated in PBMC supernatants. Resting PBMC exhibited similar levels of cytokines in the three groups (Figure 5a). Exposure to Sp expectedly increased IL-22 and, to a lesser extent, IL-17 production in the non-smoker and smoker groups, but had no effect on cytokine production in COPD patients. The response to PHA was also partially altered in COPD patients, in contrast to the other two groups (data not shown).

We next looked at the cellular sources of IL-17 and IL-22, focusing on conventional T cells, NK cells, NKT cells,  $\gamma\delta$  T cells, mucosal-associated invariant T (MAIT) cells and Lineage-negative cells (Figures 5b and supplementary Figure 5). In the non-smoker group, bacteria increased the proportion of IL-17-producing cells (in particular Lin-, NK and NKT cells), IL-22-producing cells (mainly NK and NKT cells) and MAIT cells (not shown). In contrast, the stimulation with Sp did not significantly amplify the proportion of cells producing these cytokines in NK, NKT and Lin- cells (Figure 5b) as well as in MAIT cells (data not shown) from COPD patients. In smokers, IL-17 production induced by Sp was also impaired in these three cell types, whereas IL-22 expression was only reduced in NK cells. No modification of the percentage of cytokine+ cells was detected among the three groups of patients for  $\gamma\delta$ T and CD4/CD8+ T cells (data not shown). This defective production of IL17 and IL-22 was probably linked to the lower production of IL-1 $\beta$  and IL-23 by PBMC from COPD patients (Figure 5C). These data showed that the blood innate immune cells from COPD patients displayed an altered Th17 cytokine response to Sp.



**Figure 5- COPD patients have a defective cytokine response to *S. pneumoniae*.**

Levels of IL-17 and IL-22 was quantified by ELISA in supernatants from PBMC from healthy non-smoker subjects (n=14), healthy smokers (n=14) and COPD patients (n=12) (a). In parallel, percentages of IL-17 and IL-22 producing cells were measured by intracellular staining in Lin<sup>-</sup> (CD11c<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup>) cells, NK cells and NKT cells (b). Levels of IL-1 $\beta$  and IL-23 was quantified by ELISA in supernatants from PBMC from healthy non-smoker subjects, healthy smokers and COPD patients (c). Data represent mean  $\pm$  SEM. \*: p<0.05 versus Medium in the different groups (one-way ANOVA test).

## Discussion

Infection with Sp is one of the main factor responsible for COPD exacerbation (18, 19). In our mouse model mimicking COPD, Sp challenge resulted in greater lung inflammation and tissue remodeling, and therefore an exacerbation of the disease. Combined exposure to CS and SEB resulted in a raised number of lymphocytes and neutrophils, epithelial remodeling and over-production of IL-17 (20). Gaschler et al used *Haemophilus influenza* to exacerbate COPD and demonstrated that the bacterial burden observed in COPD mice was mainly due to a skewed inflammatory mediator expression, probably in AM (21). Innate immunity associated with the recruitment of competent AM and neutrophils is crucial in the early phase of natural anti-pneumococcal host defense and particularly in bacterial clearance (22). Such a pattern was observed in our model despite a defective clearance of the pathogen in CS-exposed mice.

Indeed, we observed some important modifications in the activation of APC from CS-exposed mice, but also in not conventional lymphocytes. Major cellular sources of IL-17 and IL-22, described as NK, NKT, ILC in mice and humans (23-26), failed to produce higher levels of Th17 cytokines in response to Sp in CS-exposed mice whereas only the production of IL-22 was altered in conventional T cells. According to the implication of such cells in the protection against Sp (16, 22, 26), this suggests that this defect might be an important determinant of bacterial susceptibility during COPD. In contrast, the activation of conventional T cells, MAIT and  $\gamma\delta$ T cells was not clearly modified during COPD.

The defective activation of conventional T cells and some innate populations could be explained by the alteration of pulmonary APC, as previously reported in CS-exposed mice (15, 27). Indeed expression of pro-Th17 cytokines, such as IL-1 $\beta$  and IL-23 (28), was decreased both in lung AM and DC from infected CS-exposed mice. IL-23 plays a key role in the clearance of the bacteria and the production of Th17 cytokines by ILC (29). IL-23 is also needed for IL-17 expression by others immune cells like NKT and  $\gamma\delta$  T-cells (22). Therefore, APC from CS-exposed mice can not correctly educate the T cells and other innate cells to respond to Sp. Such a defective production of IL-1 $\beta$  and IL-23 was also observed in COPD patients in response to Sp. (27). Altogether, during COPD, the reduced production of IL-17 and IL-22 by conventional T cells and other innate cells might result from a deficient IL-1 $\beta$  and IL-23 synthesis by DC in response to Sp.

Functionally, IL-17 and IL-22 have been reported as essential factors in anti-bacterial defenses. During infection, the early production of IL-22 by innate immune cells is crucial for host protective immunity (12, 30, 31) including a role in chemotaxis and tissue repair (13, 31-35). It has been recently shown that IL-17A is required for NTHi-exacerbated pulmonary neutrophilia induced by cigarette smoke although the role of IL-22 was not evaluated (36). Moreover, IL-17 and IL-22 induced the production of anti-microbial peptides (including  $\beta$ -defensins, S100A7-9, Reg3 $\beta$  and Reg3 $\gamma$ ) important in the containment of pathogens (31, 33, 34, 37). In our report, the defective production of IL-22 in CS-exposed mice to Sp was not associated to an impaired production of these antimicrobial peptides as previously reported in COPD patients (38). Nevertheless, opposite results have been reported suggesting that the levels of antimicrobial peptide expression were insufficient to control the higher bacterial load both in COPD patients and mice. We can also suspect that bacterial susceptibility in infected CS-exposed mice was not solely related with the defective production of cathelicidin, an IL-22 independent peptide involved in defense against Sp (39). Interestingly, local administration of rmIL-22 amplified  $\beta$ -defensin levels in the lungs and a competent immune response, allowing Sp clearance in CS-exposed mice. No impact on neutrophil influx was observed in infected CS-exposed mice, suggesting that the effect of this cytokine is mostly related with cell priming to efficiently kill the bacteria and/or the release of anti-microbial peptides. In these settings, the preventive role of IL-22 on lung injury is potentially linked to its complementary action on the induction of antimicrobial peptides, the activation of immune cells (including neutrophils) and in the maintenance of the epithelial barrier (40). In infected CS-exposed animals, treatment with rmIL-22 results in an efficient resolution and to the preservation of lung tissue after infection, as previously reported in inflammatory models (41). The balance between IL-17 and/or IL-22 expression has been found to contribute to either the pro-inflammatory or tissue-protective phases of lung defense, depending on the context (24, 32, 34). In our model, a protective role for IL-17 cannot be excluded (42), since the production of IL-17 was also defective in CS-exposed mice and patients in response to Sp. However, IL-17 is implicated in COPD pathogenesis. During COPD exacerbation, this cytokine has no effect on lung bacterial load and promotes the neutrophil recruitment, which is potentially deleterious (36).

Alteration of the innate immune response to bacterial infection is a key determinant in the COPD course. It is now well recognized that respiratory infections are important in the induction,

progression and exacerbation of the disease. Here we identified the IL-22 defect as a key factor in COPD exacerbations, both in patients and in the murine model. This alteration related to deficient activation of lymphocytes by APC offers hints for the development of novel therapeutic strategies in COPD exacerbations. Thereby, we propose IL-22 as a promising target in the treatment and/or the prevention of COPD exacerbations. Restoring this defective cytokine response could represent an ideal therapy to build a competent immune response against pathogens in COPD patients, and to limit the consequences of exacerbation of the disease.

## References

1. Agusti, A. G., A. Noguera, J. Sauleda, E. Sala, J. Pons, and X. Busquets. 2003. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 21:347-360.
2. Barnes, P. J., and R. A. Stockley. 2005. COPD: current therapeutic interventions and future approaches. *Eur Respir J* 25:1084-1106.
3. Fletcher, C., and R. Peto. 1977. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1:1645-1648.
4. Soler, N., S. Ewig, A. Torres, X. Filella, J. Gonzalez, and A. Zaubet. 1999. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 14:1015-1022.
5. Soler-Cataluna, J. J., M. A. Martinez-Garcia, P. Roman Sanchez, E. Salcedo, M. Navarro, and R. Ochando. 2005. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 60:925-931.
6. Sethi, S., and T. F. Murphy. 2008. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 359:2355-2365.
7. Drannik, A. G., M. A. Pouladi, C. S. Robbins, S. I. Goncharova, S. Kianpour, and M. R. Stampfli. 2004. Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 170:1164-1171.
8. Eidenschenk, C., S. Rutz, O. Liesenfeld, and W. Ouyang. 2014. Role of IL-22 in microbial host defense. *Curr Top Microbiol Immunol* 380:213-236.
9. Ivanov, S., J. Renneson, J. Fontaine, A. Barthelemy, C. Paget, E. M. Fernandez, F. Blanc, C. De Trez, L. Van Maele, L. Dumoutier, M. R. Huerre, G. Eberl, M. Si-Tahar, P. Gosset, J. C. Renaud, J. C. Sirard, C. Faveeuw, and F. Trottein. 2013. Interleukin-22 reduces lung inflammation during influenza A virus infection and protects against secondary bacterial infection. *J Virol* 87:6911-6924.
10. Doisne, J. M., V. Soulard, C. Becourt, L. Amniai, P. Henrot, C. Havenar-Daughton, C. Blanchet, L. Zitvogel, B. Ryffel, J. M. Cavaillon, J. C. Marie, I. Couillin, and K. Benlagha. 2011. Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria. *J Immunol* 186:662-666.
11. Ivanov, S., C. Paget, and F. Trottein. 2014. Role of non-conventional T lymphocytes in respiratory infections: the case of the pneumococcus. *PLoS Pathog* 10:e1004300.
12. Aujla, S. J., Y. R. Chan, M. Zheng, M. Fei, D. J. Askew, D. A. Pociask, T. A. Reinhart, F. McAllister, J. Edeal, K. Gaus, S. Husain, J. L. Kreindler, P. J. Dubin, J. M. Pilewski, M. M. Myerburg, C. A. Mason, Y. Iwakura, and J. K. Kolls. 2008. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14:275-281.

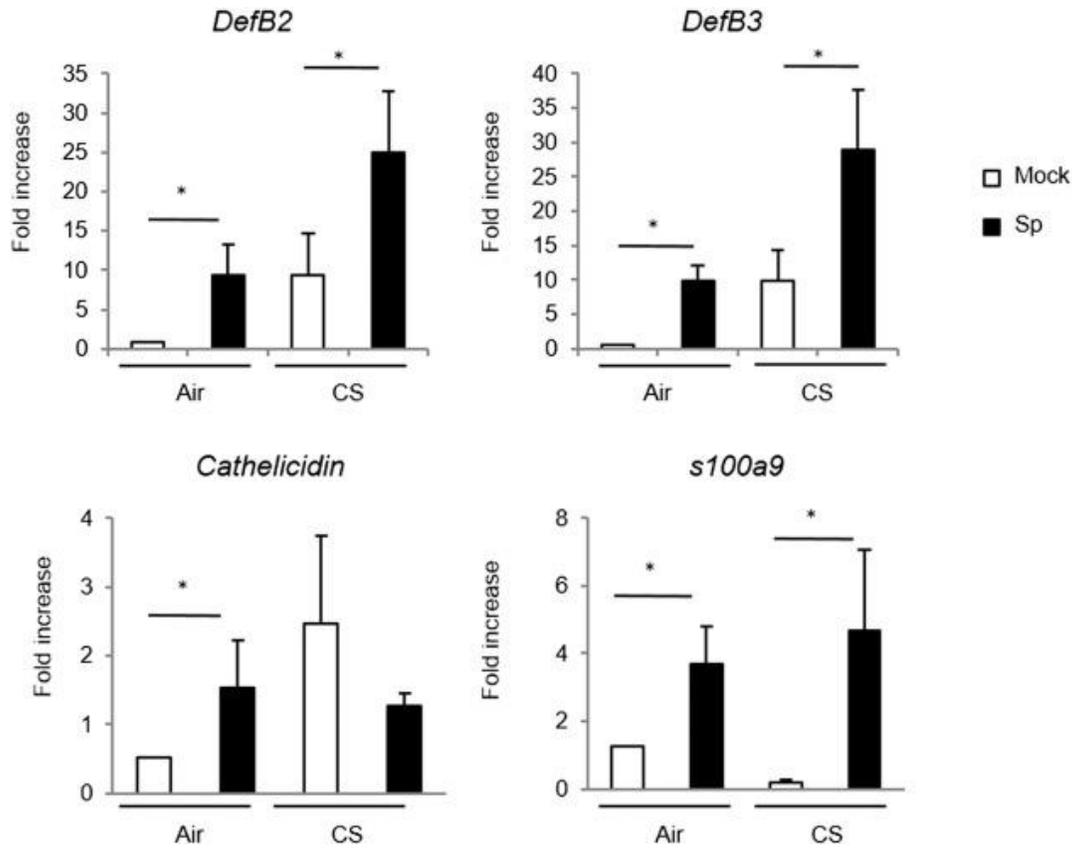
13. Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah, and R. Sabat. 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21:241-254.
14. Sonnenberg, G. F., L. A. Fouser, and D. Artis. 2011. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 12:383-390.
15. Pichavant, M., G. Remy, S. Bekaert, O. Le Rouzic, G. Kervoaze, E. Vilain, N. Just, I. Tillie-Leblond, F. Trottein, D. Cataldo, and P. Gosset. 2014. Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunol* 7:568-578.
16. Marques, J. M., A. Rial, N. Munoz, F. X. Pelay, L. Van Maele, H. Leger, T. Camou, J. C. Sirard, A. Benecke, and J. A. Chabalgoity. 2012. Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN-gamma-mediated immunity. *Immunobiology* 217:420-429.
17. Tsoumakidou, M., I. K. Demedts, G. G. Brusselle, and P. K. Jeffery. 2008. Dendritic cells in chronic obstructive pulmonary disease: new players in an old game. *Am J Respir Crit Care Med* 177:1180-1186.
18. Gaschler, G. J., C. M. Bauer, C. C. Zavitz, and M. R. Stampfli. 2007. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Contrib Microbiol* 14:126-141.
19. van der Poll, T., and S. M. Opal. 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 374:1543-1556.
20. Huvenne, W., 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. *Respir Res* 12:69.
21. Gaschler, G. J., M. Skrtic, C. C. Zavitz, M. Lindahl, P. O. Onnervik, T. F. Murphy, S. Sethi, and M. R. Stampfli. 2009. Bacteria challenge in smoke-exposed mice exacerbates inflammation and skews the inflammatory profile. *Am J Respir Crit Care Med* 179:666-675.
22. Clement, C. G., S. E. Evans, C. M. Evans, D. Hawke, R. Kobayashi, P. R. Reynolds, S. J. Moghaddam, B. L. Scott, E. Melicoff, R. Adachi, B. F. Dickey, and M. J. Tuvim. 2008. Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 177:1322-1330.
23. Colonna, M. 2009. Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity* 31:15-23.
24. Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, and L. A. Fouser. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203:2271-2279.
25. Sonnenberg, G. F., L. A. Monticelli, T. Alenghat, T. C. Fung, N. A. Hutnick, J. Kunisawa, N. Shibata, S. Grunberg, R. Sinha, A. M. Zahm, M. R. Tardif, T. Sathaliyawala, M. Kubota, D. L. Farber, R. G. Collman, A. Shaked, L. A. Fouser, D. B. Weiner, P. A. Tessier, J. R.

- Friedman, H. Kiyono, F. D. Bushman, K. M. Chang, and D. Artis. 2012. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* 336:1321-1325.
26. Van Maele, L., C. Carnoy, D. Cayet, P. Songhet, L. Dumoutier, I. Ferrero, L. Janot, F. Erard, J. Bertout, H. Leger, F. Sebbane, A. Benecke, J. C. Renauld, W. D. Hardt, B. Ryffel, and J. C. Sirard. 2010. TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *J Immunol* 185:1177-1185.
  27. Kroening, P. R., T. W. Barnes, L. Pease, A. Limper, H. Kita, and R. Vassallo. 2008. Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways. *J Immunol* 181:1536-1547.
  28. Mucida, D., and S. Salek-Ardakani. 2009. Regulation of TH17 cells in the mucosal surfaces. *J Allergy Clin Immunol* 123:997-1003.
  29. Van Maele, L., C. Carnoy, D. Cayet, S. Ivanov, R. Porte, E. Deruy, J. A. Chabalgoity, J. C. Renauld, G. Eberl, A. G. Benecke, F. Trottein, C. Faveeuw, and J. C. Sirard. Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Infect Dis* 210:493-503.
  30. Graham, A. C., K. D. Carr, A. N. Sieve, M. Indramohan, T. J. Break, and R. E. Berg. 2011. IL-22 production is regulated by IL-23 during *Listeria monocytogenes* infection but is not required for bacterial clearance or tissue protection. *PLoS One* 6:e17171.
  31. Zheng, Y., P. A. Valdez, D. M. Danilenko, Y. Hu, S. M. Sa, Q. Gong, A. R. Abbas, Z. Modrusan, N. Ghilardi, F. J. de Sauvage, and W. Ouyang. 2008. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 14:282-289.
  32. Eyerich, S., K. Eyerich, A. Cavani, and C. Schmidt-Weber. 2010. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends Immunol* 31:354-361.
  33. Kolls, J. K., P. B. McCray, Jr., and Y. R. Chan. 2008. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol* 8:829-835.
  34. Sonnenberg, G. F., M. G. Nair, T. J. Kirn, C. Zaph, L. A. Fouser, and D. Artis. 2010. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 207:1293-1305.
  35. Witte, E., K. Witte, K. Warszawska, R. Sabat, and K. Wolk. 2010. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:365-379.
  36. Roos, A. B., S. Sethi, J. Nikota, C. T. Wrona, M. G. Dorrington, C. Sanden, C. M. Bauer, P. Shen, D. Bowdish, C. S. Stevenson, J. S. Erjefalt, and M. R. Stampfli. IL-17A and the Promotion of Neutrophilia in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 192:428-437.

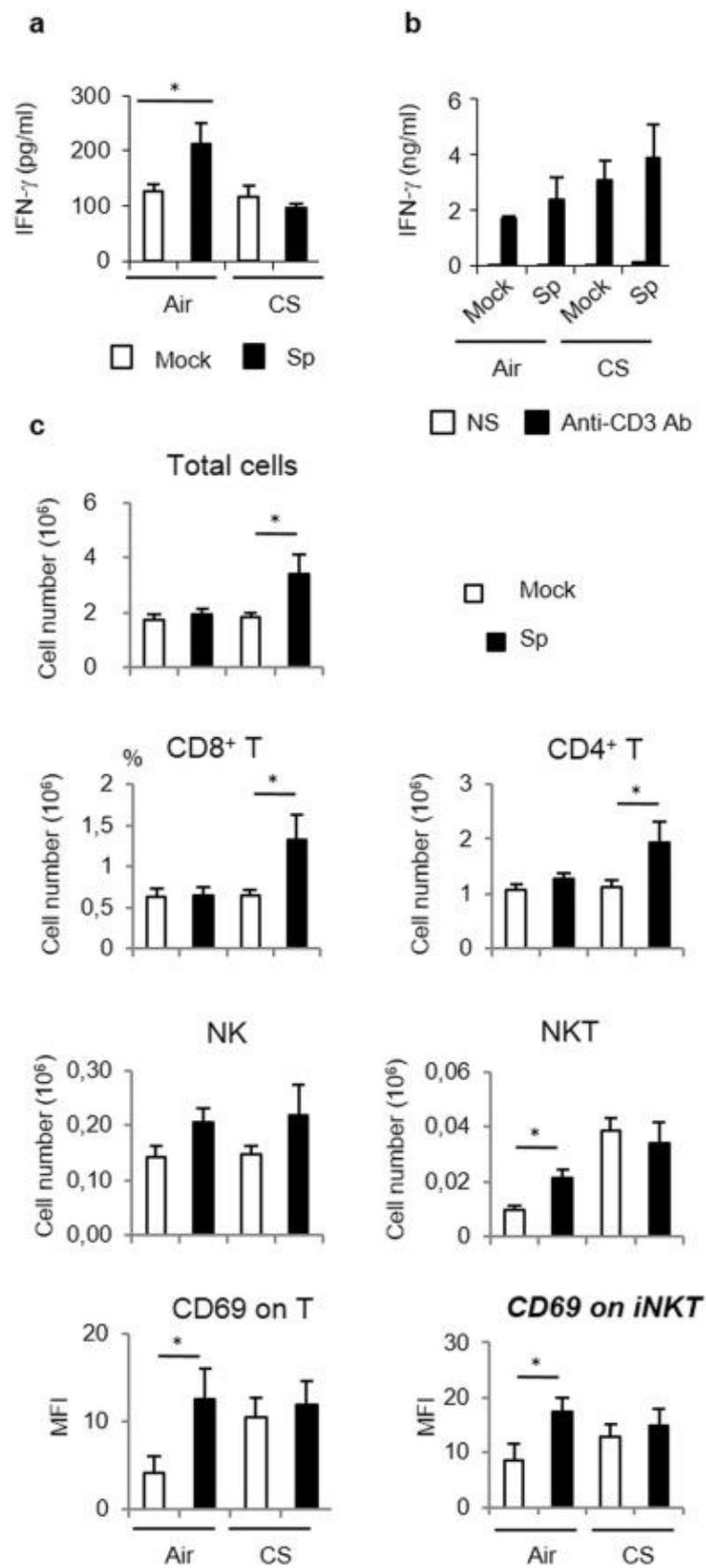
37. Cash, H. L., C. V. Whitham, C. L. Behrendt, and L. V. Hooper. 2006. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313:1126-1130.
38. Pace, E., M. Ferraro, M. I. Minervini, P. Vitulo, L. Pipitone, G. Chiappara, L. Siena, A. M. Montalbano, M. Johnson, and M. Gjomarkaj. 2012. Beta defensin-2 is reduced in central but not in distal airways of smoker COPD patients. *PLoS One* 7:e33601.
39. Felgentreff, K., C. Beisswenger, M. Griese, T. Gulder, G. Bringmann, and R. Bals. 2006. The antimicrobial peptide cathelicidin interacts with airway mucus. *Peptides* 27:3100-3106.
40. Kumar, P., M. S. Thakar, W. Ouyang, and S. Malarkannan. 2013. IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection. *Mucosal Immunol* 6:69-82.
41. Liu, J. Z., M. Pezeshki, and M. Raffatellu. 2009. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: dichotomies of help and harm. *Cytokine* 48:156-160.
42. Lu, Y. J., J. Gross, D. Bogaert, A. Finn, L. Bagraade, Q. Zhang, J. K. Kolls, A. Srivastava, A. Lundgren, S. Forte, C. M. Thompson, K. F. Harney, P. W. Anderson, M. Lipsitch, and R. Malley. 2008. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog* 4:e1000159.

Supplemental data

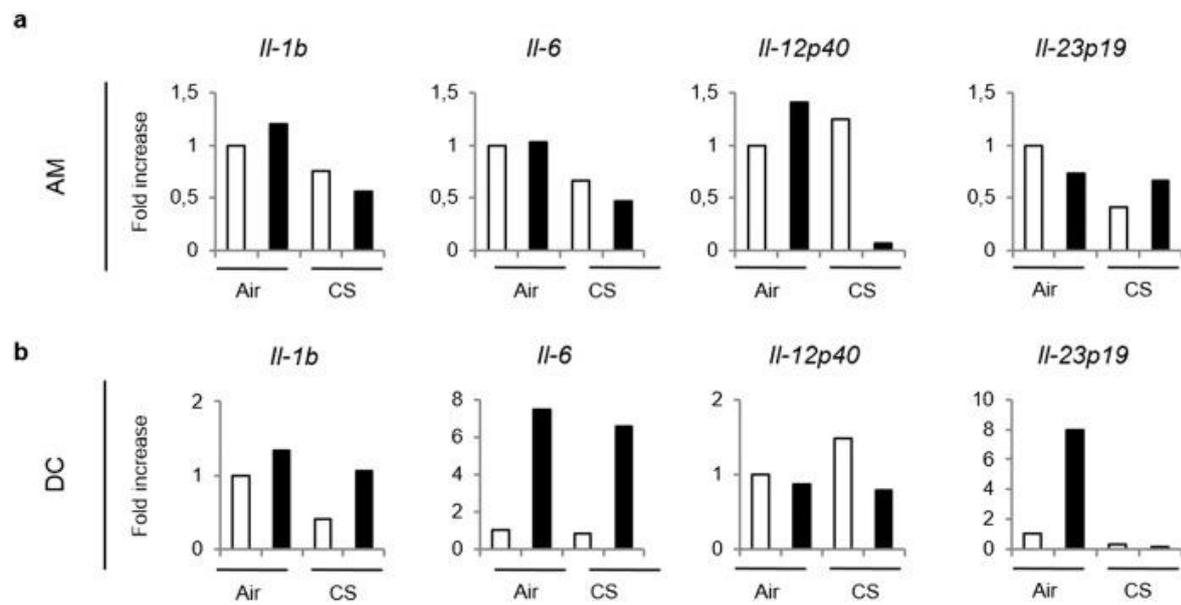
Supplemental Figure 1



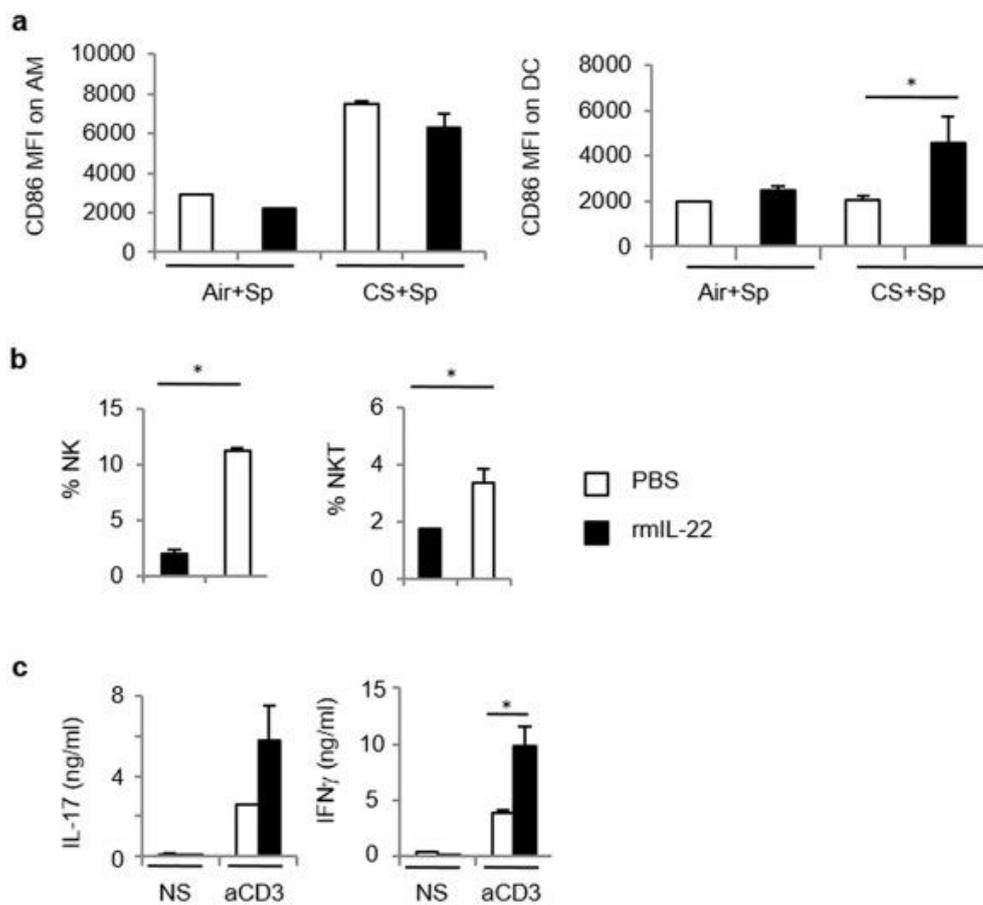
Supplemental Figure 2



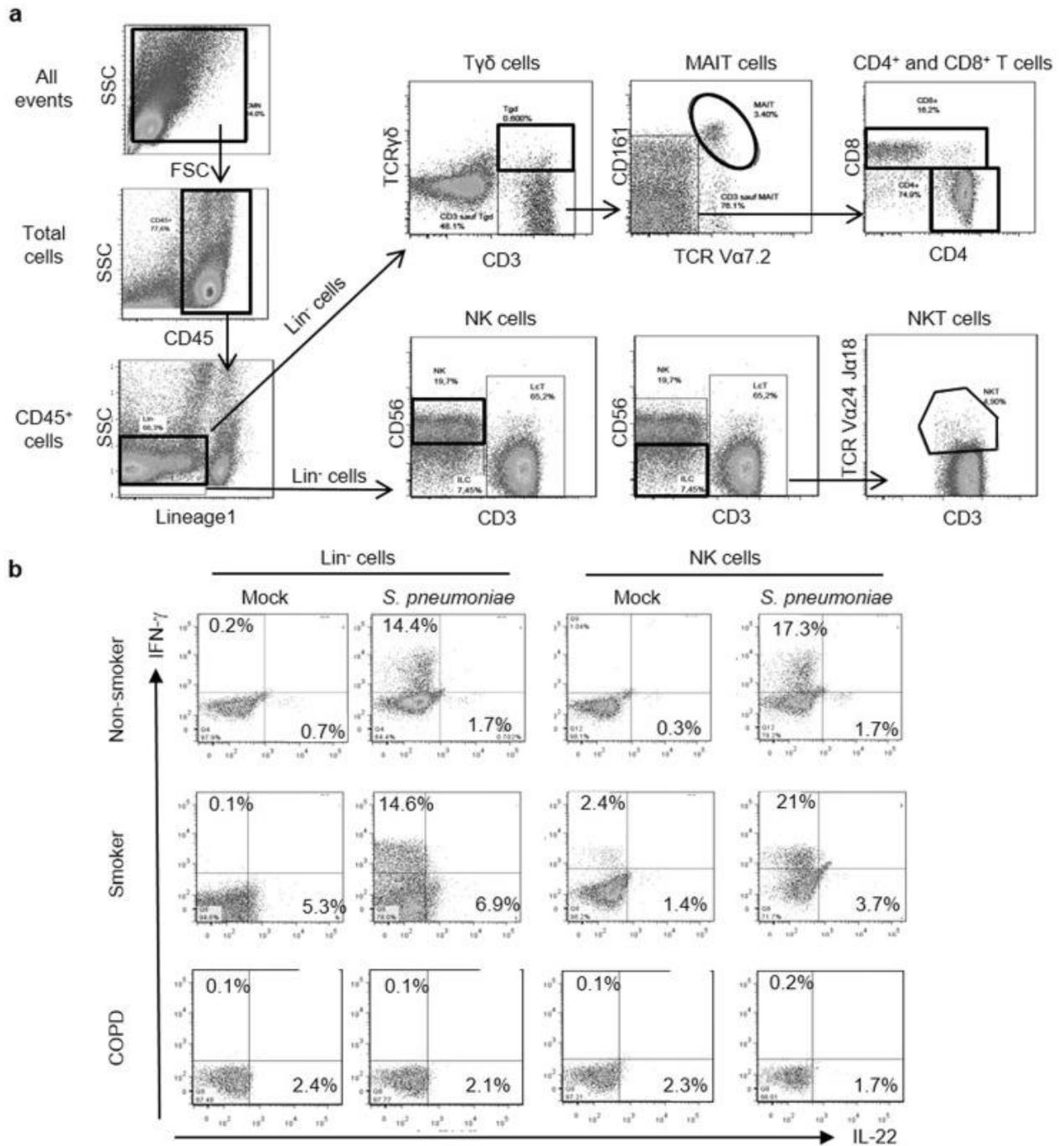
## Supplemental Figure 3



## Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 5



30. Annexe n°2

**Cigarette smoke alters the ability of human dendritic cells to promote anti-*Streptococcus pneumoniae* Th17 response**

Olivier Le Rouzic<sup>1,2,3,4,5</sup>, **Bachirou Koné**<sup>1,2,3,5</sup>, Jerome Kluza<sup>6,7</sup>, Philippe Marchetti<sup>6,7</sup>, Florence Hennegrave<sup>4</sup>, Cécile Olivier<sup>4</sup>, Gwenola Kervoaze<sup>1,2,3,5</sup>, Eva Vilain<sup>1,2,3,5</sup>, Clémence Mordacq<sup>1,2,3,5,8</sup>, Nicolas Just<sup>9</sup>, Thierry Perez<sup>4</sup>, Nathalie Bautin<sup>4</sup>, Muriel Pichavant<sup>1,2,3,5</sup>, Philippe Gosset<sup>1,2,3,5</sup>.

<sup>1</sup> Univ. Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> CNRS, UMR 8204, F-59000 Lille, France

<sup>3</sup> Inserm, U1019, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup> CHU Lille, Service de Pneumologie Immunologie et Allergologie, F-59000 Lille, France

<sup>5</sup> Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

<sup>6</sup> Univ. Lille, UMR-S 1172 – JPArc – Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, F-59000 Lille, France

<sup>7</sup> Inserm, UMR-S 1172, F-59000 Lille, France

<sup>8</sup> CHU Lille, Service de Pédiatrie, F-59000 Lille, France

<sup>9</sup> CH Roubaix, Service de Pneumologie, F-59100 Roubaix, France

Corresponding author:

Dr Philippe Gosset, LI3, CIIL, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP245, 59019 Lille cedex, France, Tel: (33) 32087 7965, Fax: (33) 32087 7888, E-mail: [philippe.gosset@pasteur-lille.fr](mailto:philippe.gosset@pasteur-lille.fr)

**Keywords:** Chronic obstructive pulmonary disease, dendritic cells, streptococcus pneumoniae, smoking, interleukin-1 $\beta$ , interleukin-23, Th17 cytokines

**Article publié dans Respiratory Research 2016 ; 17(1) : 94.**

**Facteur d'impact : 3,751**

**Abstract**

*Background:* Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with chronic inflammation and impaired immune response to pathogens leading to bacteria-induced exacerbation of the disease. A defect in Th17 cytokines in response to *Streptococcus pneumoniae*, a bacteria associated with COPD exacerbations, has been recently reported. Dendritic cells (DC) are professional antigen presenting cells that drive T-cells differentiation and activation. In this study, we hypothesized that exposure to cigarette smoke, the main risk factor of COPD, might altered the pro-Th17 response to *S. pneumoniae* in COPD patients and human DC.

*Methods:* Pro-Th1 and -Th17 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from COPD patients was analyzed and compared to those from smokers and non-smokers healthy subjects. The effect of cigarette smoke extract (CSE) was analyzed on human monocyte-derived DC (MDDC) from controls exposed or not to *S. pneumoniae*. Bacteria endocytosis, maturation of MDDC and secretion of cytokines were assessed by flow cytometry and ELISA, respectively. Implication of the oxidative stress was analyzed by addition of antioxidants and mitochondria inhibitors. In parallel, MDDC were cocultured with autologous T-cells to analyze the consequence on Th1 and Th17 cytokine production.

*Results:* PBMC from COPD patients exhibited defective production of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 and IL-23 to *S. pneumoniae* compared to healthy subjects and smokers. CSE significantly reduced *S. pneumoniae*-induced MDDC maturation, secretion of pro-Th1 and -Th17 cytokines and activation of Th1 and Th17 T-cell responses. CSE exposure was also associated with sustained CXCL8 secretion, bacteria endocytosis and mitochondrial oxidative stress. Antioxidants did not reverse these effects. Inhibitors of mitochondrial electron transport chain partly reproduced inhibition of *S. pneumoniae*-induced MDDC maturation but had no effect on cytokine secretion and T cell activation.

*Conclusions:* We observed a defective pro-Th1 and -Th17 response to bacteria in COPD patients. CSE exposure was associated with an inhibition of DC capacity to activate antigen specific T-cell response, an effect that seems to be not only related to oxidative stress. These results suggest that new therapeutics boosting this response in DC may be helpful to improve treatment of COPD exacerbations.

## Background

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a leading cause of morbidity and mortality worldwide mainly due to cigarette smoke exposure [1]. Oxidative stress induced by cigarette smoke induces a chronic lung inflammation responsible for a non-reversible airflow limitation and an impaired immune lung defenses leading to airway bacterial infections [2,3]. Most of these are due to *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* [4]. These infectious episodes are the major cause of acute exacerbations which have a strong impact on mortality and on disease-related costs [5]. Indeed, about 50% of COPD patients developing a first severe exacerbation die within 4 years after this episode [6]. Although studies reported that the mucosal inflammation is increased during COPD disease, recent evidences demonstrated that the immune response to micro-organisms is altered [7].

Dendritic cells (DC) are professional antigen presenting cells (APC) linking innate and adaptive immune responses, that are crucial to build an effective anti-bacterial response [8]. DC drive antigen-specific T-cells differentiation and activation in response to pathogens by delivering 3 signals including antigen presentation, co-stimulatory molecule expression and immuno-modulatory cytokine production [9]. The characteristics of these signals determine the polarization of the T-cell response as well as those of non-conventional lymphocytes [10]. Both Th1, i.e. IFN- $\gamma$ , and Th17, i.e. interleukin (IL)-17 and IL-22, cytokines are needed to control *S. pneumoniae* infection [11,12]. The oxidative stress induced by cigarette smoke inhibits LPS-induced DC maturation [13] and production of interleukin-12 (IL-12) and IL-23, which are involved in Th1 and Th17 T-cell differentiation, respectively [14]. However, there are little data on cigarette smoke effects on live bacteria-induced DC maturation.

Previous studies have shown that IL-17-producing cells are more frequent in the airways of steady-state COPD patients [15]. Conversely, another study have reported lower IL-17 levels during exacerbation in severe COPD patients compared to healthy subjects and mild COPD patients [16]. These results are strengthened by another clinical study confirming lower IL-17 blood levels in COPD patients colonized in the airways by opportunistic pathogens [17]. We recently described an altered IL-17 response to infection by *S. pneumoniae* in *in vitro* stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of COPD patients and in mice chronically exposed

to cigarette smoke [18]. As reported in lung APC from these mice, we hypothesized that exposure to CSE might altered the response to *S. pneumoniae* in COPD patients and human DC.

To evaluate this, we first analyzed the pro-Th1 and -Th17 response to *S. pneumoniae* in PBMC from COPD patients. Since DC play a central role in the host response to bacteria, we evaluated the effects of cigarette smoke extract (CSE) on their capacity to initiate a Th17 response against *S. pneumoniae*, on bacteria uptake and on costimulatory molecule expression and cytokine secretion. We finally investigate the role of cytoplasmic and mitochondrial oxidative stress in CSE effects.

## Methods

### Cell preparation

Whole blood from anonymous healthy adult donors was obtained at the Etablissement Français du Sang (French National Blood Service). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using Ficoll-paque gradient. Human monocytes were purified from PBMC by positive selection over a MACS column using anti-CD14-monoclonal antibodies conjugated microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). Immature human monocyte-derived dendritic cells (MDDC) were generated by culturing monocytes for 5 days in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, Paisley, UK), IL-4 (10 ng/ml) and GM-CSF (25 ng/ml) (PromoCell, Heidelberg, Germany). Immature MDDC were characterized by their phenotype (CD11c<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> HLA-DR<sup>low</sup> CD83<sup>low</sup> and CCR7<sup>low</sup>). Autologous T-cells were purified from whole blood by negative selection using the Pan T cell isolation kit II (Miltenyi Biotec GmbH) and stored at -80°C in freezing mix (90% FCS and 10% DMSO). For the *ex vivo* study, whole blood was collected from 14 non-smokers healthy adults, 13 smokers without COPD and 9 stable COPD patients after informed consent (CPP 2008-A00690-55). Description of the patients is depicted in Table 1. PBMC were isolated as described above and stimulated as previously described [18].

**Table 1:** Clinical characteristics of COPD patients, smokers and non-smokers.

Group	Nb	Sexe (M/F)	Age	Smoking (Pack.year)	FEV1 %	PO <sub>2</sub>	BODE	Inhaled corticosteroid
COPD	9	8 / 1	57.8 ± 3.2	57 ± 5.9	57.8 ± 7.9	70.9 ± 2.3	2.4 ± 0.8	4
Smokers	13	10 / 3	42.6 ± 4.9	35.4 ± 4.6	93.6 ± 1.5	ND	ND	0
Non smokers	14	10 / 4	45.5 ± 5.7	0	95.3 ± 3.5	ND	ND	0

FEV1%, percentage of the forced expiratory lung volume in the first second; PO<sub>2</sub>, blood partial pressure of oxygen; BODE: index combining *Body mass index, airflow obstruction, dyspnea and exercise capacity (6-minute walk test)*. Results are expressed as mean ±SEM. ND: not determined.

### Preparation of cigarette smoke extract

Cigarette smoke extract (CSE) was prepared according to the method described by Blue and Janoff [19]. Briefly, the smoking apparatus consisted of a 60-ml syringe to which a cigarette was attached. CSE was prepared by drawing 60 ml of cigarette smoke through the filter into the syringe and then slowly bubbling the smoke into 10 ml of basal Airway Epithelial Cell Medium (PromoCell). Two Kentucky research cigarettes 3RF4 were smoked per 10 ml of medium. The final solution was filtered through 0.2 µm filters and used immediately at 4% dilution.

### **Streptococcus pneumoniae**

Encapsulated *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 (clinical isolate from University Hospital of Lille, France) was stored at -80°C in 60% glycerol. For infection, bacteria was expanded by re-suspension in Todd Hewitt broth supplemented with 2% FCS and incubated at 37°C for 4 hours. The multiplicity of infection (MOI) used was 2 bacteria in exponential phase growth per 1 MDDC or PBMC.

### **Activation of human MDDC and design of the coculture**

Immature MDDC were exposed to 4% CSE for 3 hours in RPMI 1640 before activation by *S. pneumoniae* or by the Lipopolysaccharide as a positive control (LPS, *E.coli* serotype O55B5, 1µg/ml) (Invivogen, San Diego, CA). To stop bacterial growth, 100 UI/ml Penicillin and 100µg/ml Streptomycin were added to the culture medium 1 hour after *S. pneumoniae* has been added. After an overnight incubation at 37°C, supernatants were harvested and MDDC collected and divided in two groups, one to analyze their phenotype in flow cytometry and one to analyze their APC function in coculture with autologous T-cells (5 x 10<sup>4</sup> MDDC per 5 x10<sup>5</sup> T-cells in 500 µL RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 5 days at 37°C). Cell viability assessed by trypan blue staining confirmed that exposure to CSE did not increase cell toxicity in unstimulated and *S. pneumoniae*-stimulated MDDC (data not shown). For cocultures, a condition with T-cells alone in a well coated by anti-CD3 antibodies (20µg/ml, BD Biosciences, San Diego, CA) was used as a positive control of T-cells activation.

### **Flow cytometry**

MDDC were labelled (30 min at 4°C) with different mix of FITC-conjugated anti-CD36, -CD86, -CD209, -CCR7 or -CD1a, PE-conjugated anti-B7H1, -CD80 or -CD54, APC-conjugated anti-CD83, -CD40 or -CD11c, PECy5-conjugated anti-HLA-DR and corresponding IgG isotype

controls (BD Pharmingen™, BD Biosciences). After been washed and fixed in 0.25% paraformaldehyde (PFA), MDDC were gated using FSC and SSC on a FACSCalibur flow cytometer with CellQuest software (BD biosciences). For intracellular staining, T-cells were incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS plus brefeldin A (10µg/ml) for 6 hours at 37°C. Cells were first labelled (30 min at 4°C) with APC-Cy7-conjugated anti-CD45, Alexa Fluor 700-conjugated anti-CD4 and AmCyan-conjugated anti-CD8. After 15 min incubation, cells were fixed, permeabilized (Kit, BD Biosciences) and labelled with FITC-conjugated anti-IFN-γ, APC-conjugated anti-IL-17, PE-conjugated anti-IL-22 or the related isotype controls. Results are expressed as the difference between median fluorescence intensity (MFI) with the specific antibody and the isotype control ( $\Delta$ MFI).

### **Cytokines measurements**

For *in vitro* and *ex vivo* studies, supernatants were collected 24h after *S. pneumoniae* exposure, and stored at -20°C. Concentrations of cytokines were determined by sandwich ELISA as described by the manufacturer for IFN-γ, IL-1β, IL-4, IL-6, CXCL8, IL-10, IL-17, IL-22, IL-23 (eBiosciences, San Diego, CA) and for TNF-α and IL-12p70 (R&D systems, Abingdon,UK).

### **Real Time quantitative PCR**

Specific experiments were done to quantify the mRNA expression of markers for oxidative stress. After a 6-hours incubation with *S. pneumoniae*, MDDC were washed in PBS and homogenized and stored at -20°C in TRIzol reagent (Invitrogen). RNA were extracted using successively chloroform, isopropyl alcohol and 75% ethanol, and re-suspended into 30µl RNase free water. Quantity and quality was determined by Nanodrop spectrophotometer using OD 260nm for measuring concentration and 260/280 ratio for assessing the purity. Overall quality was also evaluated by electrophoresis through a 0.8% agarose gel visualized using GelStar™ staining (Lonza, Rockland, USA). Total RNA was reverse transcribed using Superscript® III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, Paisley, Scotland). Real-Time PCR was performed in duplicates in 96-well plates using SYBR® Green Master mix (Invitrogen, Paisley, Scotland). Primer sequences are listed in Additional file 1. Relative mRNA quantities were calculated using the comparative Ct method normalized to human β-actin ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

### **Endocytosis and bactericidy of *S. pneumoniae* by MDDC**

*S. pneumoniae* was first labelled with pHrodo™ SE (Molecular Probes®, Invitrogen®) and stored at 4°C protected from light according to manufacturer's instructions. CSE was added 3 hours before MDDC dye-labelled *S. pneumoniae* exposure (MOI 20). After a 30 min-incubation at 37°C, cells were washed and a flow cytometer analysis was immediately performed with 488nm argon-ion laser using a R-phycoerythrin emission filter. One condition of MDDC was incubated at 4°C as an endocytosis negative control. Results are expressed in MFI. Endocytosis of viable bacteria after a 3-hours CSE exposure (MOI 10), was studied in MDDC as described by Zhou [20].

### **Oxidative stress and mitochondrial dysfunction assessment**

Cellular and focused mitochondrial oxidative stress were quantified either after 3 and 6 hours after *S. pneumoniae* exposure using H2DCFDA and MitoSOX™, respectively as described by the manufacturer (ThermoFisher). After 30 minutes incubation at 37°C, cells were washed in PBS and analyzed in flow cytometry. For evaluation of oxidative stress involvement in CSE effects, the antioxidants N-Acetyl-Cystein (0.5mM), tertiary butyl hydroquinone (5, 10 or 20µM), butylated hydroxyanisole (20µM) or MitoTEMPO (10 µM) were added to the MDDC medium 30 minutes before CSE exposure (Sigma, St Louis, MO). Finally, to test involvement of mitochondrial dysfunction, two inhibitors of mitochondrial electron transport chain inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress, rotenone (2µM) and antimycin A (1µM) (Sigma), were used separately instead of CSE.

### **Statistical analysis**

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. The statistical significance of differences was calculated by a Wilcoxon rank-sum test when comparing two groups and a Friedman test with a post-hoc Wilcoxon test with Holm correction when comparing more than two groups (R version 3.2.3). P-value lower than 0.05 were considered as significant.

## Results

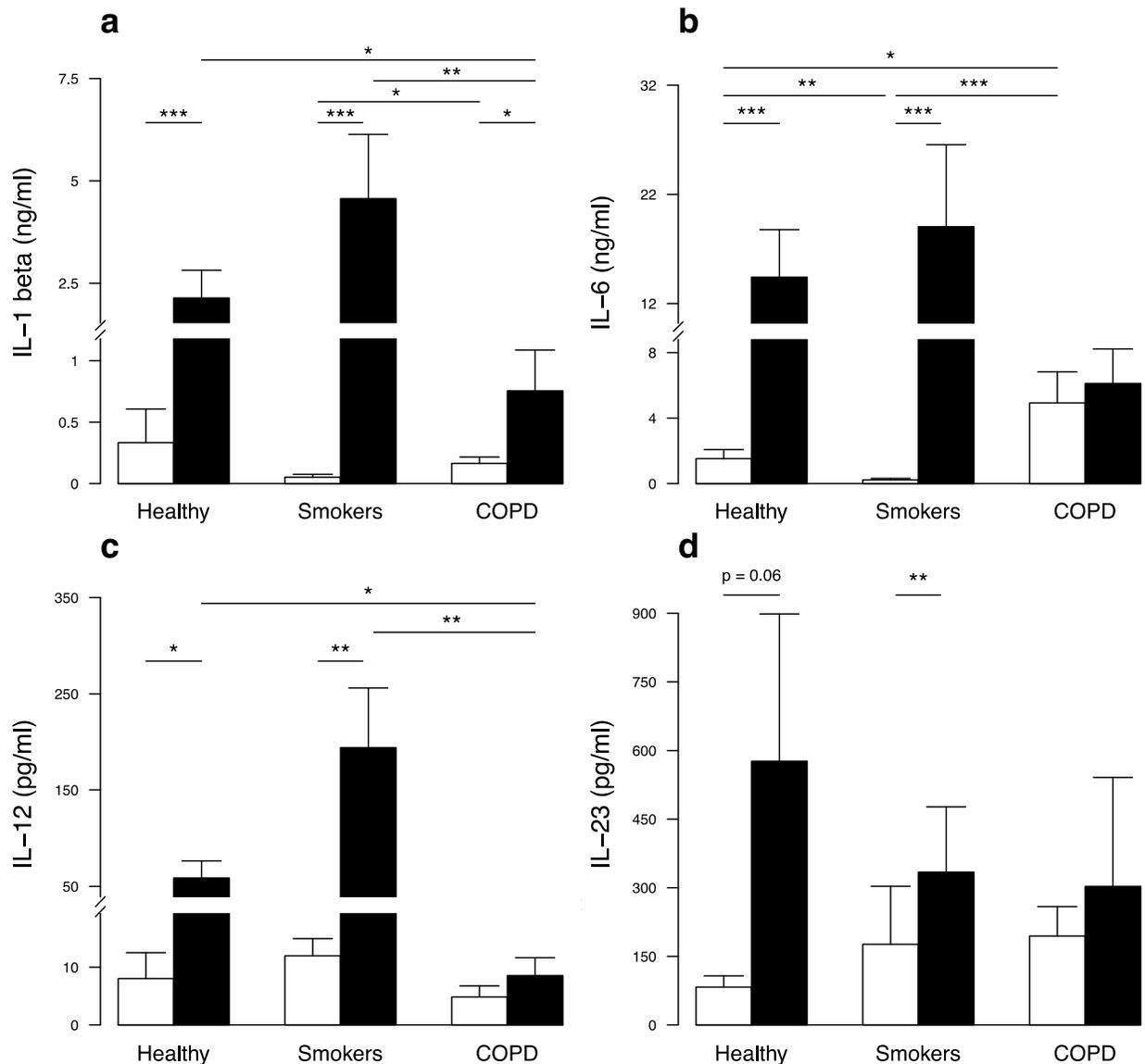
### **PBMC from COPD patients exhibit a defective pro-Th1 and pro-Th17 response to *S. pneumoniae***

To compare the cytokine profile of PBMC from healthy subjects, smokers and COPD patients, levels of CXCL8 (Additional file 2), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 and IL-23 were evaluated (Fig. 1). At baseline, PBMC from COPD patients produced more IL-6, but not IL-12 and IL-23, than healthy controls and smokers and more CXCL8 and IL-1 $\beta$  than smokers. As expected, *S. pneumoniae* exposure triggered higher secretion by PBMC from healthy controls of CXCL8, IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-12 with a same trend for IL-23. Interestingly, the same pattern was observed with PBMC from smokers. However, *S. pneumoniae* exposure did not induce IL-6, IL-12 and IL-23 secretion by PBMC from COPD patients whereas it increased IL-1 $\beta$  (Fig. 1). However, the concentrations of IL-1 $\beta$  in *S. pneumoniae*-stimulated PBMC were lower in COPD patients than in smokers. CXCL8 production by PBMC from COPD patients activated by *S. pneumoniae* was unchanged although the CXCL8 levels were similar in the 3 groups (Additional file 2). These data suggest that the response to *S. pneumoniae* is altered in PBMC from COPD patients but not those from smokers.

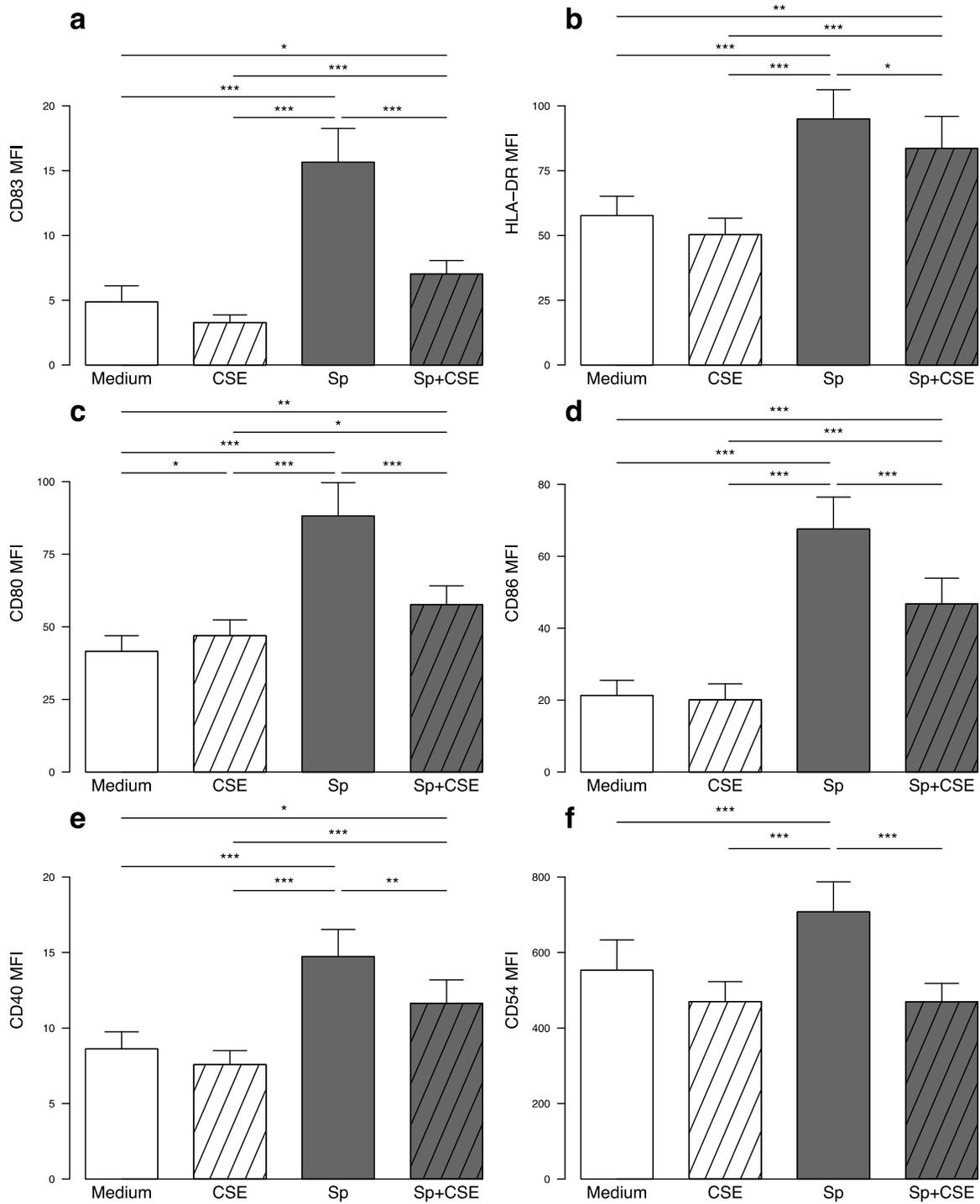
### **CSE inhibits *S. pneumoniae*-induced MDDC maturation**

Since we observed a defective production of cytokines that are known to be mainly produced by APC, in PBMC from COPD patients, we next focused on the effect of CSE on DC. Stimulation with *S. pneumoniae* significantly increased the expression of maturation markers including CD83, HLA-DR, CD80, CD86, CD40 and CD54 on MDDC (Fig. 2). In contrast, pre-exposure of MDDC with CSE modulated the phenotypic response to *S. pneumoniae* by minimizing the expression of all these molecules. As a note, CSE itself did not have any impact on MDDC phenotype except a small increase of CD80 expression. Addition of *S. pneumoniae* also increased the secretion of pro-inflammatory cytokines including TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-23 and CXCL8 with a similar trend for IL-12 by MDDC (Fig. 3 and Additional file 3a). CSE exposure inhibited IL-6 and IL-23 secretion in *S. pneumoniae*-activated MDDC with a similar trend for TNF- $\alpha$  and IL-12 (Fig. 3). CSE alone only modulated the CXCL8 levels for higher levels (Additional file 3a-b). As a control, CSE was also partly able to inhibit the LPS-response by MDDC by inhibiting CD83, CD40 and CD54 expression and TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 and IL-23

secretion (Additional file 3 and 4). All of these data showed that CSE inhibits *S. pneumoniae*-induced MDDC maturation and secretion of cytokines involved in Th1 and Th17 T-cell differentiation.

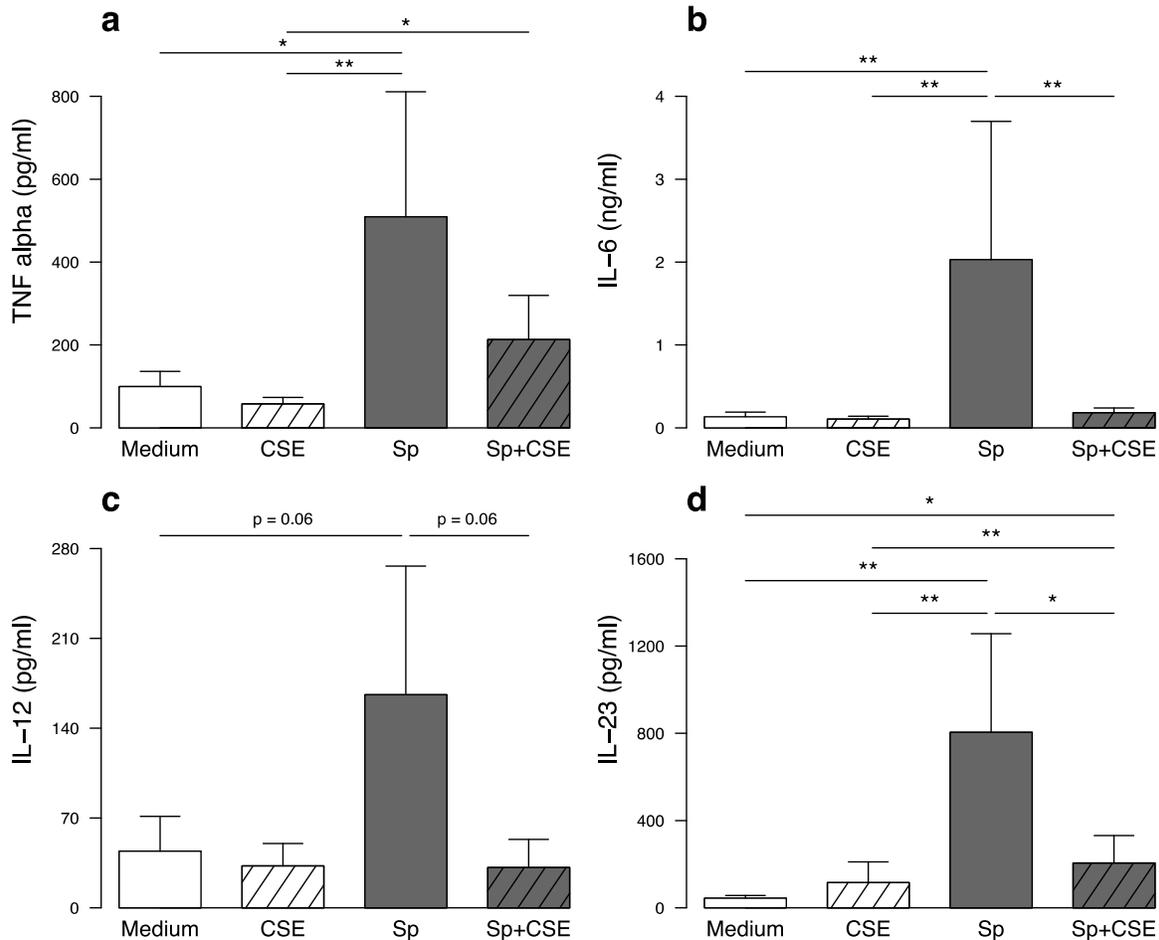


**Figure 1:** *S. pneumoniae*-induced cytokine secretion by PBMC from non-smoker healthy subjects (n=14), smokers without COPD (n=13) and COPD patients (n=9). Supernatants were collected after 24h incubation without stimulation (white columns) or after addition of *S. pneumoniae* (black columns). (a) IL-1 $\beta$ , (b) IL-6, (c) IL-12 and (d) IL-23 were quantified by ELISA. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.



**Figure 2:** *In vitro* exposure to cigarette smoke extract (CSE) modulate the phenotype of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) from healthy subjects activated by *S. pneumoniae* (Sp). Expression of (a) CD83, (b) HLA-DR, (c) CD80, (d) CD86, (e) CD40 and (f) CD54 was evaluated by flow cytometry in MDDC exposed to CSE and then activated or not by *S.*

*pneumoniae* for 24h. Data are reported as mean fluorescence intensity (MFI)  $\pm$  S.E.M. of 27 experiments. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001.

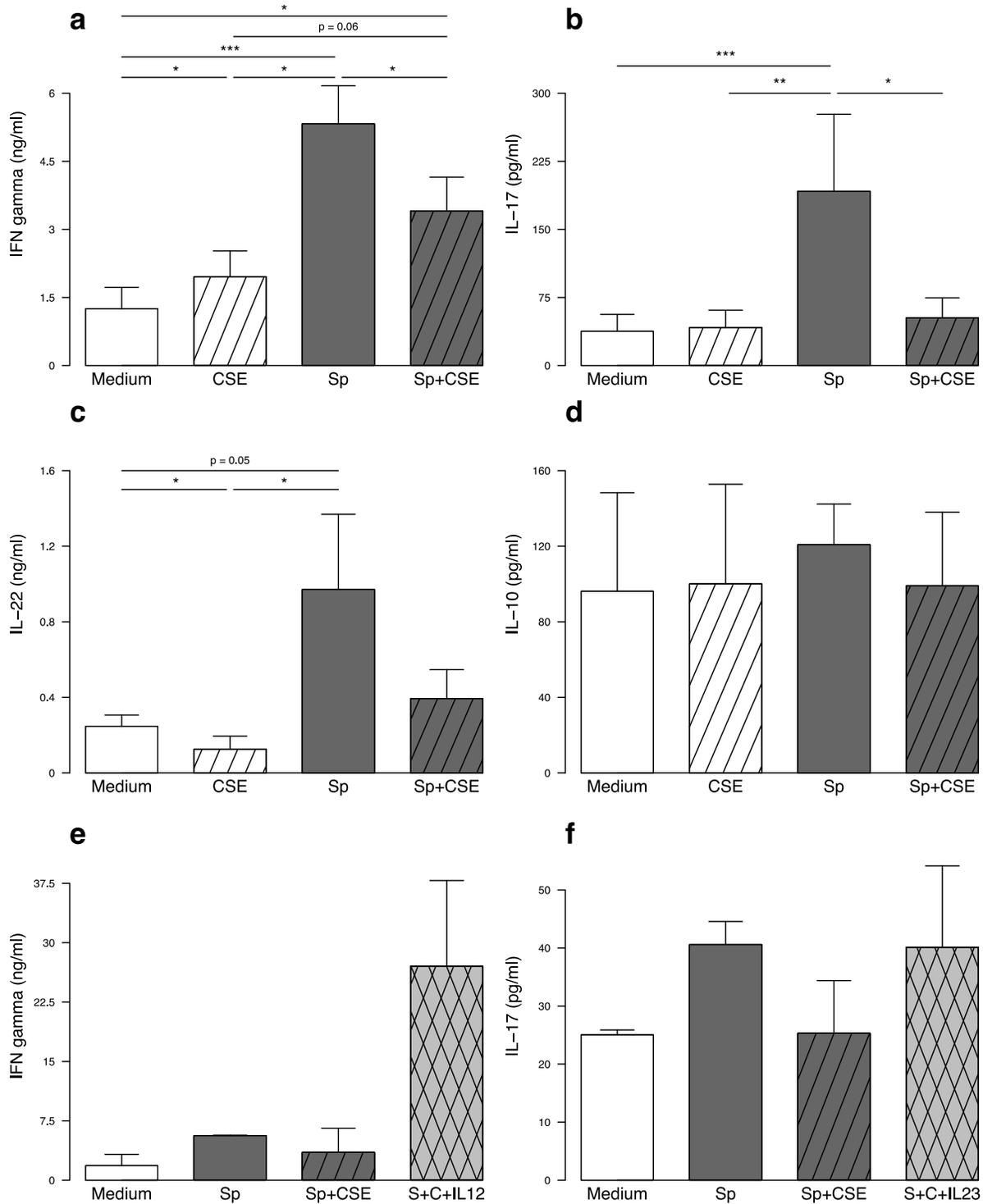


**Figure 3:** *In vitro* exposure to cigarette smoke extract (CSE) modulates the secretion of cytokines by monocyte-derived dendritic cells (MDDC) from healthy subjects activated by *S. pneumoniae* (Sp). Levels of (a) TNF- $\alpha$ , (b) IL-6, (c) IL-12 and (d) IL-23 were quantified by ELISA in MDDC culture supernatants collected after 24 hours incubation with CSE and/or *S. pneumoniae*. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. of 14 experiments. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01.

### CSE-exposed MDDC are responsible for a defective Th1 and Th17 response to *S. pneumoniae*

To evaluate the effects of CSE on the crosstalk MDDC/T-cells, we next performed coculture experiments between MDDC and autologous T-cells. T-cells cultured with *S. pneumoniae*-exposed MDDC secreted significantly higher levels of IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-22 (Fig. 4a-c). Intracellular staining confirmed the T-cell origin of these cytokines (Additional file 5). In

contrast, when MDDC were pre-exposed to CSE prior *S. pneumoniae* activation, T-cells secreted lower levels of IFN- $\gamma$  and IL-17 with a similar trend for IL-22 (Fig. 4a-c). MDDC only exposed to CSE had no effect on IL-17 secretion but induced a slightly higher IFN- $\gamma$  and lower IL-22 production ( $p < 0.05$ ). Exposure to CSE had no impact on IL-10 and IL-4 levels (Fig. 4d and data not shown).



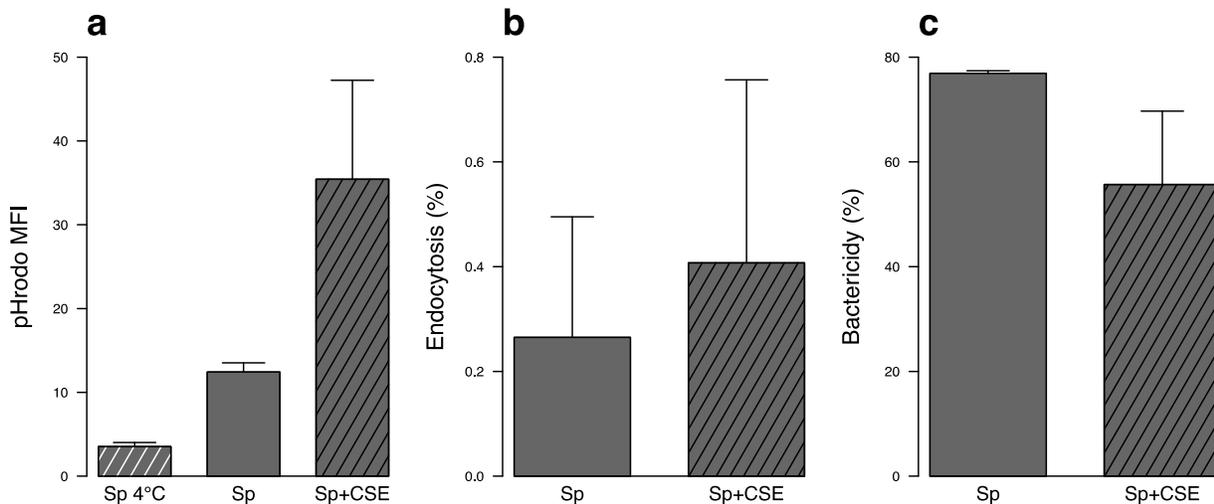
**Figure 4:** *In vitro* exposure to cigarette smoke extract (CSE) of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) altered their ability to prime T-cells. MDDC were exposed to CSE and then activated or not by *S. pneumoniae* (Sp). After 24 hours incubation, MDDC were then cocultured 5 days with

autologous T-cells. Levels of (a) IFN- $\gamma$ , (b) IL-17, (c) IL-22 and (d) IL-10 were quantified by ELISA in coculture supernatants. In some experiments, either recombinant human IL-12 or IL-23 were added to the cocultures with CSE- and Sp-exposed MDDC in order to quantify their ability to restore (e) IFN- $\gamma$  or (f) IL-17 secretion, respectively. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. of 14 and 3 experiments for a-d and e-f, respectively. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001.

To demonstrate that the defective production of IL-12 and IL-23 by MDDC following CSE exposure was responsible for the defective IFN- $\gamma$  and IL-17 production by T-cells respectively, we supplemented the cocultures with these recombinant cytokines. As depicted in Figure 4e and 4f, addition of recombinant human IL-12 and IL-23 to cocultures induced a huge IFN- $\gamma$  secretion and restored IL-17 secretion, respectively. Although, the difference was not significant due to the small sample size, the effect is reproducible. These data showed that inhibition of MDDC maturation by CSE altered their ability to promote Th1 and Th17 T-cell differentiation, an effect that seems to be related to the decreased secretion of IL-12 and IL-23 by MDDC.

#### **Impact of CSE on *S. pneumoniae* endocytosis by MDDC**

To understand why CSE limits MDDC maturation induced by *S. pneumoniae*, bacterial endocytosis was first investigated. Despite CSE inhibition of *S. pneumoniae*- and LPS-induced MDDC expression of the adherence molecule CD54 (Fig 2f and Additional file 4f), MDDC exposure to dye-labeled *S. pneumoniae* showed higher fluorescence in CSE pre-exposed cells (Fig. 5a). As pHrodo™ is only fluorescent in acidic environment, it indirectly reflected a greater internalization of bacteria. This result was comforted with viable bacteria showing a trend to a higher endocytosis and a decreased killing of internalized bacteria in MDDC pre-exposed to CSE (Fig. 5b-c). These results showed that CSE inhibition of MDDC maturations is not related to decreased bacterial endocytosis.

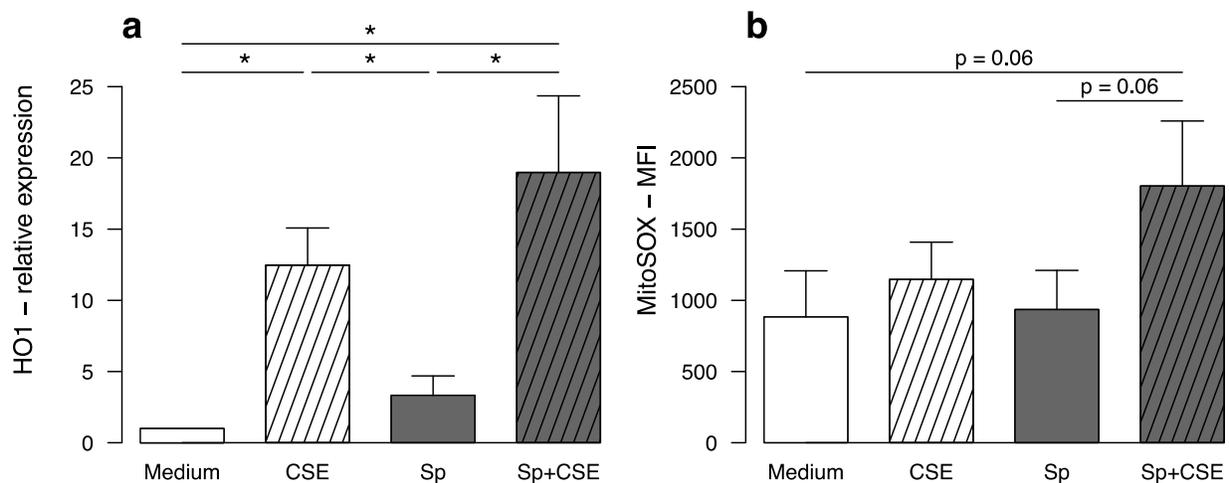


**Figure 5:** *In vitro* exposure to cigarette smoke extract (CSE) is associated with higher endocytosis of *S. pneumoniae* (Sp) by monocyte-derived dendritic cells (MDDC). (a) Mean fluorescence intensity (MFI) of internalized dye-labelled Sp was measured by flow cytometry. One condition was put at 4°C to inhibit endocytosis as a negative control. (b) Proportion of viable internalized Sp after one hour exposure were quantify to measure bacteria endocytosis as described by Zhou (Zhou and Kobzik, 2007). (c) After one more hour incubation, internalized still viable Sp were quantify to measure the proportion of killed Sp. Data represent mean ± S.E.M. of 4 and 2 experiments for a and b-c respectively. There was no statistical difference between groups.

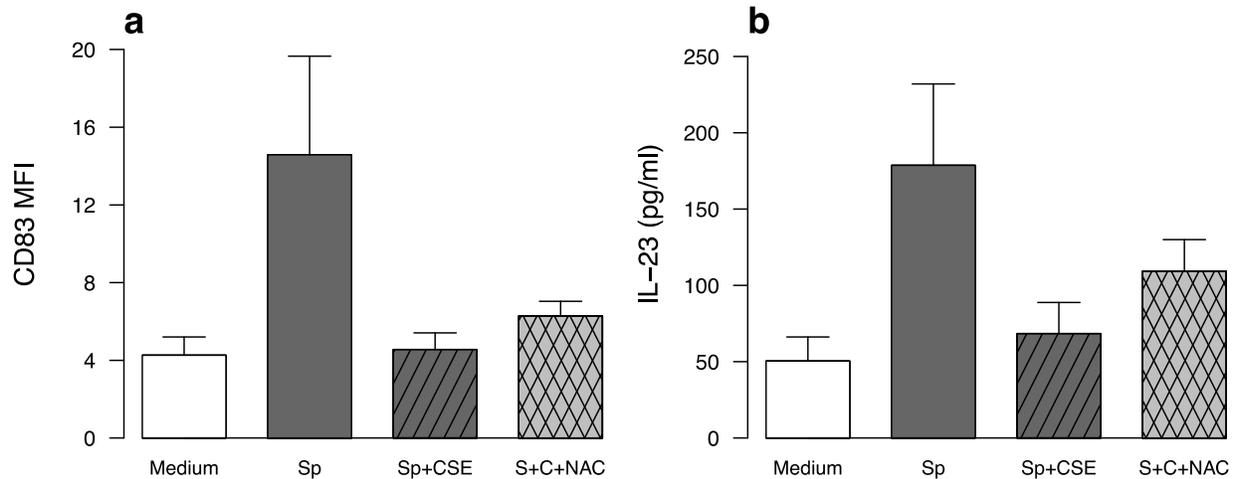
**CSE induced oxidative stress was not implicated in the altered response to *S. pneumoniae*.**

We next focused on the impact of oxidative stress in the repressive effect of CSE on DC maturation. As expected, CSE exposure, despite the presence or not of *S. pneumoniae*, increased the expression of heme oxygenase 1 (HO1) within MDDC (Fig. 6a). This was confirmed by increased fluorescence in DCFDA-pre-treated MDDC after 3h incubation (data not shown). Oxidative stress involvement in CSE inhibitory effects was next tested by adding before CSE exposure, antioxidants targeting different oxidative pathways. After addition of N-Acetyl-Cystein (NAC), the inhibitory effect of CSE on co-maturation marker expression and cytokine expression was not reversed except for CD80 and CD86 for which NAC tended to increase their expression

( $p=NS$ ) (Fig. 7, Additional file 6). Similarly, two other antioxidants, tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) and butylated hydroxyanisole (BHA) were not able to reverse CSE inhibitory effects (data not shown). Whereas cytoplasmic oxidative stress did not persist after 6h incubation, co-activation with CSE and *S. pneumoniae* induced a mitochondrial oxidative stress depicted by increased MitoSOX fluorescence (Fig. 6b). Again, MitoTEMPO a mitochondrially-targeted antioxidant could not reverse CSE inhibitory effects (data not shown). Moreover, MDDC pre-treatment by NAC and MitoTEMPO did not restore the production of IFN- $\gamma$  and IL-17 by T-cells in cocultures (data not shown).

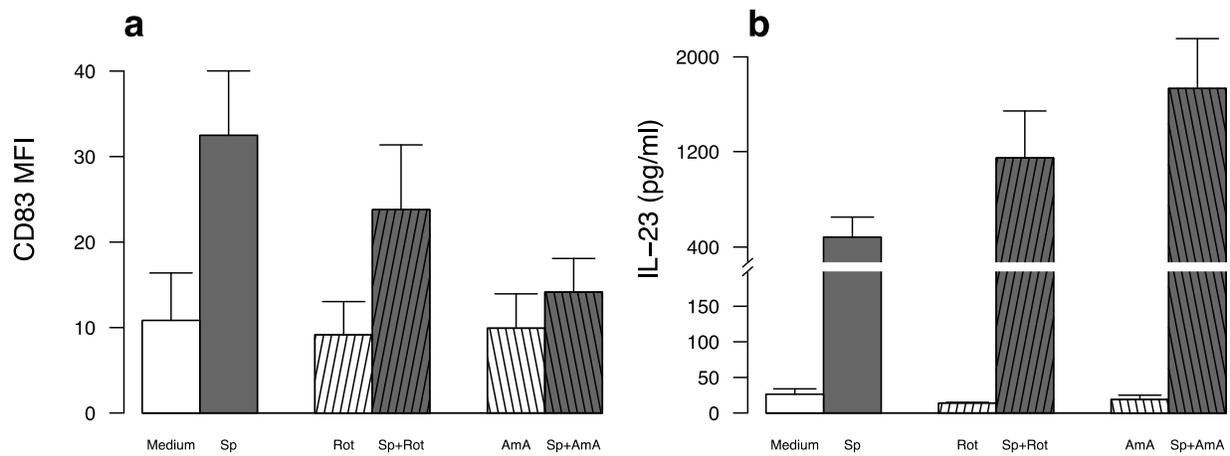


**Figure 6:** *In vitro* exposure to cigarette smoke extract (CSE) induced an oxidative stress in monocyte-derived dendritic cell (MDDC) from healthy subjects activated by *S. pneumoniae* (Sp). (a) Expression of Heme-oxygenase (HO)-1 was evaluated by qRT-PCR in MDDC exposed to CSE and then activated or not by *S. pneumoniae* for 6 hours. (b) Mitochondrial oxidative stress was measured by flow cytometry by measuring the fluorescence of MitoSox in MDDC exposed to CSE and then activated or not by *S. pneumoniae* for 6 hours. Data represent mean  $\pm$  S.E.M of 4 and 6 experiments for a and b, respectively. \* $P < 0.05$ .



**Figure 7:** Treatment with the anti-oxidant N-acetylcystein (NAC) did not reverse the inhibitory effect of cigarette smoke extract (CSE) on the phenotype and the secretion of cytokines by monocyte-derived dendritic cell (MDDC) activated by *S. pneumoniae* (Sp). The expression of (a) CD83 and the secretion of (b) IL-23 by MDDC treated or not with NAC and then exposed to CSE and Sp for 24 hours were evaluated by flow cytometry and ELISA, respectively. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M of 6 experiments. There was no statistical difference between groups.

Furthermore, treatment with rotenone and antimycin A, which induced a mitochondrial dysfunction, tended to minimize *S. pneumoniae*-induced MDDC CD83 expression (Fig. 8a) as well as *S. pneumoniae*-stimulated maturation marker expression (Additional file 7). In contrast, cytokine production by *S. pneumoniae*-activated MDDC was not modified by addition of rotenone and antimycin A as illustrated by sustained *S. pneumoniae*-induced IL-23 secretion (Fig. 8b). These data suggest that CSE-induced mitochondrial stress does not reproduce the major effects of CSE.



**Figure 8:** *In vitro* exposures to rotenone (Rot) and antimycin A (AmA) inhibit the phenotype of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) activated by *S. pneumoniae* (Sp) but not the secretion of cytokines. (a) Expression of CD83 and (b) the secretion of IL-23 were evaluated by flow cytometry and ELISA, respectively, in MDDC exposed to inhibitors and then activated or not by *S. pneumoniae* for 24 hours. Data represent mean  $\pm$  S.E.M of 6 and 4 experiments for a and b, respectively. There was no statistical difference between groups.

## Discussion

In this study, we observed that PBMC from COPD patients secrete lower pro-Th1 and -Th17 cytokines in response to *S. pneumoniae* strengthening the concept of an APC defective response to pathogens in this disease. We demonstrated that *in vitro* exposure to CSE inhibits MDDC maturation and induction of specific Th1 and Th17 responses against *S. pneumoniae*. In contrast to previous studies using LPS [14], anti-oxidants did not markedly reverse these effects suggesting that cigarette smoke (CS) inhibitory effects are not mainly related to oxidative stress in the context of infection with a live bacteria.

Previous studies have reported higher pro-inflammatory cytokines blood levels in COPD patients at steady state compared to controls [21]. Besides, others studies have also showed increased pro-inflammatory cytokines levels during exacerbations compared to steady state [22]. Whereas in our study, the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8 were higher in unstimulated cells from COPD patients, we report for the first time that PBMC from COPD patients exhibit a defective pro-inflammatory cytokine (including IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 and IL-23) secretion in response to bacteria compared to controls or to smokers. This defective response may favor airway bacterial infection and colonization which is a main feature of the disease [23]. This is comforted by another study reporting lower IL-17 blood levels in COPD patients with opportunistic pathogen colonization [17]. These pro-inflammatory cytokines are mainly produced by APC and are involved in induction of Th1 and Th17 responses to pathogens. Therefore, these results strengthen our previous data showing a defective Th17 response to *S. pneumoniae* in PBMC from COPD patients and in mice chronically exposed to CS. This defect in mice is related to an altered activation of alveolar macrophages and DC by *S. pneumoniae* and suggests that the altered Th17 response to pathogens in COPD patients might be due to a defective response of both DC and macrophages [18].

DC are professional APC linking innate and adaptive immune responses which play a central role in the COPD immunopathology [8]. There are discrepant data on DC features in the lung of COPD patients either reporting an accumulation of DC or a decreased number of matured DC in small airways of COPD patients [24,25]. This might be related to the different clinical status or potentially to the presence of dysbiosis and/or colonization in the airways of these patients. A recent clinical study based on lung biopsy showed decreased CD83 expression in DC from small

airways of COPD patients as well as smokers compared with healthy non smokers, corroborating cigarette smoke involvement in DC decreased maturation even in subjects without COPD [26]. Surprisingly, in our study, the cytokine secretion in response to *S. pneumoniae* in smokers was not altered compared to non-smokers suggesting that this defective response may be a specific feature of the disease. In our model of mice chronically exposed to cigarette smoke, we report a decreased lung DC maturation and a lower production of IL-1 $\beta$  and IL-23 in response to *S. pneumoniae* suggesting that both in human and mice, the defect in these cytokines explained the altered Th17 cytokine production induced by CS [18]. Therefore, all these data as well as ours suggest that cigarette smoke exposure locally inhibits lung APC maturation even in smokers without COPD. In contrast, defective systemic response to bacteria is a specific feature of COPD, which may be the consequence of the conjugate effect of exposure to CS, systemic chronic inflammation and/or host predisposition to develop the disease.

After demonstrating the inhibitory effects of CSE on DC maturation, we would like to decipher those mechanisms. In a recent study, Givi *et al.* have reported that short-term CSE exposure induced maturation of DC whereas 10 days exposure suppress it [27]. In our model, both short-term and 6 days exposure (data not shown) had inhibitory effects on DC maturation. We think that these differences may be linked to the use of different cells, namely murine bone marrow derived DC and Hodgkin's disease-derived cell line L428, and of cigarette smoke from commercial cigarette without filter. In fact, other authors using human MDDC have reported that exposure to CSE of LPS-activated DC decreased IL-12 secretion and expression of costimulatory molecules [13,14]. Moreover, they showed that secretion of IL-12 can be partially restored by treatment with the antioxidants N-acetylcysteine and catalase. Conversely, in our model we were not able to restore DC maturation and cytokine secretion with physiologic concentrations of N-acetylcysteine nor with two other antioxidants, TBHQ and BHA. Interestingly, we observed that exposure to CSE induced a mitochondrial oxidative stress. As previously reported, inducing a mitochondrial dysfunction by blocking mitochondrial electron transport chain with rotenone or antimycin A inhibits expression of maturation associated molecules [28]. However, it could not reproduce all CSE inhibition as these molecules had no effects on cytokines secretion. Moreover, the mitochondria-targeted antioxidant did not reversed the inhibitory effect of CSE in bacteria-activated DC. These data indicate that CSE-induced oxidative stress is not essential for the inhibitory effect on response to bacteria. Recent reports demonstrated that exposure to cigarette

smoke also modulated miRNA expression [29]. In our model, we observed in preliminary experiments that exposure to CSE inhibits the expression of miR22, a miRNA involved in the development of COPD through its effect on DC and the synthesis of IL-17 [30]. However, in our hands, the inhibition of miR22 as well as its upregulation with a mimicker did not allow to reproduce the phenotype of CSE-exposed MDDC. Altogether, we can suspect that since the effect of CSE, a very complex atmosphere, involved different targets, the modulation of one of them did not allow to block its major effects.

Bacteria endocytosis was higher in CSE pre-exposed DC. This contrasts with previous data on alveolar macrophages showing decreased *S. pneumoniae* internalization after concentrated ambient particles exposure [20]. However, Phipps *et al.* have shown that CS exposure of alveolar macrophages reduced complement-mediated endocytosis of *S. pneumoniae* while unopsonized bacteria endocytosis was sustained [31]. This suggests that CS exposure may affect only the complement-dependent endocytosis pathway and not the others. As endocytic activity is inversely correlated to the degree of maturation in DC [32], this indicates that the inhibition by CSE of maturation might explain the sustained bacteria endocytosis. Although this effect should be confirmed, we observed decreased intracellular killing of *S. pneumoniae* in CSE pre-treated DC suggesting that bacteria may persist inside DC promoting bacterial colonization and subsequent re-infection. Other extracellular bacteria like *Streptococcus pyogenes* or intracellular like *Coxiella burnetii* and *Brucella abortus* have demonstrated ability to persist inside macrophages or DC respectively by inhibiting phagolysosome trafficking [33,34]. Interestingly, these effects are associated with decreased DC maturation. Furthermore, Tardif *et al.* have demonstrated that heme-oxygenase-1 which was increased in our model and carbon monoxide which is an important component of cigarette smoke could both block endosome-lysosome fusion without endocytosis reduction in LPS-exposed DC [35]. Altogether these data suggest that the inhibitory effects of CSE may be related to defective phagolysosome trafficking.

**Conclusion**

In this study, we observed a defective pro-Th1 and -Th17 response to *S. pneumoniae* in the PBMC of COPD patients compared to healthy controls and smokers suggesting an altered response to bacteria in APC during COPD. Moreover, we showed that this may be explained by cigarette smoke inhibition of DC capacity to activate antigen specific T-cell response, an effect which may implicate an altered phagolysosome trafficking. Further studies are needed to confirm this hypothesis. Nevertheless, these data suggest that new therapeutics targeting this defect may be helpful to improve treatment and prevention of COPD exacerbations.

## References

1. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2011;378:1015–26.
2. Pichavant M, Rémy G, Bekaert S, Le Rouzic O, Kervoaze G, Vilain E, et al. Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunol*. 2014;7:568–78.
3. Donnelly LE, Barnes PJ. Defective phagocytosis in airways disease. *Chest*. 2012;141:1055–62.
4. Sethi S. Molecular Diagnosis of Respiratory Tract Infection in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin. Infect. Dis*. 2011;52:S290–5.
5. Pasquale MK, Sun SX, Song F, Hartnett HJ, Stenkowski SA. Impact of exacerbations on health care cost and resource utilization in chronic obstructive pulmonary disease patients with chronic bronchitis from a predominantly Medicare population. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis*. 2012;7:757–64.
6. Suissa S, Dell’Aniello S, Ernst P. Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: severe exacerbations and mortality. *Thorax*. 2012;67:957–63.
7. Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas CMR, Tudhope SJ, Wedzicha JA, et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur. Respir. J*. 2010;35:1039–47.
8. Van Pottelberge GR, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. The Role of Dendritic Cells in the Pathogenesis of COPD: Liaison Officers in the Front Line. *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis*. 2009;6:284–90.
9. Joffre O, Nolte MA, Spörri R, Sousa CR e. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol. Rev*. 2009;227:234–47.
10. Briseño CG, Murphy TL, Murphy KM. Complementary diversification of dendritic cells and innate lymphoid cells. *Curr. Opin. Immunol*. 2014;29:69–78.
11. Marqués JM, Rial A, Muñoz N, Pelay F-X, Van Maele L, Léger H, et al. Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity. *Immunobiology*. 2012;217:420–9.
12. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov D, Porte R, Deruy E, et al. Activation of Type 3 Innate Lymphoid Cells and Interleukin 22 Secretion in the Lungs During *Streptococcus pneumoniae* Infection. *J. Infect. Dis*. 2014;210:493-503.
13. Vassallo R, Tamada K, Lau JS, Kroening PR, Chen L. Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2005;175:2684–91.
14. Kroening PR, Barnes TW, Pease L, Limper A, Kita H, Vassallo R. Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2008;181:1536–47.

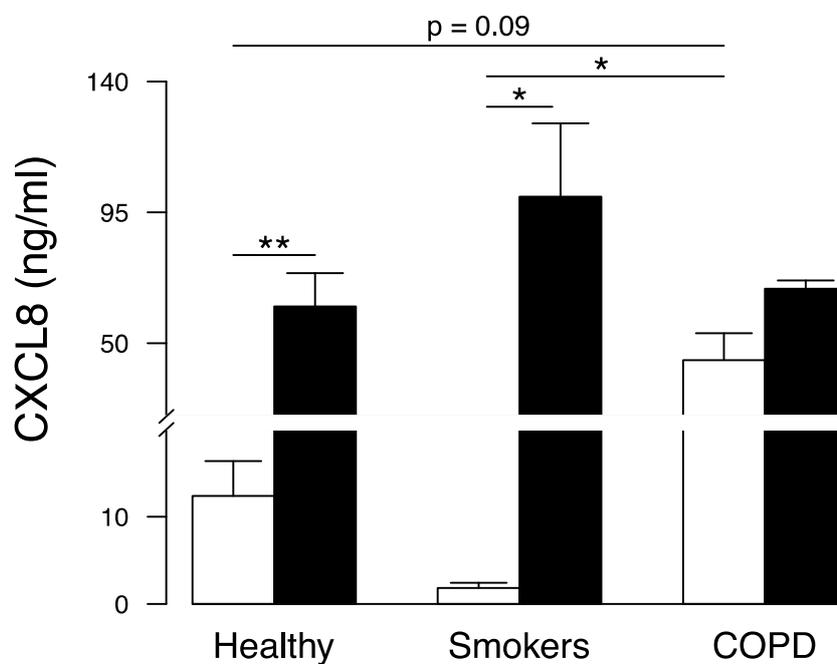
15. Chang Y, Nadigel J, Boulais N, Bourbeau J, Maltais F, Eidelman DH, et al. CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.* 2011;12:43.
16. Zhang X, Zheng H, Zhang H, Ma W, Wang F, Liu C, et al. Increased interleukin (IL)-8 and decreased IL-17 production in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) provoked by cigarette smoke. *Cytokine.* 2011;56:717–25.
17. Andelid K, Tengvall S, Andersson A, Levänen B, Christenson K, Jirholt P, et al. Systemic cytokine signaling via IL-17 in smokers with obstructive pulmonary disease: a link to bacterial colonization? *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2015;10:689–702.
18. Pichavant M, Sharan R, Le Rouzic O, Olivier C, Hennegrove F, Rémy G, et al. IL-22 Defect During *Streptococcus pneumoniae* Infection Triggers Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *EBioMedicine.* 2015;2:1686–96.
19. Blue ML, Janoff A. Possible mechanisms of emphysema in cigarette smokers. Release of elastase from human polymorphonuclear leukocytes by cigarette smoke condensate in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1978;117:317–25.
20. Zhou H, Kobzik L. Effect of concentrated ambient particles on macrophage phagocytosis and killing of *Streptococcus pneumoniae*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2007;36:460–5.
21. Wei J, Xiong X-F, Lin Y-H, Zheng B-X, Cheng D-Y. Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ.* 2015;3:e1199.
22. Pinto-Plata VM, Livnat G, Girish M, Cabral H, Masdin P, Linacre P, et al. Systemic cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD. *Chest.* 2007;131:37–43.
23. Sethi S. Infection as a comorbidity of COPD. *Eur. Respir. J.* 2010;35:1209–15.
24. Vassallo R, Walters PR, Lamont J, Kottom TJ, Yi ES, Limper AH. Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a Lung Tissue Research Consortium study. *Respir. Res.* 2010;11:45.
25. Tsoumakidou M, Koutsopoulos AV, Tzanakis N, Dambaki K, Tzortzaki E, Zakyntinos S, et al. Decreased small airway and alveolar CD83+ dendritic cells in COPD. *Chest.* 2009;136:726–33.
26. Liao S-X, Ding T, Rao X-M, Sun D-S, Sun P-P, Wang Y-J, et al. Cigarette smoke affects dendritic cell maturation in the small airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mol. Med. Rep.* 2015;11:219–25.
27. Givi ME, Folkerts G, Wagenaar GTM, Redegeld FA, Mortaz E. Cigarette smoke differentially modulates dendritic cell maturation and function in time. *Respir. Res.* 2015;16:131.
28. Castera L, Hatzfeld-Charbonnier AS, Ballot C, Charbonnel F, Dhuiege E, Velu T, et al. Apoptosis-related mitochondrial dysfunction defines human monocyte-derived dendritic cells with impaired immuno-stimulatory capacities. *J. Cell. Mol. Med.* 2009;13:1321–35.
29. Smet EGD, Mestdagh P, Vandesompele J, Brusselle GG, Bracke KR. Non-coding RNAs in the pathogenesis of COPD. *Thorax.* 2015;70:782–91.

30. Lu W, You R, Yuan X, Yang T, Samuel ELG, Marcano DC, et al. The microRNA miR-22 inhibits the histone deacetylase HDAC4 to promote TH17 cell-dependent emphysema. *Nat. Immunol.* 2015;16:1185–94.
31. Phipps JC, Aronoff DM, Curtis JL, Goel D, O'Brien E, Mancuso P. Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2010;78:1214–20.
32. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 2001;106:255–8.
33. Hertzén E, Johansson L, Wallin R, Schmidt H, Kroll M, Rehn AP, et al. M1 protein-dependent intracellular trafficking promotes persistence and replication of *Streptococcus pyogenes* in macrophages. *J. Innate Immun.* 2010;2:534–45.
34. Gorvel L, Textoris J, Banchereau R, Ben Amara A, Tantibhedhyangkul W, von Bargen K, et al. Intracellular Bacteria Interfere with Dendritic Cell Functions: Role of the Type I Interferon Pathway. *PLoS ONE.* 2014;9:e99420.
35. Tardif V, Riquelme SA, Remy S, Carreño LJ, Cortés CM, Simon T, et al. Carbon monoxide decreases endosome-lysosome fusion and inhibits soluble antigen presentation by dendritic cells to T cells. *Eur. J. Immunol.* 2013;43:2832–44.

## Additional files

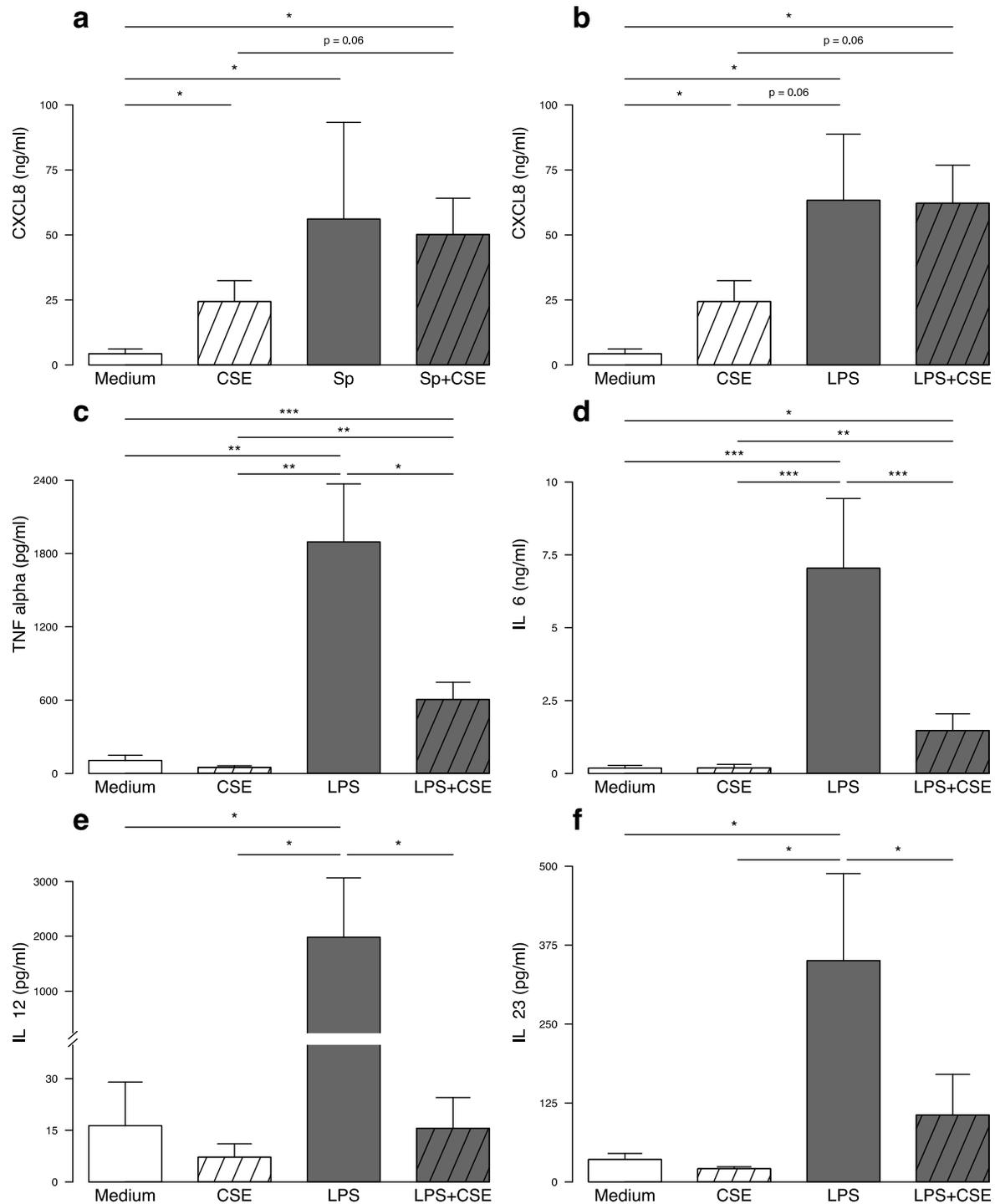
**Additional file 1: Primer sequences**

Primers	Forward	Reverse
$\beta$ -actin	5'-TCCTCACCTGAAGTACCCCA-3'	5'-AGCCACACGCAGCTCATTGT-3'
HO1	5'-ATGGCCTCCCTGTACCACATC-3'	5'-TGTTGCGCTCAATCTCCTCCT-3'

**Additional file 2**

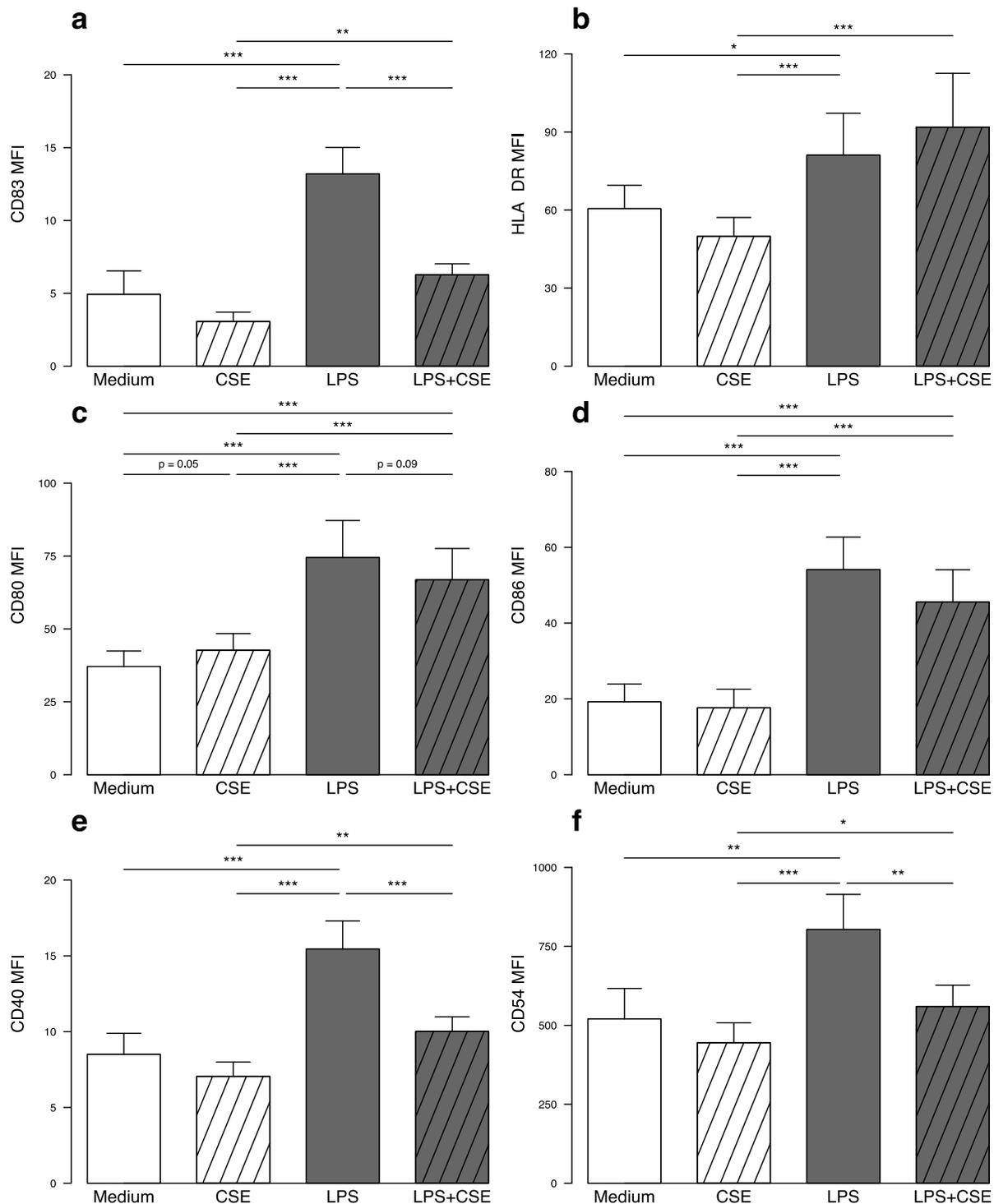
Additional file 2: *S.pneumoniae*-induced CXCL8 secretion by PBMC from non-smoker healthy subjects (n=14), smokers without COPD (n=13) and COPD patients (n=9). Supernatants were collected after 24h incubation without stimulation (white columns) or after addition of *S.pneumoniae* (black column). Data are reported as mean +/- S.E.M. \* P<0.05, \*\* P<0.01.

## Additional file 3



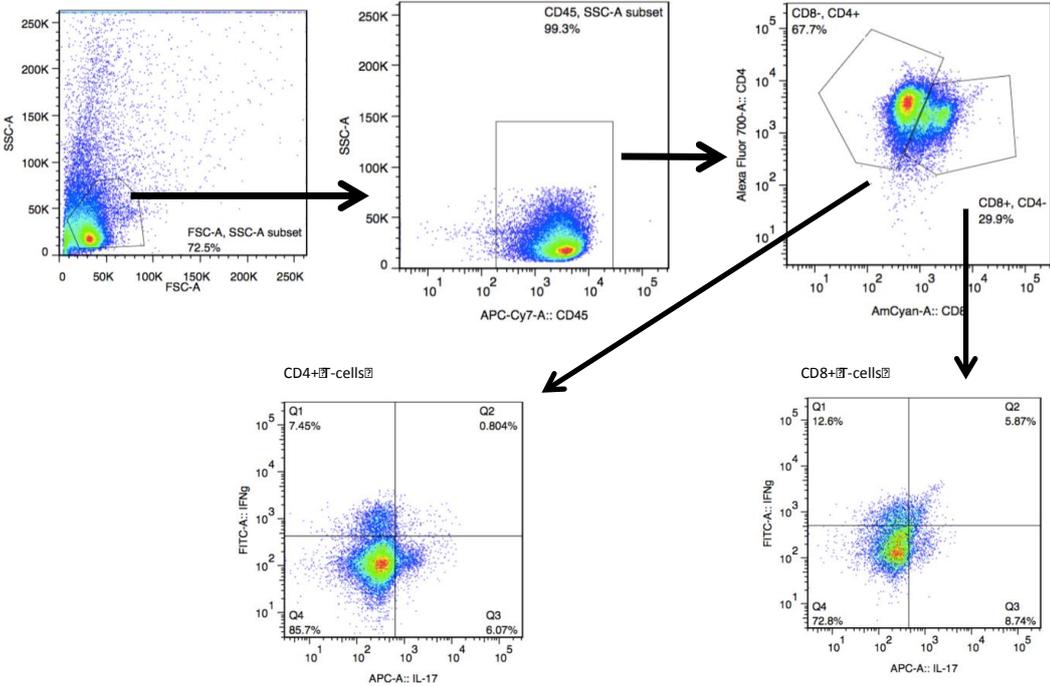
Additional file 3: In vitro exposure to cigarette smoke extract (CSE) modulate the secretion of cytokines by monocyte-derived dendritic cells (MDDC) from healthy subjects activated by (a) *S. pneumoniae* (Sp) or by (b-f) LPS. Levels of (a-b) CXCL8, (c) TNF alpha, (d) IL-6, (e) IL-12 and (f) IL-23 were quantified by ELISA in MDDC culture supernatants collected after 24 hours incubation with CSE and Sp or LPS. Data are reported as mean +/- S.E.M. of 12 experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

## Additional file 4

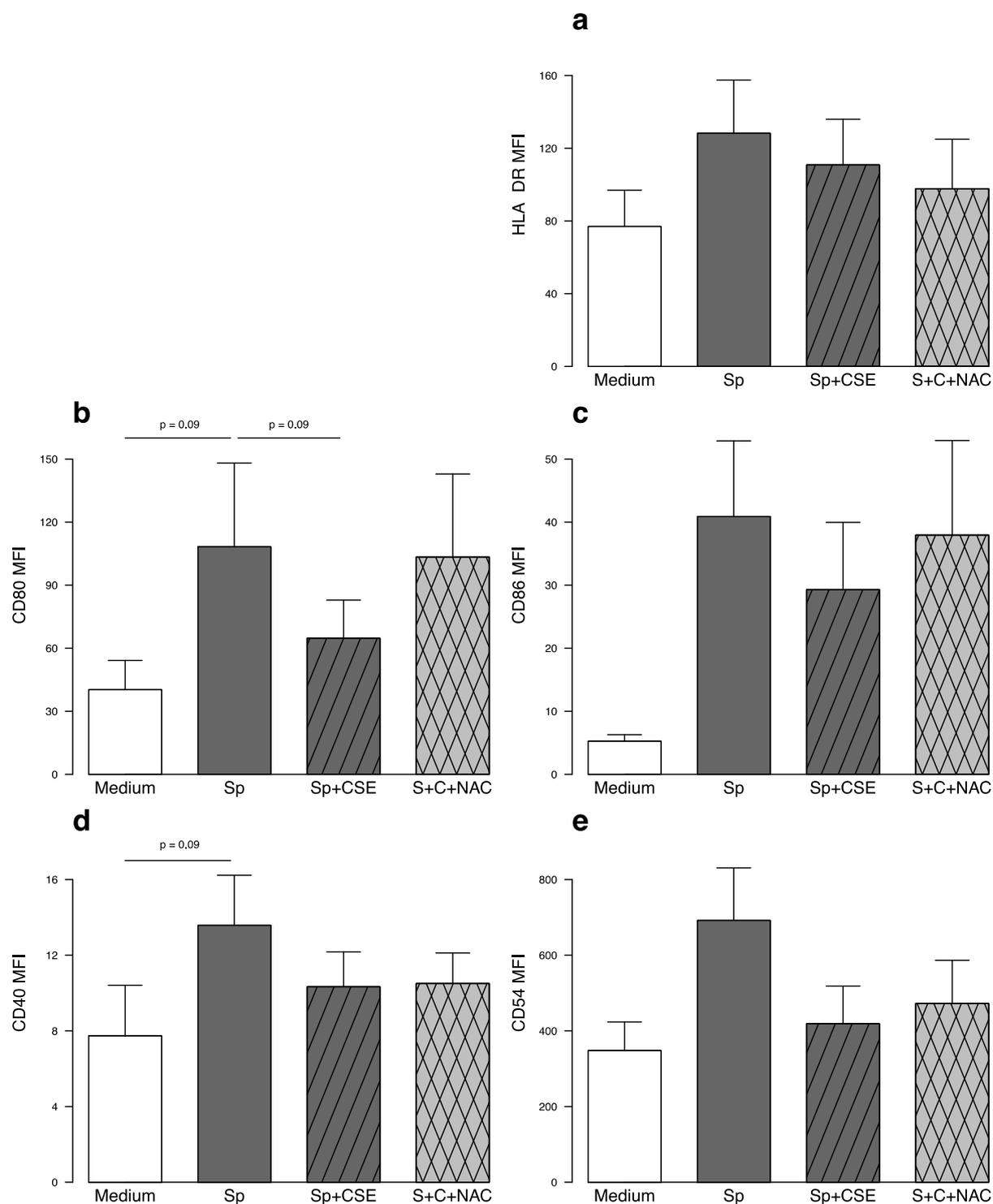


Additional file 4: In vitro exposure to cigarette smoke extract (CSE) modulate the phenotype of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) from healthy subjects activated by LPS. Expression of (a) CD83, (b) HLA-DR, (c) CD80, (d) CD86, (e) CD40 and (f) CD54 was evaluated by flow cytometry in MDDC exposed to CSE and then activated or not by LPS for 24 hours. Data are reported as mean fluorescence intensity (MFI) +/- S.E.M. of 20 experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Additional file 5: T-cells intracellular staining strategy of gaiting

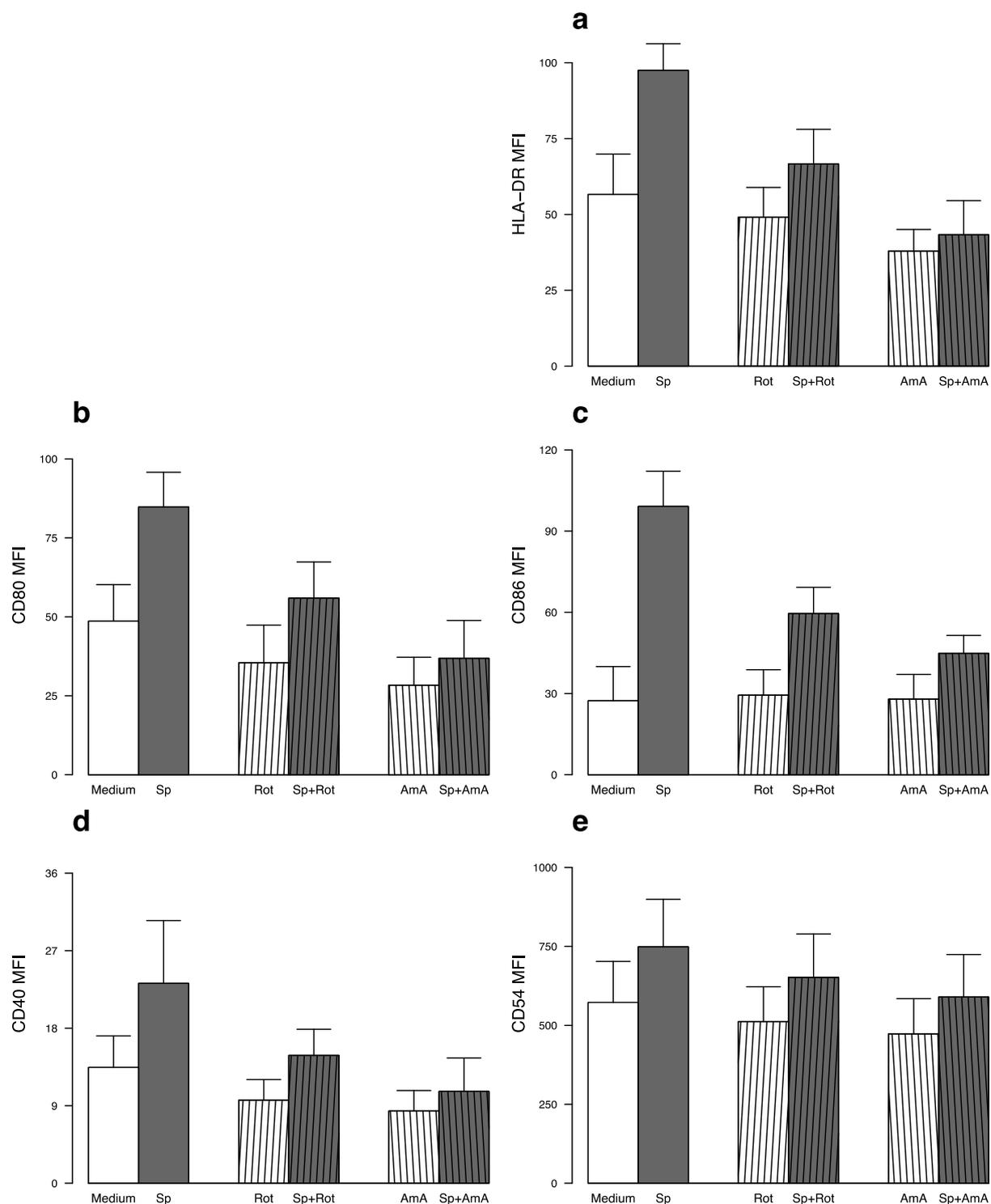


## Additional file 6



Additional file 6: Treatment with the anti-oxidant N-acetylcystein (NAC) did not reverse the inhibitory effect of cigarette smoke extract (CSE) on the phenotype of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) activated by *S. pneumoniae* (Sp). The expression of (a) HLA-DR, (b) CD80, (c) CD86, (d) CD40 and (e) CD54 by MDDC treated or not with NAC and then exposed to CSE and Sp for 24 hours were evaluated by flow cytometry. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments

## Additional file 7



Additional file 7: In vitro exposure to rotenone (Rot) or antimycin A (AmA) inhibits the phenotype of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) activated by *S. pneumoniae* (Sp). Expression of (a) HLA-DR, (b) CD80, (c) CD86, (d) CD40 and (e) CD54 were evaluated by flow cytometry in MDDC exposed to rotenone or antimycin A and then activated or not by *S. pneumoniae* for 24 hours. Data represent mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments. There were no statistical differences between groups.



31. Annexe n°3

**The Toll-Like Receptor 5 agonist flagellin prevents bacteria-induced chronic obstructive pulmonary disease exacerbations in mice.**

**Koné Bachirou<sup>1-5\*</sup>**, Magdiel Pérez-Cruz<sup>1-5\*</sup>, Rémi Porte<sup>1-5</sup>, Christophe Carnoy<sup>1-5</sup>, Pierre Gosset<sup>6</sup>, Julien Tabareau<sup>1-5</sup>, François Trottein<sup>1-5</sup>, Jean-Claude Sirard<sup>1-5</sup>, Muriel Pichavant<sup>1-5\*</sup>  
and Philippe Gosset<sup>1-5\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, U1019 - UMR 8204 - CIIL - Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59000

Lille, France,

<sup>2</sup> CNRS, UMR 8204, F-59000 Lille, France,

<sup>3</sup> Inserm, U1019, F-59000 Lille, France,

<sup>4</sup> CHU Lille, F-59000 Lille, France,

<sup>5</sup> Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France,

<sup>6</sup> Service d'Anatomo-pathologie, Hôpital Saint Vincent de Paul, Lille, France,

\*Equal contribution

**Running Title:** Flagellin protects against COPD exacerbations

**Corresponding author and present address:**

Philippe Gosset, PhD

CIIL, Team 12 “Lung infection and innate immunity”

Institut Pasteur de Lille

1 Rue du Professeur Calmette

59019 Lille Cedex France

Phone: +33 3 20 87 79 65

Fax: 03 20 87 78 88

E-mail: [philippe.gosset@pasteur-lille.fr](mailto:philippe.gosset@pasteur-lille.fr)

**Conflict of interest:**

The authors declared that they have no conflict of interest.

**Abstract**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major cause of morbidity and mortality worldwide. The progression of the disease is marked by acute exacerbations due to infections by bacteria such as *Streptococcus pneumoniae* (Sp). Prophylactic administration of flagellin, a Toll-like receptor 5 (TLR5) agonist, protects healthy mice and primates against respiratory pathogenic bacteria. We hypothesized that TLR5-mediated stimulation of lung immunity might prevent or treat experimental COPD exacerbation. Recombinant flagellin (FliC) was intraperitoneally injected to Sp-infected COPD animals. Compared with control, COPD mice treated with FliC showed a lower bacterial load in the airways, the lungs and the blood. This protection was associated with an early neutrophilia, a lower production of pro-inflammatory cytokines, and an increased cell activation (in the spleen) and IL-22 production. Interestingly, FliC treatment limited the recruitment of inflammatory cell and the lung damage related to Sp exacerbation. Moreover, the protective effect of FliC against Sp was altered by treatment with anti-IL-22 blocking antibodies in COPD mice. FliC treatment also amplified the production of anti-bacterial peptides such as S100A8 and S100A9. This study shows for the first time that stimulation of innate immunity is a potent antibacterial treatment against exacerbation during experimental COPD and opens the way to innovative therapeutic strategies.

**Key words**

Chronic obstructive pulmonary disease; Toll-like receptor 5 agonist; Bacterial infection; Lung, IL-22.

## Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by a progressive and irreversible decline in lung function[1]. Being the third leading cause of death worldwide, it is mainly caused by chronic exposure to cigarette smoke (CS) or pollutants[2]. Inhalation of CS essentially leads to activation of epithelial cells and macrophages responsible for the mobilization of effector and immuno-modulatory cells including neutrophils and invariant natural killer T (iNKT) cells[3, 4]. The chronic inflammatory response progressively leads to airway remodeling, impaired mucociliary clearance and parenchymal destruction in the lungs, further culminating in irreversible airflow limitation[5]. These components are involved in the increased susceptibility of COPD patients to bacterial and viral airway infections.

Airway colonization with bacteria such as *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae* contributes to the pathogenesis and clinical course of the disease[6]. This colonization will be responsible for lung infection leading to exacerbations of the disease which have a strong impact on health status, exercise capacity, lung function, and mortality. *S. pneumoniae* (Sp), a Gram-positive encapsulated bacteria, is one of the most important cause of COPD acute exacerbations and comorbidity[7, 8] that invariably scarred the chronic course of COPD[9].

Bacterial infections are mainly controlled by the innate immune system, involving Toll-like receptors (TLRs) such as those recognizing lipoproteins (TLR2), lipopolysaccharides (TLR4), flagellin (TLR5) or DNA (TLR9) responsible for the mobilization of effector cells[10]. During COPD, bacterial infections (both in patients and experimental models) is characterized by an increased influx of immune cells, including neutrophils, macrophages, dendritic cells (DC) and T lymphocytes[3, 11, 12]. However, this response is not effective enough to clear the pathogens. In this context, we recently reported a defective production of Th17 cytokines (IL-17/IL-22) in response to bacteria both in COPD

patients and mice chronically exposed to CS[13, 14]. Interestingly, the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 promote the recruitment of neutrophils, the synthesis of antimicrobial peptides and the expression of tight junction molecules[15, 16]. Supplementation of COPD mice with recombinant IL-22 improves the clearance of the bacteria and prevents the development of COPD exacerbation in mice, showing that this cytokine represent a new therapeutic target in this context. Several reports showed that activation of innate receptors, including TLR, is able to elicit protective immune responses against infections[17, 18]. Among them, systemic administration of flagellin, the main component of bacterial flagella and the TLR5 ligand, induces immediate production of Th17 cytokines through the activation of DC and type 3 innate lymphoid cell[19], leading to a rapid neutrophil infiltration into the airways and to the clearance of bacteria including Sp[20-22]. Protection against Sp was also associated with the early production of both IFN- $\gamma$  and the synthesis of various interferon-dependent genes[23-25]

In this study, we hypothesized that systemic administration of a recombinant form of flagellin could inhibit the development of bacteria-induced COPD exacerbation episodes through an appropriate protective innate Th17 response. We report that preventive and curative systemic stimulation of the innate immunity by recombinant flagellin from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (FliC) allow to control the COPD exacerbation induced by Sp. We also show that the protective effect of flagellin involves IL-22 production probably initiated in the spleen and is associated with the upregulation of anti-microbial peptides.

## Material and Methods

### Animals

Male C57BL/6 (WT), 6–8 weeks old were purchased from Janvier Labs (Le Genest-St-Isle, France). WT mice were daily exposed to cigarette smoke (CS) during 12 weeks (5 days / week during 12 weeks) to induce COPD pathogenesis[4]. Research cigarettes 3R4F were obtained from the University of Kentucky Tobacco and Health Research Institute (Lexington, KY, USA). The control group was exposed to ambient air. After 12 weeks of CS or air exposure, mice were either treated intranasally with phosphate buffered saline (PBS) or Sp (n=4 per group). All procedures were performed according to the Pasteur Institute, Lille, Animal Care and Use Committee guidelines (agreement number N°AF16/20090) and were approved by the local ethic committee. Experiments were performed at least in triplicate.

### Mice infection and flagellin treatment

*Streptococcus pneumoniae* serotype 1 (Sp) (clinical isolate E1586) was obtained from the National Reference Laboratory, Ministry of Health, Montevideo, Uruguay[24]. Sp was grown to log-phase in Todd-Hewitt yeast broth (THYB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 2% Fetal Calf Serum (FCS), and stored at -80°C in THYB plus 12% glycerol for as long as 3 months.

For mouse infection, working stocks were thawed, washed with sterile PBS, and diluted to the appropriate concentration. The number of bacteria in stocks was confirmed by plating serial dilutions onto blood agar plates. Mice were anesthetized and intranasally (i.n.) challenged with  $4 \times 10^5$  CFU of Sp.

Native flagellin was purified and depleted in endotoxin as described previously [26]. To evaluate the preventive effect, 5µg of flagellin was administrated intraperitoneally (i.p.)

just before and 48h after bacterial challenge. In order to evaluate its curative effect, FliC was administrated 6h after Sp-infection. For IL-22 neutralizing experiment, mice received 200µg of neutralizing anti-IL-22 (AM22) or control isotype (a mouse IgG2a) antibodies intraperitoneally 5 minutes before infection.

### **Sample collection and processing**

Mice were euthanized at 24h or 72h post-infection by Sp. Broncho-alveolar Lavage (BAL) fluids, lungs, and blood were collected and kept on ice till the processing or immediately frozen in liquid nitrogen.

BAL was performed by instilling 5 x 0.5 ml of sterile PBS + 2% fetal bovine serum (FBS) via a 1 ml sterile syringe with 23-gauge lavage needle into a tracheal incision. BAL samples were used for cytokine analysis, flow cytometry analysis and numbering of CFUs. Lung tissues were collected aseptically and analyzed for CFU counts, cytokine analysis, pulmonary cell analysis (flow cytometry analysis and lung cell restimulation) and histology. Blood was used for the determination of CFU counts.

### **Flow cytometry**

Cells harvested from BAL, lungs and spleen were washed and incubated with antibodies (see list in supplementary table 1) (BD, Franklin lakes, NJ, USA) for 30 min in PBS before being washed. Staining was performed as described in online supplementary information. Data were acquired on a LSR Fortessa (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo™ software v7.6.5 (Stanford, CA, USA). Gating strategies are previously reported by Sharan et al[14] and cell population phenotypes are listed in supplementary table 2. Absolute number of cell populations was obtain by multiplying the frequency (relative to CD45+ cell) to the total cell count (from Turks' staining and light microscopic counting).

### **Cytokine measurement**

Levels of IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-6, IL-17, IL-22 and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) were quantified in lung tissue lysates and BAL using commercial ELISA kits (eBiosciences, San Diego, USA; R&D Systems, Minneapolis, USA). Similarly, levels of IFN- $\gamma$ , IL-17, and IL-22 were measured in the supernatants of lungs ( $0.5 \times 10^6$  of cells) alone or re-stimulated *in vitro* with anti-CD3 antibodies (eBiosciences) during 72h.

### **Primers**

Quantitative RT-PCR was performed to quantify mRNA of interest (Supplementary table 3 in the online supplementary information). Results were expressed as mean  $\pm$  SEM of the relative gene expression calculated for each experiment in folds ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) using *Gapdh* as a reference, and compared to non-infected PBS-treated control mice.

### **Histological analysis**

To study lung remodeling post-infection with Sp, the lungs were inflated and fixed in formalin. The lungs were paraffin-embedded; cross-sections were cut and stained with hematoxylin and eosin.

To define the lung lesions we have used this lung injury scoring including both lung remodeling and inflammation. More specifically, this scoring includes the Extent of lung injury, the alveolar wall thickness, the presence of hyaline membrane, the neutrophilic alveolitis, the bronchial epithelial degeneration, the neutrophilic and lymphocytic peribronchitis, the vasculitis, the emphysema and the haemorrhage for a cumulative score from 0 to 30.

### **Statistical analysis**

The data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Results were statistically analyzed using the non-parametric Mann Whitney test (PRISM software, v5 GraphPad), and expressed in terms of probability (p). Differences were considered significant when  $p < 0.05$  (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

## **Results**

### **Preventive administration of flagellin accelerates the clearance of Sp in COPD mice and increases IL-22 production**

We previously reported that mice chronically exposed to CS developed the major COPD features[4]. In this study, CS mice were intranasally challenged with Sp to mimic COPD exacerbation. To evaluate the protective effect of flagellin in this context, we treated some animals with flagellin (FliC) before infection with Sp (Figure 1a). As previously reported[13], the bacterial load was the highest at 72h p.i in CS mice infected with Sp (Figure 1b and supplementary figure 1). Administration of FliC strongly reduced the bacterial load in BAL and lungs of COPD mice at 24 and 72h p.i. (Figure 1b). Similarly, the bacterial load within the blood was lower in COPD mice treated with FliC at 72h whereas there was no significant bacteria translocation at 24h after infection (Supplementary figure 1a).

Th17 cytokines (IL-17 and IL-22) whose production is controlled by IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-23 expression, play a key role in the control of lung inflammation and bacterial infection. For this reason, the production of these cytokines was measured in the BAL, the lung lysate and the supernatants of lung cells restimulated with anti-CD3. Infection with a sublethal dose of Sp did not significantly increase the production of IL-17 and IL-22 both in BAL and lung lysates from COPD mice at day1 (not shown) and day 3 (Figure 1c and Supplementary figure 2c) whereas the concentrations of IFN- $\gamma$  were higher in the lung (Supplementary figure 2b). COPD mice infected with Sp and treated with FliC have higher levels of IL-22 in the BAL ( $p < 0.05$ ) but not in the lung at 72h post-infection whereas the administration of FliC had no

effect on IL-17 and reduced the concentrations of IFN- $\gamma$ . A lower production of the other inflammatory cytokines was observed in the lung of infected COPD mice although administration of FliC enhanced IL-1 $\beta$ , IL-23 and TNF- $\alpha$  in the BAL of control mice (Supplementary figure 2).

At day 1, histopathological analysis showed that infection with Sp induced a mild inflammatory cell recruitment mostly in peribronchial and perivascular areas (Figure 1e). Moreover, some alteration of the alveolar walls and of the bronchial epithelial barrier (with hypersecretion of mucus) was observed at 72h in COPD mice but not in control. Treatment with FliC did not amplify the lung inflammation at this time and strongly limited the lesions in the alveolar walls and the bronchial epithelium. This was confirmed by a lower histopathological score in COPD-infected mice receiving FliC ( $5.2 \pm 0.7$ ) compared with those treated with PBS ( $9.1 \pm 0.7$  versus  $5 \pm 1.2$  for not-infected COPD mice). Altogether, these data demonstrate that treatment with FliC amplified the clearance of Sp in COPD mice, a result associated with a strong reduction of lung inflammation and damages resulting from the infection.

### **Flagellin treatment modifies the immune cell recruitment and activation consecutive to infection with Sp in COPD mice**

Since COPD exacerbation is associated with an altered immune cell response relative to control mice[13, 27], we next characterized immune cells in the lungs, the BAL and the spleen of mice presenting Sp induced COPD exacerbation. In COPD mice, total cell number and neutrophils in the BAL but not in lung tissue was higher at baseline compared to controls and was increased after infection with Sp ( $p < 0.05$ ) (Figure 2a and supplementary figure 3a). This is related with a higher number of neutrophils, AM, NKT cells and T lymphocytes. Administration of FliC to COPD mice did not significantly modulate the number of total cells and neutrophils in the BAL (at day 3) whereas the numbers of AM and DC were lower. In the

lung, there is a trend for a decreased total cell number after treatment with FliC associated with a lower number of neutrophils. Moreover, FliC treatment increased the neutrophil number in the lung of infected COPD mice at 24h (Supplementary figure 3a). In control mice, treatment with FliC increased the numbers of total cell and neutrophil in the BAL and lung at 24h, but not at 72h (Figure 2a-b and supplementary figure 3a). Moreover, this treatment did not modify the expression of CD86 and I-Ab on DC from BAL and lung (Supplementary figure 3b). Concerning the lymphocytes, administration of flagellin reduced the T cell numbers in BAL and lung from COPD mice whereas it did not modulate the number of NKT cells (Figure 2c). Cytokine production potential was measured in supernatants of lung cells stimulated with anti-CD3 antibodies (Figure 1d and Supplementary figure 2c). There was no significant modulation of IL-17, IL-22 and IFN- $\gamma$  secretion in lung cell supernatant from both Sp-infected control and COPD mice. Lung cells from COPD mice infected with Sp also produced lower levels of IL-22 than the controls. In these mice, treatment with FliC did not modulate the levels of IFN- $\gamma$  and IL-17 after anti-CD3 restimulation whereas the concentrations of IL-22 were increased ( $p < 0.05$ ).

In the spleen, the percentage and the number of the main macrophage and myeloid dendritic cell populations did not change in the infected mice treated or not with FliC. However, a higher expression of CD86 was observed in macrophages, DCs and inflammatory monocytes at 24h after flagellin administration as well as I-Ab expression in macrophages and inflammatory monocytes as revealed by (Supplementary Figure 4a). This was associated with the activation of conventional T cells and with a higher ability to secrete IL-22 after anti-CD3 restimulation (Supplementary Figure 4b and c). Overall, flagellin only transiently amplifies (at day 1) the recruitment of neutrophils in Sp-infected COPD mice. At day 3, a lower recruitment of immune and effector cells was detected within the lung of Sp-infected COPD

mice. Treatment with FliC specifically amplifies the production of IL-22 by lung and spleen cells from COPD mice, an effect associated with activation of spleen APC.

**Flagellin promotes the production of anti-microbial peptides in infected COPD mice.**

Flagellin as well as IL-22 are able to promote the production of antibacterial peptides[28, 29]. To investigate this pathway, we analyzed the expression of anti-microbial peptide mRNA in the lung and the protein level of S100A8 and S100A9 in the BAL.

Infection with sublethal dose of Sp significantly increased the expression of *Defb3*, *Camp*, *Reg3g* (data not shown) and *Defb2*, in the lung of both control and COPD mice whereas the expression of *S100a8* and *S100a9* was not affected 24h after infection. (Figure 3a). There were no differences between infected COPD and control mice. The treatment with FliC significantly increased the mRNA expression of *S100a9* (control:  $p < 0.01$ , COPD:  $p < 0.05$ ) (Figure 3a) as well as *S100a8* (data not shown) in both groups whereas *Defb2* levels were lower at 24h p.i. The protein level of S100A8 and S100A9 in the BAL of control and COPD mice was increased at 24h post-infection with Sp whereas only higher levels of S100A8 were observed at 72h (Figure 3b). While treatment with FliC had no effect at day 1, the concentrations of both S100A8 and S100A9 were significantly higher level at 72h in both COPD and control groups.

These data suggest that the increased bacterial clearance related to FliC was associated with upregulation of anti-microbial peptides synthesis.

**IL-22 is important for Flagellin-mediated protection in COPD exacerbation**

It has already been described that the preventive effect of flagellin against lung infection by Sp is mediated by IL-22 overexpression [19]. We first confirmed these observations, and found that as soon as 6h after treatment, FliC induced recruitment of innate

immune cells (Neutrophils, inflammatory monocytes, NK cells) and promotes IL-22 production (not shown).

To further investigate the implication of IL-22 in the protective effect of flagellin, WT COPD mice were intraperitoneally treated with anti-IL-22 blocking antibodies (anti-IL-22) before FliC treatment and infection with Sp (figure 4a). After infection, anti-IL-22 abrogated the protective effect of FliC on the bacterial load in the BAL at day 1 and 3, as well as in the lung at day 3 (figure 4b). Anti-IL-22 receiving COPD mice showed increased bacterial translocation in the blood at day 3 compared to mice treated with PBS before FliC administration (Supplementary figure 1b).

Although the IL-17 production in mice treated with FliC was not higher in the BAL and the supernatant of lung cells restimulated with anti-CD3, administration of anti-IL-22 decreased these levels in the BAL both at day 1 and 3 (figure 4c). Treatment with the blocking antibody and FliC also limited the recruitment of macrophages at 72h in the lung compared with infected COPD mice. The same trend was observed in neutrophils and DC at 24h and 72h (figure 4d).

These results suggest that the protective response of flagellin during COPD exacerbation is at least partly dependent of IL-22.

#### **Curative administration of FliC accelerates the clearance of Sp in COPD mice.**

For clinical purpose, it seems also important to determine if the treatment of COPD exacerbation with FliC is also effective in a curative approach. In our model, FliC was administrated 6 hours after infection (Figure 5a). Curative treatment significantly decreased the bacterial load at day 3 post-infection in the BAL and lung from control mice (Figure 5b). No significant effect was reported at day 1 post-infection (data not shown). Evaluation of cytokine concentration revealed an increase of Il-17 and IL-22 levels in the BAL and the lung

of COPD mice with FliC treatment (Figure 5c). Priming of lung cells was also exhibited by a significant increase in the concentrations of S100A9 but not S100A8 in the BAL of FliC treated mice (Figure 5d).

In parallel, we evaluated the lung infiltrate at 72h in these mice. The total cell numbers as well as the absolute numbers of AM, DC and lymphocytes were not significantly modulated both in the lung and the BAL (Figure 5e and data not shown). However, the number of neutrophils and inflammatory monocytes were increased only in the BAL of treated COPD mice.

These data showed that a curative treatment with flagellin is also able to block the SP-induced exacerbation of COPD, a process associated with a higher production Th17 cytokines and calgranulin.

## Discussion

The increased susceptibility to bacteria associated with COPD is linked to a defect in IL-22 production related with an altered innate immune response[13, 14, 27]. In this study, we demonstrated that treatment with flagellin, a TLR5 ligand, is able to improve the ability of COPD mice to clear bacteria. The mechanism involved in this bacterial clearance is at least partially dependent of IL-22 associated with an increased production of anti-microbial peptides. Interestingly, the clearance of the bacteria was associated with a reduced inflammatory infiltrate and a decreased production of inflammatory cytokines in the lung of COPD mice resulting in a less intense remodeling of lung tissues.

The efficiency of FliC was demonstrated in a model of COPD exacerbation induced by an invasive Gram positive bacteria, although additional experiment showed that this treatment was also efficient with NTHi, a Gram negative bacteria (unpublished data). Both bacteria represents the most frequent bacterial involved in COPD exacerbations. As observed in COPD patients, these experimental models are characterized by an altered clearance of bacteria, an increased inflammatory reaction, some lung damage and an increased mucus secretion[3, 30]. However, this inflammatory reaction (recruitment of effector cells including neutrophils and macrophages and the higher production of pro-inflammatory cytokines in COPD mice) did not allow to clear the bacteria. An altered production of Th17 cytokines (mainly IL-22) is involved in this susceptibility to bacteria, since supplementation of COPD mice with recombinant IL-22 was able to restore an efficient clearance of bacteria[13, 14].

It has been previously reported that FliC treatment improved the clearance of a lethal dose of Sp in control mice, a mechanism associated with a neutrophil mobilization [22, 31, 32]. Since the pathophysiology of COPD exacerbation episodes implicated a defect in IL-22 production and a deleterious effect of neutrophils in the tissue damage, we choose intraperitoneal route to treat our mice rather than the local administration which promotes a

strong neutrophil recruitment in the airways. As previously reported with Sp in control (non COPD) mice[19, 33, 34], the systemic treatment with FliC increases the IL-22 production in the BAL and the supernatant of restimulated spleen and pulmonary cells. This is related with the activation of spleen cells but not in the lung. Both AM and DC expressed TLR5 and it has been reported that they are stimulated after administration of FliC[33, 35]. According to our data, we can suspect that FliC promotes the response against Sp through the spleen and potentially in other secondary lymphoid organs. These primed cells could then recirculated towards the lung. We confirmed the role of IL-22 in the control of the bacterial load by the pre-administration of neutralizing anti-IL-22 antibody in FliC-treated COPD mice. These data are in line with our previous report showing that the supplementation with recombinant IL-22 is able to accelerate the clearance of the bacteria and to limit the consequences of bacterial infection in COPD mice[13]. In the same line, we previously showed that blood mononuclear cells from COPD patients produced lower levels of IL-22 in response to bacteria[13]. Preliminary experiments revealed that addition of FliC to these cultures boosts the IL-22 production, confirming the interest of this treatment.

Neutrophil mobilization can be involved in the effect of FliC since we observed an early increase of neutrophil count in the lung of infected COPD mice (at 24h). This recruitment can be related to the direct activity of FliC on the production of chemokines and pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by airway epithelial cells and APC[34]. This effect can be also indirect through the modulation of IL-22 and its ability to modulate the expression of chemokines by epithelial cells[16]. Through this mechanism, FliC might prime the antibacterial activity of effector cells including macrophages and neutrophils. We can also suspect that this treatment restores the barrier function of the airway mucosa since it decreased bacterial translocation within the blood in COPD mice (supplementary figure1), a property also shares with IL-22. Moreover, we cannot exclude that the production of IL-17

and/or IL-20 cytokines (belonging to the same family as IL-22) might also participate to the anti-bacterial activity and the recruitment of inflammatory cells[15, 16]. However, we did not detect a significant modulation of these cytokines in the mice treated with FliC (data not shown).

The effect of FliC might be related with its ability to directly boost the anti-microbial response in airway epithelial cells, macrophages and neutrophils. Our data show that the treatment with this TLR ligand promotes the production of calgranulins in Sp-infected mice. It has been reported that S100A9, potentially with its partner S100A8, are a major player in the host response against pneumococcal infection by increasing lung recruitment of neutrophils and macrophages[36, 37]. In vitro,  $\beta$ -defensin 2 is active against the major pathogens involved in COPD exacerbations including Sp, while treatment with  $\beta$ -defensin 1 appeared to only affect *M. catarrhalis*[38]. All these data suggest that the production of calgranulins and  $\beta$ -defensin 2 might be important to control Sp-induced COPD exacerbations. Due to the capacity of IL-22 to upregulate the synthesis of these anti-microbial peptides[16], we can also suspect the implication of IL-22 in this process.

Interestingly, we also described that the protection induced by preventive treatment with FliC was associated with a decrease in lung inflammatory cell recruitment and in airway remodeling in infected COPD mice at later stage (day 3). This effect is probably the consequence of the accelerated clearance of the bacteria and to the activation of effector cells. Although these data must be confirmed in clinical practice, our data suggest that this treatment can limit the consequences of bacterial infection during COPD, particularly the alteration of lung functions and comorbidities. By restoring an efficient barrier, we can also hypothesize that this treatment will reduce the systemic inflammatory effects of the exacerbation. Interestingly, this treatment is efficient in both preventive and curative administration. Moreover, recent data underlines that the combined administration of

antibiotic with flagellin have an additive antibacterial effect[19, 22]. Both data suggest that FliC can be associated with antibiotic regimen for the curative treatment of exacerbation episodes in COPD patients.

In conclusion, we demonstrated that treatment by flagellin is able to control bacterial infection in COPD mice and to limit their consequences in terms of lung inflammation and remodeling. Although this effect seems to be partially dependent of the production of IL-22, we also suggest that the protection induced by FliC leads to the modulation of anti-microbial peptide production. FliC-induced restoration of an efficient bacterial clearance and limitation of the inflammatory reaction could be a step forward the treatment of COPD exacerbations.

### **Acknowledgments**

We gratefully acknowledge Eva Vilain and Gwenola Kervoaze for their excellent support in completion of experiments. We also acknowledge Dr Jean Christophe Renauld (Brussel, Belgium) which has generated the IL-22-deficient mice. We also thank Hélène Bauderlique for her help for advice on flow cytometry (BICel Cytometry Plateform, Institut Pasteur de Lille, France). A special thanks to François Trottein for critical reviewing of the paper.

This work was granted by the *Conseil R  gional du Nord-Pas de Calais* [StreptoCOPD project; grant number # 13005300]. This work was supported by the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (Inserm), the *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS). Funders had no role in study design, data collection, data analysis, interpretation, and writing of the report.

### **Author contributions**

Conception and design: MPC, BK, RP, CC, JCS, MP and PhG; Analysis and interpretation: MPC, BK, MP and PhG; Histopathologic analysis: PiG; Drafting the manuscript for important intellectual content: MPC, BK, RP, CC, JCS, MP and PhG. All authors gave their agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

The authors declare that they have no conflict of interest.

**References**

1. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 183-192.
2. Pauwels RA, Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet* 2004; 364: 613-620.
3. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2011; 378: 1015-1026.
4. Pichavant M, Remy G, Bekaert S, Le Rouzic O, Kervoaze G, Vilain E, Just N, Tillie-Leblond I, Trottein F, Cataldo D, Gosset P. Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunol* 2014; 7: 568-578.
5. Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2012; 379: 1341-1351.
6. Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 465-471.
7. Boixeda R, Almagro P, Diez-Manglano J, Cabrera FJ, Recio J, Martin-Garrido I, Soriano JB. Bacterial flora in the sputum and comorbidity in patients with acute exacerbations of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2015; 10: 2581-2591.
8. Simpson JL, Baines KJ, Horvat JC, Essilfie AT, Brown AC, Tooze M, McDonald VM, Gibson PG, Hansbro PM. COPD is characterized by increased detection of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and a deficiency of *Bacillus* species. *Respirology* 2016; 21: 697-704.
9. Wedzicha JA, Seemungal TA. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet* 2007; 370: 786-796.
10. Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol* 2012; 14: 460-466.
11. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 479-489.
12. Van Pottelberge GR, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. The role of dendritic cells in the pathogenesis of COPD: liaison officers in the front line. *Copd* 2009; 6: 284-290.

13. Pichavant M, Sharan R, Le Rouzic O, Olivier C, Hennegrave F, Remy G, Perez-Cruz M, Kone B, Gosset P, Just N, Gosset P. IL-22 Defect During *Streptococcus pneumoniae* Infection Triggers Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *EBioMedicine* 2015; 2: 1686-1696.
14. Sharan R, Perez-Cruz M, Kervoaze G, Gosset P, Weynants V, Godfroid F, Hermand P, Trottein F, Pichavant M, Gosset P. Interleukin-22 protects against non-typeable *Haemophilus influenzae* infection: alteration during chronic obstructive pulmonary disease. *Mucosal Immunol* 2016: In press.
15. Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 2008; 226: 160-171.
16. Rutz S, Wang X, Ouyang W. The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 783-795.
17. Lembo A, Pelletier M, Iyer R, Timko M, Dudda JC, West TE, Wilson CB, Hajjar AM, Skerrett SJ. Administration of a synthetic TLR4 agonist protects mice from pneumonic tularemia. *J Immunol* 2008; 180: 7574-7581.
18. Romagne F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today* 2007; 12: 80-87.
19. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov S, Porte R, Deruy E, Chabalgoity JA, Renauld JC, Eberl G, Benecke AG, Trottein F, Faveeuw C, Sirard JC. Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Infect Dis* 2014; 210: 493-503.
20. Feuillet V, Medjane S, Mondor I, Demaria O, Pagni PP, Galan JE, Flavell RA, Alexopoulou L. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12487-12492.
21. Janot L, Sirard JC, Secher T, Noulin N, Fick L, Akira S, Uematsu S, Didierlaurent A, Hussell T, Ryffel B, Erard F. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur J Immunol* 2009; 39: 1587-1596.
22. Porte R, Fougeron D, Munoz-Wolf N, Tabareau J, Georgel AF, Wallet F, Paget C, Trottein F, Chabalgoity JA, Carnoy C, Sirard JC. A Toll-Like Receptor 5 Agonist Improves

the Efficacy of Antibiotics in Treatment of Primary and Influenza Virus-Associated Pneumococcal Mouse Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 6064-6072.

23. Ivanov S, Fontaine J, Paget C, Macho Fernandez E, Van Maele L, Renneson J, Maillet I, Wolf NM, Rial A, Leger H, Ryffel B, Frisch B, Chabalgoity JA, Sirard JC, Benecke A, Faveeuw C, Trottein F. Key role for respiratory CD103(+) dendritic cells, IFN-gamma, and IL-17 in protection against *Streptococcus pneumoniae* infection in response to alpha-galactosylceramide. *J Infect Dis* 2012; 206: 723-734.

24. Marques JM, Rial A, Munoz N, Pelay FX, Van Maele L, Leger H, Camou T, Sirard JC, Benecke A, Chabalgoity JA. Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN-gamma-mediated immunity. *Immunobiology* 2012; 217: 420-429.

25. Sun K, Salmon SL, Lotz SA, Metzger DW. Interleukin-12 promotes gamma interferon-dependent neutrophil recruitment in the lung and improves protection against respiratory *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 2007; 75: 1196-1202.

26. Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard JC. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol* 2008; 181: 2036-2043.

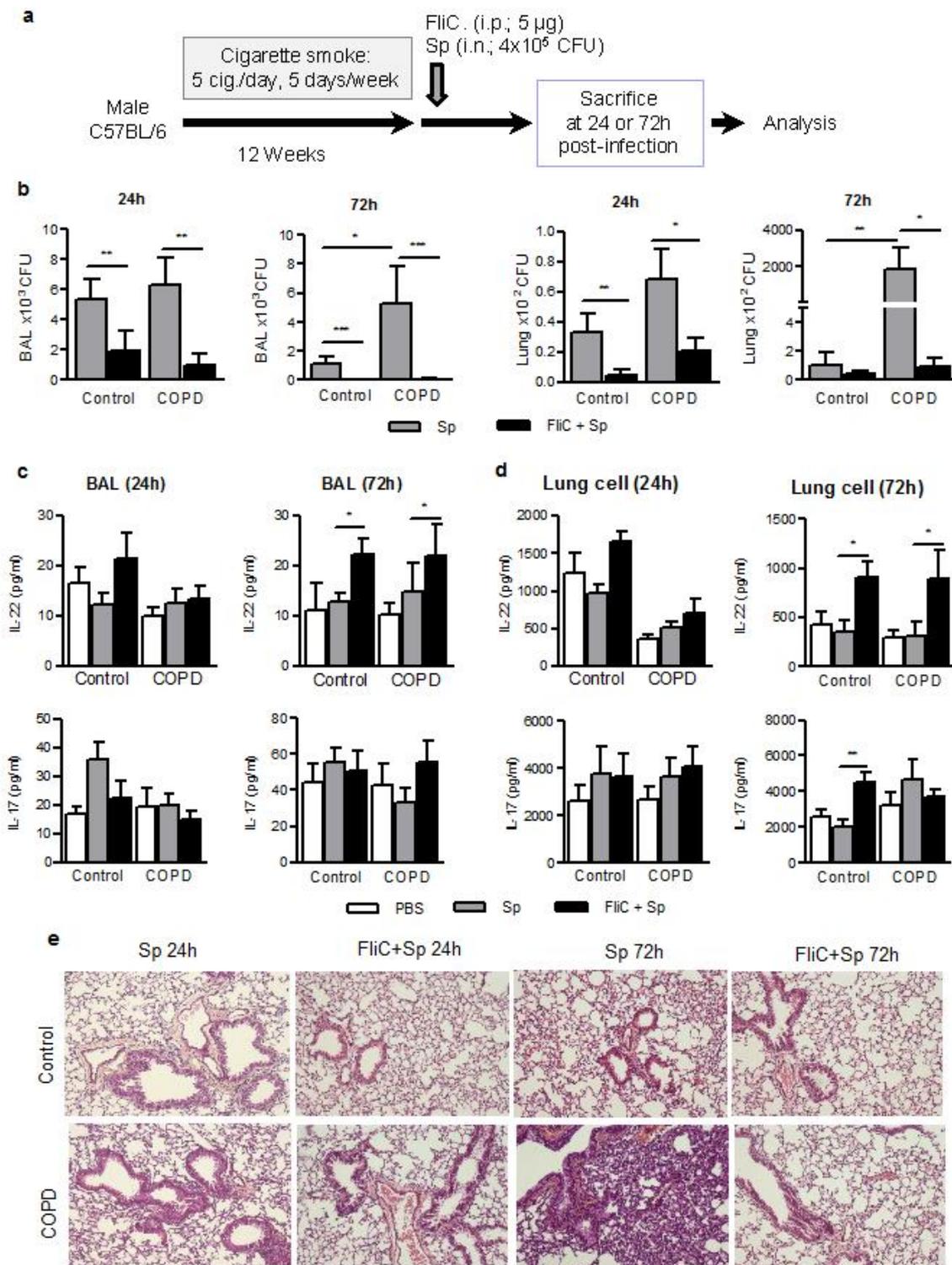
27. Roos AB, Sethi S, Nikota J, Wrona CT, Dorrington MG, Sanden C, Bauer CM, Shen P, Bowdish D, Stevenson CS, Erjefalt JS, Stampfli MR. IL-17A and the Promotion of Neutrophilia in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 192: 428-437.

28. Abtin A, Eckhart L, Gläser R, Gmeiner R, Mildner M, Tschachler E. The Antimicrobial Heterodimer S100A8/S100A9 (Calprotectin) Is Upregulated by Bacterial Flagellin in Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 2010; 130: 2423-2430.

29. Mulcahy ME, Leech JM, Renauld JC, Mills KH, McLoughlin RM. Interleukin-22 regulates antimicrobial peptide expression and keratinocyte differentiation to control *Staphylococcus aureus* colonization of the nasal mucosa. *Mucosal Immunol* 2016; 9: 1429-1441.

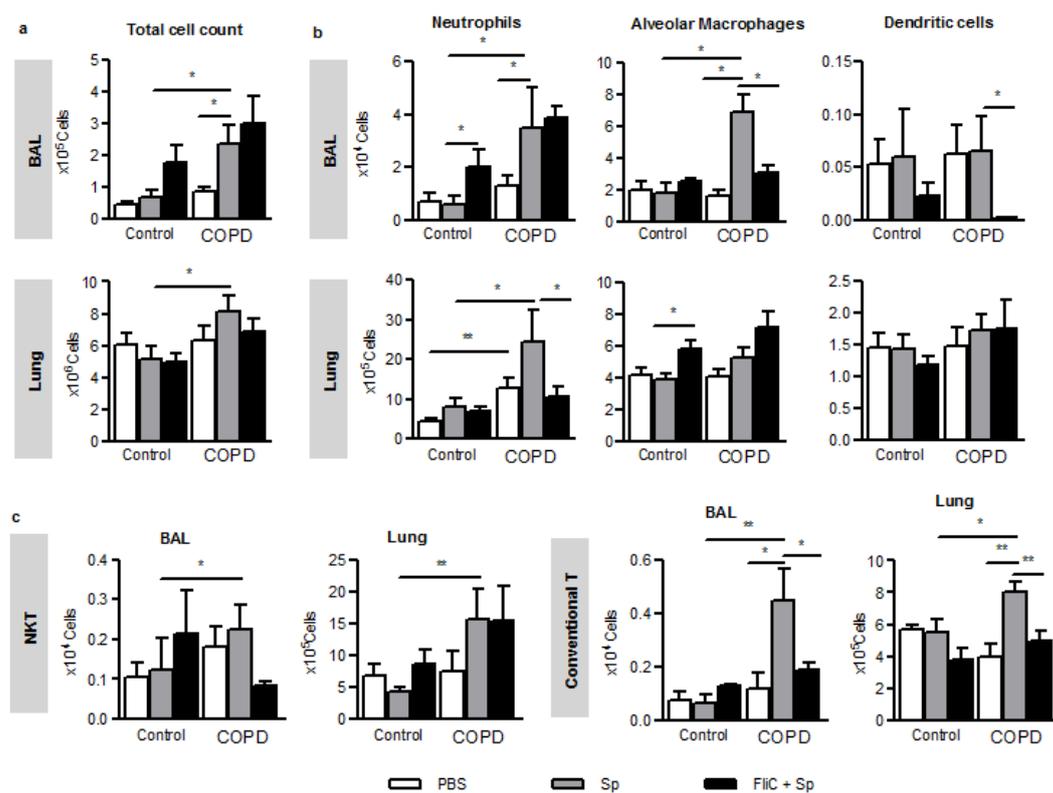
30. Gaschler GJ, Skrtic M, Zavitz CC, Lindahl M, Onnervik PO, Murphy TF, Sethi S, Stampfli MR. Bacteria challenge in smoke-exposed mice exacerbates inflammation and skews the inflammatory profile. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 666-675.
31. Munoz N, Van Maele L, Marques JM, Rial A, Sirard JC, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun* 2010; 78: 4226-4233.
32. Porte R, Van Maele L, Munoz-Wolf N, Foligne B, Dumoutier L, Tabareau J, Cayet D, Gosset P, Jonckheere N, Van Seuningen I, Chabalgoity AJ, Simonet M, Lamkanfi M, Renault JC, Sirard JC, Carnoy C. Flagellin-mediated protection against intestinal *Yersinia pseudotuberculosis* infection does not require interleukin-22. *Infect Immun* 2016.
33. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Songhet P, Dumoutier L, Ferrero I, Janot L, Erard F, Bertout J, Leger H, Sebbane F, Benecke A, Renault JC, Hardt WD, Ryffel B, Sirard JC. TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *J Immunol* 2010; 185: 1177-1185.
34. Van Maele L, Fougeron D, Janot L, Didierlaurent A, Cayet D, Tabareau J, Rumbo M, Corvo-Chamaillard S, Boulenouar S, Jeffs S, Vande Walle L, Lamkanfi M, Lemoine Y, Erard F, Hot D, Hussell T, Ryffel B, Benecke AG, Sirard JC. Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. *Mucosal Immunol* 2013.
35. Liaudet L, Deb A, Pacher P, Mabley JG, Murthy KG, Salzman AL, Szabo C. The Flagellin-TLR5 Axis: Therapeutic Opportunities. *Drug News Perspect* 2002; 15: 397-409.
36. De Filippo K, Neill DR, Mathies M, Bangert M, McNeill E, Kadioglu A, Hogg N. A new protective role for S100A9 in regulation of neutrophil recruitment during invasive pneumococcal pneumonia. *Faseb J* 2014; 28: 3600-3608.
37. Raquil MA, Anceriz N, Rouleau P, Tessier PA. Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia. *J Immunol* 2008; 180: 3366-3374.

## Figures



**Figure 1- Treatment with Flagellin prevents the Sp-induced COPD exacerbation in mice exposed to CS and promotes IL-22 production.**

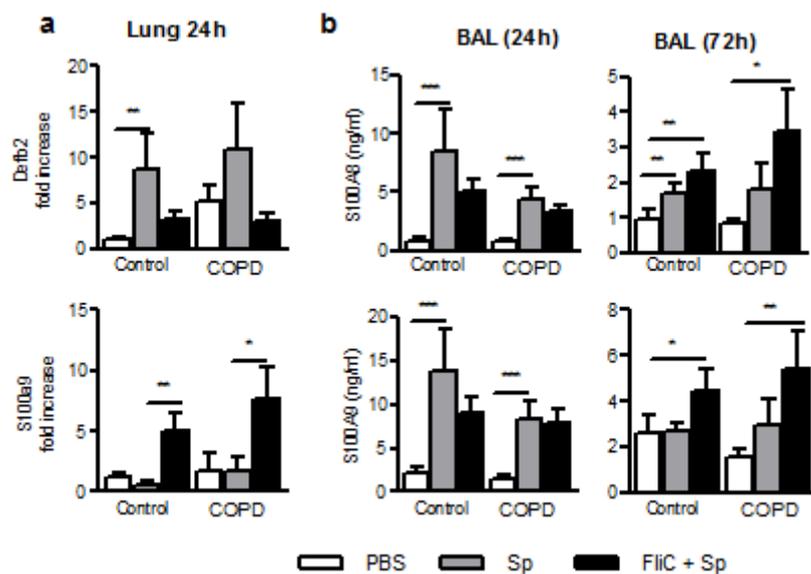
(a) To assess the impact of smoking on Sp infection, mice were first exposed to cigarette smoke (CS) for 12 weeks followed by intranasal challenge with Sp at  $4 \times 10^5$  CFU. Mice were euthanized at 24h or 72h after Sp challenge. (b) Colony Forming Unit (CFU) counts were evaluated in Broncho-alveolar lavage fluid (BAL) and lungs by plating on blood agar. The concentrations of IL-17 and IL-22 were analyzed by ELISA (c) in the BAL and the lung lysates (d) the supernatant of lung cell cultures stimulated with anti-CD3 (72h culture), at 24h and 72h after Sp challenge. (e) Lung histopathology was performed by Eosin hematoxylin staining, on control *versus* COPD mice injected with PBS or FliC and infected or not with Sp at 24 and 72h. Three independent experiments have been performed with 4 mice in each group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .



**Figure 2- Flagellin modulates the inflammation in COPD mice infected with Sp.**

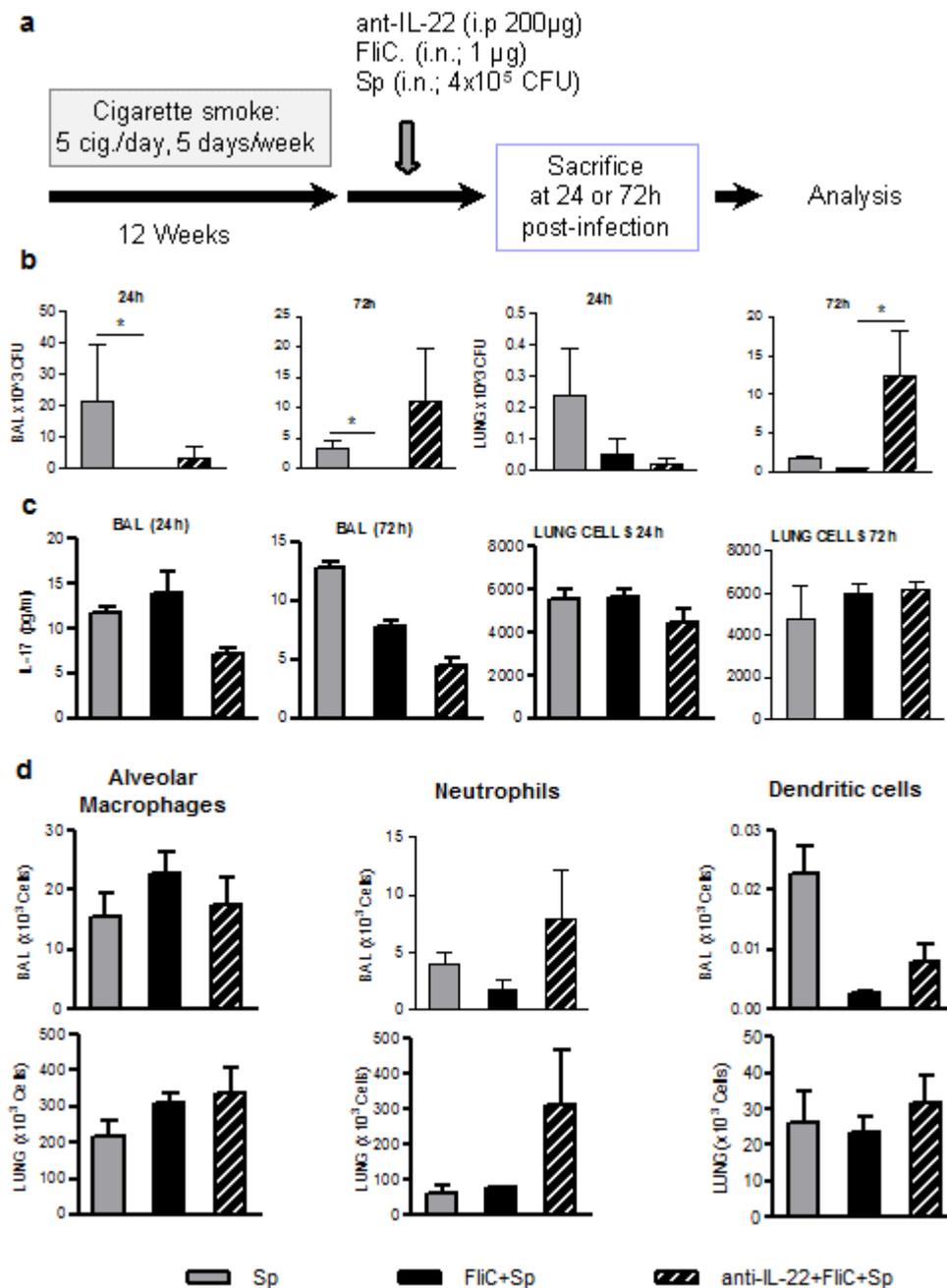
(a) The total number of recruited cells was reported in BAL and lungs of control *versus* COPD mice infected or not and treated or not with flagellin using Turks' staining and

light microscopy. (b) Absolute number of neutrophils, macrophages and dendritic cells was reported in BAL and lungs of control *versus* COPD mice (c) Absolute number of NKT and conventional T cells was defined in BAL and lungs of COPD mice infected or not with Sp. Data are from samples collected at 72h after challenge. Three independent experiments have been performed with at least 3 mice in each group. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .



**Figure 3- Flagellin upregulates anti-microbial peptides in COPD mice infected with Sp.**

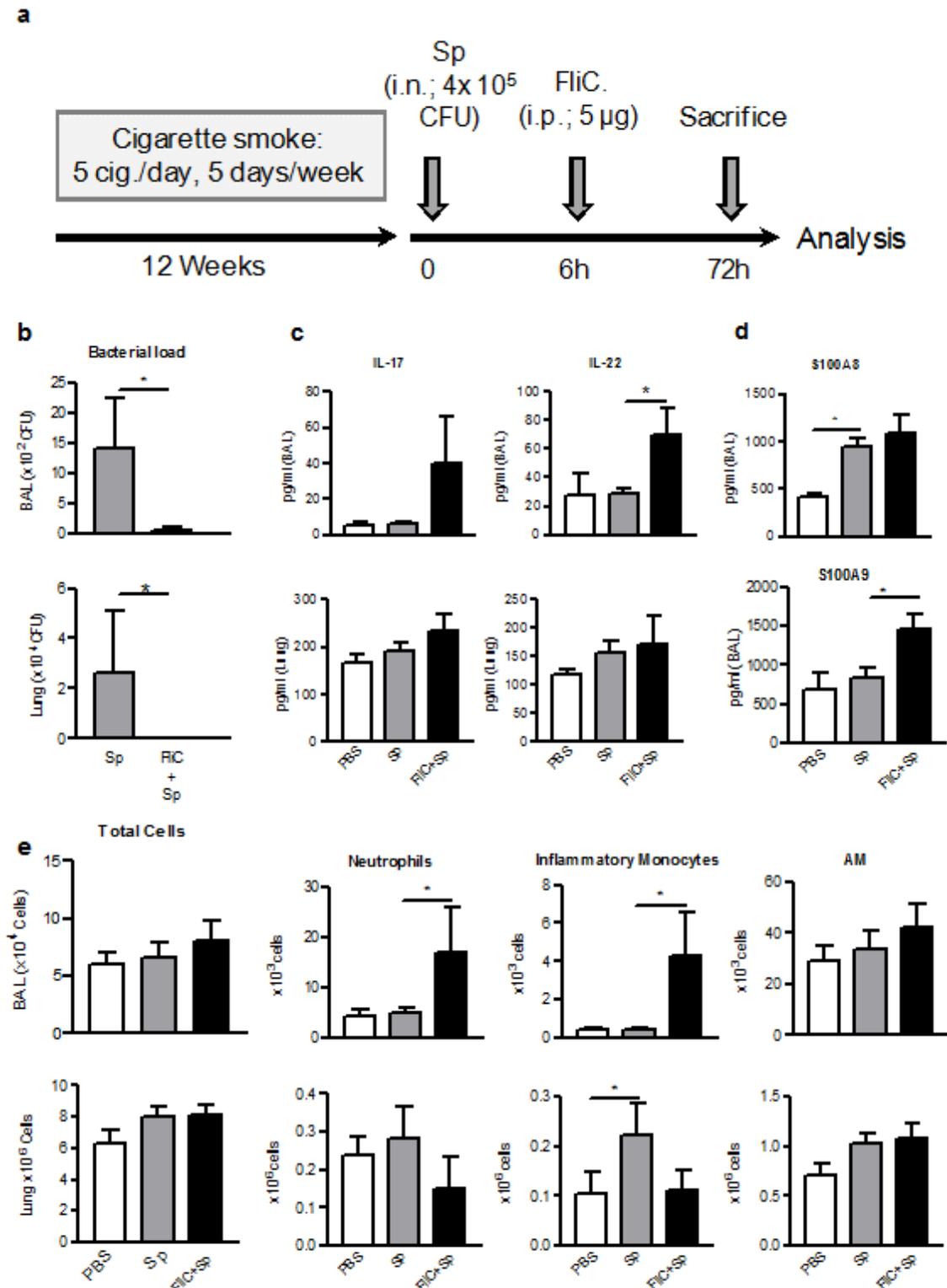
(a) RT-qPCR quantification of mRNA expression of *Defb2* and *S100a9* in the lung tissue of control *versus* COPD mice infected or not with Sp and treated or not with flagellin. (b) Concentrations of S100A8 and S100A9 measured by ELISA, in the BAL of control *versus* COPD mice infected or not and treated or not with flagellin. BAL were collected 24h and 72 h after infection. Three independent experiments have been performed with at least 3 mice in each group. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .



**Figure 4- IL-22 is important in flagellin-mediated protection during Sp infection.**

(a) Wild type COPD mice were intraperitoneally injected with anti-IL-22 neutralizing antibodies 5min before FliC treatment and infected with Sp for 24h or 72h. (b) CFU count, (c) IL-17 and IL-22 production in BAL and by lung cell stimulated *ex-vivo* with anti-CD3 during 72h. (d) Alveolar macrophages, Neutrophils, and dendritic cells count were reported in the

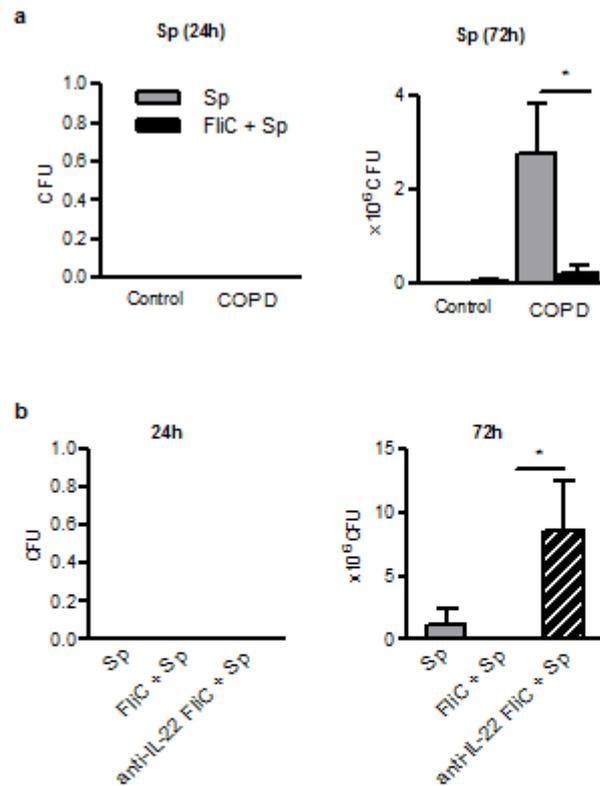
BAL and the lungs. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 2 independent experiments ( $n \geq 3$ ). \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .



**Figure 5- Curative treatment with Flagellin blocks the Sp-induced COPD exacerbation in mice exposed to CS.**

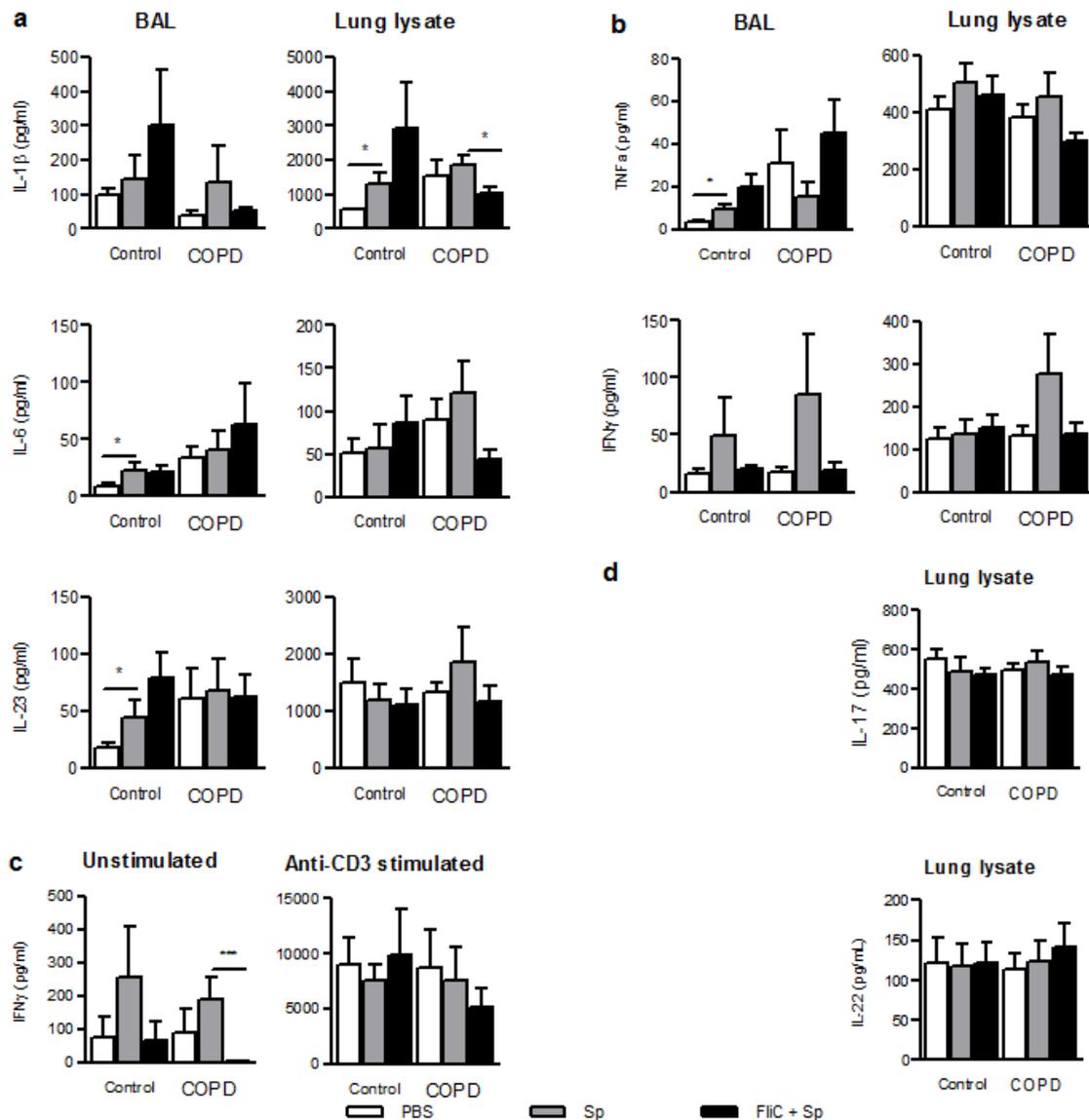
(a) Experimental protocol used for these experiments. Mice were euthanized at 72h after Sp challenge. (b) Colony Forming Unit (CFU) counts were evaluated in Bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and lung tissue. (c) The concentrations of IL-17, IL-22 and IL-23 were analyzed in the BAL and the lung tissue lysates at 72h after Sp challenge. (d) Concentrations of S100A8 and S100A9 in the BAL of COPD mice infected or not and treated or not with flagellin. BAL were collected 72 h after infection. (e) The total number of recruited cells as well as the absolute number of neutrophils, inflammatory monocytes and alveolar macrophages (AM) were reported in BAL and lung tissue of control versus COPD mice. Three independent experiments have been performed with 4 mice in each group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

**Supplementary figures and tables**



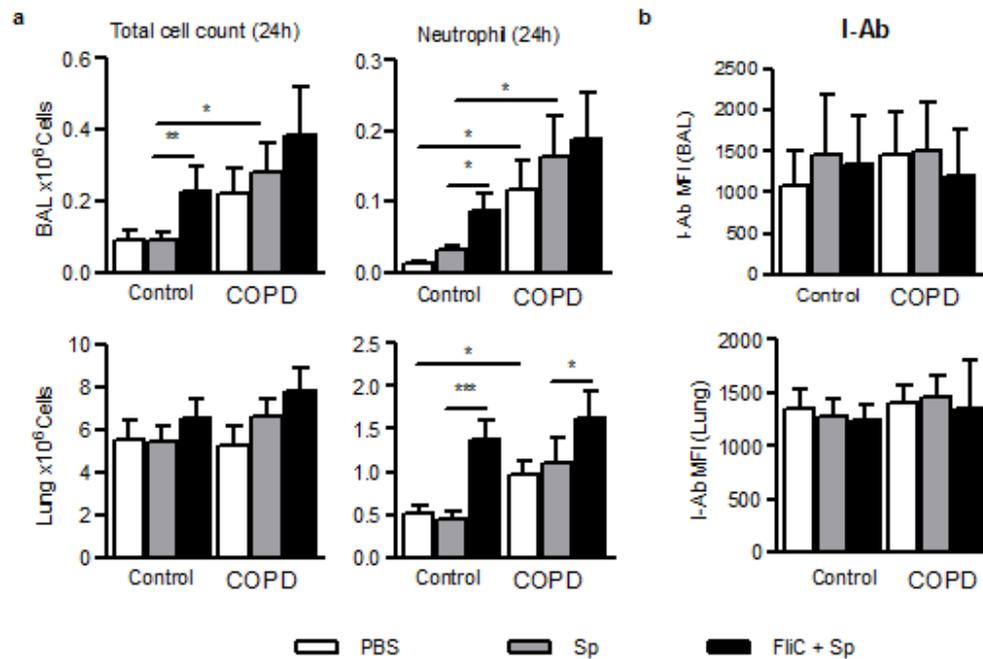
**Supplementary figure 1: Treatment with flagellin reduces the dissemination of Sp in the blood of CS mice, that is IL-22 dependante.**

Bacterial load was measured in the blood of mice treated or not with FliC and infected or not with Sp during 24h or 72h (a) without (figure 1a) or (b) with (figure 4a) pretreatment with IL-22 blocking antibodies. Three independent experiments have been performed with 4 mice in each group (a). The data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ .



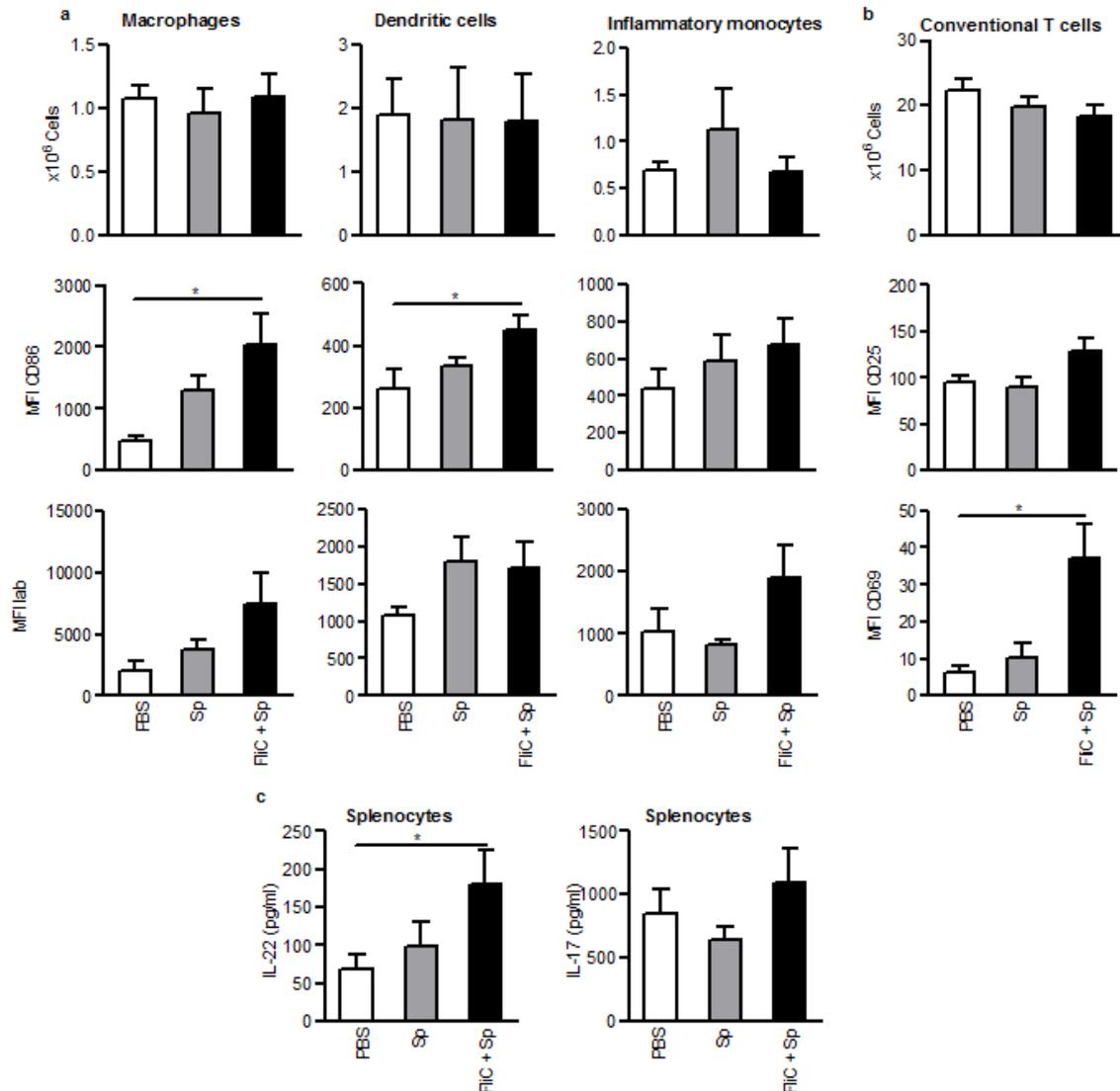
**Supplementary figure 2: Flagellin treatment of Sp infected CS mice did not prime the secretion of cytokines in the lung.**

(a) Concentrations of pro Th17 cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-23) were measured in the BAL and the lungs of control and CS mice infected or not with Sp (72h) without or with flagellin (FliC) treatment. (b) Levels of Th1 associated cytokines (TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) were evaluated in the BAL and the lungs of control and CS mice in the same conditions. (c) The concentrations of IFN- $\gamma$  were analyzed in the supernatants of lung cells from control and CS mice (in vitro), stimulated or not (Unstimulated) with anti-CD3 antibodies for 72h. (d) The levels of IL-17 and IL-22 was determined in the lung lysates of control and CS mice infected or not with Sp (72h) and treated or not with flagellin. Cytokine concentrations were determined using ELISA. Three independent experiments have been performed with 4 mice in each group. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .



**Supplementary figure 3: Treatment with FliC of CS mice infected with Sp modulated the inflammatory cell recruitment whereas it did not affect their activation.**

(a) Total cell number and neutrophil cell count were defined in the BAL and the lungs of mice infected or not with Sp and treated or not with FliC, at 24h post-infection. (b) Activation of dendritic cells was evaluated at 72h post-infection by the expression of the MHC molecules I-Ab in both the BAL and the lung cells. Results were obtained by flow cytometry and cell activation was reported as median fluorescence intensity (MFI). Three independent experiments have been performed with at least 3 mice in each group. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\*:  $p < 0.01$ .



**Supplementary figure 4: FliC induces early cell activation and IL-22 production in the spleen of CS mice.**

The spleen of CS mice treated or not with FliC and / or infected with Sp during 24 hours as shown in figure 1a were analysed. Number of (a) macrophages, dendritic cells, inflammatory monocytes and (b) conventional T cells as well as the expression of the activation markers (a) CD86, I-Ab (b) CD25 and CD69 were determined after flow cytometry (MFI: median fluorescence intensity). (c) Production of IL-17 and IL-22 by splenocytes stimulated *ex-vivo* with fixed anti-CD3 antibody during 72h as measured by ELISA. Three independent experiments have been performed with at least 3 mice in each group. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ .

**Auteur : KONÉ BACHIROU**

**Date de Soutenance : 26 Septembre 2017**

**Titre de la Thèse :**

***Mécanismes cellulaires et moléculaires de la susceptibilité à l'infection  
au cours de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)***

**Mots-clés :** Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), Exacerbation, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* non typable, Flagelline, Cytokines IL-20, IL-17/22

**Résumé :**

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une pathologie caractérisée par des épisodes d'exacerbation, dues aux infections, responsables de sa progression. A l'heure actuelle, la BPCO est une pathologie incurable. Les traitements actuels ne permettent seulement que d'améliorer les symptômes et de réduire les risques de complication. En dépit de cela, les patient BPCO développent des exacerbations dont la fréquence augmente avec la sévérité. Proposer de nouvelles pistes thérapeutiques est nécessaire pour lutter contre ces exacerbations. Dans le laboratoire, nous avons mis en évidence un défaut de la réponse IL-17/IL-22 (cytokines essentielles dans la réponse antibactérienne pulmonaire) dans le cadre de l'exacerbation de la BPCO par des bactéries. Etant donné l'importance des cellules présentatrices d'antigène (APC) dans cette réponse, Notre hypothèse de travail serait que la susceptibilité à l'infection serait liée à une altération des APC dans la BPCO, qui, par conséquent, ne pourraient pas déclencher la réponse Th17 nécessaire à l'élimination du pathogène.

Nous avons utilisé des approches *in vivo*, *in vitro* et *ex vivo* afin de vérifier notre hypothèse de travail. D'abord, nous avons montré que les cellules mononucléées de patient BPCO présentaient un défaut de production d'IL-17 et IL-22 en réponse à *S pneumoniae*. Ensuite, nous nous sommes intéressés à la fonction des APC dans un modèle expérimental d'exacerbation de la BPCO chez la souris. Nous avons vu que les macrophages et les cellules dendritiques (DC) des souris BPCO avaient un défaut de cytokines polarisantes et d'activation des cellules T. Ces résultats sont confirmés *in vitro* sur des DC dérivées de monocytes humains (MDDC) exposées à l'extrait de fumée de cigarette. Afin de mieux comprendre le processus mis en jeu, nous avons étudié le rôle de certaines cytokines régulatrices de la famille de l'IL-10 pouvant inhiber la réponse Th17. Ces cytokines (IL-19, IL-20 et IL-24) ont montré un effet inhibiteur sur la maturation et la fonction des MDDC. Par ailleurs, le ciblage de ces cytokines permet de bloquer leur effet (*in vitro*) et d'améliorer la clairance bactérienne au cours de l'exacerbation de la BPCO par *S. pneumoniae* (*in vivo*). Enfin, nous avons utilisé la flagelline, un agoniste de TLR5 afin de restaurer la réponse IL-17 et IL-22 et de limiter le développement de l'exacerbation. Cet immunostimulant améliore l'élimination de *S. pneumoniae* dans notre modèle murin d'exacerbation, par un mécanisme impliquant l'augmentation de l'IL-22 et des peptides antimicrobiens S100A8 et S100A9.

Ces résultats nous ont permis de confirmer qu'il y a altération de la fonction des APC. Cette altération aurait un impact indirect sur la production d'IL-17 et d'IL-22, deux cytokines importantes dans la réponse immunitaire contre les pathogènes. Nous avons vu que non seulement la fumée de cigarette altère la maturation et la fonction des DC, mais elle induit la production des cytokines régulatrices (IL-19, IL-20 et IL-24) qui elles-mêmes inhibent la fonction des DC. Cela suggère que la fumée de cigarette peut inhiber directement la fonction des DC ou via l'induction d'une immunosuppression. Nous avons observé un effet bénéfique du ciblage des cytokines IL-20 contre l'infection, suggérant que cette approche pourra avoir des intérêts thérapeutiques. Au vu de l'amélioration de la clairance bactérienne par la flagelline, cette approche pourra également être considérée dans un contexte thérapeutique contre l'exacerbation de la BPCO. Ce travail a été principalement focalisé sur l'exacerbation de la BPCO par *Streptococcus pneumoniae*. Des tendances similaires ont été observées avec NTHi montrant un effet inhibiteur des cytokines IL-20 sur les MDDC. Il serait donc intéressant d'approfondir ces travaux dans le contexte de l'exacerbation de la BCPO par d'autres pathogènes bactériens, viraux ou fongiques.

**Adresse de l'auteur : konebachir@yahoo.fr**