



**HAL**  
open science

# Impact des cytokines de la famille IL-20 sur l'épithélium respiratoire en conditions infectieuses et dans un contexte de broncho-pneumopathie chronique obstructive

Olivia Barada

► **To cite this version:**

Olivia Barada. Impact des cytokines de la famille IL-20 sur l'épithélium respiratoire en conditions infectieuses et dans un contexte de broncho-pneumopathie chronique obstructive. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS042 . tel-02457103

**HAL Id: tel-02457103**

**<https://theses.hal.science/tel-02457103>**

Submitted on 27 Jan 2020

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

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

Université Lille Nord de France

**THESE**

Pour l'obtention du grade de :

**DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Discipline : IMMUNOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

**Olivia BARADA**

Le 25/10/2018

**Impact des cytokines de la famille IL-20  
sur l'épithélium respiratoire en conditions  
infectieuses et dans un contexte  
de Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive**

Membres du jury :

Monsieur le Professeur Eric KIPNIS	Président
Madame le Professeur Laure DUMOUTIER	Rapporteur
Monsieur le Docteur Ignacio GARCIA-VERDUGO	Rapporteur
Madame le Docteur Christelle CORAUX	Examineur
Monsieur le Professeur Didier CATALDO	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 Lille Nord de France

Equipe 12 « Lung Infection and Innate Immunity »

---

*Tu te demandes si tu es une bête féroce ou bien un saint  
Mais tu es l'un et l'autre. Et tellement de choses encore  
Tu es infiniment nombreux  
Celui qui méprise, celui qui blesse, celui qui aime, celui qui cherche  
Et tous les autres ensembles  
Trompe-toi, sois imprudent, tout n'est pas fragile  
N'attends rien que de toi, parce que tu es sacré  
Parce que tu es en vie  
Parce que le plus important n'est pas ce que tu es, mais ce que tu as choisi d'être!*

*Fauve « Blizzard »*

---

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'étudier et d'évaluer ce travail de thèse :

Monsieur le Professeur Éric KIPNIS, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. C'est pour moi un immense honneur.

Madame le Professeur Laure DUMOUTIER et Monsieur le Docteur Ignacio GARCIA-VERDUGO, je vous remercie d'avoir accepté d'être mes rapporteurs pour évaluer mon travail de thèse et me permettre de bénéficier de vos connaissances et compétences dans le domaine de la recherche.

Madame le Docteur Christelle CORAUX et Monsieur le Professeur Didier CATALDO, je vous remercie d'avoir accepté d'être mes examinateurs pour ce travail.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à l'Association du Souffle qui a financé ce projet de thèse. Sans cette bourse, tout ce travail n'aurait jamais pu être possible.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des membres de l'équipe 12 du CIIL :

- Mon directeur de thèse, le Docteur Philippe GOSSET. Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe et de m'avoir encadrée pendant ces trois dernières années. Grâce à vous j'ai pu acquérir de nouvelles compétences, particulièrement dans le domaine de l'immunologie dont je ne suis pas issue à la base. Merci pour votre patience et votre disponibilité à mon égard. Et surtout merci pour le CANADA !!
- Docteur Muriel PICHAVANT pour son co-encadrement pendant ma thèse. Ses conseils se sont révélés très précieux, notamment pour la technique de wound healing! Une histoire qui a très mal commencé mais qui se finit plus que bien, comme beaucoup d'autres ...
- Docteur Gaëlle REMY, à partir du moment où tu es arrivée au laboratoire j'ai peu à peu retrouvé la flamme qui faisait de moi une personne unique en son genre car grâce à toi je pouvais m'exprimer librement et sans jugement. Merci de m'avoir épaulée et soutenue comme tu l'as fait. Tu m'as beaucoup appris, y compris que « Ta vie commence lorsque tu comprends que tu n'en a qu'une ». Je te serai à jamais reconnaissante.
- Docteur Fahima MADOURI, tellement de choses à dire mais je vais devoir me limiter à ces quelques mots. Merci d'avoir rendu cette thèse possible en m'offrant le « ticket » gagnant ! Je ne sais pas où j'en serai sans toi... Je me souviendrai toujours des processings fais ensemble où on aura pu Friendzoner tout le monde ou alors les transformer en Licornes! Merci pour tout Mahima des bois, je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi!
- Mesdames Gwenola KERVOAZE et Eva VILAIN, les deux techniciennes du laboratoire, pour les conseils qu'elles m'ont apportés au cours de ces trois ans. Un merci tout particulier à Eva, sans qui je n'aurais jamais pu faire d'aussi belles photos d'immunohistochimie.

Mes remerciements vont bien sûr à tous les chefs de l'équipe 12 : François TROTTEIN, Jean-Claude SIRARD, Christophe CARNOY, Christophe PAGET (ex directeur de thèse par procuration), Isabelle WOLOWCZUK, Christelle FAVEEUW (merci encore pour mon tiroir de thèse !) et Emilie FREALLE, pour tous les conseils scientifiques qu'ils m'ont apporté au cours de ces trois dernières années. Un merci spécial pour vous Jean-Claude, merci de m'avoir consacré autant de temps et de m'avoir donné tant de précieux conseils.

Merci à Valentin et Laura ! Là encore beaucoup de choses à dire que ce soit professionnel ou personnel. Vous m'avez beaucoup apporté et je ne vous oublierai jamais (si je pars dans des pays ghetto je continuerai à vous ramener des souvenirs !). Une fois partie vous serez soulagés de ne plus entendre les histoires concernant la zone la plus sombre de mon anatomie ou alors ça va grave vous manquer ;).

Un grand merci à Bachirou, Asma, Clémentine, Reem, Maya, Maxime, Lucie, Delphine, Claudine, Adeline, Fior, Manu, Claire, Olivier (and when the rain begins to fall !), Laurye, Magdiel, Marina, Rémi, Aneesh, Elodie, Luciana et Daphnée pour les bons délires au labo et les sorties mensuelles, mais également pour l'entraide dans le travail. Vous êtes tous des personnes à part entière alors surtout ne changez rien et restez comme vous êtes !

Enfin mes remerciements s'adressent à mes stagiaires. A mon tour j'ai pu enseigner et ainsi transmettre mon savoir. Merci d'avoir contribué à rendre ma formation plus complète.

Je remercie aussi toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de rencontrer à l'Institut Pasteur (vous êtes tellement nombreux que je ne peux malheureusement pas tous vous citer) durant mon séjour et plus particulièrement :

- Les membres des équipes TSICOPOULOS et VISCOGLIOSI (chefs compris). J'ai grandement apprécié votre disponibilité à mon égard et votre aide pour réaliser des manips que je n'aurai probablement jamais pu faire sans vous. Je vous remercie également tous pour votre sympathie et les bons moments que j'ai passé avec vous. Et une spéciale dédicace à Alexia !
- Sophie SALOME et Docteur Meryem TARDIVEL des plateformes de microscopie Bicel. Grâce à vous j'ai réalisé mes meilleures manips de thèse.

Un grand merci au comité scientifique du CIIL. Docteur Christophe PAGET, Docteur Sabrina MARION et Docteur Catherine Daniel, grâce à vous tous, j'ai eu l'immense honneur d'inviter le Docteur Philippe JAY (que je remercie également) et d'organiser l'évènement Ma Thèse en 3min. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir confié ces responsabilités. Ces moments resteront parmi les meilleurs que j'ai vécu car je me suis vraiment sentie utile et fière de moi.

Puis, je remercie les personnes du service de nutrition de Pasteur dont Sophie évidemment, les copains de l'IBL, Caro du CHR, ... et toutes les personnes qui ont contribué à rendre ces trois années meilleures. Je sais que vous vous reconnaitrez!

Enfin, je remercie les membres de l'INSERM UMR S-1250 Pathologies Pulmonaires et Plasticité Cellulaire, le Docteur Christelle CORAUX et les Professeurs Myriam POLETTE, Gaëtan DESLEE et Philippe BIREMBAULT pour les précieux échantillons de patients dont j'ai pu bénéficier pendant mon doctorat.

D'un point de vue plus personnel je tiens à exprimer tous mes remerciements et ma gratitude aux meilleurs des meilleurs :

Ma maman (Marty). Jamais personne ne m'a autant donné que toi. Tu m'as soutenue dans ce rêve insensé qu'est celui de faire une thèse. Je ne sais pas ce que je ferai sans toi. Il n'y aura jamais assez de mots pour te dire toute l'admiration et l'amour que j'ai pour toi. Cette thèse maman je te la dédie car ce travail n'aurai jamais pu être réalisé sans toi. Encore mille mercis pour toutes ces fautes d'orthographe corrigées depuis tant d'années. Je t'aime!

Je remercie également tous les membres de la famille HOLTZ, SOMNY et mes deux brothers Romain et Alexandre BARADA.

Romain alias mon Rominou (je ne vais pas citer tous les autres autrement il me faudrait au moins 10 pages), qui aurai cru que l'Alsace me permettrait de faire une rencontre aussi géniale que la tienne?! Merci d'être là mon chat. Mon soulagement et le tien arrivent bientôt. Je te promets que je ne laisserai plus personne se mettre en travers de notre route! Pour moi tu seras toujours la colonne vertébrale de notre belle famille. J'en profite également pour remercier les membres de la famille LAHAXE pour leur gentillesse

Je remercie mes enfants, Captain Wallas SpaceDust, Chili Cheese (RIP), Cheesy Poof, Poof Goulash, Goulash Poutine (RIP) et Poutine Chili. Votre amour est si pur et sincère, merci d'être là pour moi. Wallas, mon « tout roux bisous », tous les jours tu me rappelles que la vie vaut le coup d'être vécue.

Je remercie mes meilleurs amis, Vulske, Mathilde et Izo! Vous êtes des potes en or! Merci de me supporter depuis toutes ces années. Vous êtes juste parfaits. Ou que vous soyez dans ce vaste monde, je serai toujours là pour vous tous!

Il va falloir penser à arrêter un moment les remerciements ... Pour finir en beauté je voudrai remercier des personnes chères à mes yeux, mes mentors ! Tout a commencé avec vous Mr. BARRERA puis ont suivi mes fabuleux profs de BTS, Mme Isabelle Collin, Mme Christina Pellerin, Mr Eric Demousseau et Mr Najib Motassim, les deux années passées avec vous à Nancy ont été les meilleures de toute ma vie. Petit saut à Strasbourg pour donner un immense merci aux Docteurs Joern Pütz et Jacky De Montigny, vous avez été comme des pères pour moi, merci d'avoir toujours cru en moi quand moi-même je n'y croyais plus et de m'avoir accompagnée si loin. Pour finir, je remercie du fond du cœur mes maîtres de stage et particulièrement le Professeur Jean-Louis Merlin et le Docteur Jean-Luc Galzi grâce à vous j'ai découvert une réelle passion pour le domaine de la Cancérologie et de la Bio Mol (surtout le clonage !!). Mesdames, Messieurs, ce travail c'est aussi le vôtre! Tous ce que j'ai appris je le tiens de vous et vous avez contribué à faire de moi une personne atypique avec un réel dévouement pour la recherche. Merci pour tout !

Enfin, merci aux souris alias « les kiki's » ou « les buddy's ». Je vous prie de m'excuser pour tout le mal que j'ai pu vous faire. Si un jour je réussis à faire partie du comité d'éthique de protection des animaux, je vous promets que vous aurez une meilleure vie avec plein de hamacs, de bonnes graines et du FROMAGE pour avoir un super microbiote !

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	I
TABLE DES MATIERES .....	V
ABREVIATIONS.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLES.....	XI
INTRODUCTION .....	3
I. Le Poumon.....	3
A. L'architecture pulmonaire.....	3
B. Physiologie pulmonaire .....	4
C. Les muqueuses pulmonaires .....	5
1. La muqueuse trachéo-bronchique .....	5
2. La muqueuse des bronchioles .....	5
3. La muqueuse alvéolaire.....	6
D. Les pathologies pulmonaires.....	7
II. L'épithélium respiratoire.....	8
A. Physiologie de l'épithélium respiratoire .....	8
1. Anatomie de l'épithélium respiratoire.....	8
2. Fonctions de l'épithélium respiratoire .....	9
III. La Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) .....	12
A. Histoire de la mise en évidence de la BPCO .....	12
B. Définition et diagnostic de la BPCO.....	13
C. Epidémiologie et impact économique de la BPCO .....	15
D. Facteurs de risque impliqués dans le développement de la BPCO .....	15
1. Les facteurs liés à l'hôte .....	16
a. Les événements respiratoires pendant l'enfance .....	16
b. Les facteurs génétiques.....	16
2. Les facteurs environnementaux.....	17
a. La fumée de cigarette.....	17
b. L'exposition professionnelle.....	17
c. La pollution atmosphérique .....	18
d. La pollution aérienne intérieure.....	18
E. Les Traitements de la BPCO.....	18
F. Physiopathologie de la BPCO .....	20
1. Description de la physiopathologie .....	20



2.	Auto-immunité dans la BPCO .....	23
3.	Recrutement des cellules de l'immunité et impact de la fumée de cigarette .....	23
a.	Les macrophages .....	23
b.	Les neutrophiles .....	24
c.	Les cellules dendritiques .....	24
d.	Les lymphocytes .....	25
G.	Epithélium bronchique et immunité des muqueuses : modulation lors de la BPCO .....	28
1.	La réparation de l'épithélium bronchique.....	28
2.	La clairance muco-ciliaire .....	31
3.	Production de facteurs de croissance et pro-inflammatoires.....	31
4.	Interaction entre les bactéries et les cellules épithéliales bronchiques .....	32
a.	La production de facteurs antimicrobiens .....	32
b.	La défense antibactérienne est altérée par l'exposition à la fumée de cigarette.....	33
IV.	Les pathogènes impliqués dans les exacerbations de la BPCO : zoom sur <i>Streptococcus pneumoniae</i> et <i>Haemophilus influenza non typable</i> .....	34
A.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	34
1.	Epidémiologie.....	35
2.	Traitement et prévention contre <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	35
B.	<i>Haemophilus influenza non typable</i> .....	36
1.	Epidémiologie.....	36
2.	Traitement et prévention contre <i>Haemophilus influenza</i> .....	36
C.	Réponse immunitaire dirigée contre les bactéries : spécificité de <i>Streptococcus pneumoniae</i> et <i>Haemophilus influenza non typable</i> .....	37
1.	Mise en place de la réponse immunitaire .....	37
a.	Les Toll Like Récepteurs .....	37
b.	Les Nucleotides Oligomerization domain Receptors .....	38
c.	Le rôle du complément .....	38
2.	L'immunité innée.....	39
a.	Les macrophages alvéolaires.....	39
b.	Les neutrophiles .....	39
c.	Les cellules iNKT .....	40
d.	Les Lymphocytes $T\gamma\delta$ .....	40
3.	L'immunité adaptative .....	40
V.	La sous-famille des cytokines IL-20 .....	42
A.	Les récepteurs des cytokines IL-20.....	42
B.	Voie de signalisation.....	44
C.	Site de production des cytokines IL-20 .....	45
D.	Rôles connus des cytokines IL-20 .....	46

1. Réparation cellulaire .....	46
2. Défenses de l'hôte.....	48
E. Implication des cytokines IL-20 dans diverses pathologies.....	48
1. Les maladies du foie .....	48
2. Les maladies auto-immunes.....	49
3. Les cancers .....	50
4. Les maladies vasculaires.....	51
5. Les maladies intestinales inflammatoires et chroniques (MICI) .....	52
6. Quelques autres exemples de maladie .....	52
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE .....	54
RESULTATS.....	56
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	113
I. Expression et modulation des cytokines de la famille IL-20 et de leurs récepteurs au niveau du tractus respiratoire.....	113
A. Contexte infectieux seul (Figure 11).....	114
B. Contexte d'exposition à la fumée de cigarette (Figure 12).....	116
II. Fonctions épithéliales des cytokines de la famille IL-20 .....	118
III. Hypothèse de l'action des cytokines IL-20 dans un contexte global d'infection pulmonaire (Figure 13) .....	121
IV. Implications des cytokines IL-20 dans un contexte de Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive .....	123
CONCLUSION .....	125
BIBLIOGRAPHIE.....	126
ANNEXES.....	155

## ABREVIATIONS

ADN : Acide DesoxyriboNucléique  
 Ag : Antigène  
 AQP5 : Aquaporine-5  
 ARN : Acide RiboNucléique  
 ATT :  $\alpha$ 1-antitrypsine  
 BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive  
 CAP-18 (LL-37) : Cathelicidine  
 CAT : COPD Assessment Test  
 CCL- : Chimiokine ligand type C-C  
 CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator  
 CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
 CpG : Cytosine-phosphate-Guanosine  
 CVS : Capacité Vitale Synchronisée  
 CXCL- : Chimiokine ligand de type C-X-C  
 DAMP : Damaged Associated Molecular Pattern  
 DC : Cellule Dendritique  
 DEFB : Béta-Défensine  
 D-Glu-meso-DAP : D-glutamyl-meso-diaminopimelique  
 EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor  
 EMT : Transition Epithélio-Mésenchymateuse  
 FGF : Fibroblast Growth Factor  
 FOXJ1 : Forkhead box protein J1  
 G-CSF : Facteur de stimulation de colonies Granulocytes  
 GM-CSF : Facteur de stimulation de colonies Granulocytes/Macrophages  
 GOLD : GobaI Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease  
 HDP : Protéine de Défense de l'Hôte  
 HEY2 : Hairy/E(slp)-related with YRPW motif  
 ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1  
 IFN : Interféron  
 Ig : Immunoglobuline  
 IL- : Interleukine  
 ILC : Cellules Lymphoïdes Innées  
 IRAK : IL-1 Receptor Associated Kinase  
 JAK : Janus Kinase  
 kDa : kilo Dalton  
 KRT5 : Kératine-5  
 LPS : LipoPolySaccharide  
 LTA : Acide LipoTéichoïque  
 MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1  
 MCR : Medical Council Research  
 MDA-7 : Melanoma Differentiation associated gene-7  
 MDP : MuramylDiPeptide

MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin  
 MMP : Métalloprotéases matricielles  
 MUC : Mucine  
 nAChR : Récepteurs nicotiniques neuronaux à l'Acétylcholine  
 NF-κB : Facteur Nucléaire Kappa B  
 NK : Cellule tueuse naturelle  
 NLRP3 : NOD-like receptor family pyrin domain containing 3  
 NOD : NLR, nucleotide oligomerization domain receptors  
*NTHi : Haemophilus influenza non typable*  
 OLD : Oxygénothérapie de Longue Durée  
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
 ORL : Oto-Rhino-Laryngologie  
 PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns  
 PDGF : Patelet Derived Growth Factor  
 PHA : Phytohémaglutinine  
 PRR : Récepteur de Reconnaissance de Motif  
 Rag : Recombination activating gene  
 ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
 SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis  
 SLPI : Secretory Leukocyte Protease Inhibitor  
 SOX : Sry-box transcription factor  
*Sp : Streptococcus pneumoniae*  
 SPDEF : SAM Pointed Domain-containing Ets transcription Factor  
 STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription  
 TCR : Récepteur des cellules T  
 TGF : Facteur de Croissance de Transformation  
 TLR : Récepteur Toll Like  
 TNF-α : Facteur de Nécrose Tumorale alpha  
 TP63 : Tumor Protein 63  
 TRIM29 : Tripartite motif-containing protein 29  
 TSLP : Lymphopoïétine Stromale Thymique  
 TTF-1 : Thyroïd Transcription Factor-1  
 Tyk2 : Tyrosine Kinase 2  
 VEGFA : Vascular Endothelial Growth Factor A  
 VEMS : Volume d'air expiratoire maximal en une seconde  
 ZO-1 : Zonula Occludens-1

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <b>L'arbre bronchique.</b> .....	4
Figure 2 : <b>Schéma des voies aériennes respiratoires chez l'homme.</b> .....	6
Figure 3 : <b>Répartition des différents types cellulaires épithéliaux aux différents étages de l'arbre bronchique.</b> .....	10
Figure 4 : <b>Physiopathologie de la BPCO.</b> .....	22
Figure 5 : <b>Les différentes étapes de la réparation épithéliale.</b> .....	29
Figure 6 : <b>Altération des mécanismes de réparation épithéliaux en contexte BPCO.</b> .....	30
Figure 7 : <b>Cause des exacerbations de la BPCO.</b> .....	34
Figure 8 : <b>Les membres de la famille des cytokines IL-20 et leurs sous-unités réceptrices associées (Rutz et al., 2014).</b> .....	43
Figure 9 : <b>Les cytokines de la famille IL-20.</b> .....	45
Figure 10 : <b>Rôles connus des cytokines de la famille IL-20</b> .....	47
Figure 11 : <b>Production des cytokines de la famille IL-20</b> .....	116
Figure 12 : <b>Modulation de l'expression des cytokines de la famille IL-20 en réponse à la fumée de cigarette</b> .....	118
Figure 13 : <b>Fonction des cytokines de la famille IL-20</b> .....	123

## LISTE DES TABLES

Table 1 : <b>Classification de la BPCO selon le GOLD</b> (Adapté de : <a href="http://cep.splf.fr/">http://cep.splf.fr/</a> ). .....	13
Table 2 : <b>Echelle de MCR de la dyspnée</b> (Adapté de : <a href="http://cep.splf.fr/">http://cep.splf.fr/</a> ). .....	14
Table 3 : <b>Evaluation combinée de la sévérité de la BPCO par le GOLD</b> (classification de 2017) (Adapté de : <a href="http://cep.splf.fr/">http://cep.splf.fr/</a> ). .....	15
Table 4 : <b>Traitements de la BPCO associés aux différents stades de la pathologie.</b> .....	19
Table 5 : <b>Sécrétion de facteurs permettant l'inflammation (Chimiokines, cytokines et facteurs de croissance) par l'épithélium respiratoire</b> (Message and Johnston, 2004). .....	32

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une maladie pulmonaire inflammatoire consécutive à l'exposition chronique à la pollution atmosphérique et surtout au tabagisme dans environ 90% des cas. Cette maladie se caractérise par une obstruction des bronches due à une hypersécrétion de mucus, une hypertrophie des muscles lisses, ainsi qu'une destruction de la paroi des alvéoles respiratoires amenant le patient à l'emphysème. Le stress induit par la fumée de cigarette provoque une activation de la barrière épithéliale pulmonaire associée à une altération de la réponse immunitaire responsable d'une susceptibilité accrue aux infections pulmonaires. De ce fait, les patients atteints de cette maladie développent des exacerbations principalement liées à ces infections bactériennes en particulier à *Non-Typable Haemophilus influenza (NTHi)* et *Streptococcus pneumoniae (Sp)*.

La cytokine IL-22 est un acteur très important des défenses antibactériennes et du maintien de la barrière épithéliale. Cette cytokine appartient à la grande famille de l'IL-10, et à la sous-famille des cytokines IL-20 composée de l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24. L'IL-22 se lie au récepteur formé par les sous-unités IL-10Rb et IL-22Ra, tandis que les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 utilisent deux récepteurs associant l'IL-20Rb avec l'IL-20Ra ou l'IL-22Ra. Il a été démontré que les cytokines de la famille IL-20 (IL-19, IL-20, IL-24) agissent sur la clairance bactérienne au cours d'une infection cutanée par *Staphylococcus aureus* (Myles et al., 2013), en inhibant la production des cytokines IL-17 et IL-22. De plus, des précédents travaux au laboratoire, ont montré un défaut de l'expression des cytokines IL-17 et IL-22 qui participaient à la susceptibilité à l'infection chez les souris atteintes de BPCO (Pichavant et al., 2015). Enfin, nos données actuelles montrent que l'exposition à la fumée de cigarette augmente l'expression des cytokines de la famille IL-20 et que l'inhibition de cette voie permet de bloquer le développement d'épisodes d'exacerbation chez des souris BPCO.

L'objectif de cette thèse est de préciser le rôle des cytokines IL-20 dans la réponse à l'infection bactérienne (*Sp*, *NTHi*) tant dans un contexte physiologique qu'au cours d'un contexte mimant la BPCO. Pour cela, nous nous focaliserons sur le rôle de l'épithélium pulmonaire tant dans la production que dans la fonction de ces cytokines en contexte infectieux.

Pour répondre à ces questions, nous avons analysé l'expression des cytokines IL-20 par l'épithélium pulmonaire *in vitro* et *ex vivo* dans un modèle murin mimant l'exacerbation de la BPCO ainsi que dans des biopsies pulmonaires de patients fumeurs atteints ou non de BPCO. Dans un second temps nous avons évalué la modulation par un anticorps bloquant le récepteur des cytokines IL-20 (anti-IL-20Rb) au cours de la réponse anti-infectieuse de l'épithélium dans nos modèles *in vivo* (souris infectées par *Sp*) et *in vitro* (cellules épithéliales de trachées murines). Nous avons en parallèle évalué l'implication des cytokines IL-20 dans la réparation épithéliale.

L'ensemble des résultats acquis au cours de la thèse nous a permis de démontrer l'implication des cytokines IL-20 et de préciser leur rôle sur l'épithélium pulmonaire au cours de l'infection bactérienne ainsi que dans la pathologie de la BPCO. De plus, les résultats obtenus avec l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb dans ces contextes d'infections et de BPCO, font de celui-ci une potentielle piste thérapeutique pour le traitement des lésions dues à l'infection.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is an inflammatory lung disease due to chronic exposure to air pollution and especially to cigarette smoke exposure in approximately 90% of the cases. This disease is characterized by obstruction of the bronchi due to hypersecretion of mucus, hypertrophy of the smooth muscles, and destruction of the alveolar wall leading the patient to emphysema. The stress induced by cigarette smoke exposure causes activation of resident cells including pulmonary epithelial cells and an alteration of the immune system responsible for an increased susceptibility to pulmonary infections. As a result, patients with this disease develop exacerbations especially due to *Non-Typable Haemophilus influenza (NTHi)* and *Streptococcus pneumoniae (Sp)*.

The IL-22 cytokine plays a key role in antibacterial defenses and maintenance of the epithelial barrier. This cytokine belongs to the large IL-10 family, and to the IL-20 cytokine subfamily also including IL-19, IL-20 and IL-24. IL-22 binds to the receptor formed by the IL-10Rb and IL-22Ra subunits, while the IL-19, IL-20 and IL-24 cytokines binds to IL-20Rb associated with either IL-20Ra or IL-22Ra subunits. IL-20 cytokines (IL-19, IL-20, IL-24) have been shown to impair bacterial clearance during cutaneous infection with *Staphylococcus aureus* (Myles et al., 2013), by inhibiting the production of IL-17 and IL-22 cytokines. In addition, previous work in the laboratory showed a defect in the expression of IL-17 and IL-22 cytokines contributing to the susceptibility to infection in COPD mice (Pichavant et al., 2015). In fact, our current data show that exposure to cigarette smoke increases cytokine expression of the IL-20 family and that inhibition of this pathway blocks the development of exacerbation episodes in COPD mice.

The aim of this thesis is to clarify the role of IL-20 cytokines in the response to bacterial infections (*Sp*, *NTHi*) both in a physiological context and in a context mimicking COPD. To do so, we will focus on the role of pulmonary epithelium both in the production and function of these cytokines in infectious context.

To answer these questions, we analyzed the expression of IL-20 cytokines by pulmonary epithelium *in vitro* and *ex vivo* in a mouse model mimicking the COPD exacerbation as well as in pulmonary biopsies of smokers and non-smokers patients and of COPD patients. In a second step we evaluated the modulation by an IL-20 receptor blocking antibody (anti-IL-20Rb) of the anti-infectious response in our *in vitro* (murine tracheal epithelial cells) and *in vivo* models (*Sp*-infected mice). In parallel, we evaluated the involvement of IL-20 cytokines in the epithelial repair.

All the results acquired during the thesis allowed us to demonstrate the expression of IL-20 cytokines and to demonstrate their role on the pulmonary epithelium during bacterial infection as well as in COPD. In addition, the results obtained with the anti-IL-20Rb neutralizing antibody in these contexts of infections and COPD, suggests a potential therapeutic application for respiratory infection.



# INTRODUCTION

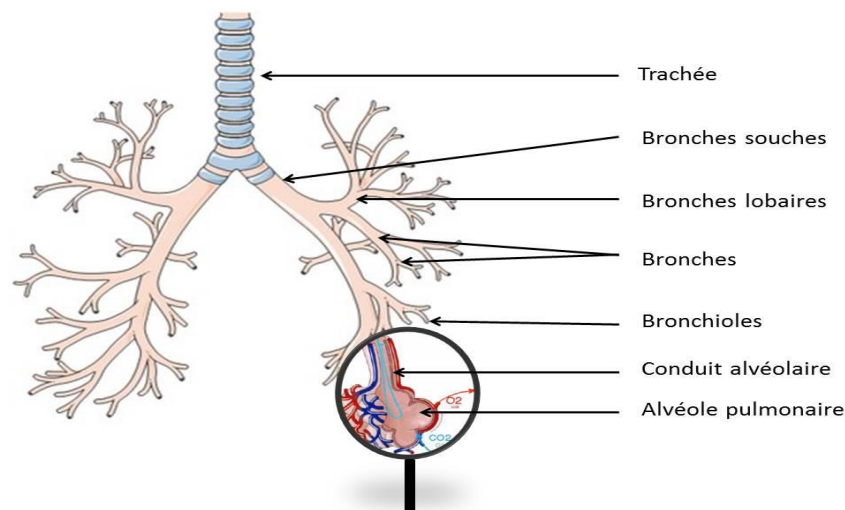
## **I. Le Poumon**

L'appareil respiratoire est constitué d'un ensemble d'organes qui a pour rôle principal l'apport d'oxygène à l'ensemble du corps humain. Cet appareil est formé d'un ensemble d'organes conducteurs reliant les alvéoles au milieu extérieur et une partie purement respiratoire composée par les alvéoles pulmonaires. Les voies aériennes dites profondes peuvent être soit extra-pulmonaires avec la trachée et les deux bronches souches soit intra-pulmonaires qui se divisent dans le poumon en différents segments bronchiques.

Le poumon est un organe essentiel au bon fonctionnement de l'organisme car il va permettre la respiration des tissus profonds et l'élimination du dioxyde d'oxygène. Cet organe fonctionne de par son insertion intra-thoracique et il est protégé par la plèvre pariétale et la plèvre viscérale. Les mouvements de l'air sont dus à l'action conjuguée des muscles présents dans la cage thoracique d'une part et du diaphragme d'autre part.

### **A. L'architecture pulmonaire**

L'appareil respiratoire est composé de deux parties bien distinctes et séparées par le larynx : les voies aériennes supérieures composées du nez, des sinus, du nasopharynx et de la trachée, puis les voies broncho-pulmonaires. La surface pulmonaire représente environ 100m<sup>2</sup> de surface et est en contact avec environ 10 000 litres d'air inhalé par jour (Holgate, 2007). Chez l'homme, le poumon est segmenté en trois lobes à droite et deux lobes à gauche qui sont alimentés par dix segments broncho-pulmonaires. L'ensemble des bronches allant de la trachée jusqu'aux bronchioles pulmonaires forme l'arbre bronchique qui va permettre la bonne diffusion de l'air inspiré jusqu'aux alvéoles puis secondairement son expiration ([Figure 1](#)). Les bronches respiratoires sont prolongées par des bronchioles aboutissant elles-mêmes à des lobules. L'épithélium respiratoire est un épithélium pseudostratifié avec des cellules ancrées au niveau de la lame basale (Coraux et al., 2005). L'air inhalé, une fois arrivé au niveau des alvéoles, est ensuite traité par ce que l'on appelle le poumon périphérique permettant les différents échanges gazeux par biais des acini au niveau des différents lobules des alvéoles pulmonaires.



**Figure 1 : L'arbre bronchique.**

Les poumons sont composés de nombreux canaux permettant l'arrivée de l'air aux alvéoles. En premier lieu, la trachée va conduire l'air jusqu'aux deux bronches souches qui vont chacune se diviser en bronches lobaires puis en bronches. *A la terminaison des bronches, on retrouve les bronchioles amenant l'air aux conduits alvéolaires qui vont permettre la fin du cheminement de celui-ci au niveau des alvéoles* (<http://www.egmos.org>).

## **B. Physiologie pulmonaire**

La physiologie pulmonaire est composée de nombreuses fonctions. La plus connue du grand public sont les échanges gazeux qui permettent la transformation du sang pauvre en oxygène et chargé en gaz carbonique provenant du cœur, en sang oxygéné permettant l'alimentation de tous les organes du corps humain. Mais ces échanges gazeux permettent également l'entrée dans les voies aériennes de multiples micro-organismes ainsi que différents types de particules (e.g nanoparticules) pouvant créer une réponse inflammatoire au niveau pulmonaire (Pope et al., 2004). Cependant le poumon a longtemps été considéré comme une zone « stérile » mais ce message n'est pas tout à fait vrai. En effet il s'agit uniquement de la zone composée des alvéoles respiratoires qui est rendue stérile principalement grâce à l'épuration mucociliaire et à la production de facteurs solubles antimicrobiens par l'épithélium des voies respiratoires. Le mucus est principalement composé de mucines et de peptides antimicrobiens agissant sur la clairance des micro-organismes (Rogan et al., 2004) (Travis et al., 1999).

Ces aspects de la physiologie ne sont possibles que grâce à la mécanique pulmonaire. En effet, cette mécanique met en place une inspiration qui est un phénomène actif basé sur la contraction du diaphragme. Le diaphragme va augmenter le diamètre de la cage thoracique et des muscles intercostaux, induisant une diminution de pression interne permettant l'entrée de l'air. L'élasticité musculaire va permettre de revenir au diamètre de base de la cage thoracique en chassant l'air présent dans les poumons. L'expiration est qualifiée de phénomène passif. La ventilation du poumon est régulée par le système nerveux central suivant le taux de dioxyde de carbone présent dans le sang ([www.pneumocourlancy.fr](http://www.pneumocourlancy.fr)).

## **C. Les muqueuses pulmonaires**

Une muqueuse est un épithélium en contact avec le milieu extérieur. Pour préserver cette structure, elle bénéficie d'une lubrification et elle est intégrée à un tissu conjonctif encore appelé lamina propria. Cette muqueuse a pour but de protéger l'organe des agressions extérieures grâce à l'escalator muco-ciliaire présent dans les voies aériennes ([www.respir.com](http://www.respir.com)) (Figure 2).

### **1. La muqueuse trachéo-bronchique**

La trachée est un tube flexible formé chez l'homme par une 20<sup>ème</sup> d'anneaux cartilagineux et mesurant onze centimètres de long et deux centimètres de large. Le muscle lisse et un muscle trachéal forment cet organe en plus des anneaux à base de cartilage. Sa paroi est composée de plusieurs éléments :

- Une muqueuse qualifiée de respiratoire composée d'un épithélium pseudostratifié formé par des cellules cylindriques. Les cellules caliciformes s'intercalent entre les nombreuses cellules ciliées. Les cils de l'épithélium battent de manière synchronisée en direction du pharynx permettant la remonté du mucus. De plus, on retrouve des cellules basales de petite taille n'atteignant pas la lumière de l'organe. Ces dernières sont des cellules impliquées dans la régénération de l'épithélium et sont les progéniteurs d'autres types cellulaires (Inayama et al., 1988). La membrane basale est épaisse et le chorion riche en vaisseaux, en fibres élastiques longitudinales et en glandes mixtes.
- Une couche fibro-cartilagineuse composée des anneaux de cartilage liés par du tissu fibreux et des fibres élastiques.
- Une couche conjonctive externe composée de tissus adipeux, de nerfs contractiles et de vaisseaux sanguins.

Les bronches sont classées en plusieurs catégories et possèdent différentes particularités :

- Les bronches souches ou bronches lombaires (externes aux poumons) sont de même composition que la trachée. On retrouve les anneaux cartilagineux et un épithélium pseudostratifié.
- Les bronches segmentaires (internes aux poumons) possèdent un épithélium cylindrique simple composé de cellules ciliées et caliciformes.

Le chorion de l'ensemble des bronches est mince et possède des nodules cartilagineux et des glandes mixtes. Les muscles lisses vont en augmentant dans les bronches segmentaires et persistent en nombre réduit dans les bronchioles.

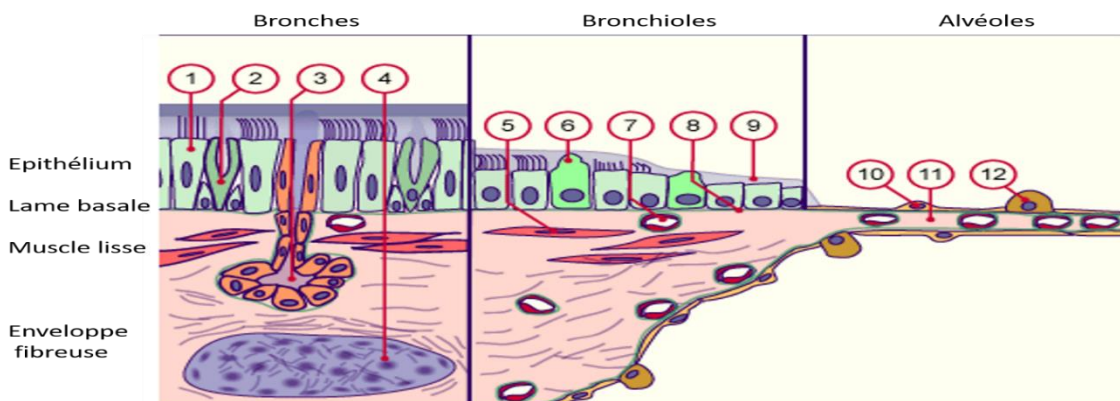
### **2. La muqueuse des bronchioles**

La muqueuse des bronchioles localisée au niveau du poumon périphérique est constituée d'un épithélium cubique simple composé principalement de cellules basales, de cellules

épithéliales ciliées avec une longueur de cils plus courte que la taille des cils observée sur les cellules épithéliales ciliées retrouvées au niveau des bronches, de cellules caliciformes et de cellules Club (anciennement appelées cellules de Clara) ayant un pôle apical « bombé » autrement dit une forme pyramidale. Ces dernières produisent des anti-protéases et des oxydases qui sont libérées au niveau des microvillosités situées au pôle apical de ces cellules. Dans la plupart des cas les sécrétions par les cellules Club sont de type mérocine c'est-à-dire une sécrétion par exocytose, alors que la sécrétion est de type apocrine ou de type diffusion après stimulation. Pour finir il existe également des cellules endocrines permettant la régularisation de la vascularisation et de la ventilation. Le chorion est composé de fibres de collagène et de quelques rares cellules musculaires lisses annulaires. Les bronchioles terminales se divisent chacune en une dizaine de canaux alvéolaires.

### 3. La muqueuse alvéolaire

Le canal alvéolaire est constitué de cellules musculaires lisses, de fibres de collagène et est recouvert d'un épithélium de type cubique aplati ou pavimenteux qui se prolonge au niveau des alvéoles. La muqueuse alvéolaire est située au niveau du poumon périphérique et est composée de deux types de cellules épithéliales : les pneumocytes de type I représentant 97% de cette paroi perméable aux gaz et imperméable aux liquides et les pneumocytes de type II. Les pneumocytes de type II sont les cellules sécrétant le surfactant composé de phospholipides et de protéines tensio-actives. De plus, ces cellules sont impliquées dans le processus inflammatoire pulmonaire car elles sont capables de présenter les antigènes et de sécréter des cytokines. Le chorion de la muqueuse alvéolaire est riche en fibres élastines.



**Figure 2 : Schéma des voies aériennes respiratoires chez l'homme.**

1. Cellule épithéliale ciliée, 2. Cellule épithéliale caliciforme, 3. Glande sous muqueuse, 4. Cartilage pulmonaire, 5. Cellule du muscle lisse, 6. Cellule épithéliale Club, 7. Vaisseau sanguin, 8. Membrane basale, 9. Mucus, 10. Pneumocyte de type I, 11. Septum alvéolaire, 12. Pneumocyte de type II. Adapté de : (Bergofsky, 1991).

L'exposition répétée de la muqueuse respiratoire à des facteurs environnementaux nocifs, ou des micro-organismes, peut conduire au développement de pathologies pulmonaires transitoires voire même chroniques telles que la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), l'asthme, la tuberculose...

## **D. Les pathologies pulmonaires**

Les pathologies pulmonaires sont multiples et possèdent de nombreuses origines. Les plus sévères sont les suivantes ([www.poumon.ca](http://www.poumon.ca)) :

- La Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive est une maladie inflammatoire chronique pulmonaire. La cause principale de cette maladie est le tabagisme. Cette maladie est caractérisée par une obstruction bronchique partiellement irréversible et une destruction de la paroi des alvéoles conduisant ainsi à l'emphysème.
- Les cancers du poumon peuvent être de deux types. Les carcinomes à petites cellules souvent très agressifs s'ils ne sont pas traités à temps et les cancers bronchiques non à petites cellules.
- L'asthme est une pathologie chronique et inflammatoire caractérisée par la dyspnée, une inflammation chronique des bronches, une production anormale de mucus et une bronchoconstriction.
- La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie chronique très grave car elle induit la dégradation des fonctions pulmonaires. Un phénomène de cicatrisation (irréversible) s'installe et conduit à la dyspnée. Les causes de cette maladie restent encore inconnues.
- La maladie pulmonaire la plus connue du grand public est la Tuberculose causée par un agent pathogène appelé *Mycobactérium tuberculosis* (bacille de Koch). Ce bacille va créer des lésions pulmonaires, la plupart du temps irréversibles, appelées cavernes dans lesquelles peuvent se loger les *Aspergillus*, ou donner suite à des tumeurs.
- Les pneumopathies infectieuses peuvent être de différentes natures : soit d'origine bactérienne notamment causées par le *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenza*, soit d'origine virale causées par le virus *influenza* ou le *rhinovirus*. Ces pathogènes sont très impliqués dans les cas d'exacerbation de la BPCO. Elles peuvent également être d'origine fongique.

Les rôles essentiels du poumon sont principalement médiés par l'épithélium respiratoire. La première ligne de défense mise en place par celui-ci est la clairance mucociliaire ainsi que la synthèse de différents facteurs tels que des cytokines et peptides antimicrobiens permettant la protection pulmonaire contre les agents extérieurs qu'ils soient de nature environnementale ou pathogénique.

## **II. L'épithélium respiratoire**

L'épithélium du tractus respiratoire joue un rôle essentiel dans la protection de l'appareil respiratoire (notamment contre les pathogènes). Cette fonction est prise en charge en premier lieu par l'épuration muco-ciliaire. Cependant, des études récentes mettent en lumière le rôle de cet épithélium au sein de l'immunité, à la fois en contrôlant la réaction inflammatoire, et en participant à l'immuno-régulation. De plus l'épithélium alvéolaire va permettre le rôle essentiel et le plus connu du poumon : celui d'oxygéner l'ensemble de l'organisme.

### **A. Physiologie de l'épithélium respiratoire**

#### **1. Anatomie de l'épithélium respiratoire**

Un épithélium est classiquement constitué de cellules jointives et juxtaposées liées les unes aux autres par des jonctions serrées qui permettent la cohésion des cellules entre elles. De plus, elles sont adhérentes et ancrées à la lame basale faisant la jonction avec les constituants du tissu conjonctif. Les cellules épithéliales sont des cellules dites polarisées du fait de l'orientation du pôle apical tourné vers la lumière de l'organe, et le pôle basal tourné vers le tissu conjonctif en lien avec la lame basale. Ces cellules, de par leur rôle de barrière, possèdent un cytosquelette très développé et un noyau volumineux unilobé.

L'épithélium respiratoire est un épithélium de revêtement pseudo stratifié et prismatique qui comporte différents types cellulaires (*précédemment décrit dans le Chapitre I*). Il comporte notamment des cellules épithéliales ciliées et des cellules épithéliales productrices de mucus (généralement une cellule à mucus pour cinq cellules ciliées). Les cellules épithéliales sont classées en trois groupes : les cellules progénitrices, les cellules ciliées et les cellules sécrétrices (Spina, 1998) :

- Les cellules basales sont des cellules progénitrices n'étant pas en contact avec la lumière bronchique. Plus on descend le long de l'arbre bronchique, plus ces cellules se font rares (Evans et al., 1990) (Evans and Plopper, 1988). Ces cellules sont capables de se différencier pour donner naissance à des cellules épithéliales ciliées ou à des cellules épithéliales caliciformes (Boers et al., 1998). Les marqueurs Kératine-5 (KRT5) (filament intermédiaire qui permet la formation du cytosquelette des cellules basales) et Tumor Protein 63 (TP63) (qui régule les cellules souches en cellules progénitrices adultes) permettent de caractériser le phénotype de ces cellules (Amatngalim et al., 2018).
- Les cellules Club, sont uniquement retrouvées au niveau des bronchioles dans le poumon. Ce sont des cellules progénitrices capables de se différencier en cellules ciliées pendant la régénération épithéliale (Hogan et al., 2014) (Bertoncello and McQualter, 2013) (Ardhanareeswaran and Mirotsoy, 2013) (Lau et al., 2012) (Kotton, 2012) (Rackley and Stripp, 2012). Elles synthétisent de nombreuses protéines

spécifiques telles que la Secretoty Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) qui est un inhibiteur qui protège les cellules épithéliales contre les sérines protéases (De Water et al., 1986) ou encore l'utéroglobuline dont le rôle est encore mal connu (Heinzmann et al., 2003) et qui permet de les distinguer des autres types cellulaires (Amatngalim et al., 2018) ainsi que des enzymes du cytochrome P450 (Yang et al., 2012). Elles produisent également un liquide proche en composition du surfactant pulmonaire.

- Les cellules sécrétrices sont divisées en deux populations distinctes : les cellules caliciformes permettant la sécrétion de mucus contenant entre autre des mucines servant à de neutraliser les agents étrangers au niveau de la trachée et des bronches (Jeffery, 1983). Ces cellules sont caractérisées par un faible niveau de vésicules de sécrétion au niveau de l'appareil de Golgi et par les marqueurs phénotypiques des mucines MUC5AC et MUC5B (Amatngalim et al., 2018). A la différence des cellules caliciformes, il existe les cellules séreuses qui morphologiquement ressemblent aux cellules caliciformes mais qui possèdent de nombreuses vésicules de sécrétion (Rogers et al., 1993). Les sécrétions des glandes séreuses sont associées à l'humidification de l'air qui a préalablement été purifié par les cellules ciliées et le mucus.
- Les cellules épithéliales ciliées sont des cellules différenciées majoritairement représentées dans l'épithélium bronchique (Ayers and Jeffery, 1988). Ce sont des cellules présentant une quantité importante de mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire au battement des cils impliqués dans l'ascenseur muco-ciliaire. Leur caractéristique phénotypique est représentée par Forkhead box protein J1 (FOXJ1) qui est un facteur de transcription impliqué dans la ciliogenèse (Amatngalim et al., 2018).

## **2. Fonctions de l'épithélium respiratoire**

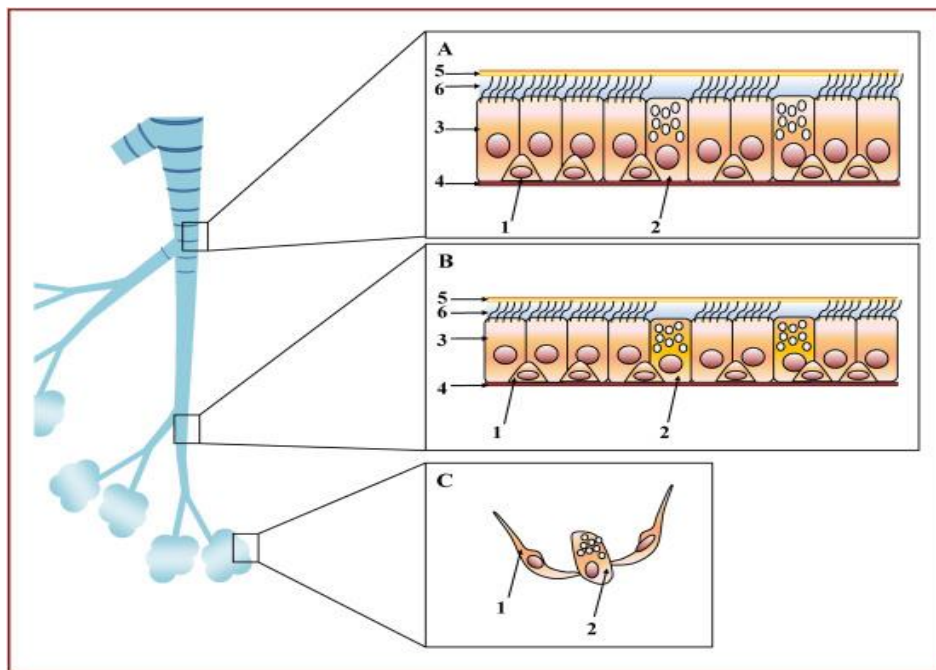
L'épithélium respiratoire possède de nombreuses fonctions propres aux différents types d'épithéliums qui le constituent (Figure 3). L'épithélium de revêtement qui constitue l'épithélium bronchique possède un rôle essentiel dans la mise en place de l'inflammation pulmonaire et il assure également les rôles de barrière et de protection physico-chimique vis-à-vis du milieu aérien. Ce phénomène repose sur la clairance muco-ciliaire qui est liée à la sécrétion de mucus grâce aux cellules caliciformes et au mouvement coordonnés des cils présents sur les cellules ciliées qui permettent la progression du mucus vers les voies aériennes supérieures.

Un liquide de surface d'environ 5-10  $\mu\text{m}$  de diamètre appelé mucus tapisse les voies aériennes respiratoires chez l'homme, protégeant ainsi le poumon contre les agressions extérieures telles que les bactéries, les poussières et autres substances (Smith et al., 2008). Le mucus est composé de deux phases, une première appelée la couche périciliaire qui est la plus profonde du mucus et la couche externe viscoélastique plus externe (Sleigh et al., 1988). Ce mucus est principalement composé de sels et de glycoprotéines (telles que les mucines) sécrétées par

les cellules épithéliales sécrétrices présentes aux différents étages de l'arbre bronchique, rendant cette sécrétion collante, non linéaire et viscoélastique (Fulford and Blake, 1986). En effet, ce sont les cellules caliciformes et séreuses qui le synthétisent au niveau de la trachée et des bronches, et les cellules Club et ciliées qui le synthétisent au niveau des bronchioles.

Le mucus produit par les cellules caliciformes va fixer les pathogènes et particules extérieures tandis que les cellules épithéliales ciliées, possédant au niveau de leur pôle apical environ 200 cils / cellule, vont les expulser vers l'extérieur du corps par un mouvement coordonné. Cet ascenseur muco-ciliaire est rendu possible par la sécrétion d'un fin film liquidien présent tout au long des voies respiratoires.

L'épaisseur de ce film liquidien décroît de la trachée aux alvéoles et celui-ci est également impliqué dans le maintien des échanges thermiques et hydriques. Concernant l'épithélium alvéolaire, celui-ci possède le rôle de surface d'échange pour l'air et le dioxyde d'oxygène. La fonction d'ouverture et de rétractation des alvéoles respiratoires est entraînée par le surfactant pulmonaire qui va diminuer la tension superficielle des alvéoles permettant ainsi d'éviter le collapsus alvéolaire. En cas d'encombrement des voies aériennes, la toux peut être enclenchée pour faciliter l'expectoration de sécrétions.



**Figure 3 : Répartition des différents types cellulaires épithéliaux aux différents étages de l'arbre bronchique.**

A) Composition de l'épithélium bronchique : cellules basales (1), cellules caliciformes (2), cellules ciliées (3), la membrane basale (4), et le mucus composé de 2 phases : la phase viscoélastique (5) et la phase périciliaire (6). B) Composition de l'épithélium bronchiolaire : cellules basales (1), cellules Clubs (2), cellules ciliées (3), la membrane basale (4), et le mucus composé de 2 phases : la phase viscoélastique (5) et la phase périciliaire (6). Composition de l'épithélium alvéolaire : 1) Pneumocyte de type I et 2) Pneumocyte de type II (Adam et al., 2014).



L'épithélium bronchique, de par ses fonctions sécrétoires est impliqué dans les mécanismes de défense de l'hôte en permettant l'initiation de l'inflammation des voies aériennes. Ces cellules épithéliales produisent des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines et des peptides bronchoconstricteurs. De plus, elles expriment des molécules d'adhésion à leur surface. Mais ces mécanismes peuvent être altérés au cours de pathologies respiratoires chroniques. Au niveau mondial, la pathologie pulmonaire la plus répandue est la BPCO. Elle est causée par une agression répétée (souvent pendant des années) par des fumées riches en oxydant qui vont entraîner une activation chronique des cellules résidentes (dont l'épithélium) et des altérations fonctionnelles.

### **III. La Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)**

La Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une maladie respiratoire chronique et inflammatoire. Cette pathologie se caractérise dans un premier temps par une obstruction progressive et partiellement réversible des bronches, causée par une hypersécrétion de mucus. Actuellement selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la BPCO est un problème majeur de santé publique dans le monde entier et va devenir la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité dans le monde d'ici 2030 (<http://www.who.int/fr>).

#### **A. Histoire de la mise en évidence de la BPCO**

C'est en 1679 que le médecin suisse Théophile Bonet décrit pour la première fois cette anomalie anatomique du poumon en tant que « poumon volumineux » (Bonet, 1700). Ses propos ont été confirmés par ceux du médecin anatomiste italien Giovanni Battista Morgagni, initiateur de l'anatomo-pathologie moderne en 1769 (Morgagni, 1769). Plus tard, en 1789, Mr. Baillie va publier des illustrations de poumons emphysémateux (destruction des alvéoles) conduisant ainsi à intégrer l'emphysème parmi les symptômes associés à la pathologie (Petty, 2006).

Le médecin britannique Charles Badham va par la suite associer la toux chronique et l'hyper sécrétion de mucus comme symptômes de la bronchiolite en 1814 (Badham, 1814). Peu de temps après, en 1821, le médecin français René-Théophile-Marie-Hyacinthe Laënnec (inventeur du stéthoscope) décrit l'emphysème pulmonaire et l'associe à la bronchite chronique (Laënnec, 1837). Il a également suggéré la pollution atmosphérique et les facteurs génétiques comme étant les principales causes de développement de la pathologie (le tabac n'étant pas fréquemment utilisé à l'époque). En 1846, le docteur John Hutchinson, d'origine anglaise, va inventer le spiromètre servant à évaluer le Volume d'air Expiratoire Maximal en une seconde (VEMS) chez les patients atteints de bronchites chroniques (Hutchinson, 1846). Une centaine d'années s'écoule avant que les médecins français, pharmacologues et physiologistes, Robert Tiffeneau et André Pinelli développent le concept de capacité vitale synchronisée (CVS) (Tiffeneau and Pinelli, 1947).

Par la suite le comité américain de société thoracique, en 1962, décrit pour la première fois la définition clinique de la BPCO en ces termes (Petty, 2006) :

- Présence d'une toux chronique sur une durée minimum de trois mois pendant au moins 2 années consécutives.
- Un emphysème caractérisé par une destruction de la paroi des alvéoles respiratoires ainsi qu'un espace alvéolaire de taille élargie.

Pour finir, la première utilisation du terme BPCO a eu lieu à la 9<sup>ème</sup> conférence sur l'emphysème à Aspen (Etats-Unis), en 1965, par le docteur William Briscoe (Petty, 2006).

## B. Définition et diagnostic de la BPCO

La BPCO est une maladie pulmonaire qui s'installe progressivement et qui est caractérisée par une toux chronique conduisant à l'emphysème respiratoire et accompagnée le plus souvent d'une dyspnée. C'est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par un fonctionnement anormal des cellules épithéliales, des macrophages et du système immunitaire, au niveau des voies respiratoires, provoquant une atrophie du muscle lisse des bronches et amenant à un épaissement de leur paroi. En effet, l'épithélium pulmonaire subit un remodelage engendrant une hyper sécrétion de mucus responsable d'une obstruction partielle ou totale des bronches respiratoires. Ainsi, les échanges gazeux au niveau du poumon sont considérablement réduits. Dans les formes les plus sévères de la maladie, une destruction du parenchyme pulmonaire est observée, engendrant un emphysème. Une destruction progressive de la paroi alvéolaire est également observée (<http://cep.splf.fr/>).

Dans la gestion et la prévention de la BPCO, le GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) a été établi. Selon des paramètres cliniques définis ([Table 1](#)), la BPCO se décline en cinq stades selon le GOLD, celui-ci étant déterminé en majeure partie grâce à la technique de spirométrie. Les mesures de VEMS (Volume Expiratoire Maximal à la première Seconde) et de CVF (Capacité Vitale Forcée) sont calculées après une inspiration profonde forcée et l'administration d'un bronchodilatateur. Le rapport VEMS/CVF est ensuite déterminé. Ces valeurs et l'identification de certains symptômes permettent de poser un diagnostic de la pathologie ([Table 1](#)).

Stade de la BPCO	Caractéristiques Cliniques
0 : à risque	Spirométrie normale accompagnée de symptômes chroniques tels que la toux et les expectorations
1 : BPCO débutante	VEMS / CVF < 70% VEMS > ou égale 80% des valeurs prédites Avec ou sans symptômes chroniques tels que la toux et les expectorations
2 : BPCO modérée	VEMS / CVF < 70% VEMS entre 50% et 80% des valeurs prédites Avec ou sans symptômes chroniques tels que la toux et les expectorations
3 : BPCO sévère	VEMS / CVF < 70% VEMS entre 30% et 50% des valeurs prédites Avec ou sans symptômes chroniques tels que la toux et les expectorations
4 : BPCO très sévère	VEMS / CVF < 70% VEMS < 30% des valeurs prédites ou VEMS < 50% des valeurs prédites avec insuffisance respiratoire

[Table 1](#) : Classification de la BPCO selon le GOLD (Adapté de : <http://cep.splf.fr/>).

En plus du rapport VEMS/CVF la gravité de la BPCO est évaluée selon d'autres critères :

- Les épisodes d'exacerbation de la maladie qui sont des épisodes aigus (environ 2 jours) et qui vont aggraver l'état pathologique du patient. Dans certains cas les exacerbations de la BPCO peuvent engager le pronostic vital du patient, on nomme ce phénomène : décompensation. Les exacerbations de la BPCO sont principalement dues à des infections d'origine bactérienne, virale ou mixtes.
- La dyspnée ou gêne respiratoire anormale est établie par l'échelle du Medical Council Research (MCR), utilisée dans la classification du GOLD et qui va permettre d'évaluer les gênes respiratoires occasionnées sur les activités du quotidien du patient ([Table 2](#)).

Stade 0	Essoufflement uniquement suite à un effort important.
Stade 1	Essoufflement pendant une marche accélérée sur un sol plat ou une pente légère.
Stade 2	Marche moins rapide qu'une personne saine du même âge.
Stade 3	Obligation de s'arrêter pour reprendre son souffle après quelques minutes ou quelques mètres marchés sur un sol plat.
Stade 4	Essoufflement peu importe la nature de l'effort.

[Table 2](#) : Echelle de MCR de la dyspnée (Adapté de : <http://cep.splf.fr/>).

- L'évaluation de la qualité de vie du patient. Les patients en toute autonomie peuvent compléter le COPD Assessment Test™ (CAT) qui est un questionnaire basé sur huit items scorés de 0 à 5 (5 étant la note la plus élevée). Ce questionnaire est ensuite étudié par le praticien hospitalier permettant d'adapter les traitements des patients.

Les différents scores obtenus permettent de classer les patients dans quatre groupes établis par le GOLD concernant la sévérité clinique de la BPCO.

Les groupes sont les suivants ([Table 3](#)) :

- A : faible risque d'exacerbation accompagné de peu de symptômes
- B : faible risque accompagné de symptômes significatifs
- C : risque élevé accompagné de peu de symptômes
- D : risque élevé accompagné de symptômes significatifs

Groupe	Exacerbations/an	MCR	CAT
A	0 à 1	< ou égal à 2	< 10
B	0 à 1	> ou égal à 2	> 10
C	2 ou plus (ou avec une hospitalisation)	< ou égal à 2	< 10
D	2 ou plus (ou avec une hospitalisation)	> ou égal à 2	> 10

*Table 3 : Evaluation combinée de la sévérité de la BPCO par le GOLD (classification de 2017) (Adapté de : <http://cep.splf.fr/>).*

### **C. Epidémiologie et impact économique de la BPCO**

D'après les rapports de l'OMS, depuis 2012, la BPCO est la 4<sup>ème</sup> cause de mortalité dans le monde, et d'ici 2030 elle passera au 3<sup>ème</sup> rang mondial (Mathers and Loncar, 2006). Cette maladie reste pourtant très mal connue du grand public sous le nom de BPCO.

En France durant l'année 2010, d'après un recensement des données épidémiologiques (Fuhrman and Delmas, 2010) la BPCO aurait une prévalence estimée à 7,5% avec une augmentation chez la femme. En effet, ces dix dernières années, l'hospitalisation est en augmentation chez les femmes pour le traitement de la BPCO. Ce phénomène est principalement dû aux habitudes tabagiques et au vieillissement de la population. Les régions de France les plus touchées par cette pathologie sont les régions du Nord (Nord et Pas-de-Calais), de l'Est (Lorraine et Alsace) et de l'Ouest (principalement en Bretagne).

En France, au cours de l'année 2006, 7391 certificats de décès ont été recensés mettant en avant comme cause initiale du décès, la BPCO (Inserm CépiDc). Chez les personnes âgées de plus de 45 ans, il a été établi que la BPCO faisait comme victimes un ratio de 41/100 000 chez les hommes et 17/100 000 chez les femmes. Selon les chiffres de l'Eurostat, pour l'année 2006, calculés sur les vingt-sept pays de l'Union Européenne, la France serait un des pays avec le taux de mortalité le plus faible parmi les patients BPCO.

Le coût annuel des soins chez ces patients, au cours de l'année 2011, s'élevait à 4366 euros par patient. Le coût peut atteindre 7502 euros/an chez les BPCO de stade IV (Patout et al., 2014).

### **D. Facteurs de risque impliqués dans le développement de la BPCO**

L'exposition à la fumée de cigarette est connue pour induire 90% des cas de BPCO. Cependant, les facteurs de risque associés au développement de la BPCO sont nombreux. Ils peuvent être directement liés à l'hôte (pathologies respiratoires durant l'enfance et facteurs de prédisposition génétique), ou liés aux facteurs environnementaux tels que la pollution atmosphérique, les polluants intérieurs et l'exposition aux risques professionnels.

## **1. Les facteurs liés à l'hôte**

### **a. Les événements respiratoires pendant l'enfance**

Certaines maladies infantiles entraînant une détresse respiratoire comme des infections sévères peuvent engendrer des anomalies du système respiratoire chez l'adulte (Bentham and Shaw, 2005).

Actuellement des études épidémiologiques sont en cours pour mieux comprendre ce lien. L'une des maladies respiratoires de l'enfant pouvant aboutir au développement d'une obstruction chronique est l'asthme.

### **b. Les facteurs génétiques**

Dans la littérature, des études montrent l'impact de certaines mutations géniques en lien direct avec la BPCO :

Le travail de Reséndiz-Hernandez & al. chez des patients BPCO causé par le tabac, l'exposition à la biomasse, et des patients non BPCO, a montré que le polymorphisme du promoteur du Facteur de Nécrose Tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) serait directement associé au risque de développement d'une BPCO (Reséndiz-Hernández et al., 2018). Li & al. ont montré que la mutation spécifique d'allèle du gène récepteur  $\beta_2$ -adrenergic (récepteur couplé aux protéines G) serait également impliquée dans la pathologie (Li et al., 2018). Ce récepteur est localisé au niveau des cellules des muscles lisses respiratoires (Barnes, 1995). De plus, l'étude menée par Li & al. montre que la longueur de MUC8 mini-satellite serait un facteur de risque pour le développement de cette pathologie (Lee et al., 2018). Des méta-analyses décrivent également qu'une mutation sur le locus CHRNA3/5 des récepteurs nicotiques neuronaux à l'acétylcholine (nAChR) influence fortement le développement de BPCO dans les populations Norvégiennes (Pillai et al., 2009).

Enfin la seule forme connue à l'heure actuelle de BPCO d'origine génétique est causée par un déficit en alpha-1 anti-trypsine (AAT) qui est un inhibiteur de sérine protéase. Une mutation génétique de AAT est connue pour engendrer des maladies pulmonaires chroniques. Ainsi, les patients ayant un déficit en AAT ont un déséquilibre entre protéases et anti-protéases amenant à l'emphysème respiratoire puis à la BPCO (Tuder, 2012).

Tous ces résultats sont encore à confirmer, mais l'association d'un ou plusieurs facteurs génétiques associés à la BPCO permettrait, dans le futur, de pouvoir diagnostiquer précocement les personnes à risque et ainsi limiter l'incidence de la maladie.

## **2. Les facteurs environnementaux**

### **a. La fumée de cigarette**

Le tabagisme est la première cause de développement de la BPCO dans le monde. Concernant l'exposition à la fumée de cigarette, deux populations bien distinctes sont étudiées. La population des fumeurs actifs et celle des fumeurs passifs.

Les fumeurs actifs, sont des personnes s'exposant de manière volontaire au tabac, que ce soit par la consommation de cigarettes, de cigares, ou de tabac à chiquer. La fumée de cigarette va causer une inflammation présente dans l'ensemble du poumon et diminuer les défenses immunitaires chez l'hôte ainsi que l'élasticité du poumon de par son remodelage. De ce fait, ces patients sont plus susceptibles de contracter des infections pulmonaires. Cependant seulement 15 à 30% des fumeurs vont développer une BPCO de manière relativement indépendante de la consommation ou de la durée d'exposition au tabac.

La fumée de cigarette est un élément très toxique. En effet, sa composition contient environ 4000 composants dont la plupart sont hautement toxiques pour l'hôte (<http://www.tabac-info-service.fr>). Les plus connus sont la nicotine et le monoxyde de carbone. Outre le lien établi avec la BPCO, la cigarette cause de multiples maladies comme les cancers (les plus connus sont les cancers de la sphère Oto-Rhino-Laryngée (ORL), du poumon, de la vessie ...), les accidents cardiovasculaires (AVC, maladie coronarienne, ...), les aggravations de l'asthme et les pathologies intestinales (rectocolite hémorragique, maladie de Crohn, colopathies fonctionnelles ...).

Les fumeurs passifs sont ceux qui sont exposés de manière non intentionnelle au tabac. La fumée de cigarette reste toxique même par inhalation indirecte. Les composants de la cigarette restent dans l'environnement extérieur et peuvent atteindre les personnes proches. Il faut également prendre en compte le fait que les fumeurs actifs sont également des fumeurs passifs. De nombreuses études démontrent le risque de développement de la BPCO chez les fumeurs passifs (Eisner et al., 2005). De plus, le tabagisme passif pendant la grossesse représente un risque potentiel sur le développement du fœtus et le risque de malformation.

Un autre facteur important à prendre en compte est la consommation de marijuana. En effet, le nombre de consommateurs est en constante augmentation dans le monde entier. La marijuana est généralement consommée en association avec le tabac et sans filtre. Une étude montre le développement fréquent d'emphysème chez les jeunes patients consommateurs de cannabis qui pourrait conduire dans le futur à de graves pathologies respiratoires de type BPCO (Beshay et al., 2007).

### **b. L'exposition professionnelle**

Certains corps de métier sont considérés comme « à risque » pour le développement de certaines maladies respiratoires, car ils sont en constante exposition à des polluants (Jouneau, 2006).

On distingue différents types de polluants :

- Les polluants industriels (charbon, silice, ciment)
- Les particules fines (gaz d'échappement et nanoparticules)
- Les particules métalliques : (osmium, acier, gaz irritant)
- Les polluants organiques (bois, coton)

Une étude épidémiologique récente sur les expositions relatives au travail montre que celles-ci seraient à l'origine de 21% des cas de BPCO (Lytras et al., 2018).

### **c. La pollution atmosphérique**

Peu de données sont disponibles quant à l'implication de la pollution atmosphérique dans le développement de la BPCO. Cependant, une étude récente datant de 2018, réalisée par Lin et al. a montré que l'exposition aux nanoparticules fines engendrerait des cas de BPCO et serait responsable de 6.4% des cas déjà existants (Lin et al., 2018). De plus, la pollution joue un rôle important dans l'aggravation de la pathologie et le développement d'exacerbation.

### **d. La pollution aérienne intérieure**

Cette pollution intérieure est en majeure partie reliée à l'utilisation de combustibles ménagés sous forme de biomasse tels que le charbon de bois, le fumier, le bois... Ce sont principalement les femmes qui développent une BPCO suite à ce type d'exposition du fait de leur rôle dans l'entretien du domicile et de la cuisine dans de nombreux pays en développement (Jouneau, 2006). Une étude épidémiologique a montré le lien entre le développement de la BPCO chez une personne de sexe féminin et l'exposition à la biomasse (Sana et al., 2018).

D'après Balmes, l'exposition à la pollution de l'air intérieur représente 2.6% des cas de BPCO (Balmes, 2010). D'après le rapport réalisé par le GOLD en 2018, une mauvaise ventilation des foyers augmenterait l'incidence de la BPCO (GOLD 2018 Report).

## **E. Les Traitements de la BPCO**

La BPCO est une maladie pour laquelle aucun traitement curatif n'est actuellement disponible. Les patients ne peuvent donc pas guérir de leur BPCO. Les traitements existants permettent seulement de stabiliser la fonction respiratoire et surtout de limiter les exacerbations de la maladie et l'insuffisance respiratoire.

La première chose à faire pour ces patients est l'arrêt total du tabac. Aucun traitement ne peut être réellement efficace si le patient continue de s'exposer à la fumée de cigarette. La prise d'un traitement médicamenteux va permettre l'atténuation des symptômes. Les différents traitements existants sont les suivants (Table 4) :

- Les bronchodilatateurs qui servent à prévenir de la bronchoconstriction. Il en existe deux catégories, les bronchodilatateurs à courte durée d'action (ex : Ventoline)



prescrits aux patients ayant une BPCO légère ou modérée. Les bronchodilatateurs à longue durée d'action (ex : Foradil) sont prescrits aux personnes atteintes de BPCO sévère voire très sévère.

- Les corticoïdes inhalés pour leurs propriétés anti-inflammatoires (peuvent être utilisés seuls ou en association avec un bronchodilatateur) prescrits chez les patients atteints de stades sévères et très sévères de la BPCO et les patients présentant de fréquentes exacerbations.
- Les antibiotiques pour le traitement des exacerbations de la BPCO. Les patients ont une susceptibilité accrue aux infections pulmonaires notamment par les bactéries. Les pathogènes les plus fréquemment observés sont *Haemophilus influenzae* (NTHi), *Streptococcus pneumoniae* (Sp) et *Moraxella catarrhalis*. Chez les patients ayant une forme sévère de la pathologie, *Pseudomonas aeruginosa* est aussi fréquemment retrouvé (Gallego et al., 2014).

	BPCO légère	BPCO modérée	BPCO sévère	BPCO très sévère
Bronchodilatateurs à courte durée d'action	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>	Non	Non
Bronchodilatateurs à longue durée d'action	Non	Non	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>
Corticoïdes inhalés	Non	Non	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>
Antibiotiques (dans le cas d'une exacerbation)	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>

**Table 4 : Traitements de la BPCO associés aux différents stades de la pathologie.**

La plupart du temps, des traitements non médicamenteux sont associés avec la médication du patient comme la kinésithérapie qui consiste à programmer des exercices de réentraînement physique adaptés aux besoins des patients. L'aérosolthérapie peut également être prescrite et va permettre l'utilisation de bronchodilatateurs et de corticoïdes sous forme nébulisée permettant d'atteindre et de traiter plus efficacement les petites bronches. De plus, la vaccination contre certains agents pathogènes tels que *Streptococcus pneumoniae* et le virus *Influenza* aide les patients à prévenir des exacerbations.

Dans les cas les plus sévères de la maladie, le traitement de l'insuffisance respiratoire chronique et aiguë doit être mise en place. Pour cela, trois méthodes sont fréquemment utilisées :

- L'Oxygénothérapie de Longue Durée (OLD) qui est définie avec la pression sanguine en oxygène pendant un état stable chez le patient. Cette méthode est utilisée dans les cas d'insuffisance respiratoire grave et chronique.

- La ventilation non invasive est mise en place pour le traitement de l'hypoventilation alvéolaire définie par le marqueur biologique de l'hypercapnie. Le traitement commence avec un masque facial pour un traitement court puis un masque nasal est utilisé pour un traitement prolongé.
- Le dernier recours est la chirurgie pulmonaire. Lorsque les traitements ne sont pas ou peu efficaces contre l'emphysème sévère, les patients peuvent avoir recours dans un premier temps à une restriction des zones bulleuses comprimant le parenchyme pulmonaire ou alors à une transplantation pulmonaire.

## **F. Physiopathologie de la BPCO**

### **1. Description de la physiopathologie**

La physiopathologie de la BPCO connaît à ce jour encore de nombreuses zones d'ombre, cependant de multiples études mettent en lumière certains de ses mécanismes (Figure 4).

Les effets du tabac, qui sont responsables de 90% des cas de BPCO vont dans un premier temps déclencher la réponse immunitaire par une activation des cellules épithéliales et des macrophages (Sun et al., 1995). La fumée de cigarette va engendrer un stress oxydatif au niveau du poumon, endommageant l'épithélium respiratoire et induisant le recrutement de neutrophiles et de macrophages (Foronjy et al., 2008). Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la manifestation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la capacité de l'organisme à les détoxifier efficacement. Les dérivés de la fumée de cigarette vont altérer l'épithélium respiratoire en dégradant les lipides de membrane, les protéines et l'ADN, conduisant à une inflammation chronique du poumon (Foronjy et al., 2008). Ainsi les neutrophiles et macrophages recrutés vont à leur tour libérer des ROS tels que le peroxyde d'oxygène et des radicaux superoxydes (Schaberg et al., 1995). De nombreuses fonctions de l'épithélium sont ainsi altérées comme la clairance mucociliaire et la composition du mucus de par son augmentation en viscosité (Siddiqi et al., 2009), ainsi que les gènes codant pour les mucines, engendrant une hyper production de mucus (Fujisawa et al., 2009).

Secondairement, les dommages occasionnés vont engendrer des débris cellulaires (Damaged Associated Molecular Pattern ou DAMP) qui vont entraîner l'activation des Toll Like Receptor (TLR) (Paul-Clark et al., 2009). Les TLR peuvent ainsi être stimulés par la réponse au stress occasionné par la fumée de cigarette induite par l'épithélium respiratoire (Matzinger, 2002) qui va libérer des molécules permettant l'activation des TLR2 et TLR4 induisant la voie de signalisation du Facteur Nucléaire Kappa B (NF- $\kappa$ B) provoquant la sécrétion des médiateurs de l'inflammation et de protéases (Di Stefano et al., 2002). Ainsi les macrophages et les neutrophiles sont recrutés au niveau du poumon (Mio et al., 1997).

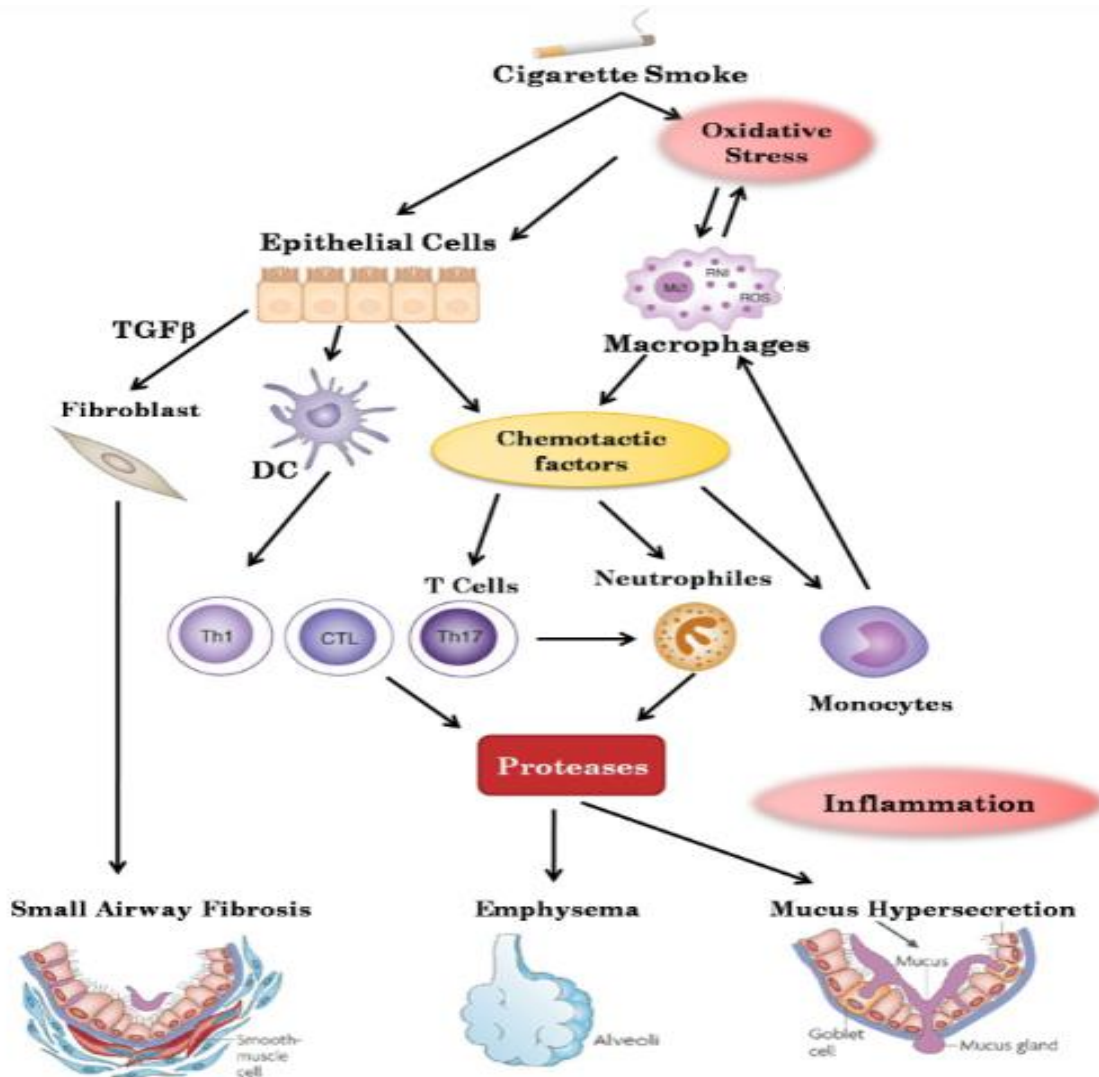
Cette réponse immunitaire innée engendre la production non contrôlée de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires qui vont induire le recrutement de cellules immunitaires telles

que les monocytes/macrophages et les neutrophiles ainsi que la production des métalloprotéases matricielles MMP9 et MMP12 et l'élastase neutrophilique au niveau de la lumière bronchique (Saetta et al., 2001) (Allain et al., 2010). Le remodelage bronchique étant à la base de l'emphysème respiratoire est principalement dû à un déséquilibre entre la production de protéases et d'anti-protéases (Finlay et al., 1997). La présence de protéases est également connue pour être induite par un stress oxydatif. En effet, soumis à un stress oxydatif comme l'exposition à la fumée de cigarette, les neutrophiles et les macrophages libèrent des radicaux oxygénés majorant la réponse immunitaire localisée et induisant un remodelage des bronches pulmonaires (Saetta et al., 2001). Le même phénomène se produit dans les alvéoles. Soumises à ce stress chronique, les cellules endothéliales et épithéliales vont progressivement entrer en apoptose, participant ainsi la destruction de la paroi des alvéoles pulmonaires (Kasahara et al., 2000). De plus, les cellules de l'épithélium pulmonaire, en réponse à la fumée de cigarette, produisent du Facteur de Croissance de Transformation  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Cette cytokine est capable d'induire un remodelage au niveau de l'épithélium entraînant la prolifération des fibroblastes et conduisant peu à peu à la fibrose pulmonaire des petites voies aériennes respiratoires. Le niveau d'expression du TGF- $\beta$  est corrélé avec le degré de fibrose pulmonaire dans la BPCO (Takizawa et al., 2001).

Progressivement, la réponse immunitaire innée va être complétée par une réponse immunitaire adaptative (Cosio et al., 2009). Ce phénomène est principalement lié au recrutement et à l'activation des cellules dendritiques (DC) et secondairement des lymphocytes T. Les DC matures vont exprimer le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II au niveau de leur paroi, et vont exprimer les molécules co-stimulatrices des lymphocytes T, les CD80 et CD86 (Janeway and Bottomly, 1994). Ainsi elles présenteront l'antigène au lymphocyte T localisé au niveau des ganglions lymphatiques. La voie de signalisation STAT4 va être activée dans les lymphocytes T par la cytokine IL-12 synthétisée par les cellules dendritiques matures. Ainsi la différenciation et la prolifération des lymphocytes T en lymphocytes CD4<sup>+</sup> de type Th1 et en TCD8<sup>+</sup> va être effective. La libération d'IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23 par les cellules dendritiques matures et les macrophages va également permettre la différenciation des cellules T en cellules Th17 (Nakagiri et al., 2012). La migration vers le poumon des cellules T se fait après différenciation et prolifération grâce aux chimiokines CXCL-9, CXCL-10, et CXCL-11 produites par les macrophages et les cellules épithéliales (Grumelli et al., 2004).

Lorsque la réponse immunitaire adaptative se met en place (Cosio et al., 2009), les lymphocytes les plus fréquemment retrouvés au niveau pulmonaire vont être les TCD8<sup>+</sup> potentiellement cytotoxiques. Les cellules cibles des lymphocytes TCD8<sup>+</sup> sont toutes les cellules exprimant le CMH de classe I, comme les macrophages, monocytes mais également les cellules épithéliales et endothéliales qui seront ensuite détruites par les phénomènes d'apoptose ou de nécrose (Imai et al., 2005). Les TCD4<sup>+</sup> sont également très mobilisés au niveau du poumon et vont fortement exprimer STAT4 et l'IFN- $\gamma$ . La production d'Interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) est corrélée avec le degré d'obstruction bronchique, ce qui suggère que les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> et TCD8<sup>+</sup> ont un rôle important dans le développement de la maladie (Stefano et al., 2004).

En résumé, la BPCO commence généralement par une inflammation chronique localisée au niveau des bronches respiratoires engendrant l'augmentation des lymphocytes TCD8<sup>+</sup>. Le muscle lisse de la paroi bronchique va s'hypertrophier et l'hyperplasie des cellules épithéliales caliciformes va engendrer une hypersécrétion de mucus qui stagne au niveau des bronches, du fait de la diminution de la fréquence des cellules épithéliales ciliées. Cette différenciation épithéliale anormale associée à une fibrose sous-épithéliale est responsable de l'obstruction bronchique chez les patients (Amatngalim et al., 2018). De plus l'apparition de la BPCO serait corrélée avec la valeur initiale de la fonction respiratoire et le déclin de celle-ci (Kerstjens et al., 1997).



**Figure 4 : Physiopathologie de la BPCO.**

La fumée de cigarette, de par ses composants toxiques, va altérer les cellules composant l'épithélium respiratoire et les macrophages qui vont induire la production de facteurs pro-inflammatoires. Ces facteurs pro-inflammatoires vont permettre le recrutement d'une part des monocytes se différenciant en macrophages amplifiant ainsi la réponse immunitaire au niveau du poumon. D'autre part, des neutrophiles sont recrutés et engendrent la synthèse de protéases, conduisant à l'emphysème respiratoire et à l'hypersecretion de mucus par les cellules épithéliales. Cette réponse inflammatoire étant perpétuellement active. Adapté de (Barnes, 2008).

## **2. Auto-immunité dans la BPCO**

L'auto-immunité consiste à la reconnaissance de peptides du « Soi » comme des particules appartenant au « Non-Soi », engendrant une réponse immunitaire anormale de l'organisme. (Rose and Bona, 1993).

La BPCO est une pathologie chronique, faisant donc d'elle une maladie auto-immune. L'origine circonstancielle de la BPCO est caractérisée par l'augmentation clinique de l'expression des lymphocytes B et T au niveau pulmonaire (Cosio et al., 2009). De plus, les patients BPCO produisent des anticorps dirigés contre l'élastine pulmonaire, ainsi que la production d'IFN- $\gamma$  et d'Interleukine-10 (IL-10). Enfin, des expériences conduites chez la souris, ont montré que des cellules T de poumon de souris exposés à la cigarette transférées chez des souris naïves de type Rag2-/- engendrait une BPCO auto-immune chez l'animal (Motz et al., 2010).

## **3. Recrutement des cellules de l'immunité et impact de la fumée de cigarette**

Les mécanismes de défenses pulmonaires font notamment appel aux cellules de l'immunité telles que les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes, qui vont induire une réponse inflammatoire puis immunitaire. Dans les premières étapes de la pathogénèse, les cellules de l'immunité innée sont responsables à elles seules de l'inflammation dans le cas où le poumon est exposé à la fumée de cigarette (Botelho et al., 2010). En effet, les macrophages et les lymphocytes TCD8<sup>+</sup> sont retrouvés fortement augmentés dans les poumons de patients BPCO tout comme chez des animaux exposés à la fumée de cigarette comparés à ceux qui ne le sont pas (MacNee, 2007) (Cosio et al., 2009).

### **a. Les macrophages**

Les macrophages sont les cellules immunitaires résidentes ou recrutées, les plus abondantes dans les voies respiratoires. Ce sont les premiers à capturer les agents étrangers ou les signaux de danger présents au niveau du poumon et en symbiose avec les cellules épithéliales, ils constituent la première ligne de défense chez l'hôte. En plus de leur implication dans la clairance bactérienne, les macrophages permettent également d'éliminer les débris et la résolution de l'inflammation (Strzelak et al., 2018). Ils ont la capacité de présenter les antigènes aux lymphocytes, fonction qu'ils partagent avec les cellules dendritiques, bien qu'ils aient essentiellement un rôle de maintien dans l'homéostasie au niveau des muqueuses. Lorsque les poumons sont exposés à la fumée de cigarette, une augmentation du nombre de macrophages résidents ayant une morphologie différente est constatée (Domagała-Kulawik et al., 2006) (Pratt et al., 1969). De plus, la fumée de cigarette altère les molécules d'adhésion à la surface de ces macrophages (Schaberg et al., 1992). Il a été démontré que les macrophages peuvent être classés en deux catégories, les macrophages M1 et les macrophages M2 (Gordon and Martinez, 2010). La fumée de cigarette va engendrer une suppression des macrophages M1 et augmenter l'induction des macrophages M2 particulièrement chez les patients BPCO (He et al., 2017) (Shaykhiev et al., 2009). Le nombre

de macrophages résidents est plus élevé chez les fumeurs et reste globalement fonctionnel (McCrea et al., 1994) (Soliman and Twigg, 1992) (Holt, 1987). Cependant leur capacité à phagocyter les bactéries présentes au niveau pulmonaire est considérablement réduite. Ce défaut de clairance a été démontré avec de nombreux pathogènes notamment *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ou en encore *P. aeruginosa* (Phipps et al., 2010) (Drannik et al., 2004). La diminution de la phagocytose par les macrophages participe à la susceptibilité accrue aux infections respiratoires ainsi qu'à l'augmentation de l'inflammation (Strzelak et al., 2018).

### **b. Les neutrophiles**

Les neutrophiles agissent dans le cadre de l'immunité innée au niveau pulmonaire et ont un rôle évident dans la BPCO (Strzelak et al., 2018). En effet, la fumée de cigarette induit le recrutement des neutrophiles au niveau pulmonaire par sa capacité à déclencher la production de DAMP par les cellules épithéliales ce qui va ensuite entraîner la production de cytokine pro-inflammatoire (IL-6) et du facteur chimioattractant (CXCL-8) (Pouwels et al., 2015). Cependant, ce recrutement de neutrophiles ne permet pas d'éliminer les agents infectieux dans le poumon, suggérant que le tabagisme va très certainement altérer leur fonction (Strzelak et al., 2018). Ces cellules activées libèrent dans le poumon des radicaux libres de l'oxygène et des protéases (élastase, MMP-2, MMP-9) qui jouent un rôle important dans l'apparition de l'emphysème.

### **c. Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques jouent un rôle majeur dans l'activation des lymphocytes T par la présentation de l'antigène ainsi que par l'expression membranaire ou la libération de molécules co-stimulatrices et immunostimulantes (Joffre et al., 2009). Les cellules dendritiques induisent la voie de signalisation de l'IL-17 qui dans un contexte pathologique tel que la BPCO, joue un rôle important dans le développement de la maladie (Le Rouzic et al., 2016). En effet, le tabac va fortement influencer la distribution et la différenciation des cellules dendritiques (Soler et al., 1989). Ainsi, la fumée de cigarette réduit le nombre de DC dans la muqueuse bronchique des patients BPCO (Rogers et al., 2008) et nuit à leur maturation dans le poumon causant une stimulation réduite des lymphocytes T par ces cellules (Robbins et al., 2008) (Pichavant et al., 2015). Cela n'empêche pas le développement, probablement en dehors du poumon, d'une réponse Th1 et Th17 pathologique qui a été largement démontrée. De plus, en réponse à une infection bactérienne, les cellules dendritiques ont une capacité réduite à stimuler les lymphocytes T ce qui facilite très probablement le développement des exacerbations de la BPCO (Le Rouzic et al., 2016). La réponse antibactérienne est notamment altérée par un défaut de phagocytose et/ou bactéricide des cellules dendritiques immatures exposées à la cigarette car la production de IL-10, IL-12, IL-23, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  est diminuée (Nouri-Shirazi and Guinet, 2003) (Le Rouzic et al., 2016). De plus, la diminution de production d'IL-12 est responsable d'une réduction de la réponse Th1 qui va conduire à une altération des défenses de l'hôte. La fumée de cigarette agit donc significativement sur la maturation des cellules dendritiques immatures diminuant ainsi la différenciation des lymphocytes T.

#### d. Les lymphocytes

La famille des lymphocytes est vaste et possède de nombreux membres que l'on peut séparer en deux groupes selon le type de reconnaissance à l'origine de leur activation (Antigène spécifique ou non). En effet, on retrouve le groupe des lymphocytes T non conventionnel (non spécifiques d'antigène) avec les ILC (impliqués dans le remodelage tissulaire), les cellules Natural Killer (NK) (des lymphocytes tueurs), les NKT (groupe hétérogène de LT, présentant des propriétés des LT et des NK) et les  $LT\gamma\delta$  (groupe de lymphocytes T impliqués dans l'immunité innée et adaptative, possédant un TCR différent des autres lymphocytes) qui vont intervenir très vite au niveau du site d'inflammation, et le groupe des lymphocytes T conventionnels ayant une intervention plus lente car ils nécessitent la présentation d'antigènes plus spécifiques.

Pendant la réponse immunitaire innée qui est la première à se mettre en place, le rôle des lymphocytes Natural Killer a été très largement décrit. Ce sont des gros lymphocytes granulaires qui produisent des perforines et des granzymes ainsi que du  $TNF-\alpha$  et de l' $IFN-\gamma$  (Caligiuri, 2008). Ils ont un rôle bien connu dans la défense de l'hôte contre les agents microbiens (Zamai et al., 1998). Une étude a montré que le taux de cellules NK ainsi que leur activation dans le sang des fumeurs est diminué, comparé aux non-fumeurs et que cet effet est réversible environ six semaines après la cessation tabagique (Ferson et al., 1979). De plus, une autre étude a montré que la cigarette entraîne une diminution de la concentration en IL-16 produite par les cellules NK. Cette baisse est responsable d'une diminution du recrutement des  $CD4^+$  suggérant que la fumée de cigarette a un impact sur la réponse immunitaire systémique (Andersson et al., 2016). L'expression de la perforine est elle aussi diminuée chez les fumeurs, impliquant donc une activité cytotoxique diminuée des cellules NK, y compris lors d'une infection microbienne (Ferson et al., 1979). Mais quelques études controversent ces données en montrant une stimulation accrue des cellules NK lors d'une exposition aigüe à la fumée de cigarette. En effet, les cellules NK activées peuvent s'accumuler au niveau du parenchyme pulmonaire et de la muqueuse des voies respiratoires (Wang et al., 2013). L'impact du tabac a un rôle controversé concernant les cellules NK montrant à la fois un rôle pro-inflammatoire et anti-inflammatoire de ces cellules. Strzelak & al. font l'hypothèse que cela dépendrait des comorbidités retrouvées chez les patients (Strzelak et al., 2018). De plus, il existe différents sous-types de cellules NK avec des fonctions distinctes dont le rôle n'est pas ou peu précisé dans ce contexte.

Les cellules NKT sont un sous-groupe de lymphocytes T exprimant les marqueurs des cellules T et des cellules NK. Ces cellules constituent environ 0.2% des lymphocytes T circulants. Les cellules iNKT constituent une sous-famille des cellules NKT. Une étude a montré que dans un modèle de souris BPCO généré par injections répétées d' $\alpha$ -Galactosylceramide (agoniste de cellules iNKT, modèle dont on peut discuter l'intérêt) que ces cellules ont un rôle important dans le développement de la pathogenèse par un mécanisme dépendant de l'IL-4 (Tsao et al., 2016). En effet, la neutralisation de l'IL-4 dans ce modèle réduit le recrutement de cellules iNKT, l'emphysème et la fibrose pulmonaire ainsi que l'hyper sécrétion de mucus. Par ailleurs, le stress oxydatif provoqué par la fumée de cigarette augmente la capacité des DC et des

cellules épithéliales bronchiques à activer les cellules NKT qui se traduit par la sécrétion de l'IL-17 et de l'IFN- $\gamma$  (Pichavant et al., 2014). Ce mécanisme participe au développement des lésions pulmonaires consécutives à l'exposition à la fumée de cigarette.

Lors d'une infection respiratoire, la réponse immunitaire adaptative plus spécifique se met en place et le rôle des différents lymphocytes impliqués est considérablement modulé lorsque les poumons sont exposés à la fumée de cigarette :

- Les cellules T régulatrices permettent le maintien et la tolérance aux auto-antigènes et évitent ainsi les maladies auto-immunes et limitent les pathologies inflammatoires. Ce sont des immunosuppresseurs impliqués dans la régulation et la prolifération des cellules T effectrices (Bettelli et al., 2006). Mais le tabac participe à établir un déséquilibre de cette population de lymphocytes. Une étude a par ailleurs montré une diminution du nombre de cellules Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> dans les lavages broncho-alvéolaires de patients BPCO comparé aux patients fumeurs n'étant pas atteints par cette pathologie (Barceló et al., 2008). D'autres auteurs confirment ce défaut de cellules régulatrices chez des patients BPCO qui continuent à fumer par rapport à des sujets fumeurs non BPCO (Hou et al., 2013).
- Les lymphocytes T sont impliqués dans l'immunité adaptative à médiation cellulaire ou humorale. Les cellules T naïves sont activées et se divisent en plusieurs sous-populations à la suite de la reconnaissance de l'antigène (Parkes et al., 2014) (Zhou et al., 2009) (Dutton et al., 1998). La fumée de cigarette va induire des changements importants dans la différenciation des lymphocytes T dans le tissu pulmonaire et dans le sang.
  - o Les lymphocytes T auxiliaires Th1 et Th2 sont des cellules CD4<sup>+</sup>. Les cellules Th1 activent les macrophages en synthétisant de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2 et du TNF- $\beta$  activant ainsi la réponse immunitaire à médiation cellulaire et la protection de l'hôte via la phagocytose (Romagnani, 1999). Les cellules Th2 synthétisent principalement de l'IL-4 et de l'IL-13 induisant la synthèse d'anticorps et inhibant le rôle des macrophages, permettant ainsi une réponse protectrice de l'hôte, indépendante de la phagocytose (en dehors du contexte allergique) (Romagnani, 1999). L'exposition chronique à l'extrait de fumée de cigarette induit l'augmentation des cellules Th1 et Th17 dans le lavage broncho-alvéolaire et va altérer la réponse Th2 au niveau pulmonaire (Shaler et al., 2013) (Harrison et al., 2008) (Van Hove et al., 2008). Cependant cette immunité n'est pas efficace contre la colonisation bactérienne (Shaler et al., 2013). De plus, l'augmentation des cellules Th1 au niveau pulmonaire peut augmenter le risque de développer un emphysème pulmonaire. Même si la réponse Th1 semble augmentée dans un contexte tabagique, ces cellules sont très importantes dans le développement de la pathogenèse et dans la progression de la BPCO (Strzelak et al., 2018).



- Les lymphocytes T auxiliaires Th17 sont des cellules pro-inflammatoires définies par la production de la cytokine IL-17 (Hartigan-O'Connor et al., 2011). La cytokine pro-inflammatoire IL-17A est un régulateur de la réponse immunitaire à médiation cellulaire car elle permet de stimuler de nombreux éléments tels que les facteurs de croissance des cellules épithéliales et mésenchymateuses, favorisant le recrutement des neutrophiles et des macrophages au niveau pulmonaire ainsi que la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires (Ouyang et al., 2008). L'impact de la fumée de cigarette va induire le recrutement des cellules Th17 au niveau du poumon et dans le sang via leur activation par les cellules dendritiques productrices de cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23 (Duan et al., 2012) (Wang et al., 2012) (Vargas-Rojas et al., 2011). Ce recrutement permet l'augmentation de l'IL-17 et d'IL-22 associé à la sécrétion de granzyme et de perforine ainsi qu'au recrutement de lymphocytes TCD8<sup>+</sup>. Cette induction de cellules Th17 est impliquée dans le développement de nombreuses maladies auto-immunes telles que la BPCO et la polyarthrite rhumatoïde. En effet, des études ont constaté une population de cellules Th17 circulant plus élevée chez les patients BPCO (Duan et al., 2012) (Koch et al., 2007). Ce pourcentage de cellules Th17 est également accru localement dans le tissu pulmonaire et les expectorations de patients BPCO (Le Rouzic et al., 2016) (Vargas-Rojas et al., 2011).
- Les lymphocytes B sont des cellules impliquées dans la sécrétion de cytokines et d'anticorps ainsi que dans la présentation de l'antigène. Le tabagisme a montré son action sur la suppression du développement des lymphocytes B ainsi que la production d'immunoglobuline (Ig) (Brandsma et al., 2012). En effet, il a été montré que le taux d'immunoglobuline IgA, IgM et IgG est diminué de 10 à 20% chez les fumeurs et à l'inverse une augmentation de l'IgE est observée (Arnsen et al., 2010) (Burrows et al., 1982) mais ces résultats restent à ce jour encore très controversés. Chez les patients atteints de BPCO, un nombre très élevé de lymphocytes B est retrouvé au niveau des petites voies respiratoires (Hogg et al., 2004) mais une étude montre une diminution des lymphocytes B mémoire au niveau du sang périphérique ainsi qu'une augmentation des T reg chez ces patients en comparaison avec des personnes saines (Brandsma et al., 2009). De plus, ce pourcentage diminué de lymphocytes B dans le sang est accompagné d'un processus de suppression de la différenciation des cellules B à un stade précoce dans la moelle osseuse de souris (Palmer et al., 2011) (Fusby et al., 2010). Différentes sous-populations de cellules B ont été décrites ayant des fonctions soit régulatrices, effectrices et productrices d'anticorps et dans le contexte de la BPCO, une caractérisation approfondie de ces sous-populations s'avère nécessaire pour pouvoir préciser leur rôle dans ce contexte.

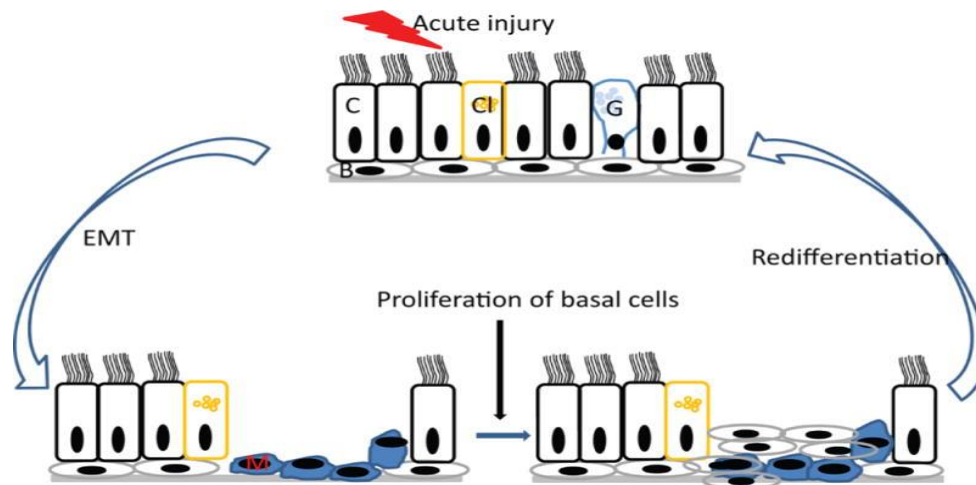
La BPCO est une maladie immunitaire complexe mettant en jeu de nombreux mécanismes inflammatoires ainsi qu'une dérégulation de l'immunité chez les patients. Une fois la pathologie installée, sa progression est marquée par des épisodes d'exacerbation causés par des pathogènes, dans de très nombreux cas d'origine bactérienne. Ces infections pulmonaires à répétition chez les patients vont à leur tour favoriser le développement de nouvelles exacerbations, amenant le patient dans une spirale infernale pouvant le conduire rapidement au décès (50% des patients sujets à une exacerbation sévère meurent dans les 3-4 ans qui suivent).

## **G. Epithélium bronchique et immunité des muqueuses : modulation lors de la BPCO**

Les cellules immunitaires bien que présentes à l'homéostasie, sont mobilisées dans le poumon lors d'une infection ou même d'une pathologie respiratoire telle que la BPCO. Ces cellules proviennent directement de la circulation lymphatique et sanguine gagnant ainsi la muqueuse respiratoire. Les cellules épithéliales, tout comme les autres cellules résidentes (macrophage alvéolaire), participent au recrutement de ces cellules immunes par la production de facteurs chimio-attractants incluant des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires.

### **1. La réparation de l'épithélium bronchique**

La barrière épithéliale est constituée de nombreuses jonctions intercellulaires incluant les jonctions serrées et les jonctions adhérentes. Cependant, cette barrière est sélective puisqu'elle permet le transport des ions et des solutés à travers l'épithélium et facilite le dialogue entre les cellules (Pohl et al., 2009) (Hartsock and Nelson, 2008). De plus ces jonctions interviennent dans le maintien de l'homéostasie, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que la protection contre les agents pathogènes (Balda and Matter, 2009) (Koch and Nusrat, 2009). Les cellules souches retrouvées au niveau de l'épithélium respiratoire sont les cellules basales et les cellules Club. Le nombre et la fonction de ces progéniteurs peut affecter significativement la réparation épithéliale lorsque celui-ci est lésé (Ganesan and Sajjan, 2013). Ce mécanisme de réparation est divisé en quatre étapes : la dédifférenciation, la migration, la prolifération et la redifférenciation (Figure 5).



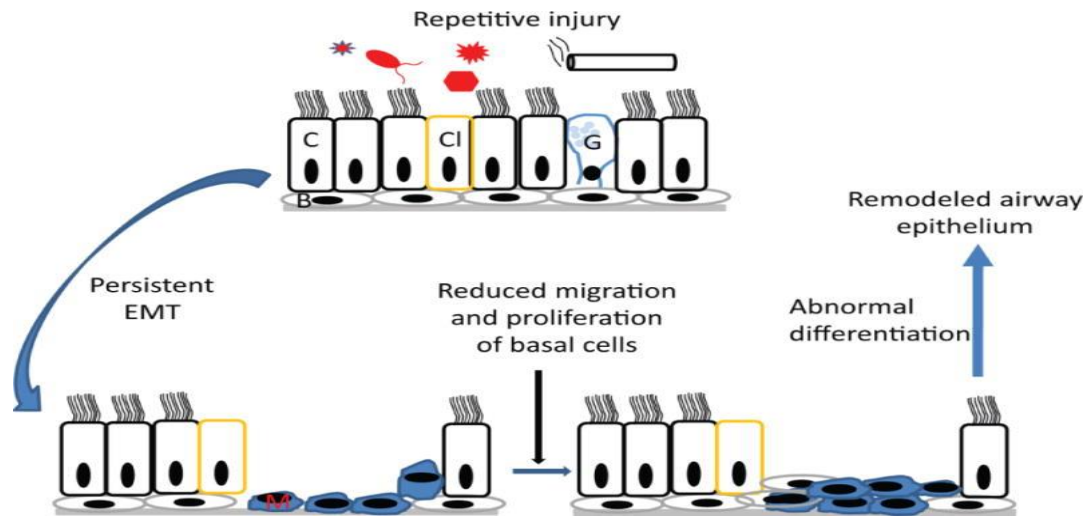
**Figure 5 : Les différentes étapes de la réparation épithéliale.**

*En condition normale, une lésion épithéliale va induire dans un premier temps la phase de Transition Epithéliale Mésochymateuse (EMT) des cellules en périphérie de cette zone qui vont migrer temporairement au niveau de la lésion. Dans un deuxième temps, les cellules basales vont migrer et proliférer dans cette zone et vont ensuite se polariser et se redifférencier pour reformer l'épithélium respiratoire (Ganesan and Sajjan, 2013).*

La phase de dédifférenciation concerne l'aplatissement des cellules lors d'une lésion pour induire le phénomène de transition épithéliale mésochymateuse. Les cellules vont se dépoliariser, induisant une perte de contact et d'adhésion de celles-ci. Certains facteurs sécrétés sont perdus pendant cette phase comme la cytokératine et l'E-cadhérine, et d'autres sont acquis comme la vimentine, MMP-9, l'actine- $\alpha$  et la N-cadhérine (Kalluri and Weinberg, 2009) (Buisson et al., 1996). L'étape de migration arrive par la suite et est rendu possible grâce à l'expression de la fibronectine (Zahm et al., 1997). Suivant la taille de la lésion occasionnée, cette phase de migration va durer entre 8h et 15h pour recouvrir complètement la blessure par des cellules aplaties indifférenciées (Erjefält et al., 1995).

Après la migration, c'est la phase de prolifération cellulaire qui prend le relais. Cette étape se met en place lorsqu'il y a suffisamment de facteurs de croissance sécrétés par les cellules résidentes et immunitaires au niveau du site de blessure (Erjefält et al., 1995). Ce sont les différents membres des familles de l'Epidermal Growth Factor (EGF) et du TGF qui vont induire ce phénomène de par leur liaison à l'EGFR ou du récepteur pour le TGF (Puddicombe et al., 2000). Pour terminer la réparation des cellules épithéliales respiratoires, la différenciation des cellules prolifératives est mise en place grâce aux cellules progénitrices et l'interaction cellule-cellule médiée par la voie de signalisation NOTCH (Tsao et al., 2009). D'autres facteurs de transcription comme les SOX, FOX, TTF-1 et SPDEF sont également essentiels (Whitsett et al., 2011). En effet, la différenciation des cellules épithéliales ciliées est induite par le facteur de transcription FOXJ1 (Whitsett et al., 2011) et la différenciation des cellules caliciformes est médiée par le facteur SPDEF qui est impliqué dans la régulation des gènes associés à la biosynthèse des mucines et à son conditionnement dans des vésicules (Chen et al., 2009) (Park et al., 2007).

Chez les patients BPCO on observe une altération au niveau des jonctions qui interviennent dans l'homéostasie, dans les différentes phases de la réparation cellulaire et dans la protection contre les agents extérieurs. La principale cause du remodelage de l'épithélium des voies respiratoires chez les patients BPCO est l'exposition chronique aux résidus inflammatoires retrouvés dans la cigarette, conduisant à une activation persistante et accrue du processus de réparation (Figure 6).



**Figure 6 : Altération des mécanismes de réparation épithéliaux en contexte BPCO.**

Chez les patients BPCO, la phase EMT va persister. Les phases de migration et de prolifération sont considérablement réduites et la redifférenciation des cellules basales est anormale conduisant à un épithélium remodelé. (C, cellules ciliées; Cl, cellules de Clara, G, cellules caliciformes, B, cellules basales et M, cellules mésenchymateuses) (Ganesan and Sajjan, 2013).

Chez ces patients ainsi que chez les fumeurs, une diminution d'expression des gènes codants pour la formation des complexes fonctionnels est observée, engendrant des cellules anormalement différenciées et hyper prolifératives (Shaykhiev et al., 2011) (Hogg and Timens, 2009). De plus, chez les patients BPCO et certains fumeurs, la réparation est anormale du fait de nombreuses lésions occasionnées par la fumée de cigarette. En effet, la phase EMT est omniprésente chez ces patients comme le montre une diminution de la Zonula Occludens-1 (ZO-1), cytokératine et E-cadhérine ainsi qu'une augmentation des marqueurs de cellules mésenchymateuses dans les tissus et biopsies de ces patients (Milara et al., 2013) (Sohal et al., 2011) (Sohal et al., 2010). De plus, le TGF- $\beta$  qui induit fortement la phase EMT, est retrouvé augmenté chez les patients BPCO (Gao and Zhan, 2012) (Takizawa et al., 2001). Enfin, la diminution d'expression de TTF-1 induit une surexpression de SPDEF conduisant à l'hyperplasie des cellules caliciformes (Park et al., 2007). Cette métaplasie est très souvent retrouvée chez les patients BPCO. Il a également été montré que la métaplasie de ces cellules est corrélée avec une augmentation de l'activité de la voie de signalisation NOTCH1 (Rock et al., 2011) (Guseh et al., 2009). En accord avec ces résultats, le gène *Hey2* (régulateur de la voie de signalisation NOTCH1) est très fortement exprimé chez les patients BPCO (Boucherat et al., 2012).

## **2. La clairance muco-ciliaire**

Les mucines sécrétées ont un rôle très important car elles sont capables de lier certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* via son flagelle (Li et al., 1997). D'autres protéines présentes dans le surfactant pulmonaire comme les collectines sont également impliquées dans la clairance bactérienne car elles reconnaissent les PAMP comme le LipoPolySaccharide (LPS) ou les polysaccharides de capsules (Iwaarden et al., 1994) (Kabha et al., 1997). Ces protéines ont également la propriété de moduler la réponse inflammatoires en agissant avec le CD14 des macrophages permettant l'inhibition du TNF- $\alpha$  (Sano et al., 1999) ou avec le TLR2 (Murakami et al., 2002). Lorsque le mucus va capter un « corps étranger », la clairance muco-ciliaire permet leur élimination. Cette clairance est rendue possible grâce aux cils des cellules épithéliales qui vont coordonner leurs battements pour exclure le mucus du poumon (Blake, 1974). La variation de la fréquence de battement des cils joue un rôle essentiel dans le transport du mucus (Lee et al., 2011) (Lubkin et al., 2007). De plus, une étude a montré à partir d'un système numérique 2D que la fréquence de battement des cils et la viscosité du mucus sont deux paramètres qui jouent un rôle important dans le processus de transport muco-ciliaire (Sedaghat et al., 2016).

De ce fait, chez les patients BPCO, la clairance muco-ciliaire est altérée. Cette altération est due en partie à une surproduction de mucus, un battement des cils réduit et une viscosité élevée du mucus (Ganesan and Sajjan, 2013). Chez ces patients l'augmentation de la production de mucus est liée à la métaplasie et l'hyperplasie des muqueuses (Curran and Cohn, 2010) ainsi qu'une diminution de l'expression de l'Aquaporine-5 (AQP5) basale qui est fortement altérée par l'exposition à la fumée de cigarette (Wang et al., 2007). De plus, une réduction du gène Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) a été démontrée chez ces patients (Sloane et al., 2012). Lorsque les cellules épithéliales bronchiques des patients BPCO sont isolées, une conservation du phénotype de l'hyperplasie des cellules caliciformes ainsi que la surproduction de mucus sont observés. Enfin, l'escalator muco-ciliaire est altéré par une diminution de 70% du nombre de cellules ciliées, ainsi qu'une réduction de la taille des cils présents sur celles-ci (Tamashiro et al., 2009).

## **3. Production de facteurs de croissance et pro-inflammatoires**

De par leur rôle de barrière protectrice, les cellules de l'épithélium bronchique permettent l'induction et la régulation de l'inflammation par le recrutement de cellules immunitaires (Table 5). Elles sont capables d'exprimer des molécules du CMH ainsi que l'InterCellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) et de sécréter des cytokines et chimiokines permettant le recrutement de cellules immunes (Krunkosky et al., 1996) (Striz et al., 1999). Les cellules épithéliales bronchiques sont capables de sécréter la Lymphopoïétine Stromale Thymique (TSLP) permettant la polarisation des lymphocytes T en réponse à la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques. En effet, TSLP va empêcher la production d'IL-12 par les cellules dendritiques conduisant ainsi dans de nombreux cas à la polarisation des lymphocytes T en lymphocytes Th2 (Kato et al., 2007). Ces cellules produisent également des facteurs

inflammatoires comme l'IL-6, CXCL-8, l'histamine et le Facteur de Stimulation de Colonies Granulocytes/Macrophages (GM-CSF) en réponse aux motifs bactériens (Takizawa et al., 1995). Lorsqu'elles sont exposées à *Haemophilus influenzae non typable* elles produisent davantage de ces facteurs comme CCL5, IL-6, CXCL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF et augmentent l'expression d'ICAM-1 au niveau de l'épithélium bronchique (Khair et al., 1996). Ces résultats pris ensemble font de l'épithélium respiratoire un acteur impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire et de l'immunité innée.

Facteurs liés à l'inflammation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chimiokines : CCL2, 3, 5, 7, 8, 11, 13, 17, 20, 22 et CXCL1, 5, 8, 10.</li> <li>- Cytokines : IL-1<math>\alpha</math>/<math>\beta</math>, IL-6, IL-10, IL-11, IL-16 et TNF-<math>\alpha</math>.</li> <li>- Facteurs de croissance : GM-CSF, G-CSF, TGF-<math>\beta</math>, EGF, FGF, PDGF</li> </ul>
--------------------------------	---

**Table 5 : Sécrétion de facteurs permettant l'inflammation (Chimiokines, cytokines et facteurs de croissance) par l'épithélium respiratoire (Message and Johnston, 2004).**

#### **4. Interaction entre les bactéries et les cellules épithéliales bronchiques**

##### **a. La production de facteurs antimicrobiens**

Le mucus respiratoire est connu pour synthétiser de nombreuses molécules ayant un pouvoir antimicrobien et jouant un rôle dans la régulation de l'inflammation (Bals and Hiemstra, 2004) (Takizawa, 1998). Ces peptides comprennent les  $\beta$ -défensines agissant au niveau des lipopolysaccharides de la membrane bactérienne Gram négatif et d'autres peptides antimicrobiens tels que LL-37 et CAP-18 sont également présents (Bals et al., 1998) (Sun et al., 2014). Les principaux peptides antimicrobiens synthétisés par l'épithélium respiratoire sont les  $\beta$ -défensines et les cathélicidines (LL-37) (Hiemstra, 2007). Le lysozyme et la lactoferrine qui agissent sur les bactéries à Gram positif et négatif, sont retrouvés en grande quantité dans le mucus (Travis et al., 1999). Les protéines du surfactant pulmonaire comme la lactopéroxydase possèdent également des propriétés bactéricides (Gerson et al., 2000). Les cellules basales de l'épithélium produisent également SLPI et la RNase7 qui sont des protéines de défense de l'hôte (HDP) dont le rôle est de protéger l'épithélium contre les sérines protéases et de contrôler la prolifération bactérienne (Amatngalim et al., 2015).

Lors d'une infection bactérienne au niveau des voies respiratoires, tous ces peptides antimicrobiens sont augmentés (Hiemstra, 2015). Par exemple dans le cas d'une infection à *Sp* de l'épithélium respiratoire humain, une forte augmentation des  $\beta$ -défensines (DEFB2 et DEFB3) est observée (Scharf et al., 2012). De plus il a été montré que la vitamine D régule l'expression de ces peptides antimicrobiens. Lorsque celle-ci est active, une augmentation de LL-37 est constatée (Hansdottir et al., 2008). Dans les cas de la BPCO et d'autres maladies respiratoires chroniques ou le remodelage épithélial est très important, une diminution des peptides antimicrobiens a été démontrée (Hiemstra et al., 2015) (Seiler et al., 2014).

### **b. La défense antibactérienne est altérée par l'exposition à la fumée de cigarette**

De nombreuses données disponibles à ce jour prouvent que le tabagisme augmente l'incidence des infections respiratoires des voies aériennes supérieures et inférieures. Les PRR qui sont essentiels à la reconnaissance et l'activation de l'inflammation lors de l'invasion bactérienne sont activés par les PAMP (Damage Associated Molecular Patterns). Cependant, la fumée de cigarette de par ses composants toxiques, induit la mort cellulaire libérant des DAMP qui conduisent notamment à l'augmentation de la production de CXCL-8, IL-1 $\beta$  et IL-6 (Hodge et al., 2005) (Pouwels et al., 2015). Ces résultats permettent de définir un mécanisme par lequel la cigarette seule induit le phénomène inflammatoire au niveau pulmonaire. Sur des cellules épithéliales exposées à l'extrait de fumée de cigarette, la stimulation par des DAMP issus des bactéries *NTHi*, *Moraxella catarrhalis* ou encore *Staphylococcus aureus* révèle une diminution de production de facteurs pro-inflammatoires ainsi qu'une diminution du recrutement des neutrophiles (Zhang et al., 2011) (Kulkarni et al., 2010) (Laan et al., 2004). De plus, en réponse au LPS bactérien, les cellules épithéliales vont libérer une quantité plus faible d'IL-8 et de GM-CSF après exposition à la fumée de cigarette (Laan et al., 2004). La libération de peptides antimicrobiens tels que les  $\beta$ -défensines 1 et 2, CCL20 et SLPI est inhibée lorsque les cellules épithéliales nasales et gingivales sont exposées à la cigarette (Jukosky et al., 2016) (Mahanonda et al., 2009). Une étude a montré que l'exposition à la cigarette augmentait l'expression des récepteurs du facteur d'activation des plaquettes (PAFR) sur lequel peut se fixer le pneumocoque au niveau des cellules épithéliales des petites voies respiratoires permettant une meilleure adhérence du pathogène sur ces cellules (Grigg et al., 2012). L'ensemble de ces résultats démontre un défaut de la réponse immunitaire innée lors d'une infection bactérienne incluant une diminution de la défense chez l'hôte, un retard de la pathogénèse ainsi qu'une colonisation chronique des voies respiratoires en présence d'une exposition à la fumée de cigarette (Garmendia et al., 2012) (Drannik et al., 2004).

Le plus grand fléau existant chez les patients atteints de BPCO, sont les exacerbations de la pathologie causées par des agents pathogènes tels que les bactéries voire même les virus. Pour mieux prévenir de ces épisodes d'exacerbation il est important de se focaliser sur les études déjà réalisées sur ces pathogènes.

#### IV. Les pathogènes impliqués dans les exacerbations de la BPCO : zoom sur *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae non typable*

Depuis plusieurs années, les médecins s'intéressent aux différentes causes des exacerbations de la BPCO. Les exacerbations peuvent être d'origine bactérienne, virale ou d'origine non infectieuse (Figure 7). Des études ont révélé que les origines d'exacerbation de la BPCO étaient dans 50% des cas dus à une infection bactérienne (Monsó et al., 1995) (Pela et al., 1998). Dans environ 50-60% des cas, les bactéries isolées étaient : *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* et *Streptococcus pneumoniae* (Murphy and Sethi, 1992) (Sethi and Murphy, 2001).

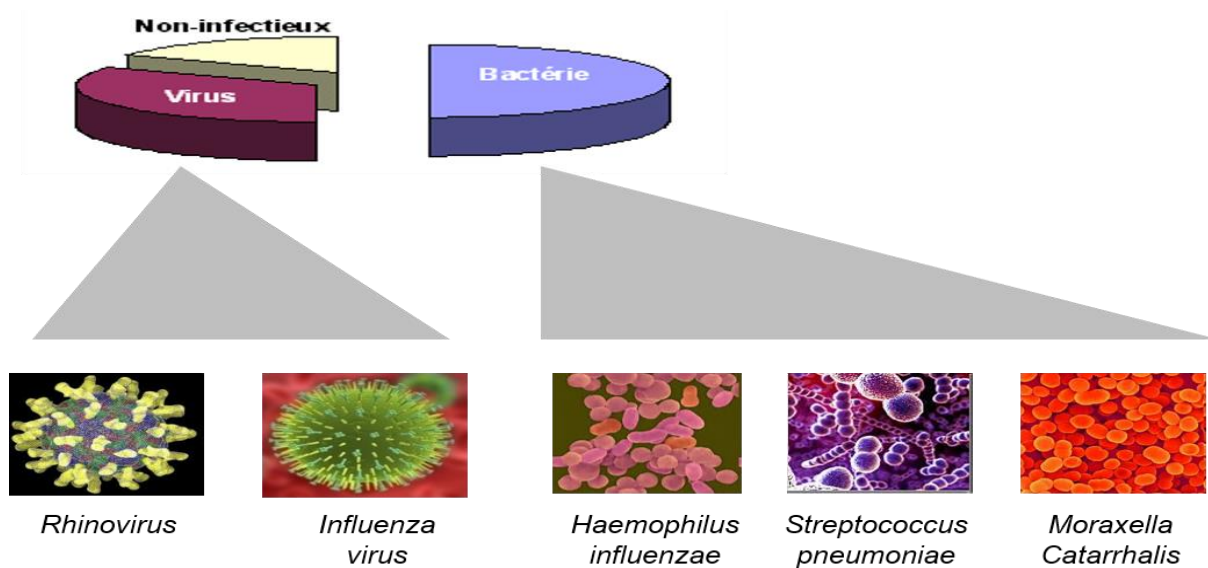


Figure 7 : Cause des exacerbations de la BPCO.

Les origines principales des exacerbations sont bactériennes avec comme bactéries les plus fréquemment retrouvées *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis*. Ces exacerbations peuvent également être d'origine virale, causées principalement par le *Rhinovirus* et le *virus Influenza* (Martinez, 2007) (Sykes et al., 2007) (Rohde et al., 2003).

##### A. *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* (Sp) (également appelé pneumocoque) est une bactérie pathogène responsable d'infections pulmonaires chez l'homme. Le pneumocoque est une bactérie commensale des muqueuses des voies respiratoires et est plus fréquemment retrouvé chez les patients atteints de bronchites chroniques. Il existe 90 sérotypes pour ce pathogène, compliquant ainsi les mécanismes de défense de l'hôte infecté. C'est au contact d'autres agents infectieux ou lorsqu'il y a un immunodéficit chez le porteur que celui-ci devient pathogène. *Streptococcus pneumoniae* est une bactérie aérobie stricte, Gram positif en forme de coque, utilisant le mode de groupement en chaînettes. Il appartient à la division des *Firmicutes*, à la classe de *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacilliales* et à la famille des *Streptococcaceae*. En 1881, ce sont les scientifiques microbiologistes Louis Pasteur et George



Sternberg qui ont découvert de manière indépendante cette bactérie. Cependant, il semblerait que la première description de la maladie remonte à l'époque de la Grèce antiques.

Ce pathogène est à l'origine de nombreuses maladies. Principalement connu pour engendrer la pneumonie, il est également impliqué dans les pleurésies et les bronchites. *Streptococcus pneumoniae* peut également causer des infections de la sphère ORL.

## **1. Epidémiologie**

Depuis plusieurs années, le pneumocoque est décrit comme étant à l'origine de nombreuses infections chez l'homme comme l'otite, la sinusite et dans les cas les plus graves la méningite et est considéré comme un problème majeur de santé publique selon l'OMS. La population la plus exposée est celle des enfants ayant un âge inférieur à deux ans (Austrian, 1999) (Austrian, 1981) et l'incidence diminue ensuite entre cinq ans et soixante-cinq ans (Örtqvist et al., 2005). En effet, en l'an 2000, *S. pneumoniae* a entraîné une mortalité de 11% chez les sujets âgés de moins de cinq ans (O'Brien et al., 2009).

De plus il a été constaté que les personnes atteintes de certaines pathologies comme le diabète, les insuffisances rénales, les syndromes néphrotiques, les pathologies chroniques respiratoires (ex : BPCO) ou même certaines pathologies cardiaques sont plus susceptibles de présenter des infections à pneumocoque. Les personnes ayant un système immunitaire défaillant (ex : le Syndrome de l'ImmunoDéfiance Acquise (SIDA)), ou encore la prise de certains médicaments comme les immunosuppresseurs favorisent également son développement.

## **2. Traitement et prévention contre *Streptococcus pneumoniae***

Lorsque le pneumocoque va coloniser les voies respiratoires, l'utilisation d'antibiotiques est nécessaire. Cette bactérie est normalement sensible aux antibiotiques tels que les pénicillines qui vont inhiber la synthèse de la paroi bactérienne en interagissant avec le peptidoglycane, les macrolides qui vont se fixer sur les ribosomes et ainsi bloquer la synthèse protéique, et les sulfamides qui vont agir sur la synthèse du folate et ainsi bloquer la transcription de l'Acide RiboNucléique (ARN). Cependant le pneumocoque comme n'importe quelle souche bactérienne peut développer une résistance aux antibiotiques.

Pour lutter en partie contre ces résistances aux antibiotiques, des moyens de prévention utilisant la vaccination existent pour éviter de contracter certaines infections à pneumocoque.

- Le vaccin Prevenar-13 permet l'immunisation contre 13 souches. Ce vaccin a fait ses preuves dans une étude montrant une diminution des infections invasives à pneumocoque aux Etats-Unis chez les enfants vaccinés en routine (Grijalva et al., 2007).
- Il existe également le vaccin Pneumovax qui permet l'immunisation contre 23 souches. Ce vaccin est utilisé principalement pour les personnes en situation de risque.

## **B. Haemophilus influenza non typable**

Le bacille de Pfeiffer également connu sous le nom de *Haemophilus influenza* a été découvert par le docteur Robert Pfeiffer en 1892. Longtemps considéré comme l'agent responsable de la grippe avant la découverte de l'étiologie virale, ce bacille est une souche commensale de la sphère ORL. Lorsqu'il devient pathogène sous sa forme non capsulée, *Haemophilus influenza non typable* (NTHi) est responsable de conjonctivites, de pharyngites et d'otites.

*H. influenza non typable* est un cocobacille (petit bacille) Gram -, non capsulé. Cependant lorsqu'il se retrouve dans un liquide biologique (ex : expectoration), le cocobacille possède une forme plus allongée. NTHi appartient à la division des *Proteobacterias*, à la classe gamma *Proteobacteria*, à l'ordre des *Pasteurellales* et à la famille des *Pasteurellaceae*.

### **1. Epidémiologie**

La souche virulente capsulée *Haemophilus influenza de type b* qui provoque des maladies invasives telles que la septicémie, la méningite et la pneumonie chez le jeune enfant de moins de cinq ans, a vu sa prévalence chutée depuis les années 1989 avec la mise sur le marché du vaccin anti-Hib (Whittaker et al., 2017). Actuellement, c'est la souche NTHi qui est à l'origine de nombreuses affections de la sphère ORL qui est une des principales causes d'infection en Europe (van Wessel et al., 2011) (Resman et al., 2011) et aux Etats-Unis (MacNeil et al., 2011).

Entre 2007 et 2014 en Europe, le niveau moyen d'infection par *H.influenzae* était de 0.6 cas pour 100000 personnes. Dans ces chiffres NTHi a causé 78% de ces infections chez des enfants âgés entre un mois et vingt ans (Whittaker et al., 2017).

### **2. Traitement et prévention contre Haemophilus influenza**

Dans 80% des cas *Haemophilus influenza* est sensible à l'amoxicilline agissant sur les mécanismes de transpeptidation permettant la formation du peptidoglycane. L'amoxicilline est très souvent associé à des inhibiteurs de pénicillinases pour lutter contre l'action des béta-lactamases synthétisées par la bactérie pour se défendre. *Haemophilus influenza* est également sensible aux molécules d'antibiotiques de la famille des fluoroquinolones et aux céphalosporines agissant respectivement sur : la topoisomérase IV et l'ADN gyrase qui sont des enzymes impliqués dans le déroulement/super-enroulement de l'ADN et sur la synthèse du peptidoglycane en rentrant en compétition avec les transpeptidases bactériennes.

Concernant la prévention dirigée contre *H. influenza* des vaccins contre la souche B (forme capsulée) sont utilisés :

- Les vaccins monovalents avec Act-Hib et Hibest.
- Les vaccins associés avec Infanrixquinta, Pentacoq, Pentavac, Hexavacet, Infanrix hexa.

A partir du 1<sup>er</sup> juin 2018 en France, la vaccination sera obligatoire pour tous les enfants nés à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2018 dans les 18 premiers mois de leur vie. De plus une étude américaine a constaté que la vaccination des jeunes enfants diminue la propagation de l'infection, mais ces résultats n'ont pas été observés chez les adultes (Rubach et al., 2011).

### **C. Réponse immunitaire dirigée contre les bactéries : spécificité de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenza non typable***

Lors d'une infection respiratoire d'origine bactérienne, l'épithélium va être avec les macrophages, la première ligne de défense mise en place permettant d'éviter l'infection. Les bactéries expriment des PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) comme l'Acide LipoTéichoïque (LTA) sécrété par les bactéries Gram négatif qui sont des signaux pathogéniques, détectés par les PRR (Pattern recognition receptor) exprimés à la surface des cellules immunitaires résidentes. L'activation des PRR va permettre la mise en place de l'immunité innée et va également servir à initier l'immunité adaptative.

Les bactéries *S. pneumoniae* et *H. influenzae* sont des bactéries à multiplication extracellulaire. Contrairement aux bactéries à multiplication intracellulaire (ex : *Bartonella*, *Coxiella*, *Rickettsia*,...). Les bactéries à multiplication extracellulaire n'ont pas besoin de se développer dans les cellules hôtes pour survivre. L'immunité de l'hôte va ainsi être rapidement mise en place contrairement au cas des bactéries intracellulaires qui vont détourner la machinerie cellulaire à leur dépend, leur permettant ainsi d'échapper à la surveillance du système immunitaire.

#### **1. Mise en place de la réponse immunitaire**

La mise en place de la réponse immunitaire innée de l'hôte se fait grâce à la reconnaissance par les PRR (TLR, NOD).

##### **a. Les Toll Like Récepteurs**

Les TLR sont cruciaux pour la mise en place du système immunitaire inné. En effet, cette famille de récepteurs composée de treize membres annotés de TLR1 à TLR13 chez l'homme et chez la souris, permet la reconnaissance de motifs moléculaires hautement conservés présents chez les pathogènes aussi bien d'origine bactérienne, que virale et parasitaire. Les adaptateurs Myd88 et l'IL1-R-associated serine kinase (IRAK) sont essentiels au bon fonctionnement de la signalisation de la majorité des TLRs chez l'humain (Medzhitov et al., 1997).

Pour la reconnaissance bactérienne ce sont les TLR2, 4 et 9 qui sont impliqués :

- Les hétérodimères TLR1-2 et TLR2-6 vont reconnaître l'acide lipotéichoïque (LTA) sécrété par la paroi des bactéries à Gram positif comme *S. pneumoniae* (Schwandner et al., 1999). Cependant Galdiero & al. ont montré que le TLR2 reconnaît les porines

exprimées par *H. influenza* qui est une bactérie à Gram -, permettant d'induire la production de cytokines par les monocytes (Galdiero et al., 2004).

- Le TLR4 est activé par le lipopolysaccharide (LPS) présent dans les bactéries Gram négatif comme *H. influenza*. Mais d'après Srivastava & al., celui-ci peut également reconnaître la pneumolysine présente chez le pneumocoque (Srivastava et al., 2005). Cependant, le rôle du TLR4 dans l'infection à *S.pneumoniae* reste encore partiellement méconnu.
- Le TLR9 : reconnaît les motifs de l'ADN, Cytosine-Phosphate-Guanosine hypométhylé (CpG) chez les bactéries de manière générale. Albiger & al. ont montré que les souris déficientes en TLR9-/- ont une survie considérablement diminuée lorsqu'elles sont challengées avec le pneumocoque au niveau du tractus respiratoire suggérant ainsi l'importance des macrophages alvéolaires résidents (Albiger et al., 2007).

#### **b. Les Nucleotides Oligomerization domain Receptors**

Les NLR sont des protéines cytoplasmiques cellulaires permettant entre autre aux cellules de reconnaître des motifs moléculaires conservés d'origine bactérienne lors de la phagocytose. Les membres les plus étudiés de cette famille sont NOD1 et NOD2. NOD1 va intervenir dans la reconnaissance des bactéries à Gram négatif via la reconnaissance de l'acide gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimélique (D-Glu-meso-DAP), présent dans la paroi bactérienne. NOD2 lui va reconnaître le muramyl dipeptide (MDP) composant la paroi des bactéries Gram positif et Gram négatif (Philpott and Girardin, 2004).

Récemment, une étude menée par Van Lieshout & al. remet en cause le paradigme actuel en montrant que lors d'une infection à *S.pneumoniae*, l'inflammasome NOD-Like Receptor family Pyrin domain 3 (NLRP3) nuirait aux défenses de l'hôte (van Lieshout et al., 2018).

#### **c. Le rôle du complément**

Le complément a un rôle important dans les infections à pneumocoque. En effet la phagocytose est un élément clé dans la mise en place du système immunitaire inné, et le complément permet de faciliter cette étape par le phénomène d'opsonisation. Il existe trois voies de signalisation induites par les différentes protéines du complément : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne (Sarma and Ward, 2011). La protéine C3 est une des protéines les plus importantes car elle est impliquée dans les différentes voies du complément. Une étude a montré chez la souris, qu'un défaut d'expression de la protéine C3 entraîne une susceptibilité accrue à l'infection par *S. pneumoniae* (Brown et al., 2002)

## **2. L'immunité innée**

Les cellules résidentes, en réponse à une infection bactérienne, vont sécréter de nombreuses molécules comme les chimiokines, les cytokines et les peptides antimicrobiens, permettant d'activer la réponse immunitaire innée. Ce mécanisme permet le recrutement des cellules immunitaires capables d'éliminer des pathogènes au niveau du site d'infection. Les cellules permettant cette élimination sont les suivantes :

### **a. Les macrophages alvéolaires**

Les macrophages alvéolaires, sont des cellules immunitaires résidentes au niveau du poumon, ce qui en fait la première ligne de défense lors d'une infection des voies respiratoires. Mais les macrophages ont également un rôle dans le contrôle de l'inflammation pendant une infection pulmonaire. Les résultats de Dockrell & al montrent que les macrophages alvéolaires sont capables d'internaliser le pneumocoque prouvant donc leur rôle dans la clairance bactérienne (Dockrell et al., 2003). De plus, un article publié récemment, montre que dans le cas d'une co-infection avec le virus de la grippe, le pneumocoque inhibe l'activité antimicrobienne des macrophages alvéolaires. Cet article souligne le rôle crucial de la signalisation induite par l'IL-1 dans le maintien de la fonction effectrice des macrophages contre l'infection à pneumocoque dans ce contexte particulier de surinfection (Bansal et al., 2018). Dans le cas d'une infection à *NTHi*, des travaux ont montré le rôle de TRIM29 (E3 ubiquitine Ligase) comme ayant un rôle négatif pour les macrophages alvéolaires, montrant un défaut de clairance du pathogène (Xing et al., 2016) tandis qu'une autre étude montre l'importance des sulforaphanes (composé qui augmente la production d'anti oxydant et les défenses anti-inflammatoires et antibactériennes) dans l'activation de la voie NFR2 et la phagocytose des macrophages alvéolaires chez des patients BPCO fumeurs dans le cas d'une infection à *NTHi* (Harvey et al., 2011).

### **b. Les neutrophiles**

Les neutrophiles jouent un rôle majeur lors d'une infection bactérienne. Les souris déficientes pour le récepteur CXCR2<sup>-/-</sup> (un récepteur essentiel dans le recrutement des neutrophiles) ont au cours d'une infection à pneumocoque, une charge bactérienne pulmonaire plus élevée accompagnée d'une diminution de leur survie suggérant l'importance de ces cellules dans le contrôle de l'infection (Herbold et al., 2010). D'autres études chez la souris montrent que le pathogène *NTHi* est très vite éliminé au niveau du poumon mais qu'il laisse derrière lui une inflammation pulmonaire persistante. L'utilisation d'aspirine déclenche la production de la résolvine D1 et augmente entre autre le recrutement de neutrophiles au niveau du poumon et du lavage broncho alvéolaire ce qui permet une diminution de la charge bactérienne et de l'inflammation (Croasdell et al., 2016).

Les neutrophiles possèdent également un autre rôle. Ils sont capables de créer des « pièges extracellulaires » qui sont des longues structures d'ADN recouvertes de diverses protéines

émanant de leurs granules. Ces pièges extracellulaires immobilisent et induisent la mort des micro-organismes. Ces pièges sont médiés par la production d'IFN- $\gamma$  agissant ainsi sur la clairance du pneumocoque (Yamada et al., 2011) (Gomez et al., 2014). En revanche aucune donnée n'est répertoriée concernant une infection par *NTHi*. Cependant Yamada & al., soulignent dans leur article que lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, une expression génique d'IFN- $\gamma$  est observée mais cette expression n'est pas retrouvée au niveau protéique (Yamada et al., 2011). Ces données peuvent suggérer que les « pièges extracellulaires » mis en place par les neutrophiles agiraient uniquement sur les bactéries Gram positif.

### c. Les cellules iNKT

Lors d'une infection à *S. pneumoniae*, les cellules iNKT vont être stimulées par l' $\alpha$ -mannosyl glycolipide de la bactérie (Shimamura et al., 2017). Au laboratoire, des travaux ont montré qu'un traitement par  $\alpha$ -galactosylceramide lors de la phase précoce d'une infection au virus influenza diminue les risques d'infection à *S. pneumoniae* dus à l'activation exogène des cellules iNKT (Barthelemy et al., 2016). Une autre étude utilisant un traitement combiné avec l' $\alpha$ -galactosylceramide et la protéine antigénique P6 présente chez *H. influenza*, va activer de manière précoce les iNKT permettant ainsi une immunité protectrice contre les otites moyennes induites par *NTHi* (Noda et al., 2010).

### d. Les Lymphocytes $T\gamma\delta$

Les cellules  $T\gamma\delta$  appartiennent à la sou-famille des lymphocytes T non-conventionnels. Ce qui les différencie, c'est la nature de leur Récepteur des Cellules T (TCR). Le nombre de ces lymphocytes augmente pendant une infection bactérienne. Au laboratoire, les travaux de Hassane & al. ont montré la dynamique moléculaire et cellulaire des lymphocytes  $T\gamma\delta$  et leur implication dans la défense de l'hôte lors d'une infection pulmonaire à *S. pneumoniae* impliquant l'activation primaire des neutrophiles (Hassane et al., 2017).

## 3. L'immunité adaptative

Lorsque l'infection bactérienne persiste et que la réponse innée n'est pas suffisante, l'immunité adaptative va prendre le relais à l'aide des lymphocytes B et T matures.

- Les lymphocytes B sont les cellules du système immunitaire qui synthétise les anticorps spécifiques d'un pathogène. Ces anticorps peuvent neutraliser les pathogènes via la reconnaissance spécifique de protéines ou polysaccharides bactériens (McCool and Weiser, 2004) grâce à l'intervention du complément ou des cellules phagocytaires.

Le rôle de la réponse de l'immunité adaptative lors d'une infection à *S. pneumoniae* reste encore mal connu. Des recherches ont montré qu'une colonisation du nasopharynx par une souche de *S. pneumoniae* protège les souris lors d'une infection pulmonaire. Cette protection n'est pas retrouvée chez les souris dépourvues de cellules B et T montrant ainsi la nécessité

de la réponse à médiation cellulaire et humorale (Wilson et al., 2015). *NTHi* quant à lui possède des mécanismes de défense permettant de créer un leurre pour les cellules B par la libération de petites particules. Ainsi les lymphocytes T ne sont pas recrutés, ce qui permet la survie de *NTHi* chez son hôte (Deknuydt et al., 2014).

- Les lymphocytes T permettent la synthèse de nombreux médiateurs cellulaires comme les cytokines IL-2, IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  qui participent dans la promotion de l'activité bactéricide des cellules effectrices. Récemment il a été montré chez les enfants atteints de maladie pulmonaire suppurée chronique, qu'une réponse déficiente en IFN- $\gamma$  augmentait leur sensibilité à *NTHi* due à une réponse immunitaire à médiation cellulaire systémique modifiée (Pizzutto et al., 2014). De plus, au laboratoire nous avons montré que des souris exposées à la fumée de cigarette ont une réponse défectueuse pour la production d'IL-17A et IL-22 lors d'une infection à *Sp* due à une réponse des cellules dendritiques réduite causant une diminution de la différenciation de cellules T en cellules Th17 (Le Rouzic et al., 2016) (Pichavant et al., 2015). De plus, nous avons aussi observé un déficit de production en IL-22 par les lymphocytes T après infection par *NTHi* chez les souris BPCO (Sharan et al., 2017).

Les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> (encore appelés T auxiliaire ou T helper), de par leur prolifération rapide vont permettre d'alerter d'autres cellules du système immunitaire pour aider à neutraliser l'infection bactérienne. Cependant, une étude montre que les TCD4<sup>+</sup> auraient un rôle défavorable dans la phase précoce d'infection à *S. pneumoniae* invasive (LeMessurier et al., 2010). De plus, il a été scientifiquement prouvé que les patients BPCO ayant un programme de réentraînement à l'effort ainsi qu'une injection de phytohémagglutinine (PHA) augmentent leur prolifération de TCD4<sup>+</sup>. Cette augmentation est corrélée avec des observations montrant une diminution des exacerbations de la BPCO chez les patients ayant une activité physique (Fernandes et al., 2018).

Les lymphocytes TCD8<sup>+</sup> (autrement nommés T cytotoxique ou T killer) sont les lymphocytes permettant la destruction des bactéries via le CMH de classe 1. C'est par leur TCR et leur corécepteur CD8 que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> reconnaissent le CMH de classe 1.

L'épithélium synthétise donc de nombreux facteurs permettant d'initier l'inflammation et la réponse immunitaire. Ces facteurs ont plusieurs rôles notamment dans la défense de l'hôte contre les agressions bactériennes. Les patients BPCO étant sujets à des épisodes d'exacerbation sont plus susceptibles à ces agressions. Myles & al. ont montré l'implication des cytokines de la famille IL-20 dans la défense anti infectieuse cutanée (Myles et al., 2013). Ces cytokines produites par les kératinocytes, agissent comme une balance négative sur la production d'IL-17 et d'IL-22 diminuant ainsi la réponse Th17. Les patients BPCO ont une réponse à l'infection diminuée, il est donc possible que les cytokines de la famille IL-20 interviennent au cours de la BPCO par le même mécanisme d'action que celui décrit par Myles.

## V. La sous-famille des cytokines IL-20

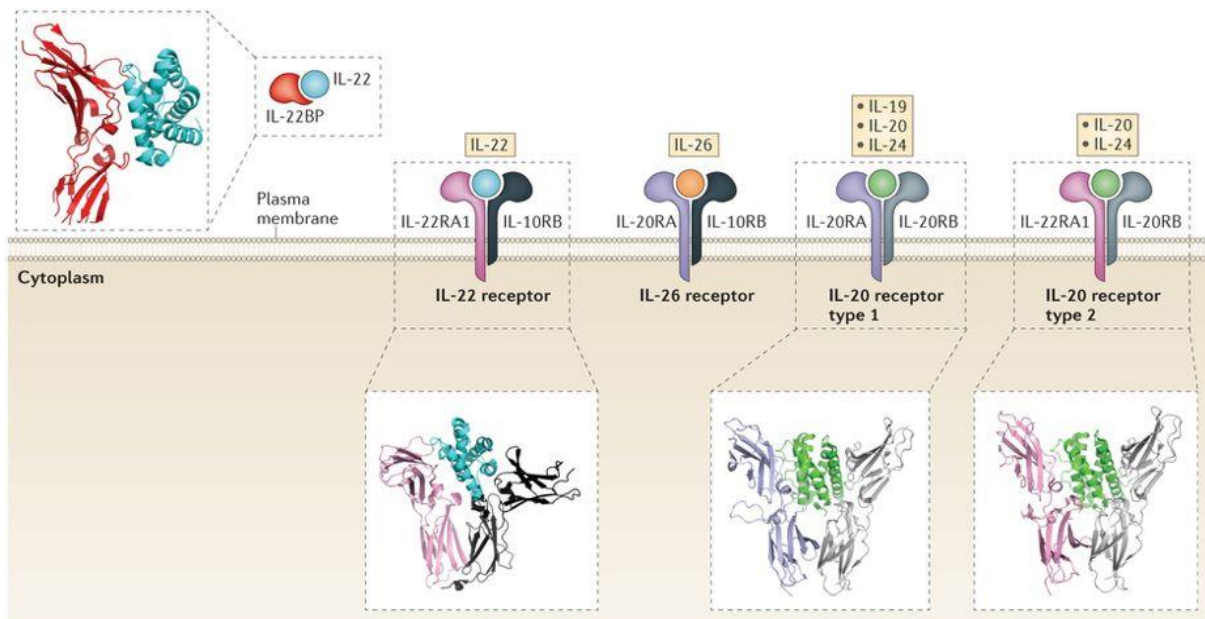
De manière générale les cytokines sont des protéines solubles d'origine peptidiques de petite taille (entre 8 et 50 kDa). Elles sont très nombreuses et répandues dans tous les organismes vivants. Les cytokines sont sécrétées par différents types cellulaires, que ce soit par les cellules de structure ou par les cellules du système immunitaire. Elles ont un rôle de messenger intercellulaire permettant de relayer les informations nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme via leurs récepteurs spécifiques. Les cytokines peuvent avoir un rôle autocrine en agissant sur la cellule productrice ou des cellules du même type, une action juxtacrine sur les cellules au contact de la cellule sécrétrice, une action paracrine sur les cellules proches et un rôle endocrine sur des cellules à distance du site de production.

La sous-famille des cytokines IL-20 appartient à la grande famille des cytokines IL-10. La famille des IL-10 est composée de trois sous-familles. La sous-famille de l'IL-10 comprend uniquement l'IL-10, une protéine de la réponse régulatrice qui va induire une diminution de l'inflammation. La sous-famille des cytokines IL-20 est composée de cinq membres : IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 et IL-26. Le membre le plus connu est l'IL-22, pour ses fonctions essentielles dans la réparation épithéliale, dans le contrôle de l'inflammation en partenariat avec la cytokine IL-17 et dans les mécanismes de défense antibactérienne. La sous-famille des interférons de type 3 composée de l'IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), l'IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) et l'IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B) dont le rôle et la structure se distingue nettement des autres membres de la famille IL-10 et qui interviennent principalement dans le cadre de la réponse antivirale (Rutz et al., 2014).

### A. Les récepteurs des cytokines IL-20

Les récepteurs utilisés par les cytokines de la famille IL-20, sont des récepteurs hétérodimériques qui sont composés de deux sous-unités non homologues. Toutes les cytokines de la famille IL-20 n'utilisent pas les mêmes sous-unités. En effet, on distingue deux groupes. Le groupe des cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) qui utilise le récepteur composé de la sous-unité IL-20Rb qui s'associe avec la sous-unité IL-20Ra et qui peut également s'associer avec la sous-unité IL-22Ra. Les cytokines IL-22 et IL-26 vont utiliser le récepteur composé de la sous-unité IL-10Rb qui va s'associer soit avec l'IL-22Ra pour lier l'IL-22, soit avec la sous-unité IL-20Ra pour lier la cytokine IL-26. (Pestka et al., 2004) (Figure 8).





**Figure 8 : Les membres de la famille des cytokines IL-20 et leurs sous-unités réceptrices associées (Rutz et al., 2014).**

La structure architecturale des récepteurs et leurs interactions avec leur ligand respectif ont été décrites pour la plupart d'entre eux : l'interaction de l'IL-20 avec les sous-unités IL-20Ra et IL-20Rb a été décrite par Logsdon & al. (Logsdon et al., 2012), celle de l'IL-10Rb a été décrite par Yoon & al. et Bleicher & al., qui ont mis en lumière l'interaction structurale de la cytokine IL-22 avec l'IL-22Ra en montrant l'existence d'un épitope de liaison hautement conservé sur le récepteur protégé par deux fentes permettant la diversité structurale des cytokines qui utilisent ces sous-unités (Yoon et al., 2010) (Bleicher et al., 2008).

D'après Rutz & al., les sous-unités IL-20Ra et IL-20Rb sont fortement exprimées dans la peau, le poumon, le foie et les organes reproducteurs (testicules, ovaires et placenta). L'IL-22Ra quant à lui est fortement exprimé dans l'intestin, le foie, les reins et le pancréas mais également dans la peau (Rutz et al., 2014).

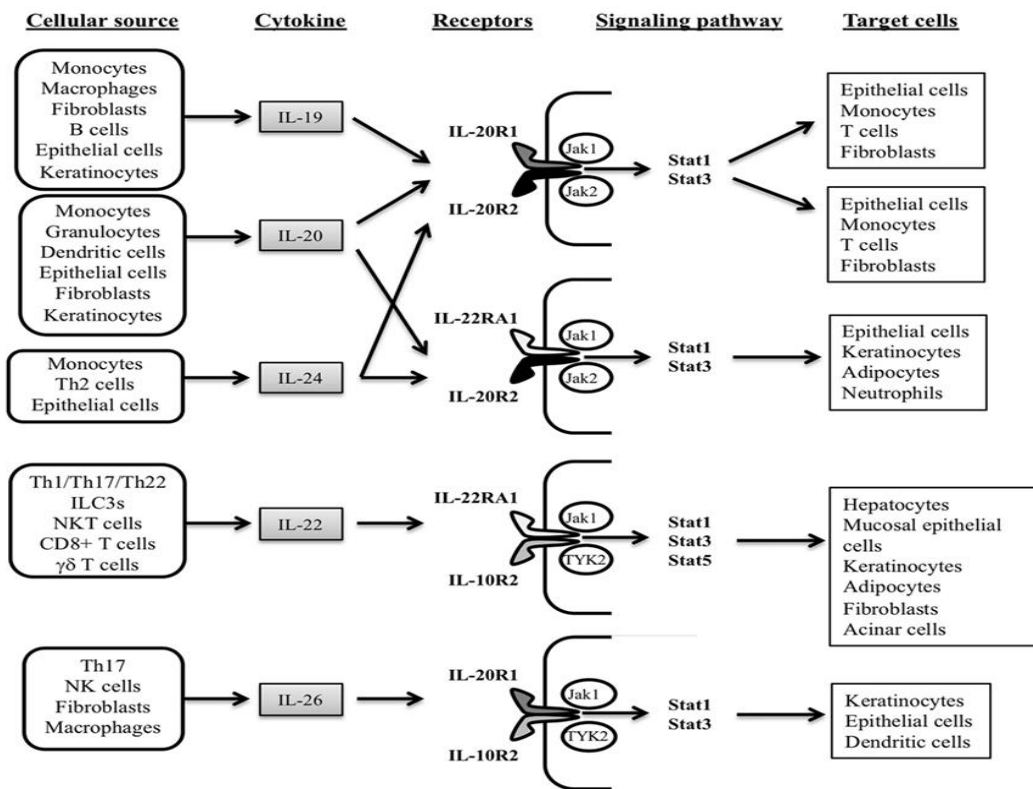
En plus de son récepteur, la cytokine IL-22 peut se lier à une forme soluble du récepteur appelé IL-22Ra2 (également connu sous le nom IL-22BP) (Rutz et al., 2014). L'IL-22Ra2 possède une forte homologie de structure avec le domaine extracellulaire de l'IL-22Ra1. L'interaction structurale de l'IL-22 et de cette sous-unité soluble a été décrite par Moura & al. (Moura et al., 2009). Cette sous-unité IL-22BP est principalement exprimée dans les tissus de type muqueux et la rate (Rutz et al., 2014) ou par les cellules dendritiques (Martin et al., 2014), mais ses propriétés sont encore mal connues. On sait qu'elle neutralise les effets biologiques de l'IL-22 de par sa forte affinité avec celle-ci (Xu et al., 2001).

## **B. Voie de signalisation**

Tous les membres de la famille des cytokines IL-20 expriment leur fonction grâce à la voie de signalisation JAK/STAT permettant son activation, cependant des nombreuses autres cytokines permettent de l'activer (Figure 9). La voie de signalisation JAK/STAT permet d'induire de nombreux mécanismes cellulaires tels que la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Rawlings et al., 2004) qui sont les mécanismes cellulaires essentiels régulant la vie et la mort des cellules.

La multimérisation des sous-unités formant le récepteur est induite par un ligand, qui va activer les sous-unités cytoplasmiques tyrosine kinase JAK permettant la transduction du signal. Chez l'homme, quatre membres composent cette famille : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2. Le changement de conformation du récepteur va induire la transphosphorylation des JAK qui va permettre l'activation des STAT présents dans le cytoplasme cellulaire. La famille STAT est composée de sept membres : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6 (Kisseleva et al., 2002). Suivant le ligand du récepteur JAK, l'un ou l'autre de ces STAT va être activé par la phosphorylation de leur extrémité C-terminale au niveau d'un résidu tyrosine conservé. Cette phosphorylation permet la dimérisation de STAT par l'interaction d'un domaine SH2 hautement conservé. Sous cette forme, STAT peut migrer vers le noyau de la cellule via l'importine  $\alpha$ -5 (Rawlings et al., 2004). Une fois dans le noyau, STAT dimérisé va reconnaître la séquence cible promotrice de l'ADN et ainsi permettre d'activer ou de réprimer la transcription du gène cible. Cette séquence d'ADN répétée, est reconnue par la plupart des STAT. Elle est composée d'environ 10 paires de bases avec la séquence consensus suivante : 5'-TT(N<sub>4-6</sub>)AA-3' (Aaronson and Horvath, 2002).

Les cytokines de la famille IL-20 vont principalement activer la voie JAK/STAT3 (Figure 9). La voie de signalisation STAT3 est vitale pour le bon développement de l'organisme. Il est très difficile de travailler sur des souris déficientes pour ce gène. En effet, ces souris KO meurent au bout du 7<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire (Akira, 2000). Il est donc indispensable de travailler avec un système Cre-Lox permettant de cibler STAT3 de manière conditionnelle ou dépendante de l'organe. Même si cette technique n'est pas létale, elle engendre un mauvais développement au niveau des tissus ciblés (Akira, 2000).



**Figure 9 : Les cytokines de la famille IL-20.**

Les différentes sources cellulaires permettant leur production, leurs récepteurs associés et les voies de signalisation qu'elles induisent ainsi que leurs cibles d'action (Caparrós and Francés, 2018).

### C. Site de production des cytokines IL-20

Les cytokines IL-20 sont produites par de nombreuses cellules du système immunitaire, mais celles-ci peuvent également être sécrétées par les cellules épithéliales (Figure 9).

Si l'on regarde d'abord du côté des cellules immunitaires, les cellules lymphoïdes innées (ILC) et les cellules T sont des cellules productrices des cytokines IL-22, IL-24 et IL-26. La cytokine IL-22 va être produite principalement par les lymphocytes TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>, T $\gamma\delta$ , les ILCs et les cellules NK (Colonna, 2009) (Sutton et al., 2009) (Takatori et al., 2009) (Ouyang et al., 2008). Les cellules dendritiques produisent elles aussi de la cytokine IL-22, mais seulement en réponse à l'action des cytokines IL-23 et IL-1 $\beta$  (Kinnebrew et al., 2010). Les cellules Th2 ont la capacité de sécréter la cytokine IL-24. Concernant l'IL-26, son étude de manière générale est un peu plus complexe que les autres membres de la famille. En effet, cette cytokine n'est pas exprimée chez la souris ce qui rend son étude plus difficile. Des études chez l'homme ont montré que les cytokines IL-23, IL-1 $\beta$  et de faible concentration de TGF- $\beta$  induisent la production de l'IL-26 par les cellules T (Manel et al., 2008). D'après Rutz & al., l'IL-26 serait co-exprimée avec l'IL-22 par les cellules NK, les lymphocytes T mémoires et les Th17 (Rutz et al., 2014).

Les cellules myéloïdes sont elles aussi à l'origine de la sécrétion des cytokines de la famille IL-20. Contrairement aux cellules lymphoïdes qui requièrent différents types cellulaires et des

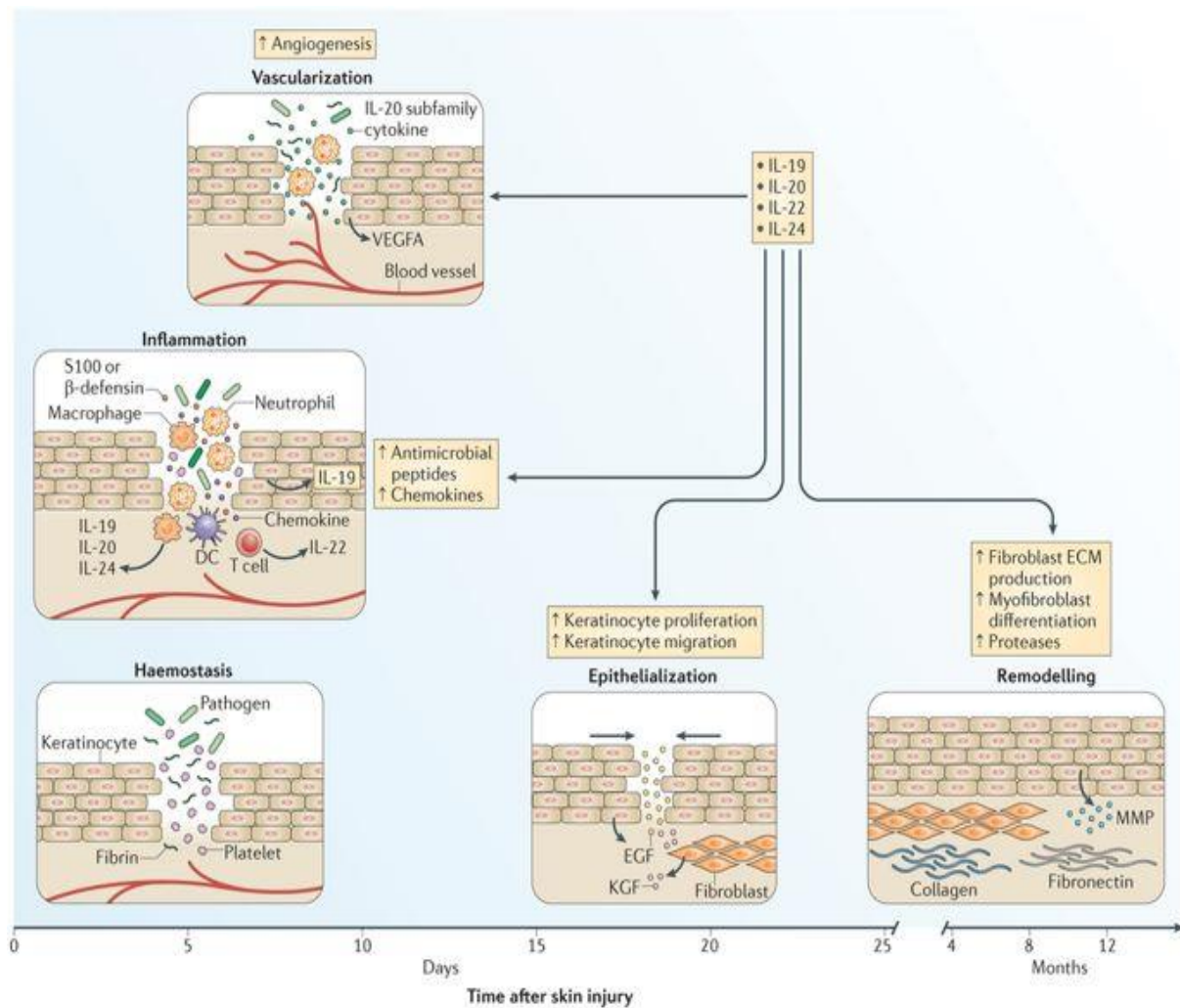
cytokines spécifiques pour induire la production des cytokines IL-20, les cellules myéloïdes sont capables de les produire directement en réponse à un stimulus microbien (Rutz et al., 2014). Ces cellules myéloïdes sont les premiers sites de production des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 (Wolk et al., 2002). En réponse à un stimulus bactérien comme le LPS, les monocytes vont être activés via les TLRs et vont synthétiser les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 (Wolk et al., 2002). Le LPS peut également stimuler les macrophages produisant de l'IL-19 et les cellules dendritiques produisant l'IL-20 (Wolk et al., 2008). La cytokine IL-19 peut également être produite par les lymphocytes B (Wolk et al., 2002).

Pour finir, les cellules épithéliales sont elles aussi à l'origine de la production de ces cytokines. Les cellules épithéliales vont répondre aux cytokines IL-20 sécrétées par les cellules immunitaires et en produire de nouvelles (Sa et al., 2007) (Hunt et al., 2006). Les principaux travaux effectués jusqu'ici ont été réalisés sur les kératinocytes. Le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-8 et l'IL-17A mais aussi l'IL-22 induisent la production de l'IL-20 par les kératinocytes (Wolk et al., 2009). Une étude sur l'épithélium respiratoire a montré que la production de la cytokine IL-19 était induite par l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-17A (Huang et al., 2008).

## **D. Rôles connus des cytokines IL-20**

### **1. Réparation cellulaire**

La réparation tissulaire est un phénomène complexe composé de différentes étapes (Figure 10). Les cytokines de la famille IL-20 interviennent dans chacune d'entre elles mais leur rôle reste encore à déterminer au cours de ces différentes étapes. Dans le phénomène inflammatoire (associé au psoriasis), les cytokines IL-20 induisent la production de peptides antimicrobiens, de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires permettant le recrutement de macrophages et de leucocytes (Rutz et al., 2014). Par la suite le facteur de croissance VEGFA va être synthétisé et induire la neo-vascularisation et l'angiogenèse (Bao et al., 2009) (Sa et al., 2007). Les cytokines IL-19 et IL-20 sont également capables d'induire la production de KGF permettant l'étape de re-épithélialisation par les kératinocytes (Sun et al., 2013). En parallèle, la cytokine IL-22 active les fibroblastes et les kératinocytes qui vont produire des fibres de collagène, de la fibronectine et des métalloprotéases (McGee et al., 2013). Ensuite les cytokines IL-20 vont stimuler la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales permettant de renforcer le rôle de barrière de l'épithélium plus spécifiquement au niveau des kératinocytes (Sonnenberg et al., 2011) (Pickert et al., 2009).



**Figure 10 : Rôles connus des cytokines de la famille IL-20**

Les cytokines de la famille IL-20 sont particulièrement étudiées dans les phénomènes de réparations induits par les kératinocytes. Dans un premier temps, elles vont induire tout comme l'IL-22, l'angiogenèse en activant le phénomène de vascularisation via le facteur VEGFA. Ensuite, elles vont également agir sur la réponse inflammatoire par la production de divers peptides antimicrobiens ainsi que de chimiokines permettant le recrutement de cellules immunitaires. Ensuite la ré-épithélialisation sera possible via l'action des cytokines IL-20 qui vont induire la prolifération et la migration des kératinocytes. Enfin, cette famille de cytokine régule également le remodelage de la barrière épithéliale. De plus, ces cytokines IL-20 jouent également un rôle dans l'homéostasie tissulaire (Rutz et al., 2014).

En plus du phénomène de réparation tissulaire, les cytokines IL-20 interviennent également dans le processus d'homéostasie tissulaire (Figure 10). Le rôle des cytokines IL-19, IL-20, IL-24 et IL-26 n'a pas encore été étudié. Les seules données de la littérature concernent la cytokine IL-22. Par exemple dans l'intestin, l'IL-22 protège les cellules souches contre l'apoptose. Chez des souris déficientes en IL-22, une diminution de la fréquence des cellules souches intestinales est observée (Hanash et al., 2012). L'IL-22 semble avoir la même fonction au niveau des hépatocytes (Radaeva et al., 2004) et améliore également la fibrose hépatique (Kong et al., 2012).

## **2. Défenses de l'hôte**

A l'heure actuelle, très peu de données sont disponibles sur le rôle des cytokines IL-20 dans les mécanismes de défense de l'hôte lors d'une infection bactérienne. A l'inverse, le rôle indispensable de l'IL-22 commence à être bien connu surtout en synergie avec l'IL-17 dans l'infection que ce soit de la peau ou du poumon (Eidenschenk et al., 2014) (Rutz et al., 2014) (Sonnenberg et al., 2011) (Aujla et al., 2008) (Liang et al., 2006). Les cytokines IL-19, IL-20, IL-22 et IL-24, en réponse aux bactéries, induisent la sécrétion de peptides antimicrobiens tels que les peptides de la famille S100 et les  $\beta$ -défensines par les cellules épithéliales de peau (Wolk et al., 2006) (Boniface et al., 2005). L'IL-26 n'intervient pas dans la synthèse de ces peptides antimicrobiens. De plus, elles induisent la production des cytokines et chimiokines par les cellules épithéliales permettant le recrutement des leucocytes (Sa et al., 2007) (Boniface et al., 2005).

Un des exemples les plus concrets dans la littérature concernant le rôle des cytokines de la famille IL-20 lors d'une infection bactérienne sont les travaux réalisés par Myles & al. Ces travaux sont basés sur l'infection des kératinocytes de la peau par *Staphylococcus aureus*. Les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 sont sécrétées au niveau du site d'infection et vont inhiber la production des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 et IL-17 qui sont essentiels lors de la phase d'infection précoce pour lutter contre *Staphylococcus aureus* (Myles et al., 2013) (Miller et al., 2006). Ce mécanisme est médié par l'activation de la sous-unité réceptrice IL-20Rb inhibant la production de l'IL-1 $\beta$ . De plus, des souris déficientes pour l'IL-20Rb contrairement aux souris sauvages, ont une charge bactérienne plus faible. A l'inverse une supplémentation en IL-19 et IL-20 augmente la sévérité de l'infection et diminue le recrutement des neutrophiles. Ces travaux montrent le rôle négatif des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 sur la réponse Th17 et en particulier sur la production des cytokines IL-17 et IL-22. Le récepteur IL-20Rb est également présent sur les neutrophiles mais uniquement après activation et sa mobilisation entraîne une inhibition de l'activité bactéricide de ces cellules, ce qui renforce le rôle pro-infectieux de ces cytokines (Gough et al., 2017).

Pour le poumon aucune donnée n'est disponible. Cependant l'expression des sous-unités récepteurs IL-20Ra et IL-20Rb au niveau de l'organe, suggère un rôle important des cytokines de la famille IL-20 dans les infections pulmonaires (Baird et al., 2011).

## **E. Implication des cytokines IL-20 dans diverses pathologies**

### **1. Les maladies du foie**

Les cytokines IL-20 sont impliquées dans de nombreuses maladies du foie, ceci étant notamment dû au niveau d'expression élevé d'IL-22Ra dans ce tissu (Rutz et al., 2014). Lors d'une infection par les virus de l'Hépatite B et C, l'IL-22 est fortement augmenté (Dambacher et al., 2008), ce qui va engendrer une augmentation de la prolifération des cellules hépatiques et la formation de fibrose (Cobleigh and Robek, 2013). La cytokine IL-26 est proposée comme marqueur de l'inflammation dans le cas d'une infection par l'Hépatite C car elle est très

fortement exprimée au niveau des lésions hépatiques et induit le recrutement des cellules NK (Miot et al., 2015).

Concernant les maladies du foie non liées à l'alcool, comme la stéatose hépatique qui est une maladie caractérisée par l'accumulation d'adipocytes au niveau de l'organe, altérant son fonctionnement. La pathologie va induire l'expression de l'IL-20 et l'IL-22 qui sont impliqués dans la régulation métabolique des lipides et de l'inflammation (Caparrós and Francés, 2018). Concernant leur impact dans les maladies liées à l'alcool (cancer, stéatose, cirrhose), l'IL-22 semble être un marqueur prédictif des stades avancés de la cirrhose (Støy et al., 2013) (Parfieniuk-Kowerda et al., 2017). De plus l'IL-22 produit par des macrophages in vitro, semble avoir un rôle hépato-protecteur (Liu et al., 2017).

Pour finir, l'IL-22 prévient l'apoptose de par son rôle hépato-protecteur et son rôle dans la réparation cellulaire (Pan et al., 2014). Cependant, IL-22 a la capacité d'induire les facteurs de croissance tumoraux et son niveau est élevé chez les patients atteints de carcinome hépato cellulaire (Jiang et al., 2011). L'IL-24 a aussi un rôle très important dans ce type de cancer car elle réduit la formation de métastases. Une étude a montré que l'utilisation de l'onco-micro ARN miT-203a-3p.1 inhibe l'effet de l'IL-24 favorisant ainsi la prolifération cellulaire et la formation de métastases (Zhao et al., 2015).

Dans l'ensemble, les cytokines IL-20, IL-22 et IL-24 ont un rôle protecteur dans l'inflammation du foie (Yi et al., 2017) (Ouyang et al., 2011). Cependant, il est nécessaire de comprendre tous les mécanismes impliquant les interleukines IL-20 au cours des différentes pathologies affectant cet organe.

## **2. Les maladies auto-immunes**

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune des articulations caractérisée par une augmentation accrue de liquide synovial et des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et IL-6 au niveau des articulations, conduisant à la destruction du cartilage suivi d'une ostéoporose. La cytokine IL-19 est retrouvée très exprimée dans cette pathologie et possède des propriétés pro-inflammatoires car elle augmente la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 via les monocytes (Liao et al., 2002). De plus, une étude a montré que la cytokine IL-19 est impliquée dans la diminution du phénomène d'apoptose des fibroblastes synoviaux engendrant ainsi une hyperplasie de ces cellules (Sakurai et al., 2008). En parallèle de l'IL-19, la cytokine IL-20 est également exprimée dans cette pathologie par les granulocytes et les cellules mononuclées. Son expression est augmentée dans le plasma de des patients (Leng et al., 2011). Cette cytokine peut également induire l'angiogenèse des cellules endothéliales au cours de la polyarthrite rhumatoïde de par sa capacité à induire la prolifération et la migration cellulaire (Hsieh et al., 2006). De plus, la cytokine IL-24 tout comme la cytokine IL-20 sont retrouvées en grande quantité au niveau du liquide synovial des patients et peuvent induire la production de MCP-1 conduisant à l'augmentation de TNF- $\alpha$  et IL-6 (Kragstrup et al., 2008). Actuellement, le seul traitement efficace chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde est l'anti TNF- $\alpha$  mais les patients développent une résistance au traitement plus ou moins

rapidement. Liu & al. ont montré qu'un traitement avec la protéine de fusion Fc-IL-20Rb diminuait l'inflammation chez ces patients et pouvait être une alternative thérapeutique (Liu et al., 2016), sachant que des anti-IL-20 sont actuellement en cours d'essai clinique chez ces patients (Šenolt et al., 2015).

Le psoriasis est une maladie auto-immune de la peau qui se caractérise par un épaissement et une inflammation de la peau. Les kératinocytes ont une prolifération anormale et une infiltration de leucocytes ainsi qu'un recrutement de cytokines dû à une dilatation veineuse (Leng et al., 2011). Les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 sont surexprimées dans cette pathologie (Blumberg et al., 2001) (Otkjaer et al., 2005), causant une activation continue de la voie de signalisation JAK/STAT. Cette activation conduit à la présence constante de STAT3 au niveau du noyau responsable à son tour d'une altération de réponse inflammatoires, des phénomènes de cicatrisation et de différenciation cellulaire ainsi que d'une production de peptides antimicrobiens tels que les  $\beta$ -défensines et la famille des S100 (Sa et al., 2007). L'injection locale d'IL-20 chez ces patients montre une augmentation des lésions alors que le blocage de la voie de signalisation de la cytokine IL-20 diminue les effets du psoriasis (Stenderup et al., 2009). La cytokine IL-19 a montré son rôle dans l'induction des facteurs de croissance des kératinocytes ce qui participe probablement à la prolifération anormale de ce type cellulaire dans la maladie (Li et al., 2005).

Dans le cadre du lupus néphrétique, la cytokine IL-20 et ses récepteurs sont surexprimés par les cellules mésangiales dans un modèle murin (Leng et al., 2011). Cette surexpression va induire la production de MCP-1 qui va à son tour induire de nombreux facteurs tels que CCL5, IL-6, IL-10 qui sont impliqués dans la pathologie. De plus, l'expression de la cytokine IL-20 a été retrouvée dans les biopsies de patients atteints de Lupus néphrétique (Li et al., 2008). Une étude chez le rat a montré que l'utilisation d'un anticorps bloquant cette cytokine diminue certaines lésions rénales (Li et al., 2008).

Pris ensemble, ces résultats suggèrent le rôle néfaste des cytokines de la famille IL-20 dans le développement et la sévérité des maladies auto-immunes. Contrôler l'action de ces cytokines serait une potentielle cible thérapeutique accompagnée d'autres traitements déjà préexistants.

### **3. Les cancers**

L'intérêt des cytokines IL-20 dans le cancer découle du fait que l'IL-24 a été découvert comme un peptide associé à la différenciation des cellules mélanomateuses (MDA-7) (Jiang et al., 1995). De ce fait, c'est une cytokine souvent étudiée dans différents types de cancer ce qui soulève la question de son intérêt comme nouvelle cible potentielle pour le traitement du cancer (Kreis et al., 2008). De plus, les sous-unités réceptrices de ces cytokines sont retrouvées très exprimées dans différents types de cancer. L'IL-22Ra est considérablement augmenté dans les cancers du poumon, de la peau, du foie, du pancréas et les cancers colorectaux (Lim and Savan, 2014) (Wen et al., 2014). Les sous-unités IL-20Ra et IL-20Rb sont plutôt exprimées dans les cancers du poumon non à petites cellules, de la vessie, de la tête et du cou et du sein



(Baird et al., 2011) (Lee et al., 2013) (Hsu et al., 2012). Enfin, les cytokines IL-20 activent STAT3 qui dans le cadre des cancers est connu pour être un facteur de transcription oncogénique (Yu et al., 2009).

Dans ce contexte, l'IL-24 a montré son rôle dans la diminution de la prolifération des cellules de mélanome humain en culture (Jiang et al., 1995) montrant son activité anti tumorale. Ce phénomène fut décrit dans bien d'autres types de cancers (Whitaker et al., 2012) (Emdad et al., 2009). Mais son rôle anti tumoral est controversé car son expression est associée à la progression des cancers (Kreis et al., 2008) (Kreis et al., 2007). Les cytokines IL-20 et IL-26 ont été décrites comme ayant un rôle promoteur dans le développement de tumeurs (Lee et al., 2012). Dans un modèle murin de cancer du sein, un anticorps bloquant la cytokine IL-20 montre une diminution des effets métastatiques (Hsu et al., 2012). Dans les tumeurs gastriques humaines, l'IL-26 favorise la croissance cancéreuse (You et al., 2013). Enfin, la cytokine IL-22 induit la tumorigenèse dans les cancers colorectaux chez la souris, ce qui est probablement dû à une inflammation très élevée dans ce type de cancer. Le fait de bloquer la voie de signalisation de l'IL-22 va diminuer la progression tumorale (Huber et al., 2012).

En résumé, les cytokines de la famille IL-20 ont un rôle contrasté entre le développement des cancers. L'étude de cette famille de cytokines dans cette pathologie nécessite encore des recherches pour préciser leur rôle.

#### **4. Les maladies vasculaires**

Les cytokines IL-20 sont également retrouvées dans les maladies vasculaires. L'IL-20 et ses récepteurs sont exprimés dans les plaques d'athérosclérose chez l'homme et chez la souris. Son expression est présente principalement dans les macrophages (Chen et al., 2006). La cytokine IL-20 dans cette pathologie ne serait pas décrite pour sa fonction immune mais pour son impact sur l'angiogenèse (Hsieh et al., 2006). Cette cytokine aurait une activité pro-angiogénique dans l'athérosclérose (Autieri, 2018). Concernant l'IL-22, très peu de données sont disponibles mais quelques études semblent montrer son rôle dans la pathologie de par son action pro-inflammatoire. En effet, l'IL-22 est suggérée comme ayant un rôle important dans les maladies vasculaires et son niveau d'expression est très élevé chez les patients hypertendus (Rattik et al., 2015) (Ye et al., 2017). L'IL-24 aurait un rôle pro-athérosclérosique de par sa capacité à induire la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 par les monocytes (Autieri, 2018). De plus, il semblerait que ce soit un facteur de risque d'accidents cardiovasculaires chez les personnes atteintes de maladie coronarienne (Vargas-Alarcón et al., 2014).

Le rôle de l'IL-19 dans ce contexte pathologique est le plus documenté. En effet, l'IL-19 est très exprimée dans les muscles lisses vasculaires, les cellules endothéliales et les artères coronaires des patients ayant une maladie vasculaire inflammatoire chronique (Ellison et al., 2013). Elle possède des effets anti-inflammatoires sur les cellules vasculaires. Elle ralentit la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire impliqué dans la resténose (récidive de la sténose) alors que l'inhibition de l'IL-19 favorise leur prolifération (Gabunia et al., 2016) (Tian et al., 2008). Ces résultats suggèrent son activité anti-re-sténose et athéroprotecteur (Ray et

al., 2018) (Autieri, 2018) (Gabunia et al., 2016). De plus, il a été montré que l'IL-19 induit la réponse adaptative Th2, permettant de diminuer l'inflammation et ainsi de réduire la gravité des pathologies vasculaires (Gallagher, 2010). Son double rôle sur les cellules vasculaires d'une part et sur les cellules inflammatoires d'autre part, fait de l'IL-19 une bonne cible thérapeutique pour le traitement de ces maladies (Autieri, 2018).

## **5. Les maladies intestinales inflammatoires et chroniques (MICI)**

L'implication et les fonctions des cytokines de la famille IL-20 dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin est encore mal comprise à ce jour. Leur niveau d'expression est retrouvé très élevé chez les patients atteints de MICI actives (et également chez les patients atteints de cancers colorectaux et d'infections gastro-intestinales) en comparaison avec des patients non atteints ou en rémission (Niess et al., 2018) (Fonseca-Camarillo et al., 2014) (Fonseca-Camarillo et al., 2013). L'IL-19 aurait un rôle protecteur dans le développement de maladies intestinales car les souris déficientes pour cette cytokine et traitées avec du sulfate de dextran-sodium (DSS) développent des colites plus sévères (Azuma et al., 2010). La cytokine IL-22 est particulièrement exprimée (Ouyang, 2010) et étudiée dans ces modèles pathologiques et semble avoir un rôle protecteur dans des modèles murins de colite (Sugimoto et al., 2008) (Zenewicz et al., 2008). Comme mentionné précédemment, l'étude de l'IL-26 est compliquée de par son absence chez la souris, mais dans des modèles *in vitro* humains cette cytokine semblerait induire la prolifération des cellules intestinales et la production de facteurs pro-inflammatoires (Dambacher et al., 2009). Concernant l'expression des récepteurs aux cytokines IL-20, les sous-unités IL-20Ra et IL-20Rb sont très faiblement exprimées au niveau des cellules épithéliales intestinales contrairement à la sous-unité IL-22Ra (Rutz et al., 2014). Si l'on regarde du côté de la colite ulcéraire, Fonseca-Camarillo & al. ont montré pour la première fois que les cellules inflammatoires et l'épithélium de ces patients expriment la cytokine IL-20 et ses récepteurs (Fonseca-Camarillo et al., 2013). Une autre étude a ensuite montré que le polymorphisme de la cytokine IL-20 était un facteur de susceptibilité de la colite ulcéraire (Yamamoto-Furusho et al., 2013).

De par l'absence des récepteurs aux cytokines de la famille IL-20, il est intéressant de comparer la fonction de ces cytokines dans l'intestin avec celles observées dans d'autres muqueuses comme la peau ou les voies aériennes (ou ces récepteurs sont très exprimés sur l'épithélium) et leur rôle dans les pathologies inflammatoires spécifiques.

## **6. Quelques autres exemples de maladie**

Dans la littérature, les cytokines de la famille IL-20 semblent impliquées de manière plus ou moins importante dans différents types de maladies. Hormis les pathologies citées précédemment, dans une étude menée chez des patientes atteintes d'endométriose, le niveau d'expression d'IL-19 et d'IL-20 semble considérablement réduit. Ces premières données semblent indiquer la potentielle implication de cette famille de cytokine dans la pathologie (Santulli et al., 2013). De plus, les cytokines IL-20 sont également décrites comme

étant impliquées dans l'ostéoporose (Wang et al., 2018). Dans le dosage de sérum de patients atteints d'ostéoporose, une concentration élevée pour la cytokine IL-20 est détectée. En effet, des travaux ont montré que la neutralisation de la cytokine IL-20 inhibe la différenciation des ostéoclastes et protège contre la perte de densité osseuse (Hsu et al., 2011).

Dans la famille des cytokines IL-20, il semble clair que la cytokine IL-22 est à dissocier des autres membres. La cytokine IL-22 n'utilise pas les mêmes récepteurs que les cytokines IL-19, IL-20, IL-24 et IL-26. De plus, la cytokine IL-22 est bien connue pour son rôle protecteur dans la défense de l'hôte ce qui semble être le phénomène inverse pour les autres membres de cette famille. Enfin, dans la majorité des pathologies où le rôle de l'IL-22 est étudié, cette cytokine ne semble pas promouvoir le développement de ces pathologies. En revanche, les cytokines IL-19, IL-20, IL-24 et IL-26 sont-elles impliquées dans le développement ou la persistance de nombreuses pathologies inflammatoires. Cependant, toutes les cytokines IL-20 ont un rôle bien défini dans la réparation cellulaire, montrant l'implication de chaque membre à différents niveaux du processus ainsi que la dualité de fonction de certaines de ces cytokines.

## OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive est actuellement la 4<sup>ème</sup> cause de mortalité dans le monde, ce qui en fait un problème de santé publique majeur. C'est une maladie pulmonaire inflammatoire et chronique qui se caractérise par une surproduction de mucus accompagnée d'une obstruction non réversible des bronches, ainsi que d'une destruction de la paroi alvéolaire conduisant le patient jusqu'à l'emphysème respiratoire. Une fois la pathologie bien établie, les patients BPCO développent une susceptibilité accrue aux infections respiratoires, la plupart du temps d'origine bactérienne, qui sont à l'origine des épisodes d'exacerbation. Ce cercle vicieux des exacerbations est souvent responsable de l'évolution fatale de la pathologie.

Cette susceptibilité est en partie causée par un défaut de production en IL-22 (Pichavant et al., 2015) (Sharan et al., 2017), qui joue un rôle majeur dans la clairance bactérienne. Une étude pour le moins intéressante, a montré qu'une expression accrue des autres membres de la famille des cytokines IL-20 (eg : IL-19, IL-20 et IL-24), lorsqu'elles sont surexprimées par les kératinocytes, induisent la diminution de l'expression de l'IL-22 en contexte infectieux (Myles et al., 2013). Nos données préliminaires montraient également une surexpression des cytokines IL-20 après exposition à la fumée de cigarette alors que leur rôle dans le contrôle de l'inflammation et des défenses pulmonaires est pratiquement inconnu. Ainsi les objectifs de cette thèse ont consisté d'une part à évaluer l'impact de ces cytokines IL-20 au niveau du poumon en contexte infectieux et d'autre part, de montrer leur implication au cours de la BPCO. L'hypothèse que nous formulons étant qu'une surexpression de ces cytokines pourrait expliquer une part de la susceptibilité aux infections chez les patients atteints par la pathologie.

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons étudié l'expression et le rôle des cytokines de la famille IL-20 et de leurs récepteurs dans un contexte infectieux seul. Pour ce faire, *Streptococcus pneumoniae*, l'un des pathogènes les plus fréquemment retrouvés dans les cas d'exacerbation de la BPCO, a été utilisé pour infecter des souris C57/Bl6. Le rôle des cytokines de la famille IL-20 a été analysé en administrant par voie générale un anticorps bloquant la sous-unité commune des deux récepteurs de ces cytokines.

Dans la deuxième partie du projet, nous avons analysé l'expression des cytokines IL-20 dans les cellules épithéliales des voies respiratoires (AEC) et leur capacité à contrôler la réponse antibactérienne dans ces cellules en condition physiologique et dans un contexte d'exposition à la fumée de cigarette. Grâce à différents modèles de cultures cellulaires (cultures épithéliales primaires murines et la lignée humaine BEAS-2B), nous avons étudié l'expression de ces cytokines IL-20 mais également leur implication dans la réponse épithéliale suite à l'infection par les pathogènes *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*. Pour aborder *in vivo* le rôle de la réponse épithéliale dans un contexte infectieux, nous avons évalué l'effet d'une administration locale de notre anticorps bloquant anti-IL-20Rb lors d'une infection par *S. pneumoniae*.

Enfin, le troisième objectif de la thèse vise à étudier l'expression de ces cytokines IL-20 chez l'homme et les conséquences de l'exposition à la fumée de cigarette. Pour mener à bien cette partie et dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Christelle Coraux (INSERM U995, Reims) nous avons pu bénéficier d'échantillons d'individus fumeurs ou non n'étant pas atteint de BPCO d'une part et d'échantillons de patients BPCO à différents stades de la pathologie d'autre part. Notre objectif étant à terme de montrer les altérations de la réponse épithéliale aux cytokines IL-20 chez les patients BPCO et de comprendre leur rôle dans la pathogénèse.

## RESULTATS

### **Chapitre I : Cibler les récepteurs des cytokines de la famille IL-20 pour limiter l'inflammation causée par l'infection à *Streptococcus pneumoniae* (Article soumis : Annexe 1)**

*Streptococcus pneumoniae* est la principale cause de pneumonie bactérienne dans le monde. Des rapports antérieurs ont montré que les cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) sont induites et ont une fonction de régulation immunitaire au cours de l'infection cutanée par *Staphylococcus aureus*. Notre but est d'évaluer la production de ces cytokines au cours d'une infection pulmonaire et de préciser leur fonction dans ce contexte.

Pour cela, nous avons étudié le rôle des cytokines de la famille IL-20 et de leurs récepteurs en administrant un anticorps bloquant le récepteur IL-20Rb au cours de l'infection par *Streptococcus pneumoniae*. Des souris C57BL/6 ont été infectées avec *ce pathogène* par voie intranasale. La charge bactérienne, la réponse immunitaire et la production de cytokines ont été évaluées après traitement par l'anticorps neutralisant le récepteur IL-20Rb. Il est intéressant de noter que l'expression des cytokines de la famille IL-20 est accrue de manière transitoire dans le tissu pulmonaire pendant l'infection. La neutralisation du récepteur IL-20Rb conduit à une diminution de la production de ces cytokines IL-20. Plus important encore, le traitement avec l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb renforce la défense de l'hôte et réduit la charge bactérienne dans les poumons et dans le sang. Cet effet protecteur est associé à une réduction transitoire des lésions pulmonaires, à une diminution de l'expression des cellules inflammatoires et des cytokines ainsi que la synthèse des peptides antimicrobiens améliorées.

Cette étude met pour la première fois en évidence l'importance des cytokines de la famille IL-20 dans la défense pulmonaire contre l'infection à *S. pneumoniae*. Cette étude doit être complétée par des approches mécanistiques qui permettront ensuite de développer des applications thérapeutiques ciblant les cytokines IL-20 en traitement de la pneumonie bactérienne chez l'homme.

## INTRODUCTION

Les infections pulmonaires en particulier causées par le pneumocoque sont une cause majeure de décès et constituent un véritable problème de santé publique. Elles sont responsables d'environ 2 millions de décès et coûtent cent billions de dollars par an (Dockrell et al., 2012). *Streptococcus pneumoniae* (*Sp*) est une bactérie Gram positif, à respiration anaérobie et organisée sous forme diplocoque pour laquelle plus de 90 sérotypes ont été identifiés (van Lieshout et al., 2018). C'est la cause la plus fréquente de pneumonie bactérienne et celle-ci est également impliquée dans les sinusites et les méningites (Xu et al., 2008) (Cukic, 2013). *Sp* colonise le nasopharynx et peut se propager à la partie inférieure des voies respiratoires (Dockrell et al., 2012).

La sévérité de la pneumonie est étroitement liée à l'efficacité de la réponse antibactérienne mise en place chez l'hôte. Les réponses immunitaires innées et adaptatives participent à la clairance du pneumocoque (Zhang et al., 2015). Parmi les facteurs orchestrant la réponse antibactérienne, les cytokines Th17, y compris l'interleukine (IL) -17 et l'IL-22, jouent un rôle majeur dans la clairance de *Sp* (Eidenschenk et al., 2014) (Le Rouzic et al., 2016) (Van Maele et al., 2014). Nous avons précédemment montré que l'augmentation de la susceptibilité à *Sp* observée au cours de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), est due à une réponse défectueuse pour l'IL-22 (Pichavant et al., 2015). Dans cette situation, l'altération des macrophages alvéolaires et de la fonction des cellules dendritiques (DC) conduit à une diminution de la sécrétion de ces cytokines par les cellules T conventionnelles et non conventionnelles.

L'IL-22 avec l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24 et l'IL-26 (IL-26 présent uniquement chez les humains), appartiennent à la sous-famille des cytokines IL-20, un sous-ensemble de la grande famille IL-10 (Kunz et al., 2006) (Commins et al., 2008) (Ouyang et al., 2011). Les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 se lient toutes au récepteur de l'IL-20 de type I (IL-20R), un récepteur hétérodimérique composé de chaînes IL-20Ra et B (IL-20Ra et IL20Rb). L'IL-20 et l'IL-24 se lient au récepteur hétérodimérique IL-20R de type II, constitué de la sous-unité  $\alpha$ 1 du récepteur de l'IL-22 et de l'IL-20Rb (Wegenka, 2010). La sous-unité IL-20Rb est la chaîne commune aux deux récepteurs reconnaissant les cytokines IL-20. Bloquer ce récepteur à l'aide d'un anticorps peut neutraliser efficacement la voie de signalisation des cytokines IL-20 (Myles et al., 2013). Ces récepteurs incluant la sous-unité IL-20Rb sont principalement exprimés par les cellules épithéliales, les cellules mononuclées et certains lymphocytes. Des données récentes ont révélé que les neutrophiles activés expriment ce récepteur (Gough et al., 2017). Les cytokines IL-20 sont impliquées dans l'homéostasie tissulaire cutanée en modulant le remodelage, la cicatrisation et la sécrétion de peptides antimicrobiens (Rutz et al., 2014). De plus, il a été montré que les cytokines de la sous-famille IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) facilitent l'infection cutanée par *Staphylococcus aureus* chez la souris, par une régulation négative de la production d'IL-17 et d'IL-22 (Myles et al., 2013). Cependant, leur implication au cours de l'infection bactérienne pulmonaire n'a pas encore été montrée.

Nos données montrent que l'infection par *Sp* engendre de manière précoce la production de cytokines liées à l'IL-20. Nous avons émis l'hypothèse que le blocage de la voie de signalisation des cytokines IL-20, en utilisant un anticorps anti-IL-20Rb neutralisant, pourrait aider à contrôler l'infection pulmonaire par *S. pneumoniae*. En effet, le blocage de la voie de signalisation des cytokines IL-20 augmente la clairance bactérienne, entraîne une diminution de l'inflammation et des lésions tissulaires dans les poumons. Notre étude montre que les cytokines IL-20 et leurs récepteurs peuvent moduler la réponse de l'hôte au cours de l'infection par *Sp*, bien que nous n'ayons pas observé d'augmentation de l'expression l'IL-17 et l'IL-22. Ainsi, cibler la sous-unité IL-20Rb pourrait être efficace pour améliorer le contrôle de l'infection par *Sp*.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **Modèle animal**

Des souris C57BL/6 (H-2Db) mâles de type sauvage (WT) de six à huit semaines provenant de l'animalerie Janvier (Le Genest-St.-Isle, France) sont utilisées. Toutes les expérimentations sur les animaux étaient conformes à la directive du Comité de protection et d'utilisation des animaux du Nord Pas-de-Calais (accord AF 16/20 090). Les souris ont été maintenues dans une installation à température contrôlée (23°C) avec un cycle de lumière/obscurité de 12h avec de la nourriture et de l'eau fournis ad libitum.

### **Infection par *Streptococcus pneumoniae* et comptages bactériens**

Un isolat clinique de *S. pneumoniae* sérotype 1 (isolat clinique E1586) a été obtenu du Laboratoire national de référence du Ministère de la santé en Uruguay et a été décrit précédemment (Van Maele et al., 2014). Pour l'infection, les stocks de travail congelés ont été dilués dans un tampon PBS.  $2 \times 10^6$  bactéries (50µl) et ont été administrés par voie intranasale à des souris anesthésiées par injection intrapéritonéale de Kétamine et de Xylazine (Imalgene 1000, Merial et Rompun 2% xylazine, Bayer). Les souris ont été sacrifiées à 24h ou à 48h après l'infection. La charge bactérienne a été mesurée dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA), les poumons et le sang en déposant les échantillons sur des géloses chocolat (Agar au chocolat + PolyViteXTM, Biomérieux). Les unités formant des colonies (UFC) ont été numérées 24h plus tard.

### **Traitement de souris avec un anticorps neutralisant anti-IL-20Rb ou un contrôle isotypique**

Certains animaux ont reçu l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb sans endotoxine (clone 20RNTC, 50µg/100µl; eBioscience) par voie intrapéritonéale, 24 heures avant et après l'infection par *Sp*. L'anticorps IgG2a-N297A 13R4 a été utilisé comme contrôle isotypique (Evitria).



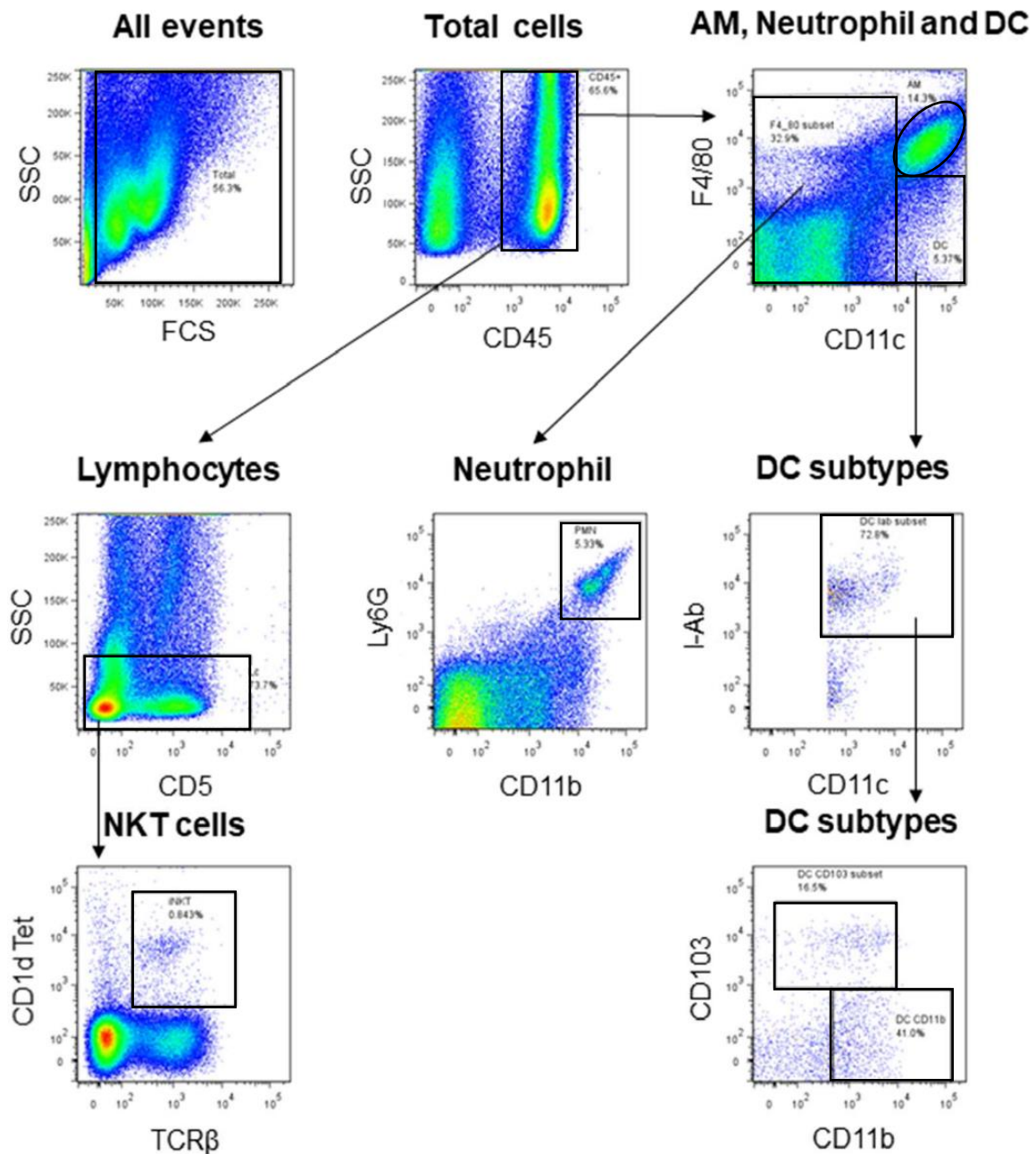
### **Lavage broncho-alvéolaire et préparation des organes**

Le LBA a été réalisé en injectant et en récupérant cinq fois 0,5 mL de PBS 2% du sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco) au niveau de la trachée. Après centrifugation à 1600 rpm / minute pendant 6 min à 4°C, le surnageant est stocké à -20 ° C pour l'analyse des cytokines. Le culot cellulaire est utilisé pour l'analyse des populations cellulaires par cytométrie en flux.

Les poumons ont été broyés mécaniquement avec une lame stérile puis digérés enzymatiquement par la collagénase (Collagenase Type VI 17104-019 Gibco by Life technologies) à 37°C pendant 30 minutes. Après centrifugation à 1600 rpm 6 minutes à 4 ° C, les culots cellulaires sont remis en suspension dans une solution de Percoll 30%, permettant la séparation cellulaire (Percoll TM GE Healthcare 17-0891-01) et centrifugés à 2000 rpm / min pendant 15 minutes. Les culots ont été remis en suspension dans du tampon de lyse de globule rouge pendant 5 minutes à température ambiante. La réaction de lyse des globules rouges a été arrêtée avec du PBS et 2% SVF (Gibco). Après centrifugation à 1600 rpm / minute pendant 6 minutes à 4°C, les cellules pulmonaires sont remises en suspension dans du PBS 2% SVF, puis comptées et utilisées pour l'analyse par cytométrie en flux des populations cellulaires.

### **Réactifs de cytométrie en flux**

Les différents types cellulaires présents dans les LBA et dans la suspension de cellules pulmonaires ont été analysés par cytométrie en flux en utilisant les anticorps suivants: Anticorps monoclonaux (mAbs) contre CD5 de souris (conjugué au FITC), tétramère CD1d/ $\alpha$ GalCer (PE-conjugué), NK1.1 (PerCp-Cy5.5-conjugué), CD4 (conjugué à PE-Cy7), CD25 (conjugué à l'APC), CD69 (conjugué à Alexa700), TCR $\gamma$  $\delta$  (conjugué à APCH7), TCR- $\beta$  (conjugué à V450), CD8 (conjugué à V500), CD45 (conjugué à Qdot605), I-Ab (conjugué à FITC), F4/80 (conjugué à PE), CD103 (conjugué à PerCP-Cy5.5), CD11c (conjugué à PE-Cy7), CD86 (conjugué à Alexa-700), CCR2 (conjugué à APC), Ly6G (conjugué à APC-H7), CD11b (conjugué à V450), CD45 (conjugué à V500), Ly6C (Q-dot605 conjugué) (BD Biosciences, Biolegend et Myltenyi Biotech). Les données ont été acquises sur le LSR Fortessa (BD Biosciences) et analysées avec FlowJo <sup>™</sup> logiciel v7.6.5 (Stanford, CA, États-Unis). Les stratégies de sélection des sous-populations cellulaires sont décrites ci-dessous.



**Panel stratégie de gating :** Cellules NKT, macrophages alvéolaires (AM), neutrophiles et cellules dendritiques (DC) (cDC1 (DC CD11b +) et cDC2 (DC CD103 +)).

### Immunohistochimie

Les poumons ont été fixés dans du paraformaldéhyde (PFA: 4%) et inclus dans de la paraffine. Pour évaluer l'inflammation des voies aériennes, les coupes de poumon (4 µm d'épaisseur) ont été colorées par l'hématoxyline et l'éosine. Sur ces coupes, nous avons mesuré à la fois le remodelage pulmonaire et l'inflammation en évaluant les lésions pulmonaires telles que définies dans la **Table 1**.

**Table 1 : Score de lésions pulmonaires.** Le score cumulatif allant de 0 à 30 a été évalué en aveugle.

Abbréviations : rbc : red blood cell, HPF : High power field, NA : not applicable

Lung injury	Score				
Scale	0	1	2	3	4
Extent of lung injury	Absence	<25 %	26 to 50 %	51 to 75 %	>75 %
Alveolar wall thickness	≤ 1 rbc	> 1 ≤ 2 rbc	3 to 5 rbc	6 to 10 rbc	> 10 rbc
Hyaline membranes	Absence	Presence	NA	NA	NA
Neutrophilic alveolitis	Absence	<10 neutrophils/HPF	10 to 20 / HPF	21 to 50 / HPF	> 50 / HPF
Suppuration	Absence	Presence	NA	NA	NA
Bronchial epithelial degeneration	Absence	Presence	NA	NA	NA
Neutrophilic peribronchitis	Absence	<10 neutrophils/HPF	10 to 20 / HPF	21 to 50 / HPF	> 50 / HPF
Lymphohiostiocytic peribronchitis	Absence	<10 mononuclear cells/HPF	10 to 20 / HPF	21 to 50 / HPF	> 50 / HPF
Vasculitis	Absence	Presence	NA	NA	NA

Concernant l'immunohistochimie, les coupes de poumon incluses en paraffine sont déparaffinées en xylène (Acros Organics) et réhydratées avec des bains successifs d'alcool et d'eau. Le démasquage des épitopes est effectué dans du tampon phosphate pH 6,0 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O) pendant 15 minutes à 90°C. Le kit ab80436 - Détection HRP / DAB spécifique à la souris et au lapin (Abcam) est utilisé en suivant les recommandations du fabricant pour détecter l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24. Pour les récepteurs, le Fast Red (SIGMAFAST™ Comprimés rapides rouges de TR / Naphthol AS-MX) est utilisé pour la révélation. La contre-coloration est réalisée avec de l'hématoxyline/éosine (Interchim) diluée au ½. Les anticorps primaires utilisés sont l'anti-IL-19 ([EPNCIR168] ab154187 Abcam), l'anti-IL-20 (orb13501 Biorbyt), l'anti-IL-24 (orb228807 Biorbyt), l'anti-IL-20Ra (bs-2619R Bioss), l'anti-IL-20Rb (20RNTC eBiosciences) et l'anti-IL-22Ra (496514 systèmes de R & D) et sont utilisés à une concentration de 0.01mg/mL.

### Mesure des cytokines par ELISA

Le taux d'IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-19 et IFN- $\gamma$  (eBiosciences), TNF- $\alpha$  (R & D (Abingdon, Royaume-Uni), IL-20 (Boster Biological Technology) et IL-24 (Elabscience) a été déterminé dans le LBA et les homogénats de poumons par dosage immuno-enzymatique (ELISA), en utilisant les kits commerciaux selon les recommandations du fabricant.

Les homogénats de poumons sont réalisés par broyage mécanique par l'Ultraturaxe en présence d'un cocktail d'anti-protéase et du NP40. Une centrifugation de 5 minutes à 1600 rpm est réalisée et les surnageants sont récupérés pour effectuer les dosages ELISA.

### Extraction d'ARN et RT-qPCR

L'ARN total a été isolé à partir des lobes pulmonaires de souris et homogénéisé en utilisant le réactif TRIzol® (Ambion) et quantifié par NanoVue Plus (Healthcare Bio-sciences AB). La transcription inverse a été réalisée avec le kit de transcription inverse d'ADNc (Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant. Les ADNc ont été soumis à la PCR quantitative (QuantStudio 12K Flex Applied Biosystems) en utilisant des amorces spécifiques pour chaque gène (**Table 2**) (Eurofins Genomics). L'expression de transcription relative est exprimée en  $-2\Delta\Delta Ct$  par rapport à la condition contrôle (PBS ou milieu seul) en utilisant un gène de référence.

**Table 1 : Séquence des amorces de souris utilisées pour la RT-qPCR**

Cibles	Amorces	Séquences
Souris GAPDH	Sens	5'-TGTTTCCTCGTCCCGTAGACAA-3'
	Anti-sens	5'-GGCAACAATCTCCACTTTGCC-3'
Souris IL-19	Sens	5'-TGTGTGCTGCATGACCAACAA-3'
	Anti-sens	5'-GGCAATGCTGCTGATTCTCCT-3'
Souris IL-20	Sens	5'-TCTTGCCTTTGGACTGTTCTCC-3'
	Anti-sens	5'-GTTTGCAGTAATCACACAGCTTC-3'
Souris IL-22	Sens	5'-AGCCGGACGTCTGTGTTGTTA-3'
	Anti-sens	5'-TTGAGGTGTCCAACCTCCAGCA-3'
Souris IL-24	Sens	5'-CCACTCTGGCCAACAACCTTCAT-3'
	Anti-sens	5'-TCTGCGGAACAGCAAAAACC-3'
Souris IL-20Ra	Sens	5'-CTGGCCGCTTCGGGACGC-3'
	Anti-sens	5'-AACCACAGACACAAGGAACTG-3'
Souris IL-20Rb	Sens	5'-CAGGTGCTTCCAGTCCGTCT-3'
	Anti-sens	5'-CTCTCCTGGAATCCCCAAAGT-3'
Souris IL-22Ra	Sens	5'-ATATTGTCCAAGGAAAGTGCCC-3'
	Anti-sens	5'-AGCCGACGAGGAAACCCAT-3'

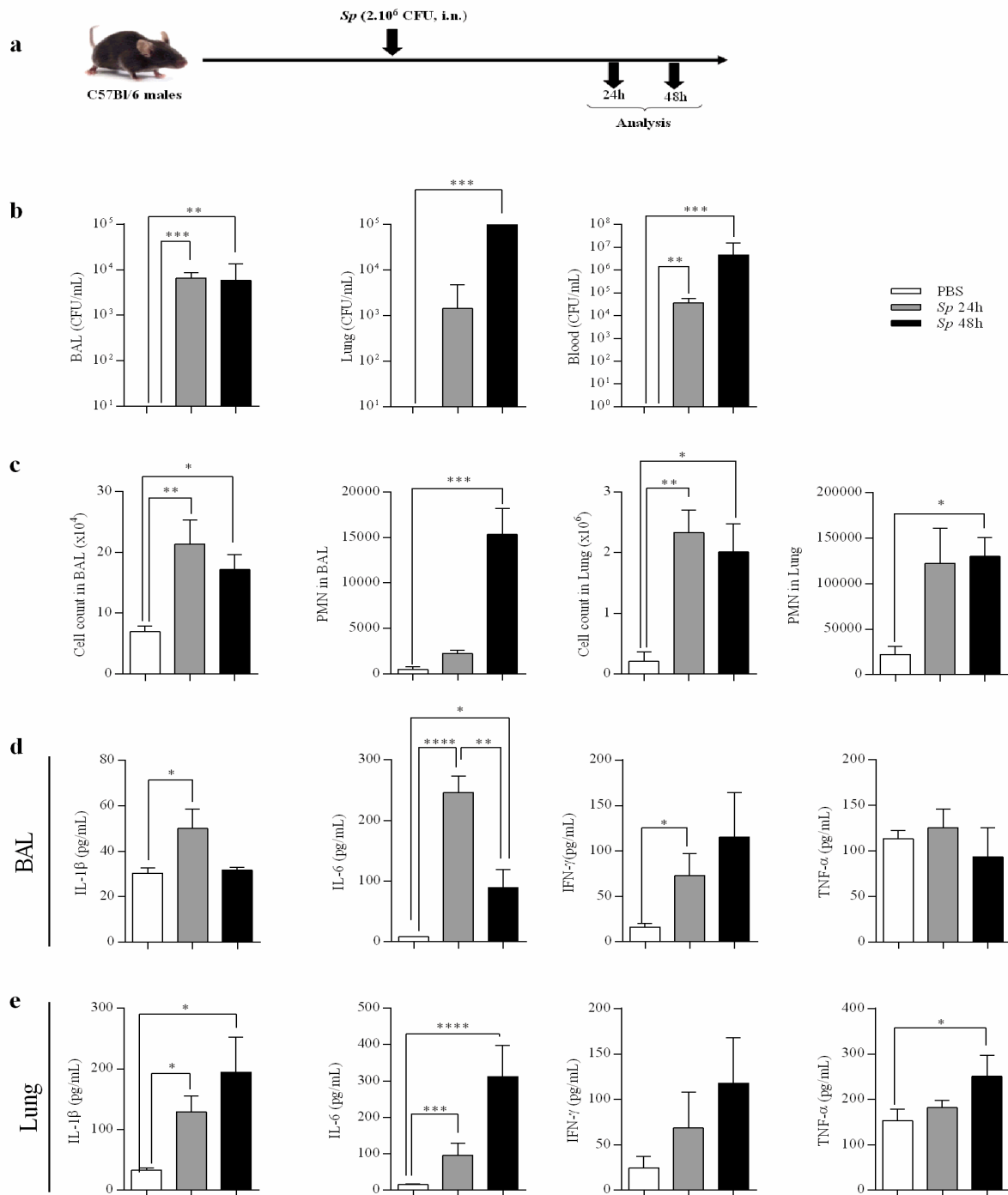
## Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été répétées au minimum 4 fois avec 4-5 souris par groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. L'analyse non paramétrique de Mann-Whitney U et Kruskal-Wallis suivi de Dunns post-test a été effectuée pour déterminer les différences significatives entre les groupes en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 5.00. Des différences statistiquement significatives ont été définies \* P <0,05, \*\* P <0,01 et \*\*\* P <0,001.

## RÉSULTATS

### **L'infection par *Streptococcus pneumoniae* initie une réponse inflammatoire pulmonaire et déclenche une septicémie.**

Après l'administration d'une dose létale de *Sp* (**Figure 1a**), nous avons mesuré la charge bactérienne et la réaction inflammatoire à 24h et 48h après infection chez la souris. Tandis que le nombre de bactéries avait tendance à se stabiliser à 48h dans le LBA, il augmentait à ce même temps dans le tissu pulmonaire et dans le sang par rapport à 24h (**Figure 1b**). De plus, le recrutement cellulaire dans le LBA et les poumons des souris infectées était significativement augmenté à la fois à 24h et 48h par rapport aux souris témoins (PBS) (**Figure 1c**). Comme attendu, le nombre de neutrophiles était significativement augmenté à 24h dans les poumons et à 48 h dans le LBA des souris infectées. Concernant les cytokines pro-inflammatoires, les concentrations d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IFN- $\gamma$  étaient augmentées dans le LBA des souris infectées à 24h (**Figure 1d**). De plus, la production de ces cytokines, en particulier du TNF- $\alpha$  ou encore de l'IFN- $\gamma$ , continuait d'augmenter jusqu'à 48h post-infection dans les poumons. (**Figure 1e**).

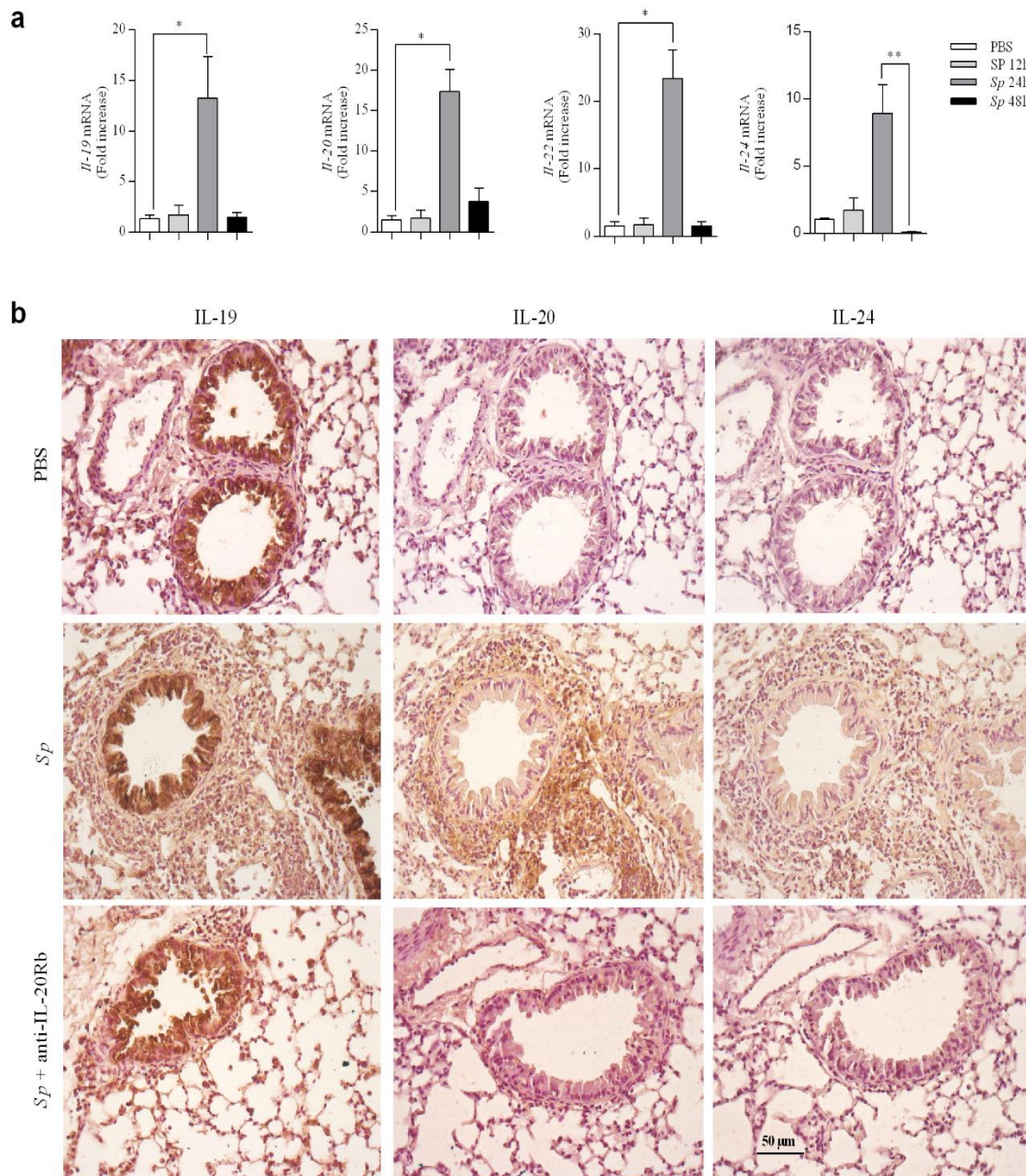


**Figure 1** : L'infection par *Streptococcus pneumoniae* induit une réponse pro-inflammatoire et une dissémination bactérienne dans le sang.

Toutes les données sont représentées à 24h et 48h après l'infection par *S. pneumoniae* (*Sp*, 2.10<sup>6</sup>UFC). **(a)** Protocole d'infection par *S. pneumoniae*. **(b)** Charge bactérienne dans le LBA, le tissu pulmonaire et le sang en nombre d'UFC. **(c)** Nombre total de cellules dans le LBA et le tissu pulmonaire, et le nombre de neutrophiles (PMN) obtenu par cytométrie de flux. **(d-e)** Niveau d'expression d'IL-1β, IL-6, IFN-γ et TNF-α dans le LBA **(d)** et dans le lysat pulmonaire **(e)** évalué par ELISA (pg/mL). Des analyses statistiques ont été réalisées en comparaison avec le contrôle PBS. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  et \*\*\*  $P < 0,001$ . Quatre expériences indépendantes ont été réalisées avec au minimum 5 souris dans chaque groupe.

**L'infection par *Streptococcus pneumoniae* induit l'expression des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs dans les poumons.**

Nous avons ensuite orienté nos recherches vers l'étude de l'expression des cytokines IL-20 au cours de l'infection par *Sp*. L'analyse quantitative par RT-PCR a indiqué une amélioration de l'expression des transcrits pour *Il-19*, *Il-20* et *Il-24* ainsi que pour *Il-22* à 24h post infection (**Figure 2a**). Cette induction était transitoire car les ARNm revenaient quasiment au niveau de base à 48h. Au niveau de la production des protéines, l'IL-19 et l'IL-20 sont augmentées dans les lysats pulmonaires à la fois à 24h et 48h post-infection, alors qu'il n'y avait pas de différence observée pour IL-24 (**Figure 2b**). Des marquages par immunohistochimie dans les poumons ont révélé que l'expression de l'IL-20 et l'IL-24 était faible chez les souris non infectées, alors que les cellules épithéliales des voies aériennes exprimaient fortement l'IL-19 à l'état basal. Par rapport aux souris traitées au PBS, l'infection par *Sp* a augmenté l'expression des cytokines IL-20 au niveau bronchique et péribronchique à 24h (**Figure 2c**) (**Table 1**). En plus, des cellules épithéliales bronchiques, les pneumocytes ainsi que les cellules inflammatoires exprimaient ces cytokines. Dans leur ensemble, nos données révèlent une expression basale pour IL-19 alors que l'infection par *Sp* augmente précocement l'expression des cytokines IL-20 dans les voies respiratoires et dans la zone péribronchique inflammatoire.



**Figure 2** : L'infection par *Streptococcus pneumoniae* induit l'expression des cytokines IL-20 dans les poumons.

Les données de qPCR et ELISA sont représentées à 24h et 48h après l'infection par *S. pneumoniae* (Sp,  $2.10^6$ UFC). Le groupe PBS est représenté en blanc, le groupe Sp à 24h en gris et le groupe Sp à 48h en noir. (a) Les niveaux d'ARNm des cytokines IL-19, IL-20, IL-22 et IL-24 évalués par RT-qPCR dans le tissu pulmonaire des souris infectées par Sp. (b) Expression d'IL-19, IL-20 et IL-24 évaluée sur des coupes de poumon de souris par immunohistochimie (grossissement x20) à 24h post-infection. Les analyses statistiques ont été effectuées en comparaison avec le contrôle PBS. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  et \*\*\*  $P < 0,001$ . Quatre expériences indépendantes ont été effectuées avec au minimum 5 fois dans chaque groupe.

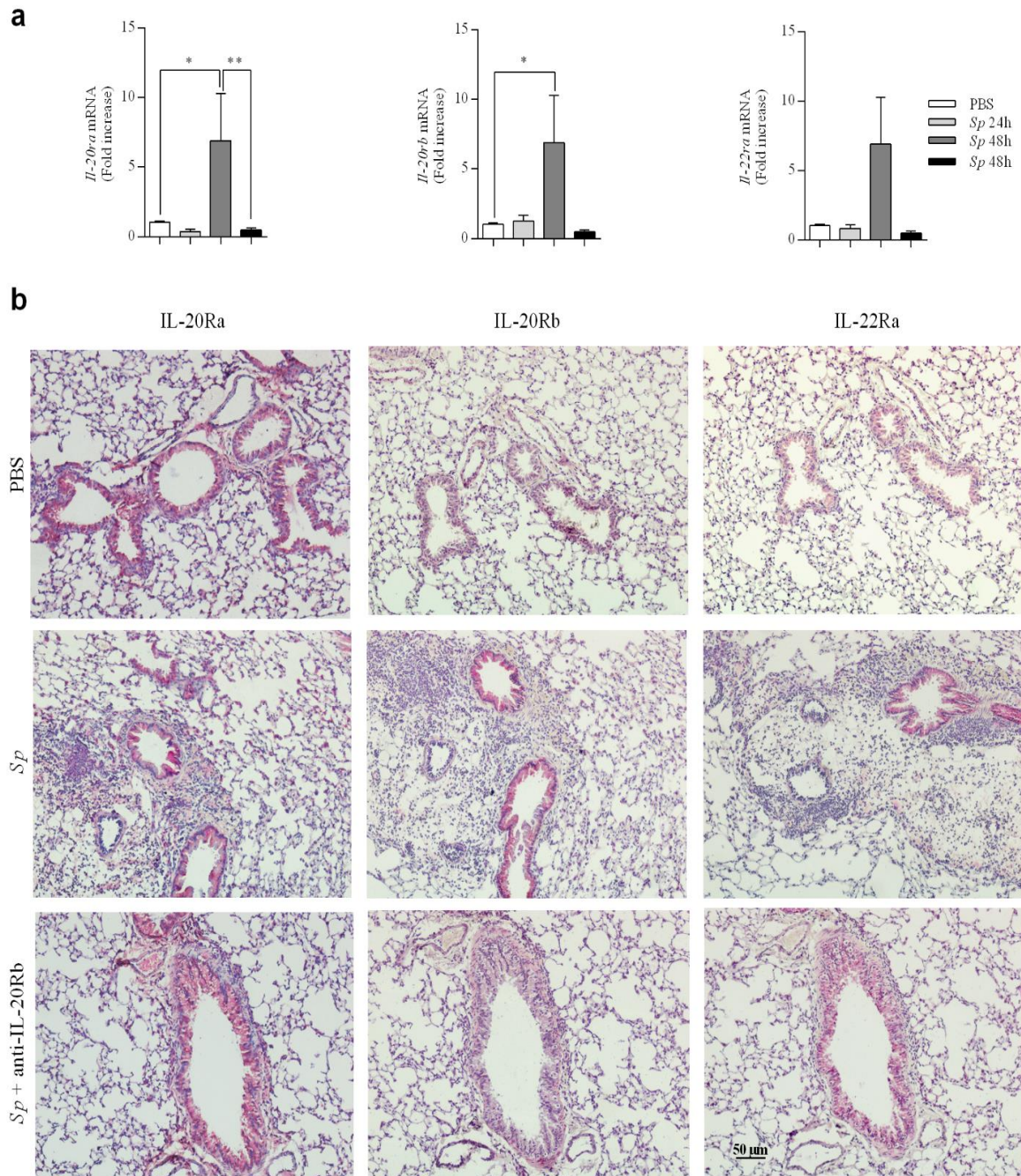


**Table 1** : Nombre de cellules exprimant les cytokines de la famille IL-20 et de leurs récepteurs sur coupes de poumon de souris.

	IL-19	IL-20	IL-24	IL-20RA	IL-20RB	IL-22RA
<b>PBS</b>	24.8 ± 2.3	9.6 ± 1.6	13.9 ± 1.5	70.6 ± 5.2	33.2 ± 11.9	31.4 ± 4.8
<b>SP</b>	84.4 ± 1.0	55.4 ± 5.9	64.5 ± 28.2	85.3 ± 2.3	51.9 ± 3.2	85.3 ± 2.3
<b>SP + ANTI-IL-20RB</b>	62.9 ± 5.3	32.9 ± 5.5	56.5 ± 3.2	42.8 ± 9.8	25.3 ± 7.9	15.6 ± 2.1

Des marquages immunohistologiques des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 et de leurs récepteurs (IL-20Ra, IL-20Rb, IL-22Ra) ont été réalisés sur les poumons collectés à 24h chez des souris PBS, des souris infectées par *Sp* et des souris infectées par *Sp* et traitées avec l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de cellules positives dans 3 à 5 champs (1 mm<sup>2</sup>) avec écart-type à la moyenne, incluant 3 souris dans chaque groupe.

Comme les cytokines IL-20 sont induites après l'infection par *Sp*, nous avons ensuite évalué l'expression de leurs récepteurs dans le poumon des souris infectées. Contrairement à l'ARNm d'*Il-22ra*, l'expression de l'*Il-20Ra* et de l'*Il-20Rb* était significativement augmentée dans les poumons de souris infectées à 24 heures post-infection, en comparaison avec des souris PBS (**Figure 3a**). Les niveaux d'expression génique sont revenus au niveau de base à 48h post-infection. De plus, l'analyse immunohistochimique dans le poumon a révélé que *Sp* augmentait le marquage bronchique et péribronchique de l'IL-20Ra, l'IL-20Rb et de l'IL-22Ra à 24h post-infection par rapport aux souris témoins PBS (**Figure 3b**) (**Table 1**).

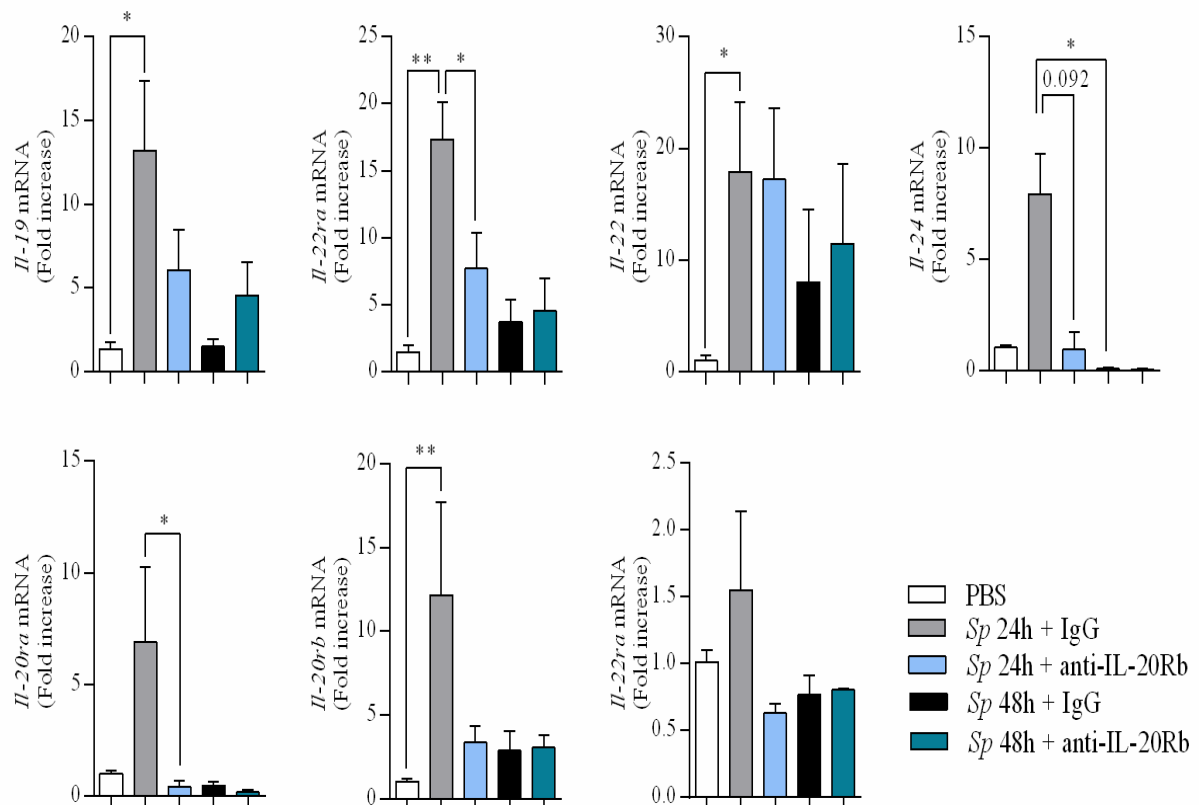


**Figure 3** : L'infection par *Streptococcus pneumoniae* amplifie l'expression des récepteurs aux cytokines l'IL-20 dans les tissus pulmonaires.

Les données de qPCR sont représentées à 24h et 48h après l'infection par *S. pneumoniae* (Sp,  $2.10^6$  UFC). (a) Niveaux d'ARNm des sous-unités IL-20ra, IL-20rb et IL-22ra dans le tissu pulmonaire de souris infectées par Sp, évalués par RT-qPCR. Les résultats sont relatifs à l'expression obtenue chez les souris PBS. (b) Expression des sous-unités des récepteurs IL-20, évaluée par immunohistochimie (grossissement x20) sur des coupes de poumon de souris à 24h post-infection. Quatre expériences indépendantes ont été réalisées avec au minimum 5 souris dans chaque groupe.

**Le blocage de la sous-unité IL-20Rb est associé à une diminution de la production des cytokines IL-20 dans les poumons des souris infectées par *Streptococcus pneumoniae*.**

Puisque l'infection par *Sp* active la voie de signalisation des cytokines IL-20, nous avons évalué l'impact de l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb sur l'expression des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs (procédure expérimentale, voir **Figure 4a**). Comparée aux souris traitées par le contrôle isotypique, l'administration de l'anticorps anti-IL-20Rb réduisait l'expression génique de l'ARNm de l'*Il-19*, l'*Il-20*, l'*Il-24* et de leurs récepteurs (*Il-20Ra*, *Il-20Rb* et *Il-22Ra*) 24 heures après l'infection (**Figure 4b**). En revanche, l'expression de l'*Il-22* n'était pas modulée.



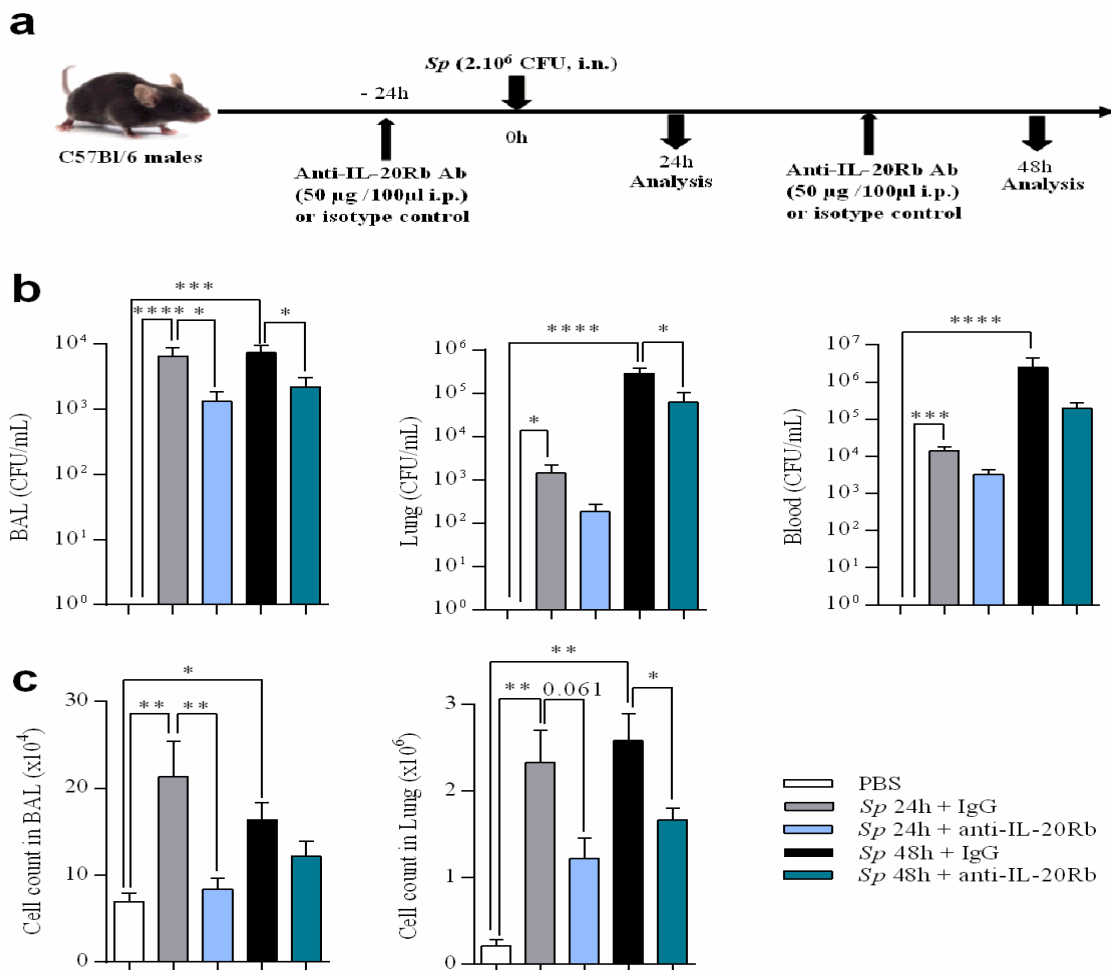
**Figure 4 : L'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb réduit l'expression des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs dans le poumon de souris infectées par *Streptococcus pneumoniae*.**

(a) Protocole d'infection par *Sp* et traitement par l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb. (b) Niveaux d'ARNm des cytokines de la famille IL-20 (*IL-19*, *IL-20*, *IL-22*, *IL-24*) et de leurs récepteurs (*IL-20Ra*, *IL-20Rb* et *IL-22Ra*) dans le tissu pulmonaire de souris infectées par *Sp*, évalués par RT-qPCR. Les résultats sont relatifs à l'expression chez les souris non infectées. Les analyses statistiques ont été effectuées en comparaison avec le contrôle PBS ou avec *Sp* + IgG. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  et \*\*\*  $P < 0,001$ . Quatre expériences indépendantes ont été réalisées avec au moins 5 souris dans chaque groupe.

De plus, l'analyse immunohistochimique a montré une diminution de l'expression protéique de l'IL-19, l'IL-20 et de l'IL-24 chez des souris traitées par l'anticorps anti-IL-20Rb au niveau bronchique (**Figure 2c**). Nous avons observé le même résultat concernant les récepteurs des cytokines IL-20 (IL20Ra, IL-20Rb et IL-22Ra) (**Figure 3b**). Ceci est probablement lié à une diminution du recrutement des cellules inflammatoires dans les poumons qui est observée en présence de l'anticorps anti-IL-20Rb.

**L'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb favorise la clairance bactérienne et limite la réaction inflammatoire causée par l'infection par *Streptococcus pneumoniae*.**

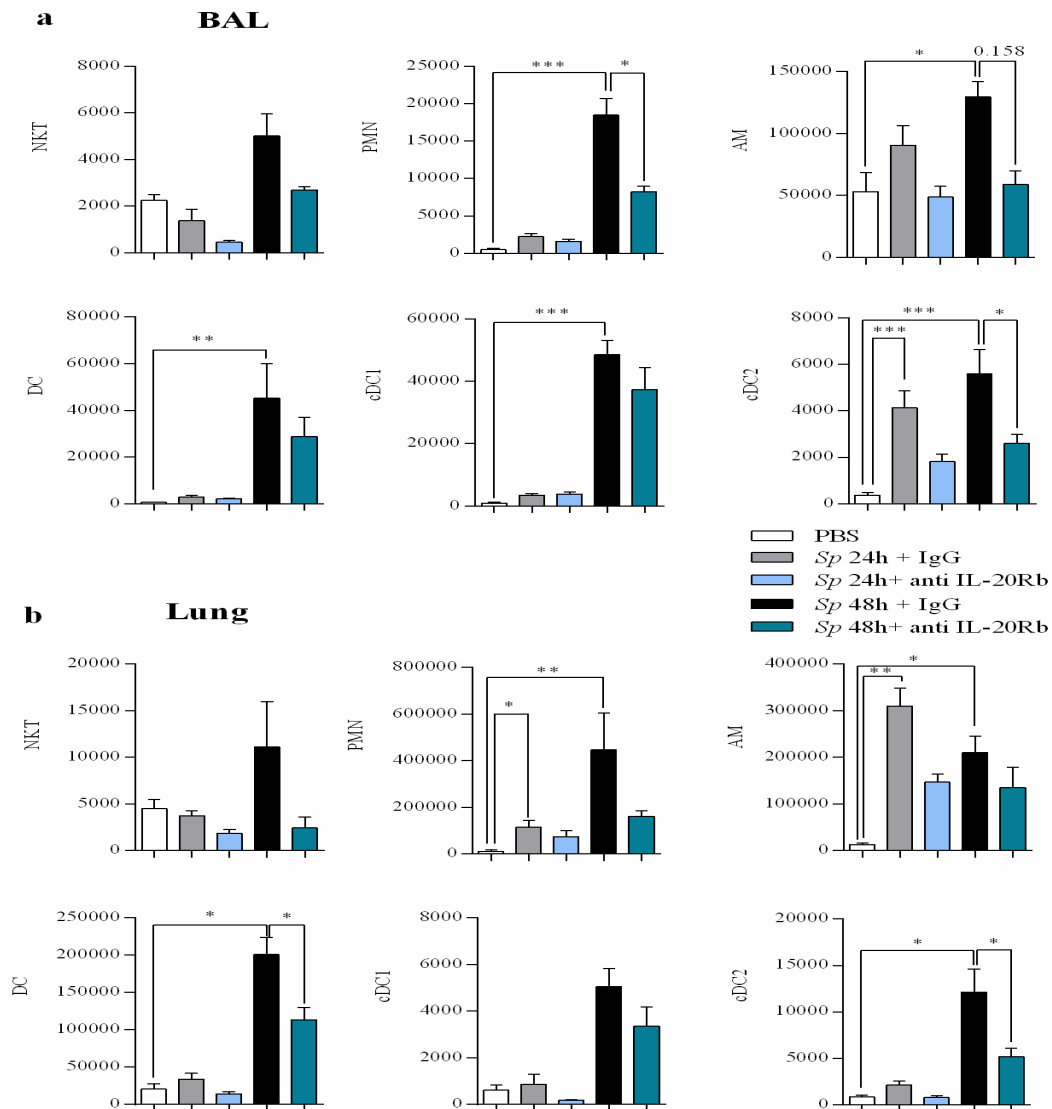
Nous avons cherché à savoir si ce traitement peut affecter la clairance bactérienne et le recrutement de cellules inflammatoires. La neutralisation de la sous-unité IL-20Rb diminue la charge bactérienne dans le LBA alors que la même tendance est observée dans le poumon (respectivement 23% et 38% d'inhibition) et dans le sang à 24h post-infection (97% et 59% d'inhibition respectivement), et (**Figure 5a**). Comme suggéré dans la **Figure 5b**, le traitement par l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb diminue le recrutement des cellules inflammatoires et les altérations pulmonaires associées à l'infection par *Sp* comme le révèle la mesure du score histopathologique à 24h ( $8,67 \pm 1,58$  vs  $13,3 \pm 2,04$ ) et à 48h ( $9,5 \pm 1,41$  vs  $13,83 \pm 1,58$ ) par rapport aux souris contrôles non infectées ( $3,4 \pm 0,68$ ). Le traitement avec l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb semble réduire le recrutement cellulaire dans le LBA ( $p < 0,05$ ) et dans le poumon (non significatif) à 24h post-infection (**Figure 5c**).



**Figure 5** : L'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb augmente la clairance bactérienne des souris infectées par *Streptococcus pneumoniae* et limite la réaction inflammatoire.

(a) UFC comptés dans le LBA, le tissu pulmonaire et le sang 24h et 48h post-infection. (b) Nombre total de cellules dans le LBA et le tissu pulmonaire 24h et 48h post-infection. Les analyses statistiques ont été effectuées en comparaison avec le contrôle PBS ou avec Sp + IgG. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  et \*\*\*  $P < 0,001$ . Quatre expériences indépendantes ont été réalisées avec au moins 5 souris dans chaque groupe.

Dans le LBA, le nombre de neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques comprenant les sous-populations de cDC1 (cellules dendritiques résidentes) et cDC2 (cellules dendritiques inflammatoires) a été fortement diminué mais de manière non significative à 48h post-infection (**Figure 6a**). Parmi les lymphocytes, le nombre de cellules NKT était nettement réduit à 24h et 48h après l'infection mais les données obtenues ne sont pas significatives. Dans les poumons, le nombre de neutrophiles, macrophages alvéolaires et cellules dendritiques (total ainsi que les sous-populations cDC1 et cDC2) a été légèrement réduit à 24h chez les souris ayant reçu le traitement par l'anticorps anti-IL-20Rb (**Figure 6b**). Cet effet semble être atténué, voire absent à 48h. A 48h post-infection, le traitement avec l'anticorps bloquant a diminué parmi les lymphocytes, le recrutement des cellules NKT dans le poumon.



**Figure 6 : L'anticorps anti-IL-20Rb neutralise l'infiltration cellulaire dans les poumons infectés par *Streptococcus pneumoniae*.**

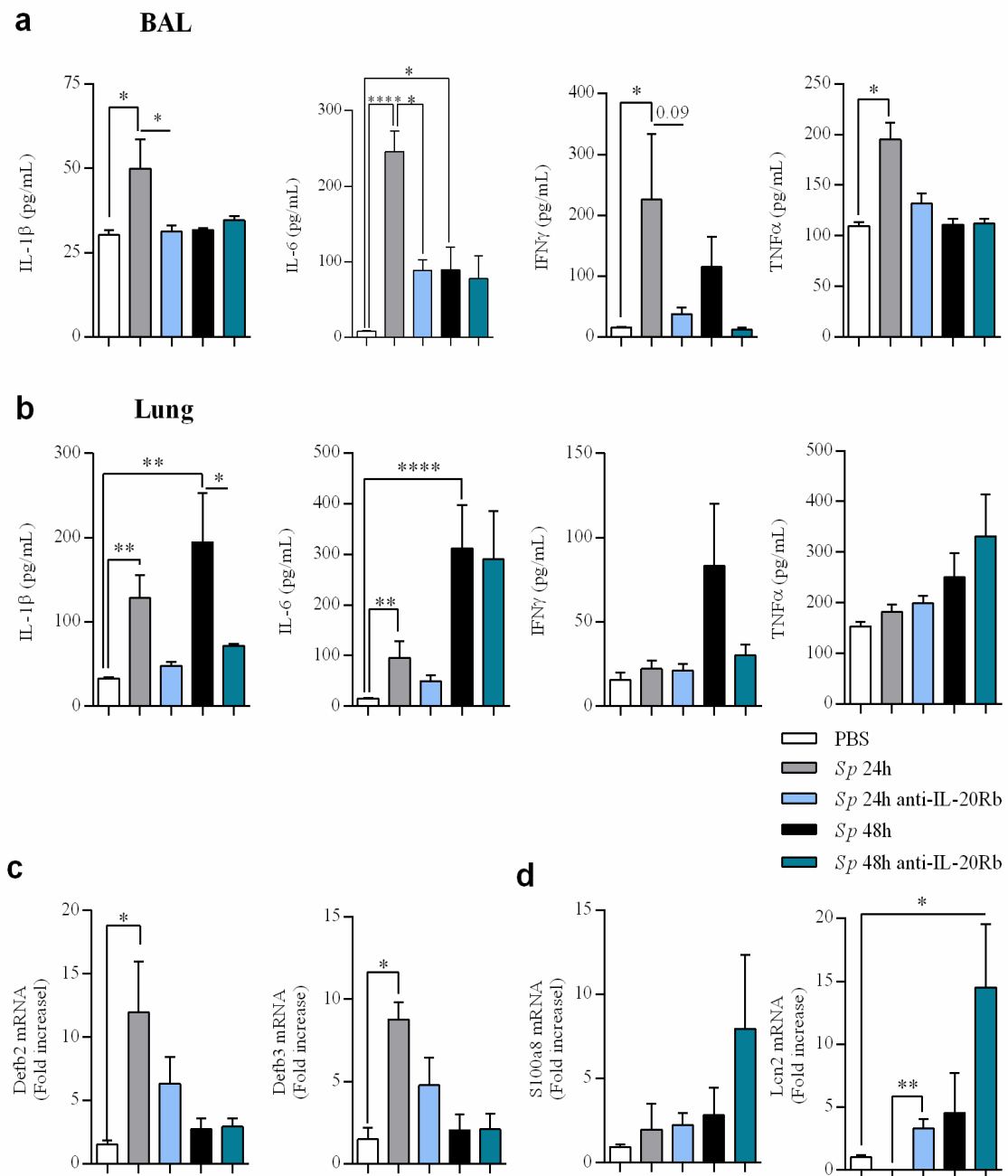
Les cellules NKT, les neutrophiles (PMN), les macrophages alvéolaires (AM), les cellules dendritiques (DC), résidentes (cDC1) et inflammatoires (cDC2) sont analysés dans LBA (a) et le poumon (b) 24h et 48h post-infection. Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SEM du nombre absolu calculé en utilisant les comptes de cellules totaux respectifs. Des analyses statistiques ont été réalisées en comparaison avec le contrôle PBS ou avec Sp + IgG. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 et \*\*\* P < 0,001. Quatre expériences indépendantes ont été réalisées avec au minimum 5 souris dans chaque groupe.

**L'anticorps anti-IL-20Rb réduit la production de cytokines pro-inflammatoires et de peptides antimicrobiens**

Le blocage des cytokines IL-20 ayant réduit le recrutement des cellules inflammatoires après l'infection par Sp, la production de cytokines a été analysée dans le LBA et les tissus pulmonaires des souris infectées (Figure 7a-b). Concernant les cytokines pro-inflammatoires, le niveau d'expression de l'IL-6 était significativement diminué dans le LBA des souris infectées

et traitées avec l'anticorps anti-IL-20Rb, et nous avons observé une diminution non significative des taux d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  (**Figure 7a**). De plus, le traitement avec l'anticorps anti-IL-20Rb inhibe la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 à 24h post-infection et de l'IL-1 $\beta$  et de l'IFN- $\gamma$  à 48h post-infection dans les poumons des souris infectées (**Figure 7b**). Nous avons également mesuré les niveaux d'expression des cytokines Th17 dans ces échantillons mais aucune modulation de l'IL-17 (données non montrées) et de l'IL-22 (**Figure 4b**) n'a été observée après le blocage de la voie de signalisation des cytokines IL-20.

Ce traitement affectant également la clairance bactérienne, nous avons analysé l'expression des peptides antimicrobiens dans les poumons par RT-PCR. L'infection par *Sp* amplifiait l'expression de l'ARNm de *Defb2* et *Defb3* à 24h post-infection (**Figure 7c**) alors qu'il réduisait de manière non significative celle de *S100a8* et de *Lcn2* (**Figure 7d**) ainsi que *S100a9* (données non présentées). L'administration de l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb a une tendance à réduire l'expression de l'ARNm pour les  $\beta$ -défensines dans le poumon de souris infectées à 24h. En revanche, le traitement améliore l'expression de l'ARNm de *S100a8* et *Lcn2* (**Figure 7d**) ainsi que *S100a9* (données non montrées), principalement à 48h post-infection. Ceci suggère que le blocage de l'IL-20Rb semble amplifier l'expression des calgranulines (S100 AMP) qui, à leur tour, facilitent la clairance bactérienne.



**Figure 7 : L'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb module la production des cytokines inflammatoires et des peptides antimicrobiens**

(a-b) Les niveaux d'IL-1β, d'IL-6, d'IFN-γ et de TNF-α sont évalués par ELISA (pg/mL) dans le BAL (a) et dans les lysats pulmonaires (b) 24h et 48h post-infection. (c-d) Le niveau d'ARNm des peptides antimicrobiens β-defensines (Defb2 et Defb3) (c) et S100a8 et lipocaline-2 (Lcn2) (d) est évalué par RT-qPCR dans les tissus pulmonaires 24h et 48h post-infection. Les résultats sont relatifs à l'expression dans les souris non infectées. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM du nombre absolu calculé à l'aide des comptes cellulaires totaux respectifs. Les analyses statistiques ont été effectuées en comparaison avec le contrôle PBS ou avec Sp + IgG. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 et \*\*\* P < 0,001. Quatre expériences indépendantes ont été réalisées avec au moins 5 souris dans chaque groupe.



## DISCUSSION

Il a précédemment été décrit que les cytokines de la famille IL-20 et leurs récepteurs jouent un rôle dans la promotion des infections cutanées de *S. aureus* (Myles et al., 2013). De plus, ces cytokines sont exprimées dans les cellules épithéliales pulmonaires (Rutz et al., 2014). Le but de notre étude était d'analyser dans un contexte d'infection pulmonaire par *Sp*, l'expression de ces cytokines IL-20 et de leurs récepteurs ainsi que leur rôle dans la clairance bactérienne et dans le contrôle de l'inflammation pulmonaire. Nous avons d'abord démontré que l'infection par *Sp* favorise principalement la production de l'IL-19 et de l'IL-20 ainsi que l'expression de la sous-unité IL-20Rb. Nous avons également montré que le pic d'expression des cytokines de la famille IL-20 était associé à une réduction de la clairance bactérienne et à une forte augmentation de la réaction inflammatoire. De cette façon, le blocage de la voie de signalisation des cytokines IL-20 permet d'améliorer de manière transitoire la clairance bactérienne et de réduire la réaction inflammatoire pulmonaire en particulier avec la diminution du recrutement de neutrophiles. Nous avons découvert un nouveau rôle critique pour les récepteurs des cytokines IL-20 et nos données suggèrent que le ciblage de la sous-unité IL-20Rb pourrait être une approche utile pour améliorer la résolution de l'infection causée par *Sp*.

*Sp* colonise les voies respiratoires inférieures par sa propagation dans ce milieu (Dockrell et al., 2012). La reconnaissance des composants bactériens de la paroi cellulaire de *Sp* (Acide lipoteichoïque, LTA et les peptidoglycanes; PG) par le Toll-like receptor 2 (TLR2) ou encore la pneumolysine pour le TLR4 (Tomlinson et al., 2014) (Dessing et al., 2009) induit l'activation de la voie de signalisation du facteur nucléaire canonique NF- $\kappa$ B dans les cellules présentatrices d'antigène (CPA) (Zahlten et al., 2013). L'activation de cette voie conduit à la libération de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, telles que l'IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ . Nos données concernant l'évaluation de l'inflammation et des cytokines dans le LBA et le poumon des souris ont validé notre modèle expérimental avec une production de cytokines pro-inflammatoires entre 24h et 48h post-infection. Pour la première fois, nous avons montré que les cytokines de la sous-famille IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24 ainsi que l'IL-22) sont également induites au cours de cette rafale de cytokines à 24h post-infection. Cependant, l'expression de l'ARNm de l'IL-19, l'IL-20, l'IL-22, l'IL-24, et de l'IL-20Ra, l'IL-20Rb et l'IL-22Ra revient au niveau de base à 48h post-infection alors que ces niveaux d'expression n'étaient pas significativement différents des témoins PBS à 12h post-infection (données non montrées). Comme décrit précédemment pour la majorité des cytokines dépendantes de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans le poumon, l'expression protéique de ces cytokines décline rapidement. Des données récentes soulignent que la production des cytokines IL-20 dépend de la voie NF- $\kappa$ B et pourrait être induite par la stimulation de TLR2 et TLR4, les deux récepteurs étant mobilisés par *Sp* (Tomlinson et al., 2014) (Dessing et al., 2009). Au niveau protéique, la production d'IL-19 et d'IL-20 est nettement augmentée alors que la production d'IL-24 semble plus faible. Certaines données récentes ont montré que la cytokine IL-24 est induite par les virus respiratoires, ce qui suggère qu'elle pourrait être plus associée avec une infection virale (Seong et al., 2016). De plus, nous avons détecté une forte expression de l'IL-19 dans l'épithélium bronchique des souris témoins

alors que nous n'avons pas détecté de différence entre l'expression de l'ARNm et l'expression protéique des autres cytokines de la famille IL-20 dans le tissu pulmonaire et dans les cultures cellulaires d'épithélium bronchique. Ceci suggère que l'IL-19 pourrait être stockée dans le cytoplasme de ces cellules. Après l'infection par *Sp*, nous avons détecté une expression accrue des cytokines de la famille IL-20 dans les cellules épithéliales pulmonaires (dans les bronches et les alvéoles) ainsi que dans l'infiltrat inflammatoire. Les cellules dendritiques et les macrophages sont capables de produire ces cytokines et nous avons observé que les DC dérivées des monocytes sécrètent ces cytokines après activation par *Sp* (données non montrées).

Selon Myles et al., dans un modèle d'infection cutanée, les cytokines de la famille IL-20 sont initialement sécrétées par les kératinocytes et les lymphocytes 24h post-infection (Myles et al., 2013). La plupart des recherches ont porté sur l'IL-22, mais nous savons que dans un contexte inflammatoire, l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24, se lient à leurs récepteurs et induisent un recrutement cellulaire des neutrophiles, des cellules dendritiques et des cellules T ainsi que l'expression de peptides antimicrobiens ( $\beta$ -défensine ou S100) et de la production de chimiokines et de cytokines.

Parmi les cytokines produites, la liaison des cytokines de la famille IL-20 à leurs récepteurs permet une expression en boucle autocrine positive de l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24, amplifiant leur effet pendant l'inflammation (Rutz et al., 2014) (Wang and Liang, 2005). Nos données montrant que la neutralisation de la sous-unité IL-20Rb diminue l'expression des cytokines de la famille IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) et de leurs récepteurs et confirme dans ce contexte le rôle de cette boucle autocrine. De plus, l'essentiel des caractéristiques de l'inflammation due à l'infection par *Sp* est réduite après blocage de la voie de signalisation des cytokines IL-20. En effet, cet anticorps anti-IL-20Rb diminue le recrutement des neutrophiles, des cellules présentatrices d'antigène et des cellules NKT. De plus, la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  est également réduite après traitement. Cependant, aucune augmentation de la production de cytokines IL-17 / IL-22 et pro-Th17 (telles que IL-1 $\beta$  et IL-6) n'est observée chez les souris infectées par *Sp* et traitées avec l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb contrairement à ce qui avait été montré par Myles et al au cours de l'infection cutanée à *S. aureus* (Myles et al., 2013). Le mécanisme d'action de notre anticorps anti-IL-20Rb pourrait être dû à l'activité antibactérienne des cytokines IL-20 sur des cellules effectrices comme montré *in vitro* chez les neutrophiles (Gough et al., 2017). En effet, le blocage de la voie de signalisation IL-20Rb favorise la clairance bactérienne dans le LBA et le poumon des souris traitées bien qu'il diminue l'afflux de neutrophiles et des macrophages alvéolaires. Ces données montrent qu'en plus, ces cytokines participent au recrutement de cellules inflammatoires, probablement en modulant la production de cytokines comme observé dans cette étude. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ce mécanisme d'action de l'anti-IL-20Rb chez les souris infectées. Cette administration module également la production de peptides antimicrobiens (PAM). Dans les poumons des souris traitées, nous avons observé une réduction de l'expression des  $\beta$ -défensines (*Defb2*, *Defb3*) qui sont produites par l'épithélium pulmonaire et les neutrophiles au cours de l'infection par *Sp* (Scharf et al., 2012). En revanche, l'expression de *S100a8*, *S100a9*

et de la lipocaline-2 est augmentée dans le poumon des souris traitées. En effet, il a été montré que les PAM S100 (exprimés par les neutrophiles, les monocytes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales activées) contrôlent la clairance bactérienne en modulant au niveau pulmonaire le recrutement de neutrophiles et de macrophages au cours de l'infection par *Sp* (De Filippo et al., 2014) (Raquil et al., 2008). Ceci suggère que ce mécanisme est utile pour améliorer l'activité antibactérienne des cellules immunitaires telles que les neutrophiles et les macrophages.

Cet effet de l'anti-IL-20Rb est associé à une réduction de l'inflammation et du remodelage tissulaire dans le poumon comme le montre le score histopathologique réduit et comme illustré dans les **Figures 2** et **3**. Ces données soulignent l'impact bénéfique de ce traitement sur les lésions tissulaires du poumon, consécutives à l'infection, un effet probablement lié à la modulation du recrutement inflammatoire. Cependant, cet effet n'a pas été associé avec un impact significatif sur la survie des souris et la perte de poids à 4-5 jours post-infection (données non montrées), suggérant qu'il est nécessaire d'associer ce traitement à une autre approche thérapeutique comme un antibiotique, afin d'améliorer son efficacité.

En conclusion, nous montrons pour la première fois que les cytokines de la famille IL-20 et leurs récepteurs sont induits au cours de l'infection pulmonaire par *Sp*, et que le traitement avec un anticorps anti-IL-20Rb neutralisant l'action de ces cytokines, limite l'inflammation due à l'infection. De plus, combiner le traitement de l'infection pulmonaire avec des antibiotiques actifs sur *Sp* plus un immunorégulateur comme l'anti-IL-20Rb pourrait aider à prévenir les lésions tissulaires associées à une inflammation, et les stratégies immunitaires bactériennes pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

## **Chapitre II : Les cytokines de la famille IL-20 participent à la réponse des cellules épithéliales des voies respiratoires lors d'une infection bactérienne : Altération lors de l'exposition à la fumée de cigarette (Article en préparation)**

Les voies aériennes sont constamment exposées à des contaminants, notamment des polluants et des micro-organismes responsables de maladies inflammatoires chroniques et d'infections. L'épithélium des voies respiratoires joue un rôle essentiel dans les mécanismes de défense par sa capacité à maintenir la barrière épithéliale, à mobiliser une réaction immunitaire et à produire des molécules bactéricides. Les cytokines de la sous-famille des IL-20 incluant IL-19, IL-20, IL-22 et IL-24 sont essentielles dans le contrôle de la fonction épithéliale notamment cutanée. Contrairement à IL-22, les fonctions de l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24 qui dépendent de la sous-unité IL-20Rb, sont principalement inconnues au niveau pulmonaire.

Notre objectif est d'analyser l'expression des cytokines IL-20 dans les cellules épithéliales des voies respiratoires (AEC) et leur capacité à contrôler la réponse antibactérienne dans ces cellules. Comme l'exposition à la fumée de cigarette (CS) module la fonction épithéliale et altère la réponse antibactérienne pulmonaire, nous avons voulu évaluer l'expression de ces cytokines et leur fonction dans les AEC après exposition à la CS. Pour cela, nous avons observé *in vitro et in vivo*, la production de ces cytokines et de leurs récepteurs après infection par *Streptococcus pneumoniae* (*Sp*) et *Haemophilus influenzae non typable* (*NTHi*) associée ou non à l'exposition à la CS.

L'infection par *Sp* et *NTHi* amplifie la transcription des ARNm de l'IL-19 et de l'IL-24 ainsi que celle de l'IL-20Rb à la fois dans l'AEC et dans les poumons des souris infectées. L'analyse immunohistochimique a révélé que l'expression de ces protéines est augmentée au sein de l'AEC provenant des souris infectées. En outre, l'exposition à la CS a également amplifié l'expression de l'IL-19 et de l'IL-24 alors qu'il ne semble pas y avoir d'effet additif avec l'infection bactérienne. L'activation d'AEC par l'IL-19 recombinante favorise l'expression génique de *S100a9* alors que l'expression de *Lcn2* est induite par cette cytokine sur des mTEC après une exposition chronique à CS. L'addition d'un anticorps anti-IL-20Rb neutralisant a diminué l'expression génique induite par *NTHi* des peptides antimicrobiens *S100a8*, *S100a9* et *Lcn2* dans l'AEC de souris témoins mais pas dans l'AEC de souris exposées de façon chronique à CS. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B. De plus, les cytokines IL-20 favorisent la cicatrisation des cellules BEAS-2B, tandis que l'exposition à l'extrait de CS altère cette réponse. Chez les souris infectées par *Sp*, l'administration locale de l'anticorps anti-IL-20Rb dans les poumons augmente la clairance des bactéries alors qu'il inhibe la production de *S100a8* et le recrutement des neutrophiles.

Nos données montrent l'implication des cytokines de la famille IL-20 au cours d'une infection bactérienne respiratoire et leur capacité à moduler la fonction des AEC. L'exposition à CS induit également leur production bien qu'elle altère leur fonction antibactérienne. Ces

données suggèrent que le ciblage de cette voie pourrait avoir des applications thérapeutiques lors d'infections respiratoires notamment dans certaines maladies chroniques liées à la cigarette telles que la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO).

## INTRODUCTION

Les voies respiratoires sont constamment exposées aux contaminants présents dans l'air inspiré. Cela inclut les polluants atmosphériques, mais aussi les micro-organismes, y compris les bactéries, les virus et les champignons. Cela entraîne fréquemment des infections respiratoires qui sont une cause majeure de décès et donc un problème de santé publique important. Parmi les bactéries, *Streptococcus pneumoniae* (*Sp*) est reconnu comme l'une des principales causes de pneumonie et d'infections opportunistes hospitalières. L'exposition chronique aux polluants atmosphériques et en particulier à la fumée de cigarette est associée à une susceptibilité accrue aux infections respiratoires (Sethi and Murphy, 2008) (Pavord et al., 2016). Parmi les bactéries impliquées dans ces infections, *Haemophilus influenza* (*NTHi*) et *Sp* sont les causes les plus fréquentes d'infection respiratoire (Sethi et al., 2002) (Sethi and Murphy, 2008).

Les mécanismes de défense pulmonaire comprennent à la fois des mécanismes physiques tels que l'escalator mucociliaire et la barrière épithéliale dans les voies respiratoires (Hallstrand et al., 2014) (Hiemstra et al., 2015). Ces mécanismes sont complétés par le système immunitaire inné et adaptatif dont la réponse est mobilisée par l'activation des cellules résidentes, principalement les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales des voies respiratoires. Sur ces cellules, les voies de signalisation déclenchées par l'activation des récepteurs de reconnaissance de motifs bactériens conduiront à la production de mécanismes effecteurs incluant la sécrétion de peptides antimicrobiens comme les  $\beta$ -défensines et les calgranulines (S100A8 et S100A9) (Hiemstra, 2015). De plus, cette activation entraîne également le recrutement d'autres cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes/macrophages, lymphocytes) par la sécrétion de facteurs chimiotactiques tels que les chimiokines CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP2) agissant sur les neutrophiles ou les cytokines CCL2 et CCL5 actives sur les cellules mononuclées (Hallstrand et al., 2014) (Hiemstra et al., 2015). Cela permet le développement d'une réaction inflammatoire appropriée capable de lutter contre les infections respiratoires. Cette inflammation est responsable de lésions tissulaires et une phase de résolution est nécessaire pour retrouver un tissu normal et une fonction pulmonaire adéquate. Dans ce contexte, le processus de cicatrisation des voies aériennes est une étape essentielle pour reconstituer une barrière épithéliale. Cependant, la fonction de l'épithélium des voies respiratoires est fortement affectée par les facteurs de croissance et les cytokines inflammatoires, y compris les cytokines de la famille IL-20 (Rutz et al., 2014).

Ces cytokines forment une sous-famille de la superfamille de l'IL-10 et comprennent l'IL-19, l'IL-20, l'IL-22, l'IL-24 et l'IL-26 (cette dernière étant uniquement présente chez l'humain) (Ouyang et al., 2011) (Rutz et al., 2014). Alors que l'IL-22 agit par l'intermédiaire d'un récepteur hétérodimérique spécifique comprenant la chaîne IL-10Rb, les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 dépendent de la sous-unité IL-20Rb. En effet, les deux types de récepteurs reconnaissant ces 3 cytokines comprennent l'IL-20Rb (ou IL-20R2) associée soit à la chaîne IL-20Ra, soit à l'IL-22Ra. Ce dernier hétérodimère se lie à IL-20 et IL-24 mais pas à IL-19 (Wegenka, 2010). Les récepteurs composés de l'IL-20Rb sont exprimés principalement sur des cellules épithéliales,

des cellules phagocytaires mononuclées, certains lymphocytes et les neutrophiles activés. Leur mobilisation active le transducteur du signal et l'activateur de la voie STAT3 ainsi que les MAPK, ERK et P38 (Rutz et al., 2014). Cette activation conduit à la restauration de l'homéostasie tissulaire en améliorant le remodelage, la cicatrisation et la sécrétion de peptides antimicrobiens dans les kératinocytes (Sa et al., 2007). Cependant, il a été montré que les cytokines de la famille IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) favorisent l'infection cutanée à *Staphylococcus aureus* chez la souris en diminuant la production des cytokines Th17 (Myles et al., 2013). Bien que les récepteurs des cytokines IL-20 soient également présents dans les cellules épithéliales des voies respiratoires (Gong et al., 2014), leur fonction sur ces cellules n'est pas connue.

L'exposition à la fumée de cigarette altère la réponse immunitaire innée et adaptative contre les bactéries et les virus, qui prédisposent aux exacerbations de la BPCO (Brusselle et al., 2011), (Le Rouzic et al., 2016). Puisque nos expériences préliminaires ont montré que la fumée de cigarette ainsi que l'infection par *Sp* pouvaient favoriser la production de cytokines IL-20 dans les poumons, notre objectif est d'analyser l'expression et la fonction des cytokines IL-20 dans la réponse aux infections bactériennes par les cellules épithéliales des voies respiratoires (AEC) et leur modulation après exposition à la fumée de cigarette (CS) par des approches *in vitro* et *in vivo*. Nos données ont montré que l'exposition à la fumée de cigarette et aux bactéries respiratoires favorisait l'expression des cytokines IL-20 et du récepteur IL-20Rb dans l'AEC. Ces cytokines ont la capacité de contrôler la production de certains peptides antimicrobiens par les cellules AEC et d'accélérer la cicatrisation de l'épithélium des voies respiratoires. De plus, l'exposition à la fumée de cigarette modifie les fonctions des récepteurs et des cytokines de la famille IL-20. L'administration intranasale de l'anticorps anti-IL-20Rb bloquant diminue la charge bactérienne chez les souris exposées à l'air ainsi que la production de peptides antimicrobiens et le recrutement des neutrophiles. Dans l'ensemble, ces données suggèrent fortement que les cytokines IL-20 sont impliquées dans le contrôle de l'infection respiratoire bactérienne, au moins en partie, en modulant la fonction de l'épithélium des voies respiratoires alors que l'exposition à CS altère cette fonction.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Modèle animal

Des souris C57BL/6 (H-2Db) mâles de six à huit semaines ont été obtenues chez Janvier (Le Genest-St.-Isle, France). Les expérimentations réalisées sur les animaux étaient conformes aux directives du Comité de protection et d'utilisation des animaux du Nord Pas-de-Calais (accord n° AF 16/20 090). Les souris ont été maintenues dans une installation à température contrôlée (23°C) avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures et avec de la nourriture et de l'eau fournies à volonté.

### Infection par *Streptococcus pneumoniae* et numération bactérienne

Les souris ont été exposées quotidiennement à la fumée de cigarette (souris CS) pendant 12 semaines (5 cigarettes/jour, 5 jours/semaine pendant 12 semaines) pour mimer la pathogenèse de la BPCO (Pichavant et al., 2014). Des cigarettes de recherche 3R4F ont été obtenues auprès de l'Institut de recherche sur le tabac et la santé de l'Université du Kentucky (Lexington, KY, USA). Puis, le groupe témoin a été exposé à l'air ambiant (souris Air).

Ensuite, les souris ont été inoculées par voie intranasale avec un isolat clinique de *Sp* sérotype1 (isolat clinique E1586) (Van Maele et al., 2014) et *NTHi* (Pichavant et al., 2015) (Sharan et al., 2017). *S. pneumoniae* a été cultivé comme décrit précédemment (Le Rouzic et al., 2016). Pour l'infection, les solutions stocks de travail congelées ont été diluées dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS).  $4 \times 10^5$  unités formant colonies (UFC) de *Sp* et  $2,5 \times 10^7$  UFC de *NTHi* ont été administrées par voie intranasale dans 50  $\mu$ l de PBS chez des souris anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine-xylazine. Les souris ont été sacrifiées à 24h et 48h post-infection par dislocation cervicale.

Certaines de ces souris ont été traitées par voie intranasale avec l'anticorps monoclonal anti-IL-20Rb de rat (50 $\mu$ g/50 $\mu$ l par souris) (clone 20RNTC, azide et endotoxine free) ou un contrôle isotypique (Invitrogen, Thermo Scientific) toutes les 24h avant et après infection. La charge bactérienne ainsi que l'inflammation ont été mesurées dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA), les poumons et le sang. Les UFC ont été énumérées 24h plus tard en étalant les échantillons sur des géloses chocolat.

### Immunohistochimie pulmonaire

Pour l'histopathologie, les poumons ont été fixés dans du paraformaldéhyde (PFA: 4%) et inclus dans de la paraffine. Pour évaluer l'inflammation des voies respiratoires, les coupes pulmonaires (4 $\mu$ m d'épaisseur) ont été colorées par l'hématoxyline et l'éosine. Sur ces coupes, nous avons mesuré à la fois le remodelage pulmonaire et l'inflammation grâce au scoring des lésions pulmonaires.

Pour l'immunohistochimie, les coupes pulmonaires incluses en paraffine sont déparaffinées en xylène (Acros Organics) et réhydratées avec des bains successifs d'alcool et d'eau. Le démasquage des épitopes est effectué dans du tampon phosphate pH 6,0 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $12\text{H}_2\text{O}$ ) pendant 15 minutes à 90 °C. Les anticorps primaires dirigés contre l'IL-19 (ab154187 Abcam), l'IL-20 (orb13501 Biorbyt), l'IL-24 (orb228807 Biorbyt) et l'IL-20Rb (clone 20RNTC Invitrogen) ainsi que les témoins isotypiques ont été tous utilisés à une concentration de 0,01 mg/mL. Le kit IHC de détection HRP/DAB Expose (Abcam) est utilisé conformément aux recommandations du fabricant pour la détection des anticorps primaires. La contre-coloration est réalisée sur les coupes pulmonaires avec de l'hématoxyline (Interchim).



### Réactifs de cytométrie en flux

Le phénotype des LBA et des cellules pulmonaires a été analysé par cytométrie en flux en utilisant les anticorps suivants : Anticorps monoclonaux (mAbs) contre CD5 de souris (conjugué à FITC), Tétramère CD1d/ $\alpha$ GalCer (conjugué à PE), NK1.1 (conjugué à PerCp-Cy5.5), CD4 (conjugué à PE-Cy7), CD25 (conjugué à APC), CD69 (conjugué à Alexa700), TCR $\gamma\delta$  (conjugué à APC-H7), TCR- $\beta$  (conjugué à V450), CD8 (conjugué à V500), CD45 (conjugué à Q-dot605) (BD Biosciences, Biolegend et Myltenyi Biotech), I-Ab (conjugué à FITC), F4/80 (conjugué au PE), CD103 (conjugué à PerCP-Cy5.5), CD11c (conjugué à PE-Cy7), CD86 (conjugué à Alexa-700), CCR2 (conjugué à APC), Ly6G (conjugué à APC-H7), CD11b (conjugué à V450), CD45 (conjugué à V500), Ly6C (conjugué à Q-dot605) (BD Biosciences, Biolegend et Myltenyi Biotech). Les données ont été acquises sur un LSR Fortessa (BD Biosciences) et analysées avec le logiciel FlowJo™ v7.6.5 (Stanford, CA, USA). Les stratégies de gating ont déjà été décrites (Sharan et al., 2017).

### Préparation de l'extrait de fumée de cigarette

L'extrait de fumée de cigarette (CSE) a été préparé selon la méthode décrite par Blue et Janoff (Blue and Janoff, 1978). La fumée de cigarette est extraite grâce à une seringue de 50 mL à laquelle une cigarette est attachée. Le CSE a été préparé en aspirant 50 mL de fumée de cigarette à travers le filtre dans la seringue, puis en faisant buller lentement la fumée dans 10 mL de milieu de culture Airway Epithelial Cells (PromoCell). Deux cigarettes de recherche Kentucky 3RF4 ont été fumées par 10 mL de milieu. La solution finale a été filtrée à travers des filtres de 0,2  $\mu$ m et utilisée immédiatement à une dilution au 1/50.

### Culture cellulaire de cellules épithéliales trachéales de souris (mTEC) et activation

La trachée de souris est digérée dans du milieu DMEM F12 (Gibco) + 1% de Pénicilline-Streptomycine (Pen/Strep Gibco) + pronase (1,6 mg/mL, Roche) pendant 1 heure à 37°C. La réaction est arrêtée avec du sérum de veau fœtal (Gibco). Les cellules épithéliales sont récupérées et cultivées dans du milieu DMEM F12 additionné de 2% d'Ultrosor G (PALL sciences de la vie), d'antibiotiques et de 2 mM de L-Glutamine. Les cellules ont été cultivées sur des plaques de culture revêtues de matrice de collagène G humain (Biochrom, Berlin, Allemagne). Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont sevrées dans du milieu de culture appauvri avec du milieu basal sans antibiotiques, puis activées par différents stimuli dans le même milieu. L'activation avec *Sp* et *NTHI* a été réalisée par l'ajout de bactéries viables (MOI de 2 et 10, respectivement). Dans d'autres puits, les cytokines murines recombinantes IL-20, IL-22 (systèmes de R & D), IL-19 et IL-24 (Myltenyi biotech) ont été ajoutées au milieu à une concentration de 20 ng/mL. Dans certaines expériences, l'anticorps anti-IL-20Rb neutralisant (clone 20RNTC) ou un témoin d'isotypique a été ajouté à la culture à 5  $\mu$ g/mL avant la stimulation cellulaire. Après 1h30 d'incubation à 37°C, les antibiotiques, pénicilline et streptomycine ont été ajoutés au milieu afin d'arrêter la croissance bactérienne. Les cellules

sont récupérées à 4 heures après stimulation pour effectuer des qPCR et le surnageant est récupéré à 24 heures pour réaliser les dosages ELISA.

### **Culture cellulaire de cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B et activation**

Les cellules BEAS-2B ont été obtenues par l'ATCC (Manassas, VA). Ces cellules ont été maintenues dans du milieu de culture Airway Epithelial Cells complété (Promocell, Heidelberg, Allemagne). La lignée cellulaire a été cultivée sur des plaques de culture revêtues de matrice de collagène G humain (Biochrom, Berlin, Allemagne). Les BEAS-2B ont été placées en milieu de carence avec un milieu non complété et dépourvu d'antibiotique, puis activés par les différents stimuli dans le même milieu. L'activation avec *Sp* et *NTHi* a été réalisée par l'ajout de bactéries viables (MOI de 2 et 10, respectivement). Dans d'autres puits, les cytokines humaines recombinantes IL-20, IL-22 (systèmes de R & D), IL-19 et IL-24 (Miltenyi biotech) ont été ajoutées au milieu à une concentration de 20 ng/mL. Après 1h30 d'incubation à 37°C, les antibiotiques, pénicilline et streptomycine ont été ajoutés au milieu afin d'arrêter la croissance bactérienne. Les cellules sont récupérées à 4 heures après stimulation pour effectuer des qPCR et le surnageant est récupéré à 24 heures pour réaliser les dosages ELISA.

### **Test de cicatrisation cellulaire**

Des cellules BEAS-2B confluentes ont été préparées dans des plaques à 24 puits. Les cellules ont été blessées avec une pointe de pipette et les cellules ont été rincées avec du PBS pour retirer les cellules décollées. Le milieu complet a été changé par du milieu AEC appauvri (sans facteur de croissance, Promocell, Heidelberg, Allemagne). Les cytokines recombinantes humaines IL-19, IL-20, IL-22 et IL-24 ont été ajoutées au milieu de culture à une concentration de 10 ng/mL. Les zones blessées ont été photographiées (grossissement x120) aux temps indiqués (0, 24, 48 et 72h). L'imagerie temporelle a été réalisée à l'aide d'un système de microscopie Zeiss ObserverZ.1 (Zeiss) avec 10 lentilles sèches (Plan Neofluar 10x / 0.3 Ph1) et équipé d'une chambre thermorégulée à 37 °C et 5% CO<sub>2</sub>. Une image DIC est prise toutes les 30 minutes pendant 72 heures par une caméra sCMOS Prime 95B (Photometrics) et traitée avec le logiciel ZEN blue 2.3 (Zeiss). L'analyse quantitative des taux de fermeture de la blessure est réalisée avec le logiciel Fiji (NIH) délimitant les limites de la blessure et déterminant la surface libre.

### **Dosage des cytokines par ELISA**

Pour les cellules mTEC, mIL-6 (Invitrogen, Thermo Scientific) et mCXCL-1 (R&D system, Abingdon, UK) ont été mesurées en utilisant des kits ELISA selon les recommandations du fabricant. Pour les cellules BEAS-2B, les concentrations de l'hIL-6, l'hIL-8 et de hCXCL-1 ont été dosées dans des surnageants cellulaires en utilisant des kits ELISA de chez de R&D system.

### Extraction d'ARN et RT-qPCR

L'ARN total a été isolé des cellules en utilisant TRIzolR Reagent (Ambion) et quantifié par le NanoVue Plus (Healthcare Bio-sciences AB). La transcription inverse a été réalisée avec un kit de transcription inverse d'ADNc haute capacité (Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant. Les ADNc ont été soumis à une PCR quantitative (QuantStudio 12K Flex Applied Biosystems) en utilisant des amorces spécifiques pour des souris (cellules mTEC) ou humaines (cellules BEAS-2B) (Table 1 et 2, respectivement) (Eurofins Genomics). L'expression du transcrit relatif d'un gène est donnée sous la forme  $-2\Delta\Delta C_t$  en utilisant la *Gapdh* de la souris et l'*actine* humaine comme gène de ménage.

**Table 1 : Séquence des amorces de souris utilisées pour la RT-qPCR**

Cibles	Amorces	Séquences
Souris GAPDH	Sens	5'-TGTTTCCTCGTCCCGTAGACAA-3'
	Anti-sens	5'-GGCAACAATCTCCACTTTGCC-3'
Souris IL-19	Sens	5'-TGTGTGCTGCATGACCAACAA-3'
	Anti-sens	5'-GGCAATGCTGCTGATTCTCCT-3'
Souris IL-20	Sens	5'-TCTTGCCTTTGGACTGTTCTCC-3'
	Anti-sens	5'-GTTTGCAGTAATCACACAGCTTC-3'
Souris IL-24	Sens	5'-CCACTCTGGCCAACAACCTTCAT-3'
	Anti-sens	5'-TCTGCGGAACAGCAAAAACC-3'
Souris IL-20Rb	Sens	5'-CAGGTGCTTCCAGTCCGTCT-3'
	Anti-sens	5'-CTCTCCTGGAATCCCCAAAGT-3'
Souris CXCL-1	Sens	5'-ATCGCACCCAAACCGAAGTC-3'
	Anti-sens	5'-TGGGGACACCTTTTAGCATCTT-3'
Souris S100a7	Sens	5'-TGCTCTTGGATAGTGTGCCTC-3'
	Anti-sens	5'-GCTCTGTGATGTAGTATGGCTG-3'
Souris S100a8	Sens	5'-TCCTTGCATGGTGATAAAA-3'
	Anti-sens	5'-GGCCAGAAGCTCTGCTACTC-3'
Souris S100a9	Sens	5'-CACCTGAGCAAGAAGGAAT-3'
	Anti-sens	5'-TGTCATTTARGAGGGCTTCATTT-3'
Souris LL-37	Sens	5'-GGCAGCTACCTGAGCAATGTG-3'
	Anti-sens	5'-CCAGGCTCGTTACAGCTGATGT-3'
Souris LCN2	Sens	5'-TGGCCCTGAGTGTGATGTG-3'
	Anti-sens	5'-CTCTTGTAGCTCATAGATGGTGC-3'
Souris Occludine	Sens	5'-CAGCCTTCTTTTCGGAAGACT-3'
	Anti-sens	5'-GGTAGACAGCTCCCTATGACTACTG-3'
Souris E-cadhérine	Sens	5'-TTGAAAGTCCACCTCCTTACAGA-3'
	Anti-sens	5'-CCGATAAAAAGAGTACGCTGG-3'

**Table 2 : Séquence des amorces humaines utilisées pour la RT-qPCR**

Cibles	Amorces	Séquences
Humain Actine	Sens	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'
	Anti-sens	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
Humain IL-19	Sens	5'-ATCCAAGCTAAGGACACCTTCC-3'
	Anti-sens	5'-GTCACGCAGCACACATCTAAG-3'
Humain IL-20	Sens	5'-TTTTCTGAGATACGGGGCAGT-3'
	Anti-sens	5'-GTCTTAGCAAATGGCGCAGGA-3'
Humain IL-24	Sens	5'-CAACTGCAACCCAGTCAAGAAA-3'
	Anti-sens	5'-TGCTCTCCGGAATAGCAGAAA-3'
Humain IL-20Rb	Sens	5'-TTCCACCTGGTTATTGAGCTGG-3'
	Anti-sens	5'-TGGAATACCCCCACTCCTCAC-3'
Humain CXCL-1-2	Sens	5'-TCACCCCAAGAACATCCAAAGT-3'
	Anti-sens	5'-TTGAGGCAAGCTTCCGC-3'
Humain S100a8	Sens	5'-ATGTTGACCGAGCTGGAGAAA-3'
	Anti-sens	5'-TGAGGACACTCGGTCTCTAGCA-3'
Humain S100a9	Sens	5'-TGGAGGACCTGGACACAAATG-3'
	Anti-sens	5'-CACCTCGTGCATCTTCTCG-3'
Humain DEFB1	Sens	5'-CACTTGGCCTTCCCTCTGTA-3'
	Anti-sens	5'-CGCCATGAGAACTTCTACC-3'

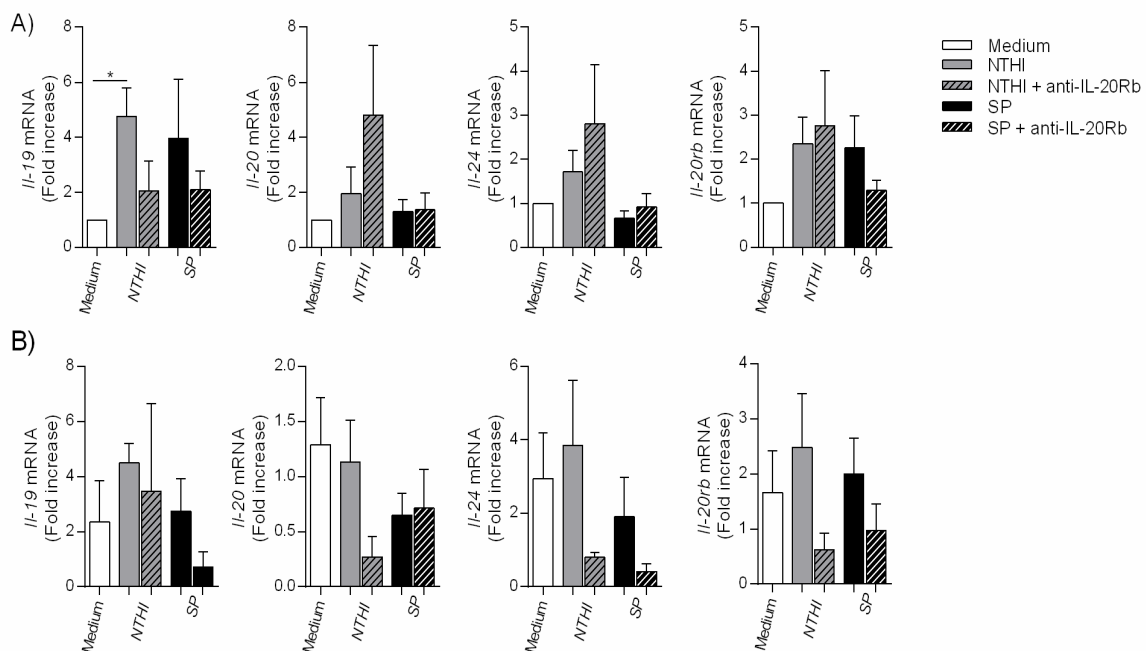
### Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été répétées au minimum 3 fois. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Une analyse de Mann-Whitney U et Kruskal-Wallis non paramétrique suivie de tests post-Dunns a été effectuée pour déterminer les différences significatives entre les groupes en utilisant la version 5.00 du logiciel GraphPad Prism. Les différences statistiquement significatives ont été définies comme suit: \* P <0,05, \*\* P <0,01 et \*\*\* P <0,001.

## RÉSULTATS

### Les cellules épithéliales produisent les cytokines de la famille IL-20 en réponse aux bactéries

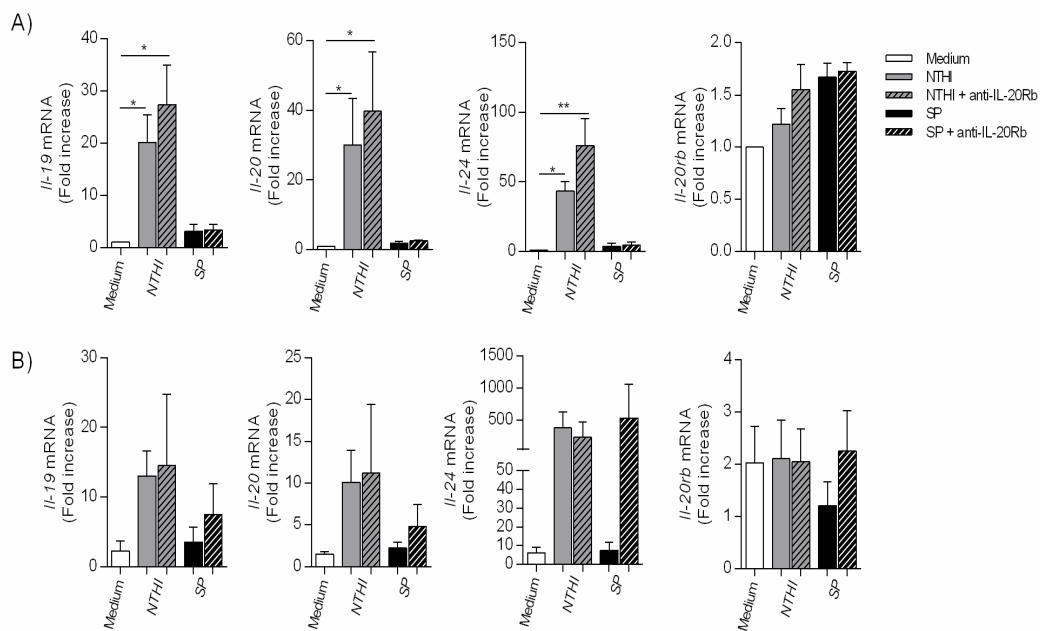
Nous avons d'abord analysé l'expression des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs dans l'épithélium des voies respiratoires (mTEC) des souris témoins et des animaux exposés de façon chronique à CS et sa modulation *in vitro* par l'infection avec *Sp* ou *NTHi*. Chez les souris Air, l'infection à *Sp* et *NTHi* a augmenté significativement l'expression de l'*Il-19* et de l'*Il-24*, mais pas de l'*Il-20* (**Figure 1**). L'exposition à CS sans infection avait tendance à augmenter l'expression de l'*Il-19* et de l'*Il-24* par les cellules mTEC. En revanche, l'activation par *Sp* et *NTHi* n'a pas augmenté l'expression de l'ARNm des cytokines de la famille IL-20 dans des cellules mTEC de souris exposées à CS. De plus, nous avons analysé la sécrétion de ces cytokines dans les surnageants cellulaires collectés après 24h d'activation. De manière surprenante, les cellules mTEC infectées par *Sp* et *NTHi* ne produisaient pas de quantités détectables de cytokines IL-20 dans les surnageants cellulaires provenant de souris exposées à l'air et à la CS (données non présentées). De plus, l'infection par *Sp* et *NTHi* a légèrement augmenté l'expression du récepteur de l'*Il-20rb* chez les souris exposées à l'air et à la CS tandis que l'expression de l'ARNm pour l'*Il-20ra* et l'*Il-22ra* n'a pas été modulée.



**Figure 1 : Production des cytokines de la famille IL-20 et de leurs récepteurs par l'épithélium respiratoire murin au cours de l'infection bactérienne.**

**A)** Expression génique des cytokines IL-20 et de l'IL-20Rb par des cellules épithéliales trachéales de souris (mTEC) exposées à l'air, infectées par *Sp* ou *NTHi* ( $n = 12$ ) et traitées ou non avec un anticorps neutralisant anti-IL-20Rb ( $n = 7$ ). **B)** Expression génique des cytokines IL-20 et de l'IL-20Rb par les cellules mTEC de souris exposées à la fumée de cigarette (CS) ( $n = 6$ ), infectées par *Sp* ou *NTHi* ( $n = 7$ ) et exposées à CS et traitées ou non avec un anticorps neutralisant anti-IL-20Rb ( $n = 3$ ). Les résultats sont relatifs à l'expression de la *Gapdh* et rapportés au milieu seul chez les souris Air. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  et \*\*\*  $P < 0,001$ .

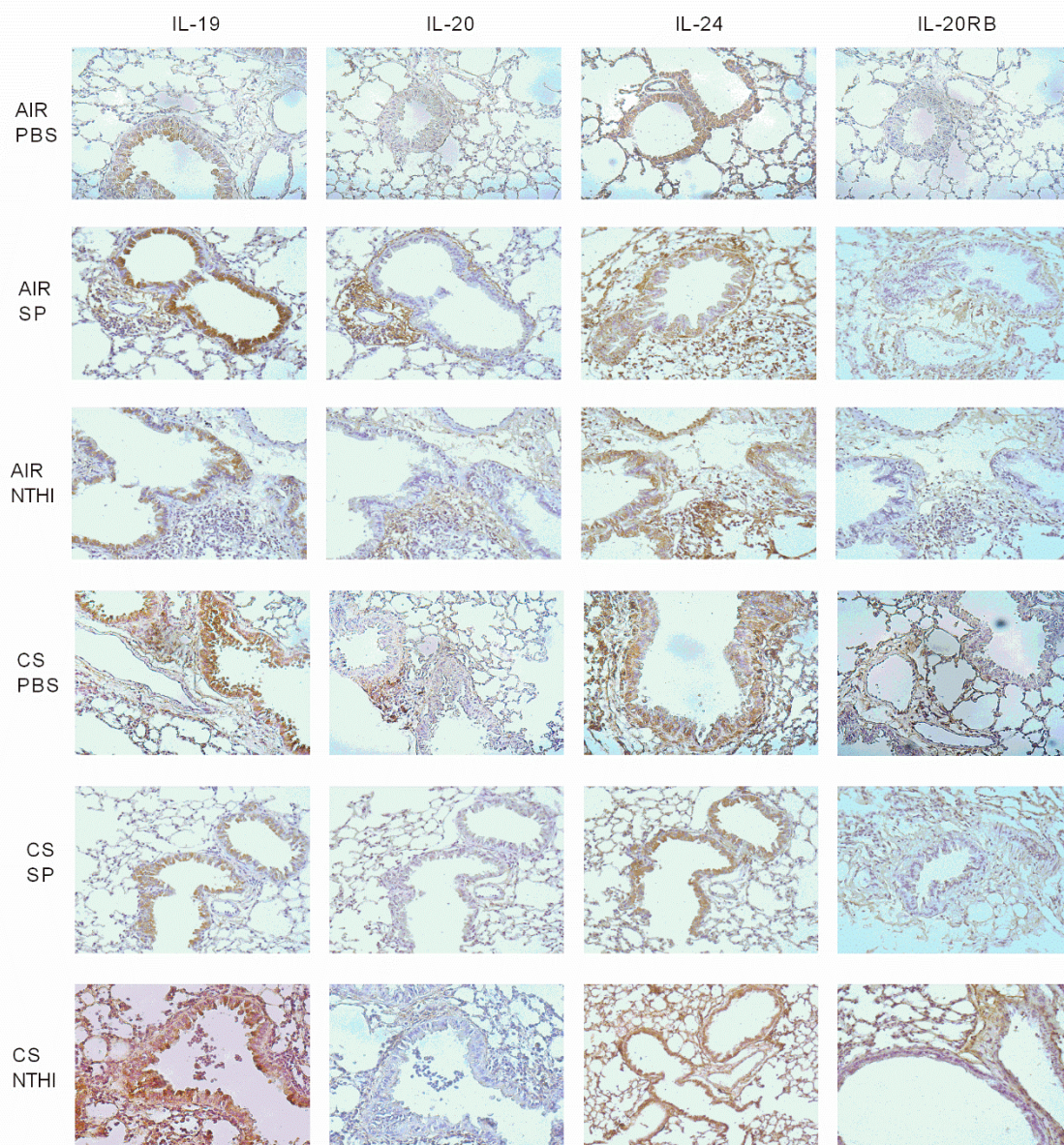
Afin de transposer nos données chez l'homme, nous avons exposé des cellules BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques normales immortalisées) à un extrait soluble de CS 3h avant l'infection par *Sp* et *NTHi*. Nos données ont montré que l'exposition à CS augmente faiblement l'expression de l'ARNm d'*Il-19* et d'*Il-24* (**Figure 2**). De plus, l'activation par *NTHi* amplifiait fortement l'expression des trois cytokines de manière significative alors que *Sp* n'augmentait que très faiblement le taux d'*Il-19* et d'*Il-24*. La pré-exposition à CS augmente l'expression de l'*Il-9* et de l'*Il-24* alors qu'elle n'a pas modulé l'expression de ces cytokines en présence de *Sp* et de *NTHi*. Nous avons également analysé la sécrétion des protéines correspondantes. Comme précédemment montré avec les cellules mTEC, nous n'avons pas détecté une sécrétion accrue d'*Il-19*, *Il-20* et *Il-24* dans les surnageants de cellules BEAS-2B après activation avec *NTHi* et *Sp* (données non présentées). En outre, l'expression de l'*Il-20rb* n'a été que modérément augmentée par l'infection par *Sp* alors que l'exposition à CS et à *NTHi* n'a eu aucun effet. L'addition de l'anticorps bloquant anti-IL-20Rb ne modulait pas significativement la production des cytokines IL-20 et d'IL-20Rb à la fois dans les cellules mTEC et les cellules BEAS-2B.



**Figure 2 : Production des cytokines de la famille IL-20 et de leurs récepteurs par la lignée cellulaire d'épithélium bronchique humain (BEAS-2B) au cours de l'infection.**

**A)** Expression génique des cytokines IL-20 et de la sous-unité IL-20Rb par les cellules BEAS-2B infectées par *Sp* ou *NTHi* et traitées ou non avec l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb (n = 4). **B)** Expression génique des cytokines IL-20 et de la sous-unité IL-20Rb par les cellules BEAS-2B pré-traitées avec de l'extrait de fumée de cigarette (CSE), infectées par *Sp* ou *NTHi* et traitées ou non avec l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb (n = 3). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  en utilisant les cellules correspondant au milieu seul comme référence et l'actine comme gène de référence. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  et \*\*\*  $P < 0,001$ .

Pour consolider ces données, nous avons analysé l'expression de ces cytokines et de leurs récepteurs dans des coupes histologiques pulmonaires de souris exposées à l'air et à la CS, infectées ou non par *Sp* et *NTHi*. Nos données ont révélé une expression décelable en base pour IL-19 et IL-24 dans les cellules épithéliales des voies aériennes, mais pas d'IL-20 (**Figure 3**). L'infection par *NTHi* ainsi que par *Sp* chez les souris exposées à l'air a augmenté l'expression de toutes ces cytokines à la fois au niveau de l'épithélium bronchique et dans les infiltrats cellulaires péri-bronchiques et péri-vasculaires. L'exposition à CS amplifie également l'expression des cytokines IL-20 dans l'épithélium bronchique et dans les cellules inflammatoires présentes dans les espaces péri-bronchiques et alvéolaires. Chez les souris exposées à CS, l'infection par *Sp* et *NTHi* n'a pas amplifié le marquage des cytokines IL-20. Le pourcentage de cellules positives dans l'infiltrat inflammatoire était similaire tandis que le nombre total de cellules inflammatoires était plus élevé après une infection bactérienne. Concernant l'expression des récepteurs, la coloration obtenue pour l'IL-20Ra et l'IL-22Ra n'a pas été modulée dans l'AEC quelle que soit la condition étudiée (données non montrées). Les deux récepteurs sont exprimés dans ces cellules au départ. En revanche, l'expression d'IL-20Rb était presque indétectable au départ dans l'épithélium ainsi que dans le poumon entier.



**Figure 3 :** L'infection bactérienne et l'exposition à la CS augmente l'expression des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs IL-20Rb dans les coupes de poumons chez la souris.

Les poumons de souris exposées à l'air et à la cigarette ont été recueillis 24h après l'infection par *Sp* et *NTHi* ou après l'administration intranasale de PBS ( $n = 3-4$  pour chaque condition). Le marquage de l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24 et l'IL-20Rb a été évalué par immunohistochimie (coloration brune). Une coloration positive a été observée dans les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires ainsi que dans les cellules inflammatoires.

L'infection par *Sp* et *NTHi* a amplifié l'expression de l'IL-20Rb à la fois dans l'épithélium bronchique et dans les cellules inflammatoires. L'exposition à CS a également augmenté cette expression dans les deux types de cellules et l'infection principalement par *NTHi* a un effet additif sur l'expression de l'IL-20Rb dans l'épithélium bronchique et les infiltrats inflammatoires.



### L'exposition à des cytokines recombinantes favorise la défense antibactérienne des cellules mTEC *in vitro*

Afin d'étudier la fonction des cytokines IL-20 lors de la réponse épithéliale aux bactéries, nous avons analysé l'expression génique des cytokines de la famille IL-20, de la sous-unité IL-20Rb, de la chimiokine neutrophile *Cxcl1*, des peptides antimicrobiens (AMP) (*S100a7*, *S100a8*, *S100a9*, *Ll37* (également nommé *Cramp*) et *Lcn2*) ainsi que des protéines impliquées dans les jonctions cellulaires (*E-cadherine* et *occludine*). Alors que l'IL-22 augmentait la production de *Cxcl1*, l'exposition à l'IL-19 et à l'IL-24 murines recombinantes favorisait l'expression de l'*Il-19* dans les cellules mTEC obtenues chez les souris Air mais pas chez les souris exposées au CS (Table 3). L'addition de mL-19 amplifie également significativement l'expression génique de *S100a9* des cellules mTEC Air et une tendance est observée avec mL-20 et mL-24. De manière surprenante, ces cytokines recombinantes ont amplifié l'expression de *Lcn2* dans le mTEC provenant de souris exposées au CS mais pas dans les cellules de souris Air.

**Tableau 3** : Modulation de l'expression génique après stimulation par des cytokines IL-20 recombinantes des cellules épithéliales trachéales murines (mTEC) de souris AIR (n = 14) ou de souris exposées à CS (n = 7). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  en utilisant les cellules correspondant au milieu seul comme référence et la *Gapdh* comme gène de référence. \*: p < 0,05 versus le milieu seul.

Gènes cibles	mIL-19		mIL-20		mIL-22		mIL-24	
	Air mTEC	CS mTEC	Air mTEC	CS mTEC	Air mTEC	CS mTEC	Air mTEC	CS mTEC
<i>Il-19</i>	<b>3.89 <math>\pm</math> 1.49*</b>	5.71 $\pm$ 3.00	1.32 $\pm$ 0.38	5.26 $\pm$ 3.91	1.99 $\pm$ 0.86	5.32 $\pm$ 3.20	<b>10.92 <math>\pm</math> 4.23*</b>	5.17 $\pm$ 2.79
<i>Il-20</i>	2.63 $\pm$ 1.11	0.83 $\pm$ 0.24	4.88 $\pm$ 2.21	4.58 $\pm$ 3.23	2.99 $\pm$ 1.51	1.08 $\pm$ 0.46	7.86 $\pm$ 4.92	1.09 $\pm$ 0.61
<i>Il-24</i>	0.84 $\pm$ 0.21	2.79 $\pm$ 1.08	0.81 $\pm$ 0.17	2.65 $\pm$ 0.97	1.12 $\pm$ 0.34	3.63 $\pm$ 1.93	1.96 $\pm$ 0.86	2.30 $\pm$ 1.71
<i>Il-20rb</i>	1.60 $\pm$ 0.45	1.97 $\pm$ 1.14	1.44 $\pm$ 0.41	1.32 $\pm$ 0.21	1.26 $\pm$ 0.28	5.55 $\pm$ 4.66	0.28 $\pm$ 1.56	1.28 $\pm$ 0.44
<i>S100a7</i>	2.18 $\pm$ 1.21	1.26 $\pm$ 0.47	2.23 $\pm$ 1.28	2.43 $\pm$ 1.58	2.56 $\pm$ 1.79	1.08 $\pm$ 0.44	1.91 $\pm$ 1.05	1.75 $\pm$ 1.01
<i>S100a8</i>	2.70 $\pm$ 1.36	1.62 $\pm$ 0.49	2.25 $\pm$ 1.13	3.64 $\pm$ 2.25	2.15 $\pm$ 1.07	1.60 $\pm$ 0.47	2.24 $\pm$ 0.84	1.49 $\pm$ 0.38
<i>S100a9</i>	<b>11.30 <math>\pm</math> 7.18*</b>	11.84 $\pm$ 11.1	4.98 $\pm$ 2.41	4.53 $\pm$ 2.61	1.31 $\pm$ 0.58	3.30 $\pm$ 2.51	14.26 $\pm$ 9.58	1.61 $\pm$ 0.86
<i>Ll37</i>	0.78 $\pm$ 0.11	0.86 $\pm$ 0.26	0.89 $\pm$ 0.17	0.86 $\pm$ 0.15	1.19 $\pm$ 0.19	1.26 $\pm$ 0.51	1.87 $\pm$ 0.57	0.82 $\pm$ 0.26
<i>Lcn2</i>	1.83 $\pm$ 0.72	<b>31.21 <math>\pm</math> 22.62*</b>	1.76 $\pm$ 0.72	2.81 $\pm$ 1.96	3.25 $\pm$ 1.93	<b>26.36 <math>\pm</math> 22.37*</b>	1.21 $\pm$ 0.11	<b>19.10 <math>\pm</math> 16.94*</b>
<i>Cxcl1</i>	1.31 $\pm$ 0.21	4.16 $\pm$ 2.13	1.46 $\pm$ 0.41	2.09 $\pm$ 0.99	<b>4.20 <math>\pm</math> 0.84*</b>	<b>6.39 <math>\pm</math> 2.35*</b>	1.95 $\pm$ 0.59	2.25 $\pm$ 0.67
<i>E-cadhérine</i>	1.03 $\pm$ 0.14	3.63 $\pm$ 2.75	0.94 $\pm$ 0.09	0.82 $\pm$ 0.25	1.03 $\pm$ 0.16	2.28 $\pm$ 1.38	0.95 $\pm$ 0.12	0.97 $\pm$ 1.82
<i>Occludine</i>	0.92 $\pm$ 0.14	9.41 $\pm$ 2.75	0.95 $\pm$ 0.10	0.79 $\pm$ 0.22	1.07 $\pm$ 0.13	4.88 $\pm$ 3.51	1.77 $\pm$ 0.69	1.95 $\pm$ 0.66

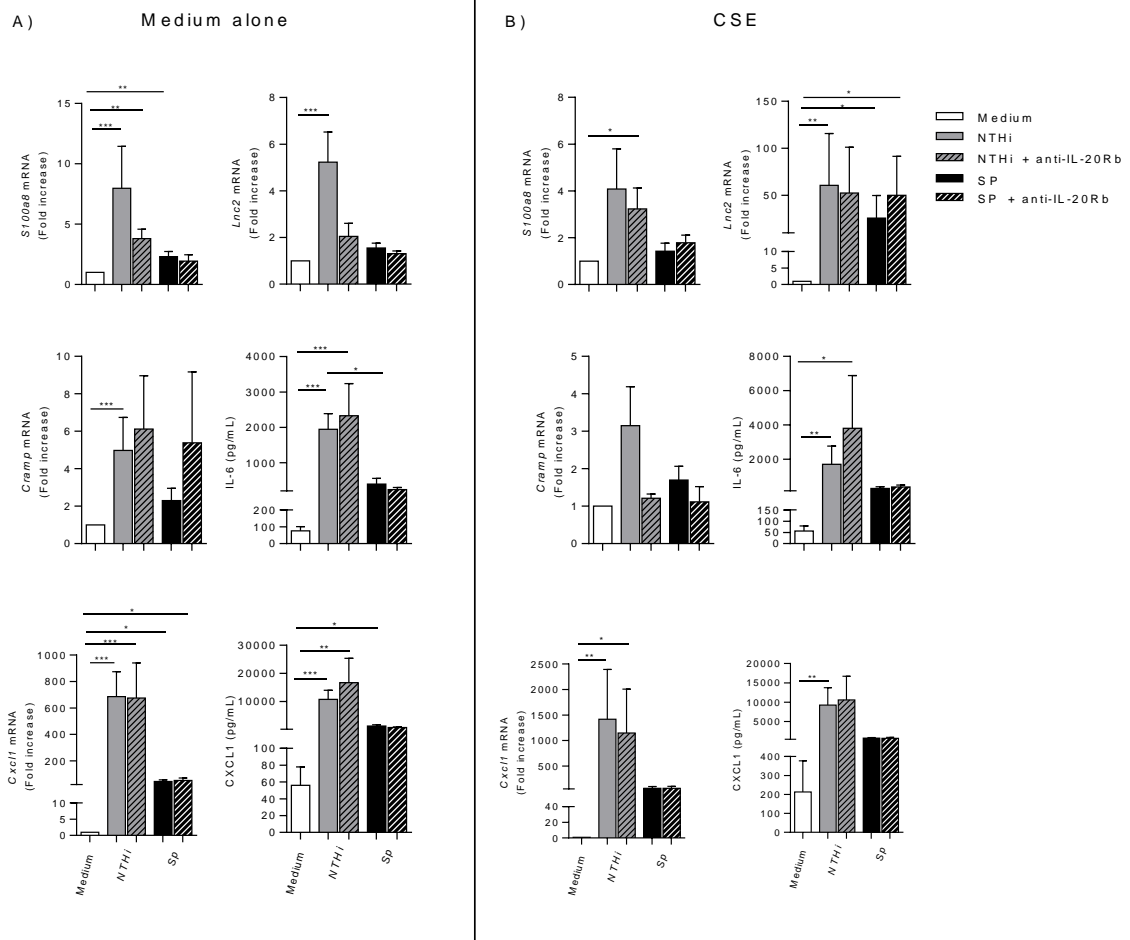
Ces données ont montré que les cytokines IL-20 et plus spécifiquement l'IL-19 sont capables d'induire une boucle autocrine positive. De plus, l'activation des mTEC par ces cytokines favorise l'expression génique de *S100a9* alors qu'après une exposition chronique à CS, elles permettent également d'amplifier l'expression génique de *Lcn2*.

**Les cytokines de la famille IL-20 modulent la réponse de l'épithélium bronchique aux bactéries *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae non typable*.**

Puisque l'infection par des bactéries a activé la production des cytokines IL-20 dans l'épithélium bronchique, nous avons émis l'hypothèse que ces cytokines pouvaient moduler la réponse antimicrobienne de l'épithélium respiratoire à l'infection par *Sp*. Pour cela, nous avons neutralisé le récepteur IL-20Rb avec l'anticorps monoclonal 20RNTC. L'infection par *NTHi* des cellules mTEC de souris Air a significativement augmenté l'expression de *S100a8*, *S100a9*, *Lcn2* et *Ll37* alors que l'addition de *Sp* a seulement amplifié l'expression de *S100a8* et *S100a9* (**Figure 4**). L'addition de l'anticorps anti-IL-20Rb a diminué l'expression génique induite par *NTHi* de *S100a8*, *S100a9* et *Lcn2* alors que ce traitement avait tendance à amplifier l'expression de *Ll37* en présence de *Sp*.

Nous avons également analysé l'expression de l'ARNm de *Cxcl1* à 4 h (**Figure 4A**). Alors que l'infection amplifiait fortement l'expression de *Cxcl1*, l'addition de l'anticorps ne modulait pas ce paramètre. En outre, nous avons mesuré la sécrétion de CXCL1 et d'IL-6 dans les surnageants de cellules recueillies à 24h. Comme attendu, l'infection amplifie fortement l'expression des deux cytokines. Le traitement avec l'anticorps anti-IL-20Rb tend à augmenter la sécrétion à la fois de CXCL1 et d'IL-6 en présence de *NTHi* alors qu'il n'y avait aucune modulation en présence de la bactérie *Sp*.

Nous avons effectué la même analyse avec les cellules mTEC de souris exposées à la CS (**Figure 4B**). Il n'y avait pas de modulation significative de la réponse à *NTHi* et *Sp* dans les mTEC de souris exposées à la CS par rapport aux mTEC de souris Air. Cependant, le traitement avec l'anticorps anti-IL-20Rb après exposition à CS ne modulait pas l'expression de *S100a8*, *S100a9* et *Lcn2* induite par *NTHi* et *Sp* alors qu'elle inhibait l'expression de *Ll37*. De plus, ce traitement n'a pas affecté l'expression et la sécrétion de CXCL1 et d'IL-6 en réponse à *NTHi* et *Sp* dans le surnageant de cellules de souris exposées au CS.

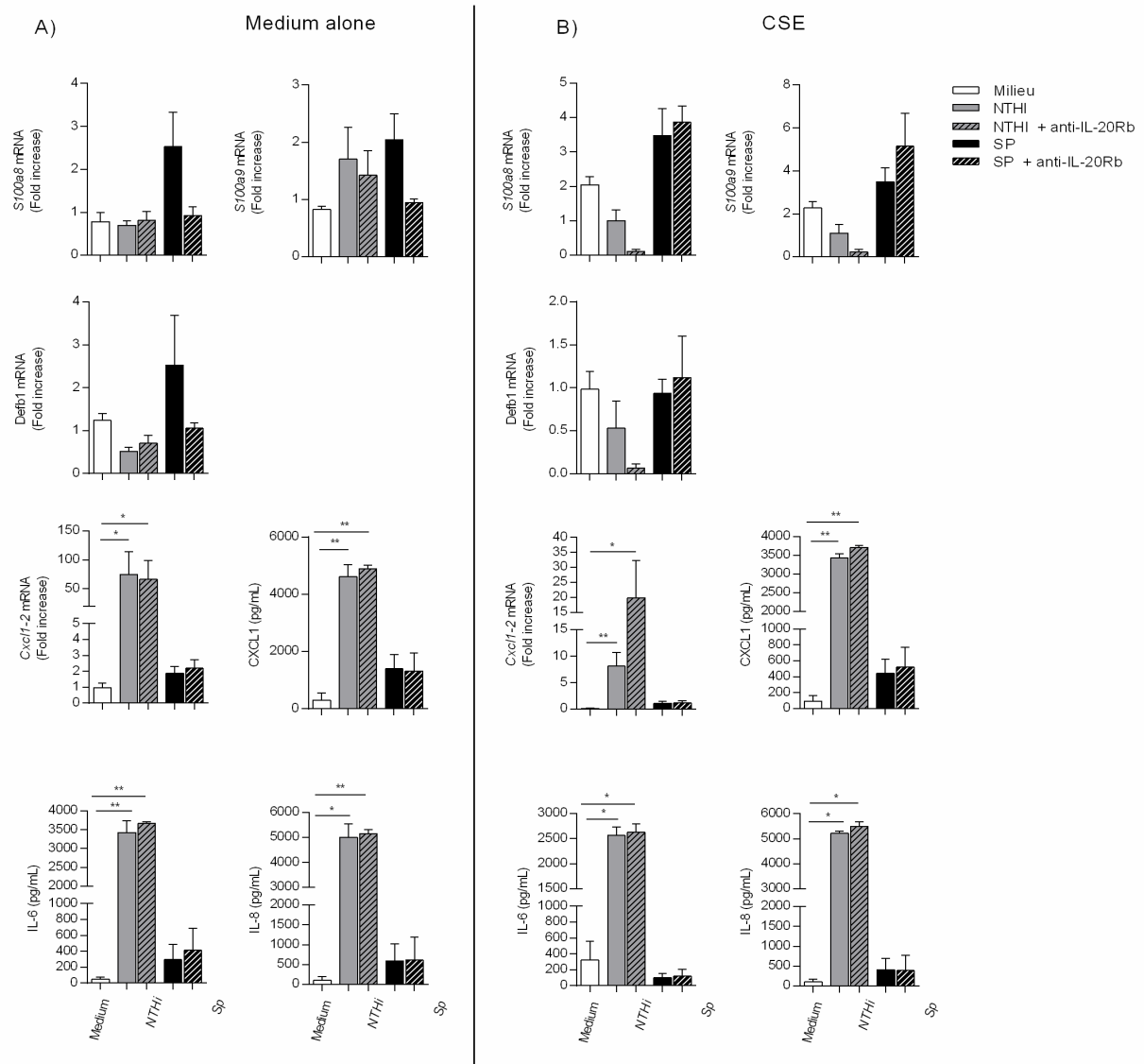


**Figure 4 : Etude de la fonction des cytokines IL-20 au cours d'une infection bactérienne sur des cellules épithéliales trachéales de souris (mTEC)**

**A)** Les cellules mTEC sont obtenues chez des souris exposées à l'Air et sont infectées *in vitro* par *Sp* ou *NTHi*. **B)** Les cellules mTEC sont obtenues chez des souris exposées à la cigarette et sont infectées *in vitro* par *Sp* ou *NTHi*. **A & B)** Les cellules sont préalablement traitées ou non avec l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb. L'expression génique des peptides antimicrobiens *S100a8*, *Lcn2* et *L137* ainsi que *Cxcl1* est exprimée de manière relative au contrôle des cellules en milieu seul, et le dosage protéique d'IL-6 et CXCL1 est exprimé en pg/mL. mTEC de souris AIR ( $n = 6$ ), mTEC de souris CSE ( $n = 3$ ). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  et \*\*\*  $P < 0,001$ .

Les mêmes expériences ont été réalisées avec des cellules BEAS-2B humaines. Comme pour les cellules mTEC, l'infection avec *NTHi* et *Sp* a augmenté l'expression de CXCL1, IL-6 et IL-8 dans les surnageants de cellules exposées ou non à CS (**Figure 5**). Concernant l'expression des peptides antimicrobiens, l'addition de *Sp* mais pas de celle de *NTHi* a augmenté l'expression de *S100a8*, *S100a9* et *Defb1* dans les cellules BEAS-2B tandis que l'exposition à CS a diminué l'expression de *Defb1* (**Figure 5**). La neutralisation du récepteur IL-20Rb a diminué l'expression de peptides antimicrobiens induite par *Sp* dans les cellules contrôles mais pas dans les cellules

exposées au CSE. La sécrétion de CXCL1, IL-6 et IL-8 n'était pas modulée par le traitement avec l'anticorps anti-IL-20Rb quelle que soit la condition.



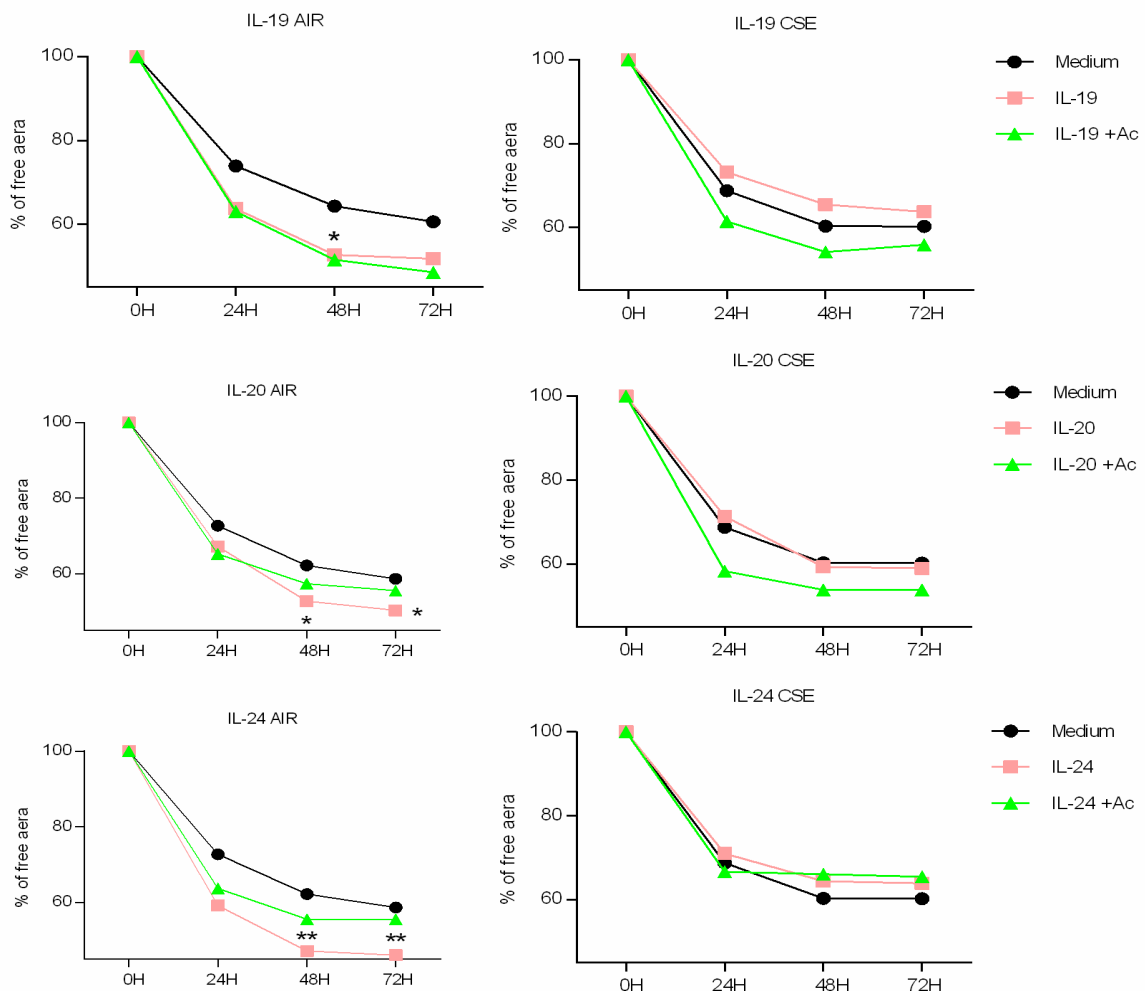
**Figure 5 : Etude de la fonction des cytokines IL-20 lors d'une infection bactérienne sur une lignée cellulaire d'épithélium bronchique humain (BEAS-2B).**

**A)** Les cellules BEAS-2B sont maintenues en milieu seul et sont infectées par Sp ou NTHi. **B)** Les cellules BEAS-2B sont exposées à l'extrait de fumée de cigarette (CSE) et sont infectées par Sp ou NTHi. **A & B)** Les cellules sont préalablement traitées ou non avec l'anticorps neutralisant anti-IL-20Rb (n = 4). L'expression génique des peptides antimicrobiens S100a8, S100a9 et Defb1 ainsi que Cxcl1-2 est quantifiée. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  en utilisant les cellules correspondant au milieu seul comme référence et l'actine comme gène de référence et le dosage protéique d'IL-6, IL-8 et CXCL1 est exprimé en pg/mL. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 et \*\*\* P < 0,001.

Pour conclure, les cytokines de la famille IL-20 semblent moduler la production des peptides antimicrobiens induits lors d'une infection bactérienne mais pas la production de cytokines inflammatoires.

### Les cytokines IL-20 accélèrent la cicatrisation des cellules épithéliales BEAS-2B

Comme il a déjà été décrit dans un modèle de kératinocyte (Rutz et al., 2014), les cytokines IL-20 sont connues pour favoriser la cicatrisation dans ce tissu. Nous avons analysé l'effet des cytokines IL-20 sur les cellules épithéliales pulmonaires BEAS-2B. L'addition de cytokines IL-20 recombinantes a significativement augmenté la cicatrisation par rapport au milieu seul (**Figure 6**). L'effet est similaire à celui de l'effet observé avec rhIL-22 (données non rapportées). L'addition de l'anticorps anti-IL-20Rb neutralise partiellement l'effet des cytokines IL-20 recombinantes. Le traitement avec le CSE a modifié la cicatrisation au départ comme décrit précédemment (Van Winkle et al., 2001). Fait intéressant, ce traitement a également inhibé l'effet positif des cytokines IL-20 recombinantes sur la cicatrisation. Après exposition au CSE, l'anticorps neutralisant tend à augmenter la cicatrisation, contrairement à l'effet observé dans le milieu non exposé au CSE.



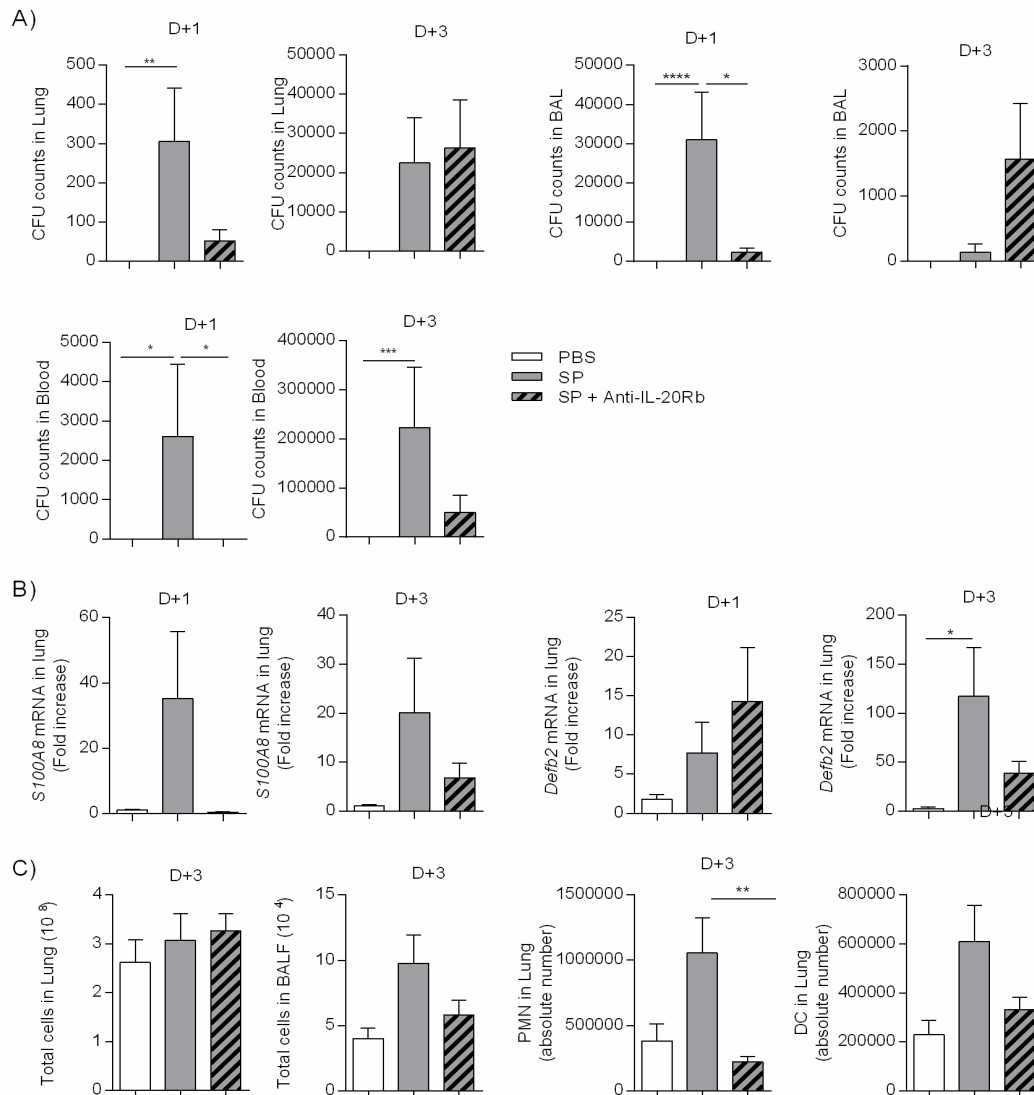
**Figure 6 :** Les cytokines IL-20 favorisent la cicatrisation de la lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine BEAS-2B

Les cellules BEAS-2B sont stimulées avec les cytokines recombinantes humaines IL-19, IL-20 ou IL-24. Les cellules sont traitées ou non avec un extrait de fumée de cigarette (n = 4). L'anticorps anti-IL-20Rb est testé dans chaque condition. La réparation épithéliale est évaluée par vidéo-microscopie à 0, 24, 48 et 72h. \* P < 0,05 et \*\* P < 0,01 versus milieu seul.

Ces données ont montré que les cytokines IL-20 favorisent la cicatrisation de l'épithélium bronchique humain dans des conditions physiologiques. En revanche, l'exposition au CSE a modifié ce processus et la réponse aux cytokines IL-20.

**L'effet de l'administration locale d'un anticorps dirigé contre le récepteur IL-20Rb chez des souris infectées par *Streptococcus pneumoniae* est dépendant du temps.**

Ensuite, nous avons évalué l'effet de l'administration intranasale de l'anticorps anti-IL-20Rb suite à l'infection par *Sp* chez la souris. Comme indiqué dans la **Figure 7A**, ce traitement a d'abord diminué la charge bactérienne dans le LBA et le poumon comme indiqué au jour 1 (D+1). En revanche, au jour 3 (D+3), ce traitement a augmenté la charge bactérienne dans les poumons alors qu'elle était diminuée dans le sang. Aux deux temps, ce traitement a diminué l'expression de l'ARNm de *S100a8* (**Figure 7B**) et *S100a9* (non représenté) alors qu'il n'a pas modulé l'expression de *Defb2* (**Figure 7B**), *Lcn2* et *L137* (non représenté). De plus, le traitement avec l'anticorps anti-IL-20Rb a également diminué au Jour3 post-infection, le nombre total de cellules dans le LBA ainsi que les nombres de neutrophiles et de cellules dendritiques (DC) dans les poumons (**Figure 7C**).



**Figure 7 : L'administration locale d'un anticorps anti-IL-20Rb diminue la charge bactérienne et le recrutement cellulaire chez les souris infectées par *Streptococcus pneumoniae*.**

**A)** L'administration intranasale de l'anticorps anti-IL-20Rb neutralisant (50 µg/souris) à 24 heures avant l'infection par *Sp* a diminué la charge bactérienne dans le lavage broncho alvéolaire (LBA), le poumon et le sang à D+1 post-infection. **B)** L'expression génique de *S100a8* et *Defb2* a été évaluée dans les poumons de souris collectés à D+1 et D+3 post-infection par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de 2-ΔΔCt en utilisant comme gène de référence la *Gapdh*. **C)** Le nombre total de cellules a été évalué dans le LBA et le poumon. La numération des neutrophiles (*F4/80*<sup>-</sup>, *Ly6G*<sup>+</sup>, *CD11b*<sup>+</sup>, *CD11c*<sup>-</sup>) et des cellules dendritiques myéloïdes (*F4/80*<sup>-</sup>, *Ly6G*<sup>+</sup>, *CD11c*<sup>+</sup>, *I-Ab*<sup>high</sup>) a également été mesurée par cytométrie de flux à D+3 post-infection dans le poumon de souris. \* *P* < 0,05, \*\* *P* < 0,01 et \*\*\* *P* < 0,001.

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que le blocage de la voie de signalisation des cytokines de la famille IL-20 dans le poumon a un effet biphasique sur l'infection respiratoire par *Sp*. Tout d'abord, ce traitement a augmenté la clairance bactérienne tandis qu'à jour 3, il a facilité le développement des bactéries probablement par l'inhibition de la production de peptides antimicrobiens et du recrutement de neutrophiles.

## DISCUSSION

Les cellules épithéliales des voies respiratoires contribuent à la défense innée du poumon en mettant en place une activité antibactérienne directe, qui est en partie médiée par la production de protéines et de peptides antimicrobiens (PAM) (Hiemstra, 2015). En plus des AMP qui sont exprimés à l'état basal, ils peuvent être induits suite à la reconnaissance des micro-organismes ou des structures microbiennes par des récepteurs de reconnaissance. Cette réponse est modulée par des cytokines telles que l'IL-22 (Rutz et al., 2014). Alors que son rôle lors des infections bactériennes respiratoires est essentiel pour la protection dans le poumon, le rôle des cytokines de la famille IL-20 n'a pas été étudié alors qu'elles partagent des fonctions similaires sur les cellules épithéliales cutanées. Nous avons présentement rapporté que l'infection par *Sp* et *NTHi* favoriserait l'expression des cytokines IL-20 dans les cultures d'épithélium respiratoire alors que les protéines correspondantes ont été détectées uniquement par immuno-histochimie. Comme l'expression de l'*Il-20rb* était également augmentée après l'infection, nous avons analysé le rôle de ces cytokines dans la réponse antibactérienne par l'épithélium des voies respiratoires. De façon surprenante, l'activation des cellules épithéliales pulmonaires par les cytokines IL-20 recombinantes n'a pas favorisé la production de cytokines et de protéines de jonctions cellulaires contrairement à ce qui est décrit pour l'IL-22. Néanmoins, l'activation par les cytokines recombinantes favorise l'expression des calgranulines et le blocage de la voie de signalisation des cytokines de la famille IL-20 inhibe l'expression de certains peptides antimicrobiens et de cytokines induites par *Sp* et *NTHi* dans l'épithélium respiratoire. De plus, les cytokines IL-20 accélèrent la cicatrisation des cellules BEAS-2B. Ces données peuvent en partie expliquer certains des effets *in vivo* de l'administration locale de l'anticorps anti-IL-20Rb. L'exposition à CS favorise l'expression de ces cytokines alors qu'elle altère la fonction de l'IL-20Rb suggérant un rôle différent pour les cytokines IL-20 pendant la BPCO.

Nos données ont montré que l'infection pulmonaire favorise l'expression des cytokines IL-20 dans l'épithélium respiratoire, un résultat obtenu après stimulation *in vitro* avec les bactéries. Bien que la protéine semble être transcrite comme révélée par immunohistochimie, des niveaux très faibles sont détectés dans les surnageants de culture suggérant un effet autocrine ou paracrine pour ces cytokines. De plus, la fumée de cigarette favorise également leur expression dans les cultures d'épithélium respiratoire alors qu'il n'y a pas d'effet additif entre les deux stimuli suggérant qu'ils sont induits par des voies de signalisation similaires (potentiellement la voie de signalisation NF- $\kappa$ B). Nous avons également observé que les cytokines IL-20 peuvent favoriser leur propre expression dans les cultures témoins, mais pas après l'exposition à la fumée de cigarette. Pour cette raison, ce mécanisme n'est probablement pas impliqué dans le contexte de l'exposition à CS. Cet effet est associé à une surexpression de l'IL-20Rb mais pas de l'IL-20Ra qui est fortement exprimée dans les poumons de souris témoins. Comme indiqué précédemment, l'IL-20Ra et l'IL-22Ra sont fortement exprimées dans l'épithélium respiratoire en base (Gong et al., 2014) (Rutz et al., 2014). Ceci suggère une fonction importante du récepteur IL-20Rb lors de l'exposition bactérienne et après l'exposition au CS.



Pour le démontrer, nous avons analysé tout d'abord les conséquences de la stimulation par les cytokines IL-20 sur les mTEC des souris exposées à l'air ou à CS. Contrairement à l'IL-22, les cytokines IL-20 n'induisent pas *in vitro* l'expression de la chimiokine *Cxcl1*. Concernant les peptides antimicrobiens, les cytokines de la famille IL-20 favorisent l'expression de *S100a9* uniquement chez les souris Air, alors que chez les souris CS, ces cytokines favorisent l'expression génique de *Lcn2*. Ceci suggère que l'exposition à CS modifie la réponse aux cytokines IL-20 bien que cela ne diminue pas l'expression des récepteurs. L'activation des récepteurs des cytokines l'IL-20 induit l'activation de STAT3 et de MAPK. Nous pouvons supposer que l'exposition *in vitro* aussi bien qu'*in vivo* à la fumée de cigarette pourrait moduler l'équilibre entre ces deux voies de signalisation et par ce mécanisme, moduler la transcription de différents gènes. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour valider cette hypothèse. De plus, la stimulation par les cytokines IL-20 recombinantes n'a pas modulé l'expression des protéines de jonctions cellulaires dans les cultures. Bien que les cytokines IL-20 ne modulent pas les médiateurs inflammatoires ainsi que les protéines de jonctions cellulaires, elles accélèrent la cicatrisation de l'épithélium dans la lignée cellulaire humaine BEAS-2B. Cet effet peut être la conséquence d'une prolifération accrue de ces cellules comme cela a déjà été démontré dans les kératinocytes (Sa et al., 2007). Cet effet pourrait également impliquer la modulation de la migration cellulaire comme indiqué précédemment dans d'autres types de cellules (Sabat et al., 2014). Fait intéressant, la pré-exposition à la fumée de cigarette inhibe l'effet de ces cytokines sur le phénomène de cicatrisation. L'exposition chronique à la CS étant associée à une régénération altérée de l'épithélium des voies respiratoires, nos données expliquent pourquoi la surexpression des cytokines IL-20 détectées dans ce contexte n'est pas associée à une délétion de cet effet. De manière intéressante, l'effet inhibiteur de la fumée de cigarette a également été observé en présence d'IL-22 montrant que cet effet n'est pas limité aux cytokines IL-20 (données non présentées). Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour définir le mécanisme d'inhibition provoqué par la fumée de cigarette. Au total, ces données suggèrent que les cytokines IL-20 contrôlent principalement la production de peptides antimicrobiens et le phénomène de réparation cellulaire de l'épithélium respiratoire.

Ces données associées au fait que l'infection bactérienne a augmenté l'expression des cytokines IL-20 dans l'épithélium respiratoire suggèrent fortement que ces cytokines pourraient participer *in vivo* à l'activité antibactérienne de ces cellules. Pour confirmer cela, nous avons analysé les conséquences de l'administration intranasale de l'anticorps anti-IL-20Rb chez des souris infectées par *Sp*. Ce traitement réduit la charge bactérienne dans les poumons au J+1 mais pas à J+3 post-infection. Ce traitement est associé à une diminution du niveau d'expression de la calgranuline, à une diminution du nombre de cellules totales dans le LBA et à un nombre de neutrophiles et de DC réduit dans les poumons. Ces données suggèrent que pendant le pic d'expression des cytokines IL-20 (J+1), ces cytokines ont un impact inhibiteur sur la clairance bactérienne dans les poumons, comme rapporté précédemment dans la peau (Myles et al., 2013). Selon nos données, ceci n'est probablement pas lié à la modulation d'expression des peptides antimicrobiens ni à l'augmentation de la production des cytokines Th17 comme précédemment décrit (Myles et al., 2013). Cependant,

d'autres mécanismes de défense antimicrobiens peuvent également être affectés dans l'épithélium et contribuer à l'augmentation de l'activité antibactérienne. En plus des divers peptides antimicrobiens, les lipides antimicrobiens et les espèces réactives de l'oxygène contribuent également à l'activité bactéricide de l'épithélium des voies respiratoires (Hiemstra, 2015). De plus, nous pouvons émettre l'hypothèse que ce traitement module la fonction d'autres cellules exprimant les récepteurs aux cytokines IL-20 tels que les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles (Rutz et al., 2014) (Gough et al., 2017). A J+3, l'anticorps anti-IL-20Rb favorise encore la clairance bactérienne qui néanmoins semble encore persister dans le sang. Cela pourrait être dû à l'effet inhibiteur des cytokines IL-20 sur l'activité bactéricide des neutrophiles, tel que rapporté *in vitro* (Gough et al., 2017).

Pour mieux déchiffrer le rôle des cytokines IL-20 dans la fonction épithéliale pulmonaire, l'effet du traitement avec un anticorps bloquant anti-IL-20Rb a également été analysé sur les AEC activées par des bactéries. Nos données révèlent que ce traitement diminue principalement la production de certains peptides antimicrobiens, y compris la calgranuline et *Lcn2* dans l'épithélium pulmonaire de souris Air, alors que la production de *LI37* et les  $\beta$ -défensines ne sont pas affectées. La réponse mise en place par l'épithélium pulmonaire de souris exposées à CS est différente, car le blocage de la voie de signalisation des cytokines IL-20 diminue la production de *LI37* mais pas de calgranulines et de *Lcn2*. De plus, ce traitement augmente la production de CXCL1 chez les souris exposées à l'air, ce qui suggère que les cytokines IL-20 pourraient également moduler le recrutement des cellules inflammatoires dans ce contexte. Cependant, ces mécanismes n'expliquent pas l'effet promoteur *in vivo* de l'anticorps anti-IL-20Rb sur la clairance bactérienne. Le développement de souris KO avec une délétion spécifique de l'IL-20Rb au niveau de l'épithélium pulmonaire est nécessaire pour mieux étudier le rôle de l'épithélium des voies respiratoires et la fonction de ces cytokines. Une fois de plus, l'exposition à la fumée de cigarette modifie l'effet de l'anticorps bloquant sur cette chimiokine, confirmant que l'exposition à CS modifie la transduction du signal induit par les cytokines IL-20. L'analyse du rôle de ces cytokines IL-20 dans le contexte de l'exposition chronique à la CS est nécessaire ainsi que leur implication lors de l'exacerbation de la BPCO par une infection bactérienne.

Au final, nos données montrent l'implication des cytokines de la famille IL-20 au cours de l'infection bactérienne respiratoire et précisent le rôle de l'épithélium dans ce mécanisme. En effet, l'épithélium est impliqué à la fois dans la production de ces cytokines après infection bactérienne mais elles sont aussi leur première cible dans les poumons. Nous avons également rapporté que ces cytokines IL-20 ne jouent pas un rôle essentiel dans la fonction pro-inflammatoire de ces cellules bien qu'elles contrôlent principalement la production de peptides antimicrobiens ainsi que le processus de régénération de l'épithélium respiratoire. L'exposition à la fumée de cigarette favorise également l'expression de ces cytokines IL-20 et en même temps, elle modifie la fonction de leurs récepteurs. Dans leur ensemble, ces données soutiennent fortement l'implication des cytokines IL-20 au cours de l'infection bactérienne et suggèrent que ces cytokines pourraient participer à la susceptibilité à l'infection consécutive à l'exposition à la fumée de cigarette. Cela pourrait avoir des applications thérapeutiques dans le contexte de certaines maladies telles que la BPCO.

## **Chapitre III : Mise en évidence de l'expression des cytokines de la famille IL-20 dans l'appareil respiratoire humain (Données complémentaires)**

### **INTRODUCTION**

Des nombreux travaux de recherche ont mis en lumière l'expression des cytokines de la famille IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) ainsi que de leurs récepteurs associés IL-20Ra, IL-20Rb et IL-22Ra dans différents organes ainsi que sur les cellules immunitaires chez l'homme. De plus, ces cytokines sont impliquées dans différentes pathologies inflammatoires (systémiques, intestinales ou cutanées). A l'heure actuelle, très peu de travaux ont été réalisés sur cette famille de cytokines dans le tissu pulmonaire humain. Nous savons que les cellules épithéliales expriment ces cytokines IL-20 ainsi que leurs récepteurs chez la souris. De plus, nous avons montré que l'expression de ces cytokines pouvait être modulée par l'exposition à la fumée de cigarette et en contexte infectieux. Ainsi nous nous sommes posé la question de savoir si ces dernières étaient exprimées dans le poumon et plus particulièrement dans l'épithélium respiratoire chez l'homme. De plus, au laboratoire nous nous intéressons particulièrement aux effets du tabac et notamment aux effets néfastes de celui-ci au niveau pulmonaire.

Dans le cadre d'une collaboration avec les Docteurs Christelle CORAUX, Philippe BIREMBAULT et Myriam POLETTE de l'unité INSERM UMR-S 1250 Pathologies Pulmonaires et Plasticité Cellulaire (P3Cell) spécialisées dans l'épithélium pulmonaire, nous avons pu bénéficier d'échantillons pulmonaires humains.

### **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

#### **Biopsies pulmonaires**

Des biopsies pulmonaires ont été récupérées suite à une lobectomie visant à la restriction de tumeur. Ces biopsies ont été prélevées dans la zone « saine » du poumon, déterminée par anatomopathologie.

#### **Immunohistochimie**

Les poumons sont fixés dans du formol et inclus dans de la paraffine et sont ensuite coupés au microtome à une épaisseur de 5µm. Les coupes de poumon sont ensuite déparaffinées en xylène (Acros Organics) et réhydratées avec des bains successifs d'alcool et d'eau. Le démasquage des épitopes est effectué dans du tampon phosphate pH 6,0 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O) pendant 15 minutes à 90°C. Le kit ab80436 - Détection HRP / DAB spécifique à la souris et au lapin (Abcam) est utilisé en suivant les recommandations du fabricant pour détecter l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24 ainsi que pour les récepteurs IL-20Ra, IL-20Rb et IL-22Ra. La contre-coloration est réalisée avec de l'hématoxyline (Interchim) diluée au ½. Les anticorps primaires utilisés sont l'anti-IL-19 ([EPNCIR168] ab154187 Abcam), l'anti-IL-20 (orb13501 Biorbyt), l'anti-IL-24

(orb228807 Biorbyt), l'anti-IL-20Ra (bs-2619R Bioss), l'anti-IL-20Rb (20RNTC eBiosciences) et l'anti-IL-22Ra (496514 systèmes de R&D) et sont utilisés à une concentration de 0.01mg/mL.

### RT-PCR quantitative

L'ARN total extrait des bronches ou du parenchyme de plusieurs groupes de patients non-BPCO et BPCO est quantifié par NanoVue Plus (Healthcare Bio-sciences AB). La transcription inverse a été réalisée avec le kit de transcription inverse d'ADNc (Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant. Les ADNc ont été soumis à la PCR quantitative (QuantStudio 12K Flex Applied Biosystems) en utilisant des amorces spécifiques pour chaque gène (Eurofins Genomics) (**Table 1**). L'expression de transcription relative est exprimée en  $-2\Delta\Delta Ct$  par rapport au groupe sujet témoins non-fumeurs en utilisant le gène de ménage HPRT1.

**Table 1 : Séquence des amorces humaines utilisées pour la RT-qPCR**

Cibles	Amorces	Séquences
Humain HPRT1	Sens	5'-TGCAGACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG-3'
	Anti-sens	5'-CCAACACTTCGTGGGGTCCTTTTCA-3'
Humain IL-19	Sens	5'-ATCCAAGCTAAGGACACCTTCC-3'
	Anti-sens	5'-GTCACGCAGCACACATCTAAG-3'
Humain IL-20	Sens	5'-TTTTCTGAGATACGGGGCAGT-3'
	Anti-sens	5'-GTCTTAGCAAATGGCGCAGGA-3'
Humain IL-24	Sens	5'-CAACTGCAACCCAGTCAAGAAA-3'
	Anti-sens	5'-TGCTCTCCGGAATAGCAGAAA-3'
Humain IL-20Ra	Sens	5'-GGCCCGCAAACGTTACAGTA-3'
	Anti-sens	5'-GGTCGTCGATGGCTCTTCCT-3'
Humain IL-20Rb	Sens	5'-TTCCACCTGGTTATTGAGCTGG-3'
	Anti-sens	5'-TGGAATACCCCCACTCCTCAC-3'
Humain IL-22Ra	Sens	5'-CAGACACGGTCTACAGCATCGA-3'
	Anti-sens	5'-GTCTCCACCGTCAGGTTGCA-3'

## RÉSULTATS

## Données cliniques des échantillons de patients utilisés pour l'analyse par immunohistochimie et pour la quantification de l'expression génique par qPCR

Immunohistochimie						
catégorie	nombre	fumeur	age	sexe	exposition	VEMS (%)
CTRL	7	non	74,17 ± 4,66	2M/3F	NA	112% ± 0,12
CTRL	10	ex	64,2 ± 1,86	8M/2F	50,8 P/A ± 8,80 *	90% ± 0,04 ** * : 6/10 ** : 7/10
CTRL	11	oui	63,5 ± 2,71	8M/3F	31,6 P/A ± 2,83 *	90% ± 0,04 * * : 7/11
BPCO 1	10	5ex/5oui	62,6 ± 3,88	9M/1F	50,9 P/A ± 6,65 *	94% ± 0,02 * * : 9/10
BPCO 2	10	oui	65,8 ± 2,23	7M/3F	52,5 P/A ± 6,34	68% ± 0,02

ARN						
catégorie	nombre	fumeur	age	sexe	exposition	VEMS (%)
CTRL	6	non	67,5 ± 3,34	3M/3F	NA	103% ± 0,10
CTRL	7	ex	64,4 ± 3,19	7M	35 P/A ± 7,75 *	94% ± 0,09 * : 6/7
CTRL	7	oui	65,6 ± 2,20	7M	58,2 P/A ± 7,30 *	100% ± 0,07 * * : 6/7
BPCO 1	4	ex	71,8 ± 5,54	3M/1F	50 P/A ± 0,00 *	91% ± 0,04 * : 3/4
BPCO 1	4	oui	61 ± 8,50	3M	51,7 P/A ± 8,33	92% ± 0,05
BPCO 2	4	ex	72,5 ± 3,93	4M	48,5 P/A ± 9,01	74% ± 0,04
BPCO 2	4	oui	68,2 ± 5,08	4M/1F	45 P/A ± 3,16	69% ± 0,05 * * : 4/5
BPCO 3	1	ex	62	1M	20 P/A	46%
BPCO 3	2	oui	71 ± 6	1M/1F	50 P/A ± 10	39% ± 0,09

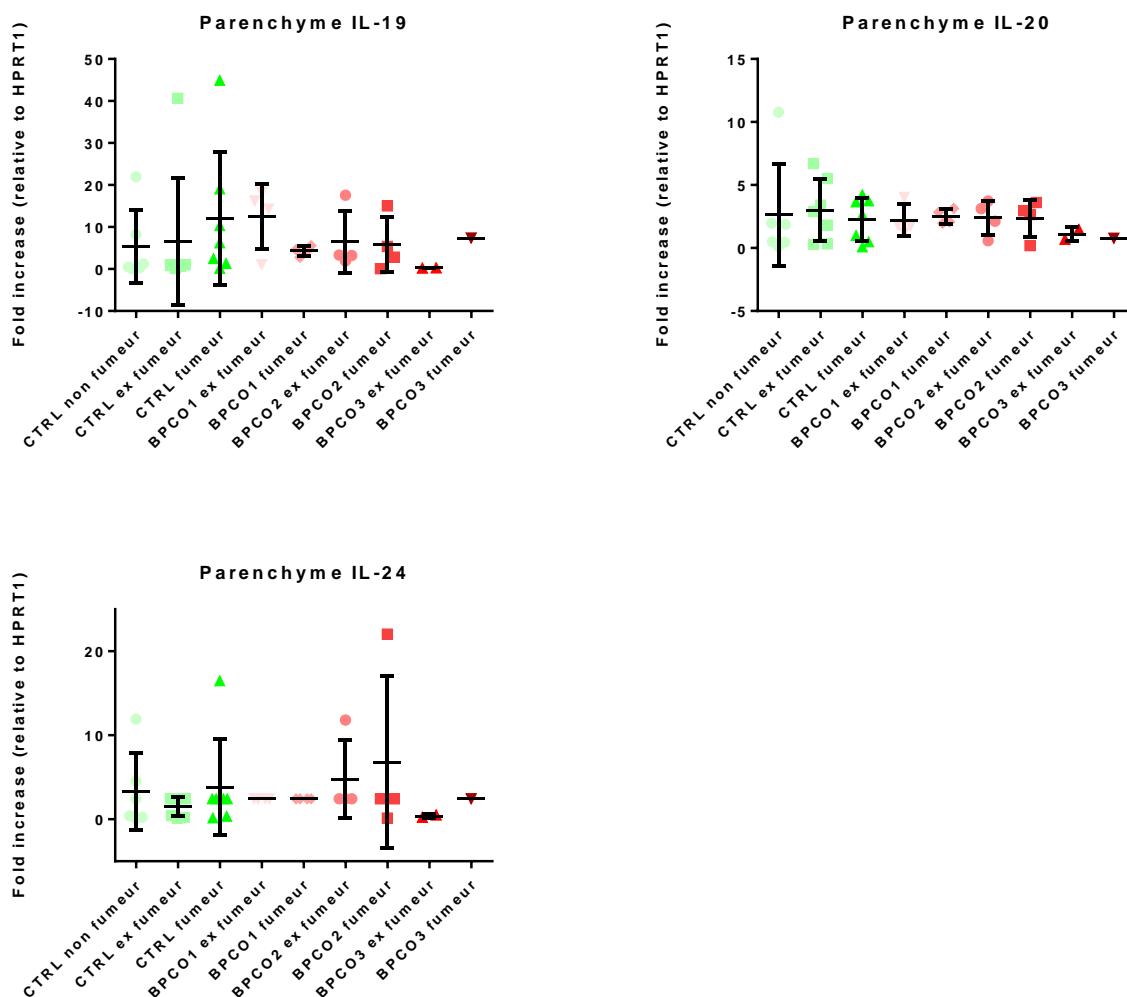
Le tableau ci-dessus nous indiquent les données cliniques des patients, leur âge comportant notamment le sexe, l'exposition à la cigarette exprimée en Paquet/Année (P/A), et la VEMS (%), la présence ou non d'une BPCO ainsi que son degré de sévérité (score de Gold).

### Expression génique des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs dans les bronches et dans le parenchyme pulmonaire

Dans un premiers temps, nous avons voulu faire l'analyse en regardant par qPCR l'expression génique de cette famille de cytokines et de leurs récepteurs au niveau bronchique et au niveau du parenchyme pulmonaire chez l'humain. Le parenchyme est la partie de poumon composée des bronchioles et des alvéoles. Ce tissu comprend de nombreux vaisseaux sanguins permettant l'échange d'O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

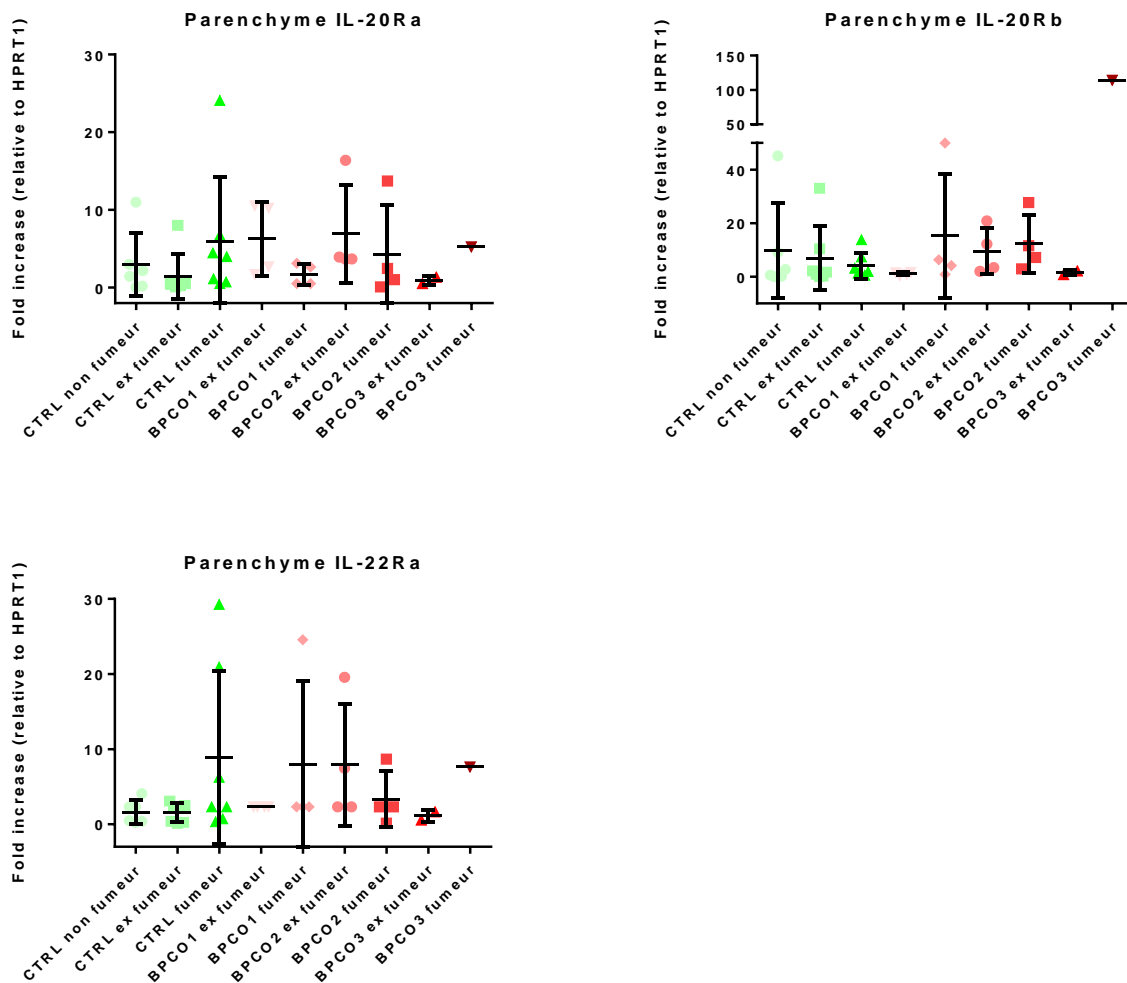
Les analyses ont été réalisées sur différents groupes de patients qu'ils soient non-fumeurs, ex-fumeurs et fumeurs mais également sur des groupes de patients BPCO de stade I, II et III fumeurs actifs ou ex-fumeurs.

Au niveau de l'expression génique des cytokines IL-20 dans le parenchyme pulmonaire, des variations plus importantes de la cytokine IL-19 sont observées comparativement aux cytokines IL-20 et IL-24. Cependant entre nos différents types de patients il n'y a pas de modulation significative de leur expression que ce soit en contexte non-BPCO et BPCO ou fumeurs et ex-fumeurs bien qu'une tendance à l'augmentation de l'IL-19 soit observée chez les fumeurs et les patients BPCO (**Figure 1**).



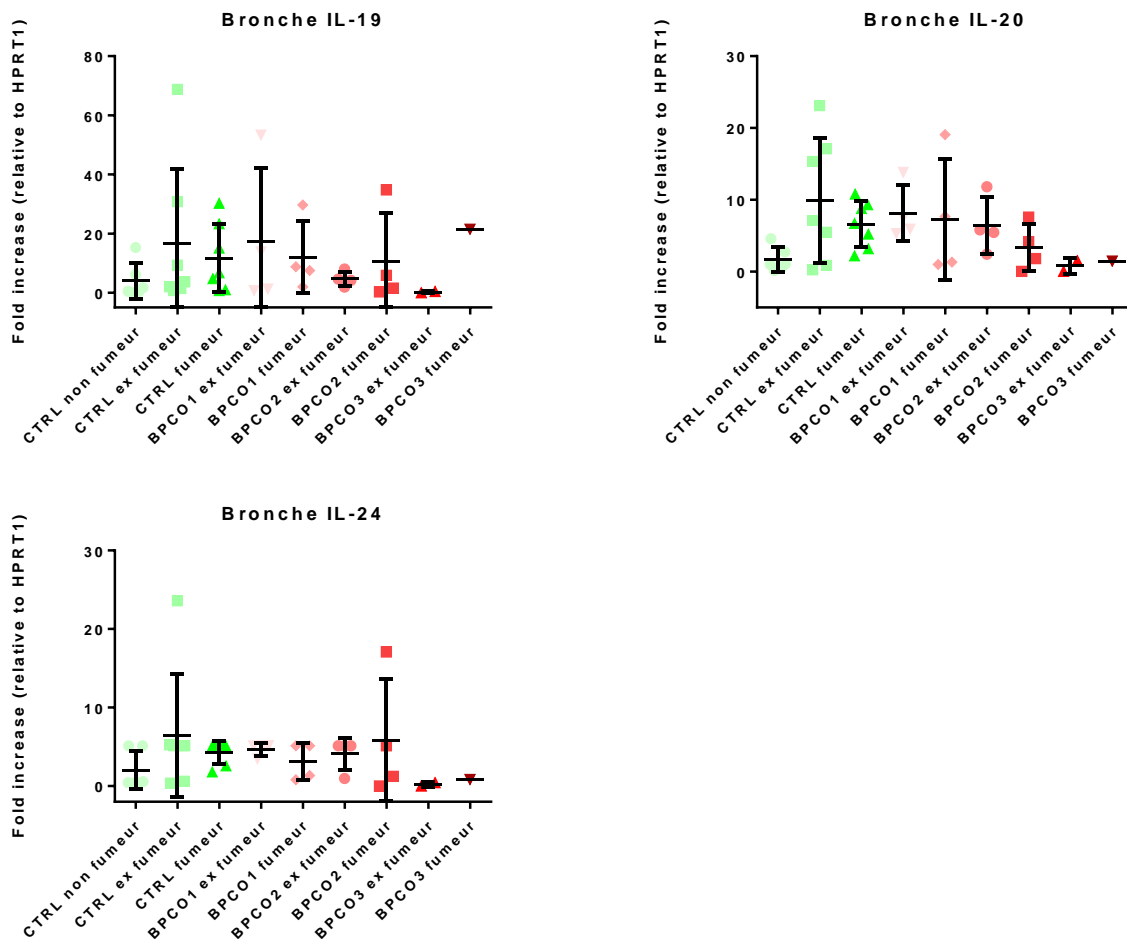
**Figure 1 : Mesure de l'expression génique des cytokines de la famille IL-20 dans le parenchyme respiratoire.** Expression génique des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 dans différents groupes de patients non-BPCO : non-fumeur (n=6), ex-fumeur (n=7), fumeur (n=7) et BPCO : BPCO I ex fumeur (n=4), BPCO I fumeur (n=4), BPCO II ex fumeur (n=4), BPCO II fumeur (n=4), BPCO III ex fumeur (n=2), BPCO III fumeur (n=1) . Les résultats sont relatifs à l'expression de HPRT1 et rapportés à la moyenne des contrôles non-fumeurs.

Concernant l'expression génique des sous-unités formant les récepteurs aux cytokines IL-20 dans le parenchyme, aucune modulation significative n'est observée entre les différents groupes de patients pour les trois sous-unités (**Figure 2**). Là encore, une tendance semble se dégager pour une augmentation de ces récepteurs chez les patients BPCO et de L'IL-20Ra et IL-22Ra chez les fumeurs.



**Figure 2 : Mesure de l'expression génique des récepteurs aux cytokines de la famille IL-20 dans le parenchyme respiratoire.** Expression génique des sous-unités IL-20Ra, IL-20Rb et IL-22Ra dans différents groupes de patients non-BPCO : non-fumeur (n=6), ex-fumeur (n=7), fumeur (n=7) et BPCO : BPCO I ex fumeur (n=4), BPCO I fumeur (n=4), BPCO II ex fumeur (n=4), BPCO II fumeur (n=4), BPCO III ex fumeur (n=2), BPCO III fumeur (n=1) . Les résultats sont relatifs à l'expression de HPRT1 et rapportés à la moyenne des contrôles non-fumeurs.

Concernant l'expression génique des cytokines IL-20 au niveau bronchique, la cytokine la plus exprimée est l'IL-19. De plus, on observe une tendance à l'augmentation de l'expression de l'IL-19 chez les patients fumeurs actifs et certains patients BPCO. La cytokine IL-20 tend à augmenter chez les sujets fumeurs ou ex-fumeurs et chez les patients BPCO de stade 1. Pour finir, l'expression génique de la cytokine IL-24 semble suivre le même profil mais à un degré moindre. Mais ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs en raison d'un faible nombre d'échantillons dans certains groupes. (**Figure 3**).

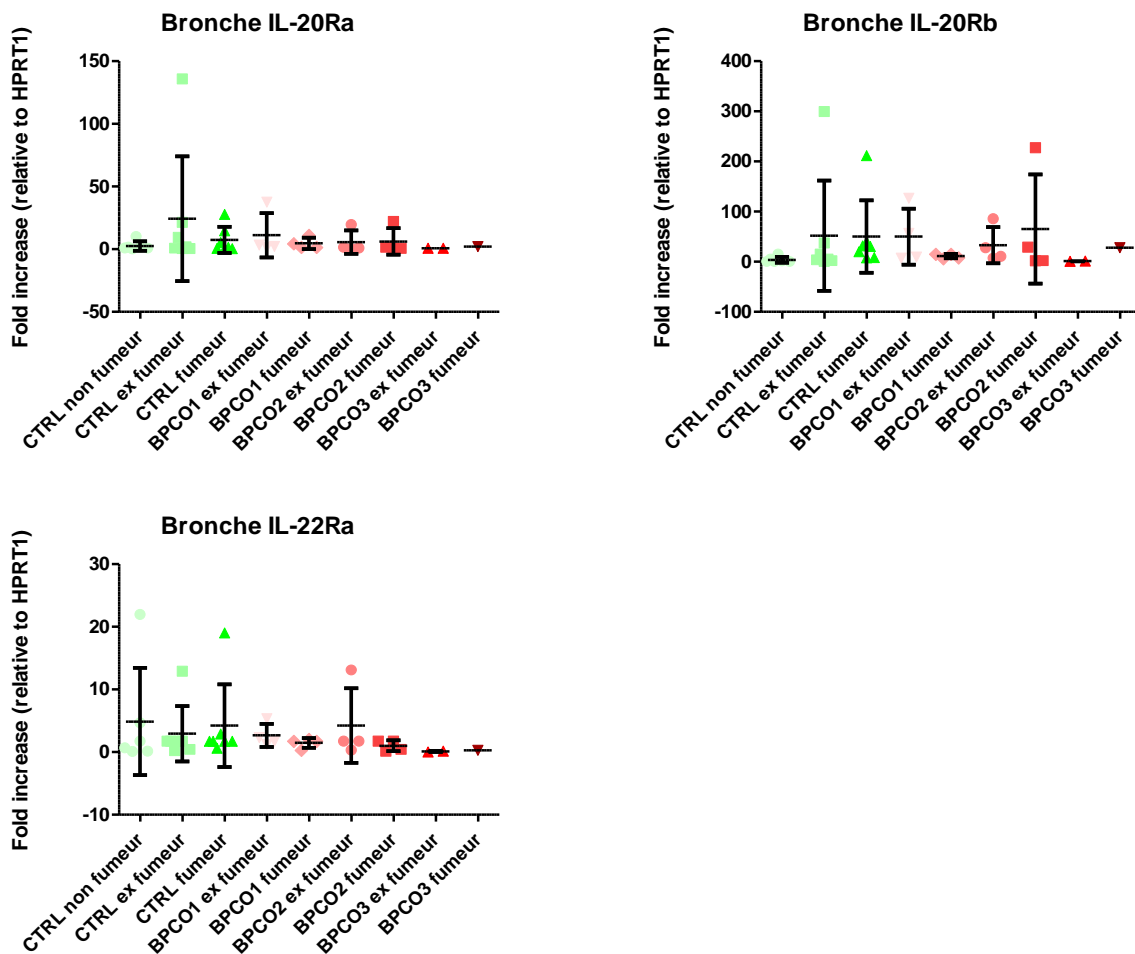


**Figure 3 : Mesure de l'expression génique des cytokines de la famille IL-20 au niveau bronchique.** Expression génique des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 dans différents groupes de patients non-BPCO : non-fumeur (n=6), ex-fumeur (n=7), fumeur (n=7) et BPCO : BPCO I ex fumeur (n=4), BPCO I fumeur (n=4), BPCO II ex fumeur (n=4), BPCO II fumeur (n=4), BPCO III ex fumeur (n=2), BPCO III fumeur (n=1). Les résultats sont relatifs à l'expression de HPRT1 et rapportés à la moyenne des contrôles non-fumeurs.

Nous avons également mesuré l'expression des récepteurs aux cytokines IL-20 produite par les ARNm bronchiques de patients (**Figure 4**). Concernant l'expression génique de la sous-unité IL-20Ra, celle-ci ne semble pas modulée dans les groupes de patients atteints de BPCO et ne semble pas non plus modulée par l'exposition à la fumée de cigarette. Les résultats obtenus pour la sous-unité IL-20Rb au niveau bronchique sont très hétérogènes avec



néanmoins une tendance à l'augmentation chez les patients ex-fumeurs, fumeurs et BPCO. La sous-unité IL-22Ra quant à elle reste très faiblement exprimée dans chaque groupe de patients en comparaison avec les patients non-fumeurs.



**Figure 4 : Mesure de l'expression génique des récepteurs aux cytokines de la famille IL-20 au niveau bronchique.** Expression génique des sous-unités IL-20Ra, IL-20Rb et IL-22Ra dans différents groupes de patients non-BPCO : non-fumeur (n=6), ex-fumeur (n=7), fumeur (n=7) et BPCO : BPCO I ex fumeur (n=4), BPCO I fumeur (n=4), BPCO II ex fumeur (n=4), BPCO II fumeur (n=4), BPCO III ex fumeur (n=2), BPCO III fumeur (n=1) . Les résultats sont relatifs à l'expression de HPRT1 et rapportés à la moyenne des contrôles non-fumeurs.

#### Induction des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs chez des patients fumeurs

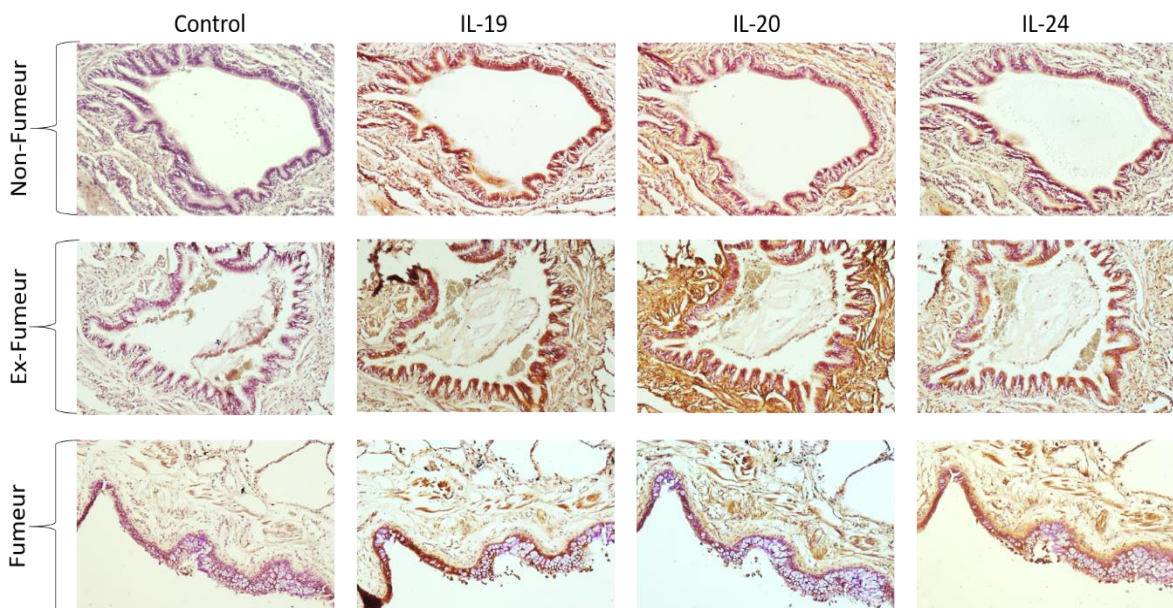
Ensuite, nous avons analysé l'expression des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 par immunohistochimie chez des sujets non BPCO (contrôles) classés en non-fumeurs, ex-fumeurs et fumeurs (**Figure 5**).

Chez les sujets non-fumeurs, les trois cytokines sont exprimées positivement en présence d'un anticorps spécifique en comparaison avec le contrôle isotypique. La cytokine IL-19 est

retrouvée fortement exprimée au niveau de l'épithélium bronchique de ces sujets. De plus, elle est également exprimée au niveau péribronchique. Les cytokines IL-20 et IL-24 sont plus faiblement exprimées et le sont plutôt au niveau péribronchique.

Les sujets fumeurs ont une morphologie épithéliale différente. Une hyperplasie des cellules caliciformes est constatée de par la présence élevée de mucus. Une augmentation de l'expression des trois cytokines de la famille IL-20 est observée, en particulier au niveau péribronchique.

Enfin, nous avons pu faire la comparaison avec des sujets ex-fumeurs. La morphologie épithéliale observée est comparable à celle des sujets non-fumeurs. Cependant le niveau d'expression des cytokines IL-20 reste très élevé.

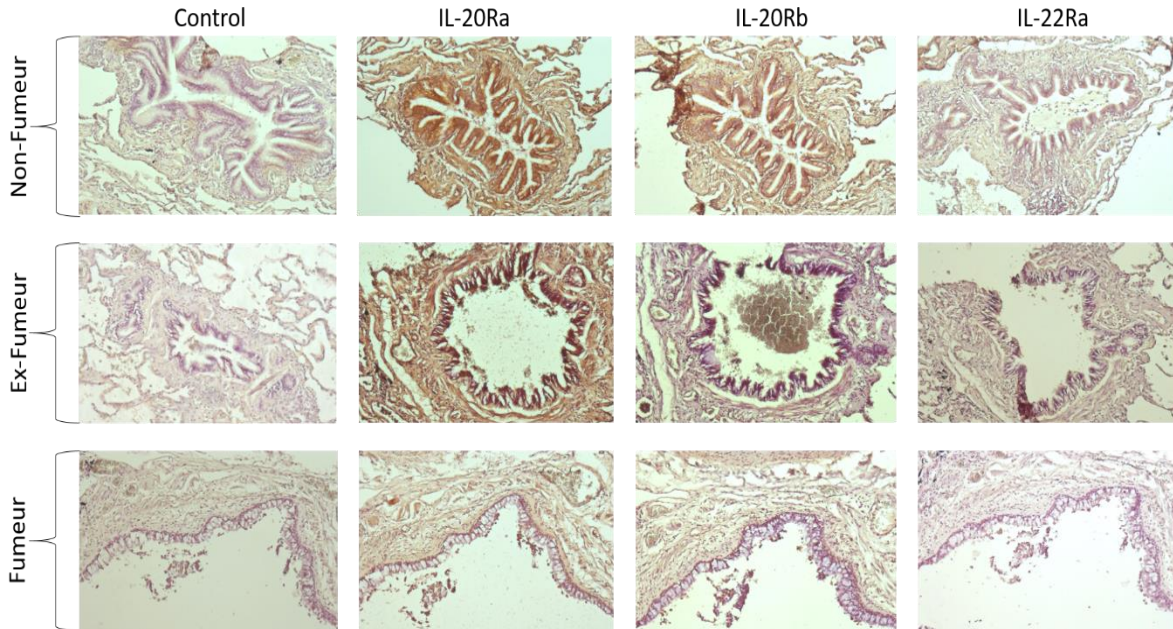


**Figure 5 : Evaluation de l'expression des cytokines IL-20 chez des sujets sans pathologie pulmonaire chronique.** Les marquages par immunohistochimie des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 ainsi que les marquages « contrôle » ont été réalisés sur plusieurs coupes de poumon provenant de différents patients non-fumeurs (n=5), ex-fumeurs (n=4) et fumeurs (n=4).

En parallèle, nous avons évalué par immunohistochimie l'expression des différentes sous-unités de récepteurs pour les cytokines IL-20, à savoir les sous-unités IL-20Ra, IL-20Rb et IL-22Ra (**Figure 6**).

Dans l'ensemble, les résultats obtenus dans nos trois catégories de patients montrent que la sous-unité IL-20Ra est très fortement exprimée en base et ne semble pas modulée par l'exposition à la fumée de cigarette. La sous-unité IL-22Ra est à l'inverse très faiblement exprimée dans nos trois groupes de patients et ne semble également pas modulée par la fumée de cigarette. Cependant, chez quelques sujets présentant un infiltrat inflammatoire au niveau pulmonaire, l'expression de l'IL-22Ra s'est révélée augmentée dans ce contexte, suggérant un rôle potentiel de cette sous-unité dans le cadre d'une inflammation. En ce qui concerne la sous-unité IL-20Rb qui rappelons-le est la sous-unité commune aux deux récepteurs permettant la signalisation des cytokines IL-20, les résultats sont plus hétérogènes.

En effet, cette sous-unité est exprimée en base chez les patients non-fumeurs. La fumée de cigarette semble induire chez la plupart des sujets, une augmentation de l'expression de la sous-unité IL-20Rb, cependant certains patients semblent faire exception. L'arrêt du tabac semble induire une diminution d'expression de la sous-unité IL-20Rb, particulièrement au niveau péribronchique.



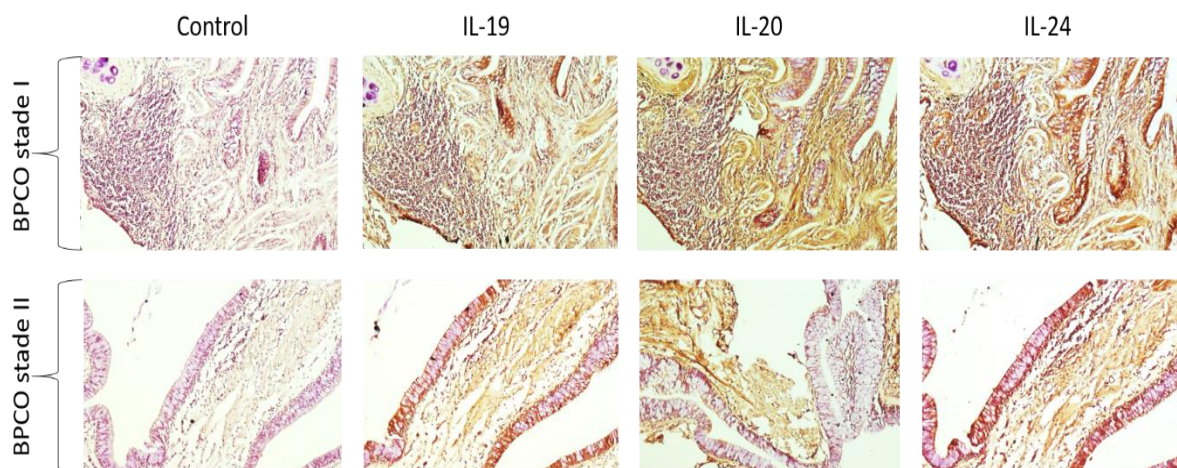
**Figure 6 :** Evaluation de l'expression des sous-unités formant les récepteurs aux cytokines IL-20 chez des sujets sans pathologie pulmonaire chronique. Les marquages par immunohistochimie des sous-unités IL-20Ra, IL-20Rb et IL-22Ra ainsi que les marquages « contrôle » ont été réalisés sur plusieurs coupes de poumon provenant de différents patients non-fumeurs (n=5), ex-fumeurs (n=4) et fumeurs (n=4).

Pris ensemble ces résultats montrent l'expression des cytokines de la famille IL-20 et de leurs récepteurs au niveau de l'épithélium bronchique chez l'homme. La fumée de cigarette étant connue pour induire des effets néfastes multiples chez le consommateur, celle-ci semble également jouer sur la modulation de l'expression de cette famille de cytokines. Ces résultats suggèrent que l'expression de l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24 ainsi que l'expression de la sous-unité IL-20Rb est augmentée chez les fumeurs. L'expression de l'IL-20Rb est modulée par l'arrêt du tabac, ce qui ne semble pas être le cas pour l'expression des cytokines IL-20.

### Induction des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs chez les patients BPCO

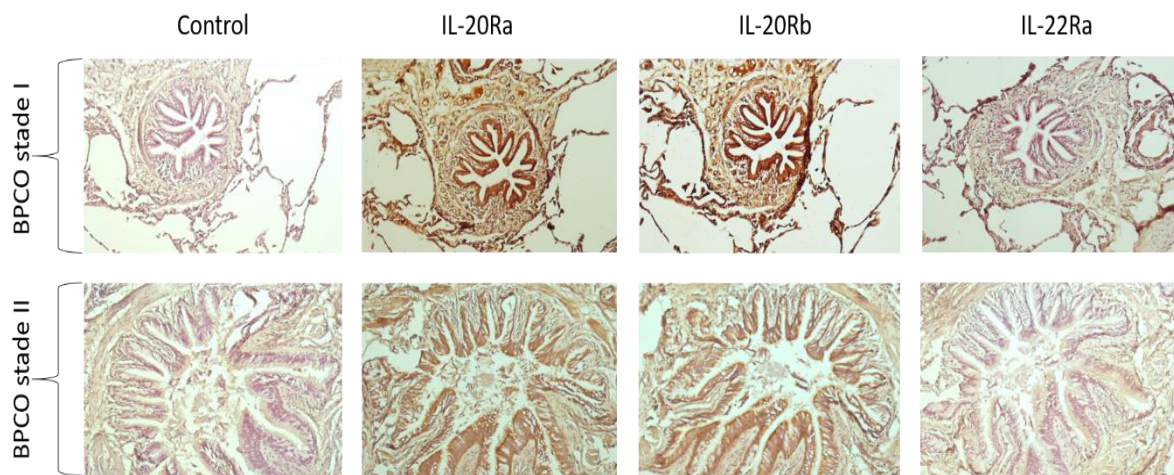
Les résultats précédents ont montré que le tabagisme module l'expression de la famille des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs, ce qui nous a amené à regarder ce qui se passait dans le cadre d'une pathologie chronique liée principalement à l'exposition à la fumée de cigarette : la BPCO. Cette pathologie est classée selon sa sévérité par le score de GOLD allant du stade I (le moins sévère) au stade IV (le plus sévère). Nous avons pu procéder à l'analyse de l'expression des cytokines de la famille IL-20 et de leurs récepteurs chez des patients de stades I et II.

Les biopsies de certains patients BPCO présente un important remodelage bronchique et péribronchique caractéristique de la pathologie. Si l'on regarde l'expression des cytokines IL-20 chez les patients BPCO de stades I et II en comparaison avec les patients non-fumeurs, une tendance à une expression accrue de ces cytokines est constatée que ce soit au niveau de l'épithélium respiratoire ou au niveau du tissu périphérique (**Figure 7**). Cependant, nous avons observé une grande variabilité des résultats selon les patients qui pourraient être liés au degré d'inflammation associé. De plus, certains de ces patients sont des fumeurs actifs, des ex-fumeurs plus ou moins anciens et des non-fumeurs. Globalement, il semble que le marquage soit plus important lorsque la sévérité de la pathologie augmente.



**Figure 7 :** *Evaluation de l'expression des cytokines IL-20 chez des patients atteints de BPCO. Les marquages par immunohistochimie des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 ainsi que les marquages « contrôle isotypique » ont été réalisés sur plusieurs coupes de poumon provenant de différents patients BPCO de stade I (n=5) et BPCO de stade II (n=5).*

Concernant l'expression des sous-unités formant les récepteurs aux cytokines IL-20, les différences observées chez les patients BPCO montrent une expression accrue de la sous-unité IL-20Rb indépendamment des antécédents d'exposition à la fumée de cigarette (**Figure 8**). La sous-unité IL-20Ra reste très fortement exprimée ne permettant pas de mettre en avant une modulation chez les patients BPCO de stade I et II. Pour finir, la sous-unité IL-22Ra reste très faiblement exprimée dans ce contexte pathologique. Ces résultats suggèrent donc l'implication de la sous-unité IL-20Rb dans la pathologie.



**Figure 8 :** *Evaluation de l'expression des sous-unités formant les récepteurs aux cytokines IL-20 chez des patients atteints de BPCO. Les marquages par immunohistochimie des sous-unités IL-20Ra, IL-20Rb et IL-22Ra ainsi que les marquages « contrôle isotypique » ont été réalisés sur plusieurs coupes de poumon provenant de différents patients BPCO de stade I (n=5) et BPCO de stade II (n=5).*

Ces résultats montrent une potentielle implication des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs dans la pathologie de la BPCO. En effet, l'augmentation accrue de ces cytokines reflète une dérégulation de leur production en contexte BPCO. Ici, l'exposition à la fumée de cigarette semble jouer un rôle majeur dans la dérégulation de l'expression des cytokines IL-20 mais ne semble pas avoir d'impact sur l'expression des récepteurs.

## DISCUSSION

Les premiers résultats obtenus concernant la partie humaine confirment bien que les cytokines de la famille IL-20 et leurs récepteurs sont exprimés au niveau de l'épithélium bronchique et péribronchique chez l'homme.

En base, la cytokine IL-19 est la plus exprimée des trois cytokines de cette famille et les résultats sont en adéquation avec ceux obtenus chez la souris. La fumée de cigarette va induire une augmentation des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24, au niveau bronchique mais surtout au niveau péribronchique. L'arrêt du tabac ne permet pas de diminuer leur expression, mais la morphologie pulmonaire des fumeurs semble restaurée. Dans un contexte de maladie pulmonaire chronique telle que la BPCO, l'expression de ces cytokines est fortement augmentée que ce soit au niveau de l'épithélium bronchique, péribronchique ou encore au sein des infiltrats inflammatoires présents sur certaines coupes histologiques.

Du côté des récepteurs aux cytokines IL-20, la sous-unité IL-20Ra est fortement exprimée dans les coupes de poumons de patients non-fumeurs, et la sous-unité IL-22Ra l'est très faiblement. Nous n'observons pas de modulation franche pour ces 2 récepteurs. Nos résultats montrent que la sous-unité IL-20Rb est la plus modulée par les changements environnementaux. En

effet, faiblement exprimée en base, l'expression de cette sous-unité est augmentée chez les patients fumeurs, et elle diminue lors de la cessation tabagique. En contexte BPCO la sous-unité IL-20Rb apparaît très fortement exprimée.

Les résultats d'expression génique de ces cytokines et de leurs récepteurs ne laissent pas apparaître de différences significatives au niveau des différents groupes de patients dans le parenchyme et dans les bronches bien que des tendances se dégagent. Cependant, il est clair que la cytokine IL-19 est la plus exprimée que ce soit au niveau du parenchyme ou de l'épithélium bronchique. Les cytokines IL-19 et IL-20, paraissent modulées au niveau bronchique chez les patients fumeurs et atteints de BPCO en comparaison avec les patients non-fumeurs. Cependant l'IL-20 semble plus exprimée dans les formes peu sévères de BPCO. Les récepteurs IL-20Ra et IL-22Ra quant à eux ne semblent pas être modulés dans les différents groupes de patients et dans les différents tissus. Cependant, il reste vrai que la sous-unité IL-20Ra reste la plus exprimée en base et la sous-unité IL-22Ra la plus faiblement exprimée. La sous-unité IL-20Rb semble intéressante car elle est augmentée au niveau de l'épithélium bronchique dans nos différents groupes de patients malgré une forte hétérogénéité.

Les résultats obtenus pour la partie humaine de ce projet restent à conforter. En effet, nos résultats sont assez hétérogènes dans l'ensemble et la variabilité inter-patients est un facteur à prendre en considération. Il faut augmenter le nombre d'individus par groupe et analyser ces données en fonction des antécédents de chaque patient pour pouvoir faire un recoupement correct des résultats générés. De plus, il est important de prendre en compte un facteur essentiel liant ces patients : le cancer. Il a été montré à plusieurs reprises que l'expression des cytokines de la famille IL-20 ainsi que leurs récepteurs sont exprimés dans les cancers. Les récepteurs aux cytokines IL-20 ont été décrits comme très exprimés dans les cancers du poumon. La sous-unité IL-22Ra est très augmentée dans les cancers du poumon de manière générale et les sous-unités IL-20Ra et IL-20Rb sont exprimées dans les cancers du poumon non à petites cellules (Lee et al., 2013). Cependant, nos prélèvements sont issus de zones saines chez les patients ce qui devrait minimiser ces interférences.

L'ensemble de ces données d'expression protéique et génique semble confirmer l'hypothèse de l'implication des cytokines IL-20 au cours de la BPCO et le rôle de l'exposition à la fumée de cigarette dans ce contexte.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Des travaux réalisés dans l'équipe ont montré que le défaut de production des cytokines IL-17 et IL-22 pouvait en partie expliquer la susceptibilité à l'infection dans nos modèles expérimentaux de BPCO (Pichavant et al., 2015). Dans un contexte d'infection cutanée, Myles & al. ont montré que les cytokines IL-20 étaient capables de réguler la production d'IL-17 et d'IL-22 de manière négative (Myles et al., 2013). La confrontation de ces données nous a donc conduits à étudier le rôle des cytokines IL-20 dans la susceptibilité aux infections respiratoires, ce qui n'avait jamais été étudié avant cette thèse.

Au cours de cette thèse, nous avons commencé l'étude de différents aspects pouvant relier les cytokines de la famille IL-20 (1) au contrôle de la réponse antibactérienne, et (2) au défaut de clairance bactérienne associé aux exacerbations chez les patients BPCO. Les données présentées dans ce manuscrit sont des premiers résultats obtenus au niveau pulmonaire dans un contexte infectieux seul, et dans un contexte d'exposition à la fumée de cigarette. Nos données ouvrent de nombreuses possibilités d'études pour mieux comprendre l'implication des cytokines de la famille IL-20 dans les deux contextes. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'expression des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs au niveau du poumon, dans un contexte d'infection pulmonaire et à leur modulation en contexte cigarette. Puis, nous avons évalué leurs fonctions notamment au niveau de l'inflammation pulmonaire et de la clairance bactérienne, mais également au niveau de leur rôle dans la réparation épithéliale. Enfin, nous avons essayé de replacer les résultats obtenus au cours de ce doctorat dans le contexte pulmonaire d'une infection et leur potentiel rôle dans la BPCO.

### **I. Expression et modulation des cytokines de la famille IL-20 et de leurs récepteurs au niveau du tractus respiratoire**

Dans un premier temps, nous avons regardé l'expression génique de cette famille de cytokines chez la souris. Les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 se sont révélées exprimées au niveau de l'épithélium trachéal et au niveau du poumon total. Les dosages protéiques ont révélé une quantité très faible voir non détectable des cytokines IL-20. Cependant les résultats obtenus en immunohistochimie nous ont permis d'analyser au mieux l'expression de celles-ci. Nous avons ainsi observé que la cytokine IL-19 était le membre de cette famille le plus exprimé au niveau pulmonaire en comparaison avec l'IL-20 et l'IL-24 faiblement exprimées en base.

Comme nous avons mis en évidence l'expression de ces cytokines au niveau pulmonaire, nous nous sommes demandé dans quelles conditions elle pouvait être modulée. Ainsi, nous avons étudié l'expression de ces cytokines en condition infectieuse et en condition d'exposition à la fumée de cigarette.

## A. Contexte infectieux seul (Figure 11)

Au laboratoire, nous nous intéressons aux infections respiratoires. Pour voir si les cytokines IL-20 sont modulées en condition d'infection respiratoire, nous avons choisi deux pathogènes à tropisme pulmonaire : *Sp* et *NTHI*.

Dans les modèles expérimentaux, l'infection à *Sp* et *NTHI* induit une augmentation d'expression des ARNm des cytokines IL-20.

In vitro, dans des modèles de culture primaire de cellules épithéliales trachéales (mTEC), l'infection par *Sp* et *NTHI* induit fortement l'expression des cytokines IL-20, avec quand même une induction plus faible pour *Sp*. En modifiant la dose de *Sp* (MOI), l'induction des cytokines IL-20 pourrait être plus importante. Les résultats observés sont similaires dans la lignée cellulaire bronchique humaine (BEAS-2B).

En immunohistochimie, les cytokines IL-20 sont bien augmentées suite à l'infection au niveau de l'épithélium bronchique. Elles sont aussi fortement exprimées au niveau de l'infiltrat inflammatoire.

Nous ne pouvons pas comparer la réponse de ces deux pathogènes car ils utilisent des voies d'activation légèrement différentes. La bactérie *Sp* via son acide lipotéichoïque va être reconnue par le TLR2 en association avec TLR1 ou TLR6 (Schwandner et al., 1999), tandis que la bactérie *NTHi* va être préférentiellement reconnue par le TLR4 (Srivastava et al., 2005). Cependant, différentes études montrent que les bactéries Gram positif peuvent activer le TLR2 directement ou indirectement et de même pour les bactéries Gram négatif avec le TLR4 (Galdiero et al., 2004) (Srivastava et al., 2005). Secondairement, ces deux pathogènes vont induire via leur reconnaissance par ces TLRs, une induction de Myd88 et d'IRAK permettant l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Alexopoulou et al., 2012). Cette voie de signalisation va ainsi induire la production de cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-12 qui vont conduire à la réponse immunitaire adaptative. Il a été préalablement démontré que la transcription des cytokines IL-20 est dépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B suggérant que c'est également le cas au cours de l'infection par *Sp* et *NTHi*. Encore une fois, le dosage protéique n'a rien révélé de significatif dans l'augmentation de l'expression protéique de ces cytokines. Le déclin rapide de l'expression protéique des cytokines IL-20 peut être corrélé au fait que son expression est sous la dépendance de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. En effet, les cytokines de ce type (comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1) déclinent très rapidement. Dans notre modèle murin nous avons constaté que l'infection par *Sp* ne module pas l'expression de la cytokine IL-24. Dans la littérature, cette cytokine est plutôt décrite comme étant impliquée dans la réponse antivirale (Menezes et al., 2018). Il est également possible que ces cytokines soient rapidement liées et/ou consommées par les cellules exprimant les récepteurs correspondants.

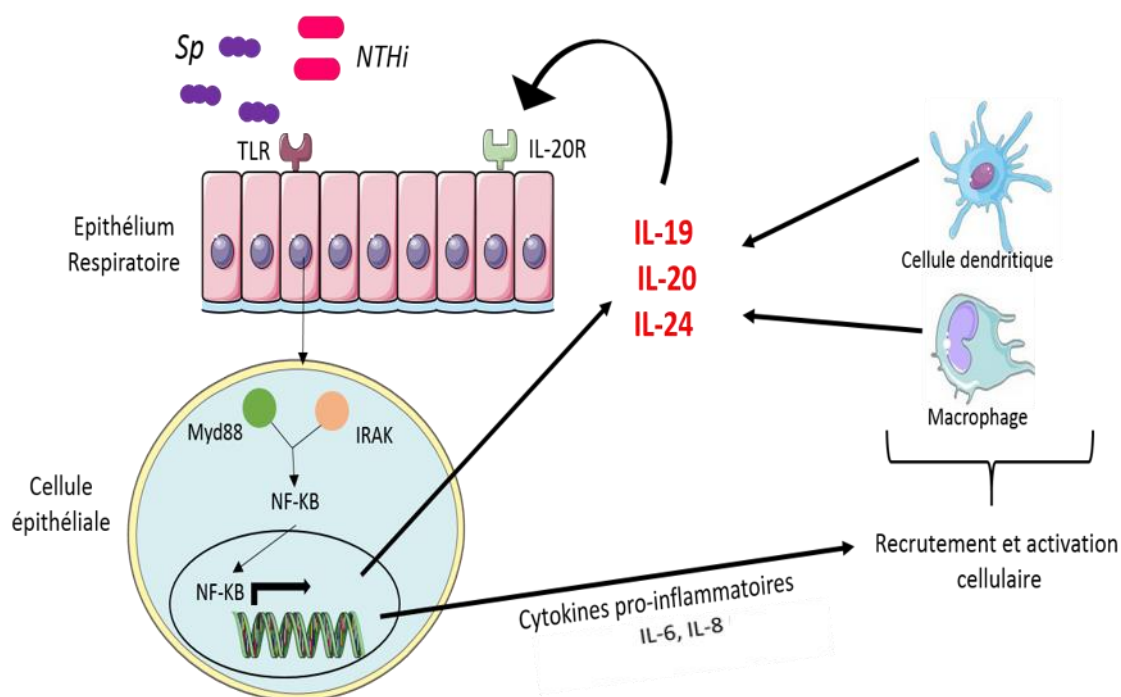
En effet, lorsque nous nous sommes intéressés à l'expression des récepteurs de ces cytokines IL-20, nous avons constaté que la sous-unité IL-20Ra était très fortement exprimée et de manière homogène au niveau de l'épithélium bronchique. Cependant, en contexte infectieux,



aucune modulation de son expression n'est constatée, suggérant son implication dans la réponse aux cytokines. A l'inverse, la sous-unité IL-22Ra est très faiblement exprimée. Son expression tend à l'augmentation en contexte infectieux mais de manière non significative. La sous-unité IL-20Rb, quant à elle, est exprimée faiblement en base mais elle est augmentée dans le cas d'une infection avec un pathogène respiratoire. Ces données suggèrent que le récepteur IL-20Ra/IL-20Rb joue un rôle important dans le contrôle de la fonction épithéliale. Cette expression n'est pas limitée à l'épithélium bronchique mais se retrouve également sur l'épithélium alvéolaire et en particulier sur les pneumocytes de type II selon leur localisation.

Par l'utilisation d'un anticorps bloquant la sous-unité IL-20Rb (sous-unité commune aux deux récepteurs des cytokines de la famille IL-20), nous n'avons pas observé de diminution de l'expression génique des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs. Cependant, les résultats d'immunohistochimie révèlent une diminution significative de l'expression des cytokines IL-20 et de la sous-unité IL-20Rb. De plus, l'utilisation de l'anticorps anti-IL-20Rb semble avoir un impact sur la modulation de l'infection car l'infiltrat inflammatoire pulmonaire est considérablement réduit chez la souris traitée. Nos données suggèrent l'implication de plusieurs mécanismes dans ce processus. Tout d'abord, le traitement par l'anti-IL-20Rb bloque la boucle autocrine entre les cytokines IL-20 et pourrait réduire la production de ces mêmes cytokines. De plus, ce traitement augmente la clairance bactérienne, ce qui pourrait limiter l'activation du système immunitaire (en particulier des TLR) par les bactéries *Sp* et *NTHi* ou leurs métabolites. En effet, l'inhibition du recrutement de cellules inflammatoires (neutrophiles, monocytes/macrophages) diminue du même coup le nombre de cellules productrices des cytokines IL-20 (cf numération des cellules positives pour les cytokines IL-20, article 1). Il est vraisemblable que plusieurs de ces mécanismes expliquent l'observation faite dans ce contexte.

Les résultats d'immunohistochimie montrent une augmentation des trois cytokines IL-20 lors d'une infection bactérienne par *Sp* et *NTHi*, pathogènes connus pour être impliqués dans les exacerbations de la BPCO. Pour étendre notre champ d'observation dans le contexte infectieux, il serait intéressant de travailler sur les pathogènes *Moraxella catarrhalis* et *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, *Moraxella catarrhalis* est un pathogène très fréquemment impliqué dans les exacerbations de la BPCO (Murphy and Sethi, 1992) (Sethi and Murphy, 2001). *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène également très intéressant sur lequel focaliser nos recherches car celui-ci est retrouvé spécifiquement dans les cas d'exacerbation chez les patients atteints de BPCO sévère à très sévère (Gallego et al., 2014). Au laboratoire, une collaboration est actuellement en cours pour étudier cette thématique. Enfin, les exacerbations de la BPCO peuvent notamment être causées par des virus (Zhou et al., 2015) (Molyneux et al., 2013). Différents travaux ont déjà relaté l'impact des cytokines IL-20 au cours de l'infection virale et plus particulièrement le rôle antiviral de l'IL-24 dans l'infection grippale (Menezes et al., 2018) (Seong et al., 2016) ou encore le rôle de l'IL-22 et de l'IL-26 dans les infections pulmonaires par la grippe (Barthelemy et al., 2018) ou du foie par l'hépatite B et C (Caparrós and Francés, 2018).



**Figure 11 : Production des cytokines de la famille IL-20**

En réponse à une infection bactérienne, les TLR situés sur l'épithélium respiratoire vont reconnaître les motifs bactériens et induire la voie de signalisation NF-κB via les intermédiaires Myd88 et IRAK. La voie NF-κB activée, l'épithélium va synthétiser des cytokines pro-inflammatoires qui participent au recrutement des macrophages et des cellules dendritiques. Ces cellules peuvent à leur tour produire des cytokines IL-20. Les cytokines IL-20 sont capables d'induire leur production par les cellules recrutées au niveau du site d'inflammation et vont induire une boucle de stimulation autocrine en activant leurs propres récepteurs épithéliaux.

## **B. Contexte d'exposition à la fumée de cigarette (Figure 12)**

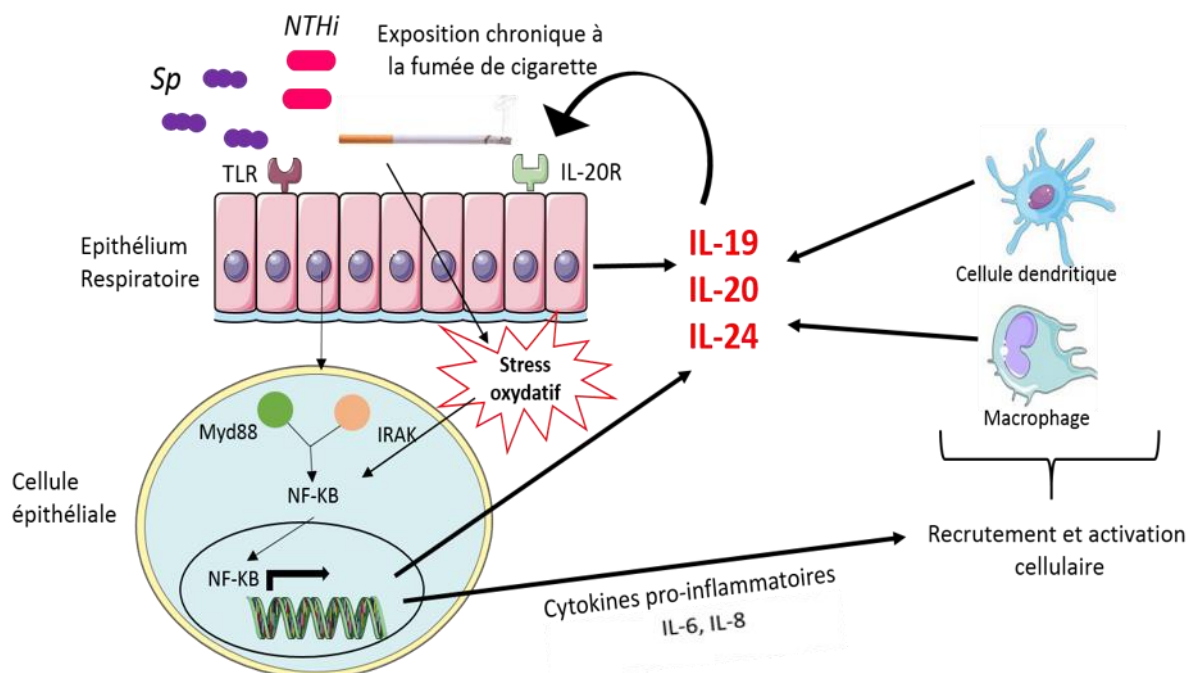
Un autre aspect du projet a consisté à regarder l'expression des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs chez des souris exposées à la fumée de cigarette. De manière intéressante et dans ce contexte, l'expression génique de ces cytokines s'est retrouvée augmentée ainsi que celle du récepteur IL-20Rb. Des résultats similaires ont été constatés dans la lignée de cellules bronchiques humaines BEAS-2B. En contexte infectieux, cette expression est d'autant plus augmentée et l'utilisation d'un anticorps bloquant la sous-unité IL-20Rb va diminuer considérablement leurs expressions dans les cellules mTEC. Cependant, ces dernières observations n'ont pas été observées *in vitro* dans la lignée cellulaire BEAS-2B. Cette différence entre les aspects *in vivo* et *in vitro* peut s'expliquer entre autre par le mode d'exposition à la fumée de cigarette. En effet, les souris sont directement exposées à la cigarette de manière chronique, tandis que les cellules reçoivent une seule fois l'extrait dans le milieu. Il est connu que l'exposition à la fumée de cigarette du poumon induit un stress oxydatif au moins partiellement responsable de la réaction inflammatoire associée (Foronjy et al., 2008). Dans un modèle cellulaire comme celui utilisé pendant la thèse, l'extrait de fumée de cigarette induit un stress dans les cultures de cellule mais ne peut pas mimer avec exactitude les effets observés au niveau pulmonaire. En effet, l'exposition chronique difficile

à reproduire *in vitro* conduit à un épuisement des systèmes de détoxification (notamment, NRF2). De plus, ces modèles unicellulaires excluent les interactions avec d'autres types cellulaires (en premier lieu, les cellules immunitaires) qui vont également moduler la réponse pulmonaire et épithéliale. Dans ce contexte, il serait intéressant d'administrer des anti-oxydants comme la N-acétylcystéine (NAC) pour déterminer le rôle de cette voie d'activation dans la production des cytokines IL-20 et de leurs fonctions. De plus, il est possible d'utiliser un système d'exposition direct à la fumée de cigarette en plaçant les cellules sur insert en phase Air/Liquide (Amatngalim et al., 2018). Ce système pourrait être une bonne alternative pour mimer au mieux l'exposition à la fumée de cigarette de l'épithélium tel que réalisé chez les souris et chez l'homme.

Enfin, grâce à notre collaboration avec le Dr. Christelle Coraux de l'Université de Reims (France), nous avons pu nous rapprocher un peu plus de la réalité par l'étude de coupes de poumons de sujets fumeurs ou non-fumeurs. Dans un contexte d'exposition seul (sans pathologie chronique associée hormis un cancer), nos premières observations sont corrélées avec celles obtenues chez la souris. La cytokine IL-19 en base est la plus exprimée. La fumée de cigarette va moduler l'expression de la famille de cytokines et de leurs récepteurs par une augmentation notamment au niveau péribronchique. Cependant l'arrêt de la consommation du tabac ne semble pas permettre de revenir au niveau de base des cytokines IL-20. Les observations sur les récepteurs en base sont les mêmes que celles observées chez le rongeur. Seule la sous-unité IL-20Rb est modulée par l'exposition à la fumée de cigarette et celle-ci diminue avec l'arrêt du tabac ce qui suggère que les mécanismes de régulation des cytokines et du récepteur IL-20Rb sont différents.

Dans cette partie nous pouvons conclure positivement quant à l'implication de cette famille de cytokines dans un contexte infectieux et d'exposition à la fumée de cigarette au niveau du tractus respiratoire chez la souris et chez l'homme. L'utilisation d'un anticorps bloquant la sous-unité IL-20Rb permet au moins de diminuer l'expression de celles-ci en contexte infectieux. Pour conforter ces résultats, l'utilisation de souris déficientes pour le récepteur IL-20Rb serait une alternative très intéressante. De plus, au laboratoire, la mise en place de cellules humaines BEAS-2B déficientes pour les sous-unités IL-20Rb et IL-20Ra par la technique du CRISPR-Cas9, est actuellement en cours pour consolider les résultats obtenus dans la partie humaine du projet.

Nous nous sommes intéressés de près à la sous-unité IL-20Rb, car celle-ci est commune aux deux récepteurs permettant la transmission du signal des cytokines IL-20. Cependant, il semble également nécessaire de s'intéresser au rôle des deux autres sous-unités dans le futur pour identifier leur spécificité surtout de par leur différence d'expression observée.



**Figure 12 : Modulation de l'expression des cytokines de la famille IL-20 en réponse à la fumée de cigarette**

L'exposition des cellules épithéliales respiratoires à la fumée de cigarette entraîne un stress oxydatif conduisant à l'activation de la voie NF-κB. Cet effet peut s'ajouter à celui des motifs bactériens pour augmenter cette réponse NF-κB. Ce processus participe probablement à amplifier l'expression des cytokines IL-20 par les macrophages, les cellules dendritiques, ainsi que par les cellules épithéliales elles-mêmes.

## **II. Fonctions épithéliales des cytokines de la famille IL-20**

Précédemment, nous avons observé que les cytokines de la famille IL-20 étaient induites dans le cadre d'une infection pulmonaire. Quelques articles ont mentionné l'implication de ces cytokines dans la défense de l'hôte au niveau de l'épithélium cutané (Wolk et al., 2006) (Boniface et al., 2005). Grâce à ces travaux, nous nous sommes donc penchés sur l'étude de cette famille de cytokines lors de l'inflammation suite à l'infection pulmonaire et de la clairance bactérienne. Les manipulations ont été réalisées avec la bactérie *Sp* chez la souris. L'expression des cytokines et de la sous-unité IL-20Rb est augmentée dans ce contexte. Le pic d'expression de ces cytokines se situe à 24h post-infection et une diminution de leur expression est constatée dès 48h. Nous avons également observé qu'au même moment, nous avons une clairance bactérienne non optimale et une augmentation des lésions tissulaires pulmonaires associées. L'utilisation d'un anticorps bloquant la sous-unité IL-20Rb améliore de manière significative la diminution de la réaction inflammatoire et augmente la clairance bactérienne mais seulement de manière transitoire.

Concernant la fonction antibactérienne des cytokines IL-20 sur l'épithélium respiratoire en condition *in vitro*, nous avons observé que l'épithélium produit les cytokines IL-20 en réponse

à l'infection mais qu'il est également leur cible lorsque l'on supplémente les cultures avec les cytokines IL-20 recombinantes. Elles induisent la production de peptides antimicrobiens en réponse à l'infection bactérienne par les bactéries *Sp* et *NTHi*. Cependant l'utilisation de l'anti-IL-20Rb ne diminue pas de manière significative l'expression de ces peptides antimicrobiens.

Nous avons dans un premier temps regardé si l'expression génique de protéines de jonctions était affectée par les cytokines IL-20. Les résultats obtenus au niveau de l'épithélium respiratoire dans les cultures primaires de mTEC murines et dans les cellules BEAS-2B n'ont montrés aucune variation, suggérant qu'elles ne sont pas impliquées dans le maintien de la barrière épithéliale au niveau du tractus respiratoire. Il a aussi été décrit que les cytokines IL-20 sont capables d'induire la production de peptides antimicrobiens notamment impliqués dans la défense de l'hôte (Rutz et al., 2014) (Sa et al., 2007) (Wolk et al., 2006). Parmi ceux produits, nous retrouvons les peptides antimicrobiens de la famille S100 et de la famille des  $\beta$ -défensines (Rutz et al., 2014). Les données collectées ont révélé une stimulation de ces différentes familles de peptides dans les cultures de cellules mTEC. En effet, les peptides de la famille S100 sont augmentés par l'introduction dans le milieu de cytokines IL-20 recombinantes, avec une significativité observée pour le peptide S100a9. Dans notre modèle murin d'infection par *Sp*, là encore nous retrouvons une augmentation des peptides S100 et des  $\beta$ -défensines.

En contexte CS, alors que les peptides S100A ne sont plus induits, c'est l'expression de LCN2 qui est augmentée suggérant ainsi les modulations apportées par l'exposition à la fumée de cigarette sur la signalisation induite par les cytokines IL-20. De plus, ces cytokines semblent capables de jouer sur leur propre induction, mais ces résultats nécessitent encore d'être approfondis.

Par ailleurs, nous avons analysé la modulation d'expression de chimiokines actives sur les neutrophiles comme CXCL1 et CXCL2 (et CXCL8 sur les cellules humaines) et nous n'avons pas observé de modulation en présence des cytokines IL-20. Cela confirme bien que ces cytokines agissent par des voies différentes.

Pour s'en assurer, il est important de s'intéresser à la mécanistique cellulaire induite par ces cytokines en étudiant la balance entre les voies de signalisation STAT3 et MAPK qu'elles stimulent (Rutz et al., 2014). La voie STAT3 va permettre d'induire de nombreux gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire tels que les gènes de régulation de l'apoptose (Mcl-1 et Bcl-2), le facteur de croissance VEGF et permet également de réprimer l'expression de P53 (Bousoik and Montazeri Aliabadi, 2018). La voie MAPK participe au niveau des neutrophiles et des cellules dendritiques dans le contrôle de la migration ou de l'endocytose par l'IL-20 (Gough et al., 2017). Actuellement au laboratoire des travaux sont en cours concernant cet aspect.

Un autre point important en faveur de la potentielle consommation rapide de ces cytokines est lié à la modulation de leur expression en contexte d'autostimulation suggérant un effet autocrine ou paracrine des cytokines de la famille IL-20. Ces manipulations ont été réalisées uniquement sur des cultures cellulaires. Pour mieux comprendre ce mécanisme complexe qu'est la stimulation autocrine, il est important de répondre à différentes questions. Dans la

littérature concernant particulièrement l'implication des cytokines IL-20 dans un contexte pathologique, nous pouvons constater que celles-ci sont habituellement analysées de manière indépendante. Par exemple, dans le psoriasis la cytokine IL-20 est la plus étudiée (Stenderup et al., 2009), dans les cancers on retrouve des études principalement basées sur l'IL-24 (Kreis et al., 2008) et pour la polyarthrite rhumatoïde, c'est l'IL-19 qui est au centre des recherches (Liao et al., 2002). En l'état actuel de nos connaissances, cela ne repose pas sur des interactions différentielles avec les récepteurs connus. Les cytokines IL-20 et IL-24, comparées à l'IL-19 ont deux possibilités de liaison car elles utilisent soit le récepteur composé de la sous-unité IL-20Ra ou IL-22Ra, alors que l'IL-19 n'interagit qu'avec le récepteur comportant l'IL-20Ra. Cependant la sous-unité IL-22Ra n'est que faiblement exprimée dans le poumon comparée aux deux autres (Rutz et al., 2014). Ces indications nous engagent donc à travailler sur les cytokines IL-20 et à les traiter au cas par cas dans le contexte pulmonaire.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'implication des cytokines IL-20 dans le phénomène de réparation cellulaire. Nos données montrent un effet bénéfique des cytokines sur la cicatrisation par les cellules BEAS-2B. De manière intéressante, il a été décrit que les cytokines IL-20 sont impliquées dans la prolifération des cellules épithéliales (Sonnenberg et al., 2011) (Pickert et al., 2009). Nous avons commencé à réaliser des manipulations pour bloquer le processus de prolifération cellulaire en traitant nos cellules avec de la mitomycine C (n=3), et nous avons pu constater que lorsque la prolifération cellulaire était stoppée par ce traitement, les cytokines IL-20 recombinantes avaient toujours un effet positif sur la fermeture de la blessure même s'il n'est que partiel (données non montrées). Ces résultats laissent à penser que les cytokines IL-20 pourraient agir sur la migration cellulaire ce qui mériterait d'être confirmé par des tests spécifiques. Ces résultats n'ont pour l'instant pas été analysés en contexte d'exposition à la fumée de cigarette.

Pour confirmer l'impact du tabagisme sur la réparation tissulaire, nous avons commencé à réaliser des tests de blessures sur des cellules bronchiques primaires de patients humains (collaboration avec le Dr. Christelle Coraux). Nous avons pu bénéficier de cellules d'un patient fumeur (n=1) et d'un patient ex-fumeur (n=1). Chez ces deux patients l'addition de cytokines IL-20 recombinantes dans le milieu de culture a également montré une réparation légèrement accélérée, et l'extrait de fumée de cigarette semble ralentir la cicatrisation. Ces résultats restent néanmoins à confirmer et à optimiser, notamment en faisant varier les concentrations de cytokines recombinantes. En parallèle, l'utilisation de culture primaire de mTEC de souris exposées à la cigarette serait une autre possibilité pour mettre en évidence des différences liées à l'exposition à la fumée de cigarette, pour corrélérer nos résultats avec ceux obtenus chez les patients.

Il s'avère difficile de pratiquer des tests de blessures au niveau pulmonaire chez la souris. Cependant, l'administration de Polidocanol (qui entraîne une desquamation importante de l'épithélium) permet de suivre la régénération épithéliale au niveau de la trachée ou des bronches. Ce modèle conjugué à l'administration des cytokines ou de l'anticorps anti-IL-20Rb pourrait permettre de préciser le rôle des cytokines IL-20 *in vivo*. De plus, l'utilisation d'un modèle cellulaire plus complexe tel que les explants de trachée (voir de bronches) semble être

une bonne alternative. Le phénomène de réparation est un phénomène multiple et complexe qui permettrait de bien définir les différentes phases et le rôle des cytokines de la famille IL-20 sur chacune d'entre elles.

Les résultats obtenus concernant la fonction des cytokines IL-20 sont encourageants. Un des objectifs fondamentaux au laboratoire est l'étude de la modulation des cytokines IL-20 en présence de l'anticorps bloquant la sous-unité IL-20Rb. Nous avons commencé à réaliser des lignées stables de cellules déficientes pour le récepteur IL-20Rb (technologie CRISPR-Cas9). Une fois ces lignées bien établies, il serait intéressant de réaliser des infections sur ces cellules et des tests de cicatrisation pour comparer les résultats obtenus avec notre anticorps. De plus, nous possédons depuis peu des souris déficientes pour ces récepteurs nous permettant d'envisager des manipulations *in vivo* pour valider nos hypothèses.

### III. Hypothèse de l'action des cytokines IL-20 dans un contexte global d'infection pulmonaire (Figure 13)

L'épithélium respiratoire constitue la première ligne de défense à laquelle vont se heurter les pathogènes respiratoires. Les bactéries (eg : *Sp* et *NTHi*), via les TLR vont activer la réponse inflammatoire. Myles & al. ont démontré l'expression de ces cytokines IL-20 dans leur modèle d'infection de kératinocytes (Myles et al., 2013). Dans notre modèle infectieux, nous avons également observé la synthèse de celles-ci. Ces cytokines IL-20 ont la capacité d'induire la voie de signalisation via STAT3, qui va induire en partie la survie et la prolifération des cellules épithéliales (Yu et al., 2014) ainsi que la synthèse des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  (Yu et al., 2014), que nous n'avons pas observé dans nos modèles respiratoires.

Nous avons ainsi montré l'implication des cytokines IL-20 lors d'une infection pulmonaire par la bactérie *Sp* et que l'anticorps anti-IL-20Rb limite les effets négatifs de ces cytokines au cours de l'infection. Pour valider ces résultats, nous devons dans un premier temps vérifier notre anticorps anti-IL-20Rb et ensuite mieux comprendre le rôle des cytokines IL-20 par exemple par l'utilisation de souris déficientes pour ce récepteur (Zheng et al., 2008). De plus, compléter les souris par chacune des cytokines recombinantes nous permettrait d'avoir des indications sur le rôle de chacune d'entre elles. Au laboratoire une première manipulation a été réalisée sur le même modèle infectieux par SP en supplémentant la souris avec de l'IL-19 recombinante (Myles et al., 2013). Cette administration de l'IL-19 n'a pas permis de moduler l'inflammation et la clairance bactérienne. Mais d'autres tests notamment en faisant varier la dose, sont encore nécessaires avant de conclure.

L'infection est associée au recrutement de cellules immunitaires car les données d'immunohistochimie ont révélé la présence d'un infiltrat inflammatoire au niveau péribronchique suite à l'infection par *Sp*. Ainsi, nous avons constaté une augmentation du nombre de cellules dendritiques, de macrophages, de lymphocytes T et de neutrophiles au niveau pulmonaire. Les cellules dendritiques et les macrophages sont déjà connus pour être des cellules productrices des cytokines IL-20 (Wolk et al., 2008). Nos données au laboratoire

ont montré une augmentation des cellules immunitaires à 24h et 48h post-infection par *Sp* dans le lavage broncho-alvéolaire et le poumon. L'anticorps anti-IL-20Rb tend à diminuer le recrutement de cellule immunitaire, ce qui peut être corrélé avec une diminution d'expression des cytokines IL-20 dans notre modèle. Par ailleurs, ces cytokines ont la capacité de moduler la fonction des macrophages et cellules dendritiques notamment en jouant sur leur migration. De plus, les cytokines IL-19 et IL-20, en activant la voie STAT3, peuvent moduler la production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  ayant un rôle direct sur ces cellules (Caparrós and Francés, 2018).

Il a été préalablement démontré que les neutrophiles sont essentiels dans le contrôle de l'infection par *Sp* et nous montrons que l'anticorps anti-IL-20Rb diminue le recrutement de ces derniers. Ce traitement devrait donc avoir un effet négatif sur la clairance bactérienne si son effet se limite aux neutrophiles. Cependant Gough et al., montrent que les cytokines IL-20 inhibent l'endocytose et l'effet bactéricide par les neutrophiles (Gough et al., 2017). Il est donc possible que même si le nombre de neutrophiles est moins important, ils soient plus efficaces pour éliminer les bactéries. Un modèle de souris déplétées en neutrophiles serait intéressant pour déterminer l'implication des neutrophiles dans l'effet de l'anti-IL-20Rb.

De manière évidente, les cellules épithéliales semblent être une bonne cible pour appréhender l'impact des cytokines IL-20 en contexte infectieux, car nous avons décrit qu'elles pouvaient synthétiser les cytokines IL-20. De plus, elles peuvent augmenter le recrutement cellulaire au niveau du site d'infection, ce qui va augmenter la production des cytokines IL-20 par les cellules immunitaires et donc contribuer à la persistance de l'inflammation (Wolk et al., 2009) (Huang et al., 2008).

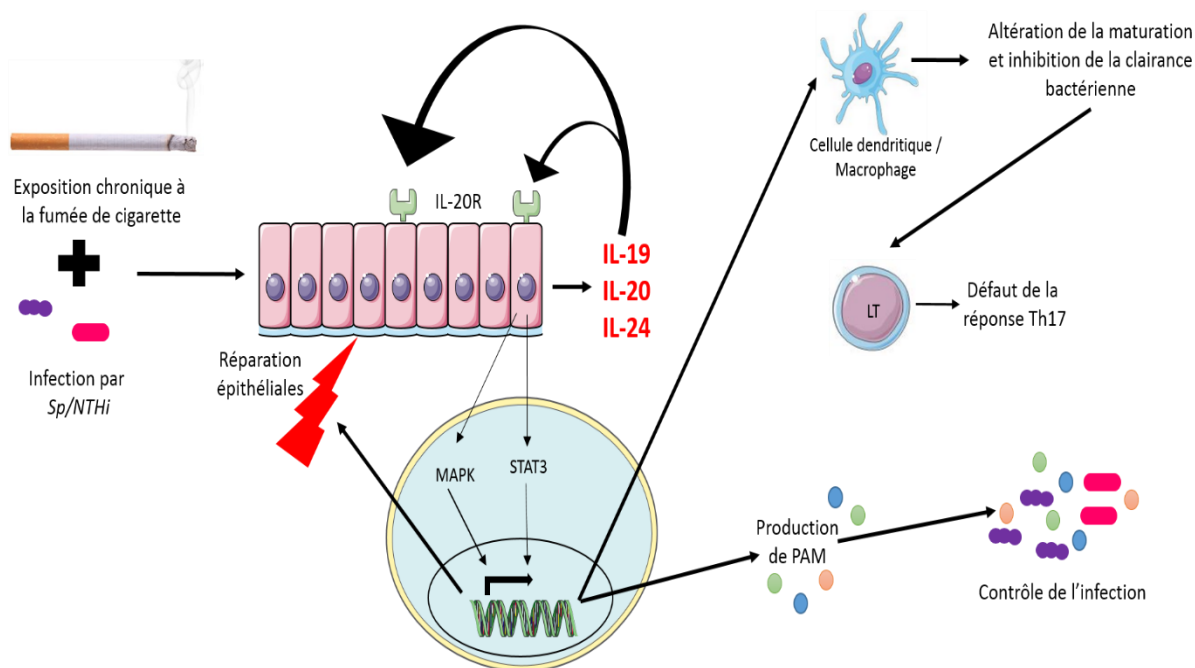
Pour finir, une chose essentielle à réaliser sur le long terme est l'infection par un autre pathogène (eg : *NTHi* ou *P. aeruginosa*) pour étudier le rôle des cytokines IL-20 dans un autre contexte d'infection respiratoire.

Pour l'étude de la modulation de cette réponse lors de la BPCO, l'exposition chronique à la fumée de cigarette est réalisée chez des souris. Ce sont des protocoles longs (12 semaines) qui nous permettent de mimer l'exacerbation de la pathologie en infectant les animaux qui présentent les signes les plus importants de la BPCO (Pichavant et al., 2014). Ces souris BPCO infectées ont une charge bactérienne plus élevée et des lésions pulmonaires causées par l'exposition à la cigarette. L'anticorps anti-IL-20Rb, diminue cette charge bactérienne et améliore les lésions et l'inflammation pulmonaire dans ce contexte (données non montrées). Comme dans notre modèle d'infection seule, ce traitement entraîne également une diminution de l'inflammation associée. Dans ce contexte d'exacerbation de la BPCO, ce traitement pourrait donc avoir un intérêt.

Cependant, dans le modèle d'infection aiguë à *Sp*, le traitement par l'anti-IL-20Rb ne module pas la survie des animaux sur le long terme. Dans ce contexte, il serait vraiment très intéressant de nous pencher sur la question d'un traitement combiné avec notre anti-IL-20Rb. En effet, l'utilisation d'un antibiotique de la famille des pénicillines, des macrolides ou encore des sulfamides, fréquemment utilisé pour le traitement de la bactérie *Sp*, pourrait s'avérer utile. Une autre hypothèse de traitement combiné serait de vacciner nos souris de manière



préventive contre *Sp* avec l'un des deux vaccins déjà existants sur le marché (Prevenar-13 ou Pneumovax) car il est connu que les patients BPCO sont vaccinés de manière préventive contre *Sp* pour limiter le risque d'exacerbation de la maladie.



**Figure 13 : Fonction des cytokines de la famille IL-20**

Les cytokines IL-20 produites par les cellules immunitaires, vont activer la voie de signalisation STAT3 ainsi que la voie de MAPK. En réponse à cette activation, les cellules épithéliales vont synthétiser des peptides antimicrobiens (PAM), alors que l'exposition à la cigarette modifie le profil de réponse. De plus, les cytokines IL-20 vont également agir sur les cellules dendritiques (DC). En effet, la fumée de cigarette et les cytokines IL-20 jouent sur les DC et les macrophages en inhibant leur maturation et leur activité bactéricide. Cette altération va engendrer un défaut de la réponse Th17 mise en place par les lymphocytes T. Enfin, les cytokines IL-20 ont le pouvoir d'accélérer le processus de réparation au niveau des lésions épithéliales, même si ce mécanisme est altéré en contexte d'exposition à la cigarette.

#### **IV. Implications des cytokines IL-20 dans un contexte de Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive**

Chez les patients atteints de BPCO, l'ensemble des résultats montrent une augmentation accrue de l'expression des cytokines IL-20 ainsi que celle de la sous-unité IL-20Rb au niveau bronchique et péribronchique, ainsi que dans les infiltrats inflammatoires présent chez certains patients. Cependant, l'expression des ARNm dans les différents groupes de patients étudiés, ne semble pas corrélée aux résultats obtenus en immunohistochimie. Une première explication pourrait être liée au fait que la régulation post-transcriptionnelle des cytokines IL-20 est très importante notamment dans un contexte d'exposition au tabac et/ou de BPCO. Cela est à mettre en parallèle avec nos données dans nos modèles cellulaires où nous n'avons pas non plus de corrélation entre les données en ARNm et en protéines. Nous n'avons pas

observé de différence significative entre les patients BPCO fumeurs et ex-fumeurs suggérant que le mécanisme physiopathologique prend une part prépondérante sur l'effet de la fumée de cigarette pour induire l'expression des cytokines IL-20. Ces premiers résultats peuvent supposer l'implication de cette famille de cytokines dans la physiopathologie de la BPCO. Ces données seront maintenant complétées par des analyses de la production de ces cytokines dans les sécrétions bronchiques et dans le sang de patients BPCO en cours d'exacerbation et à l'état stable (étude clinique COPD1722). Ces données seront complétées par des analyses de corrélation avec les autres données biologiques, le statut clinique et l'évolution des patients.

En se basant sur les données de la littérature, nous pouvons établir un rôle potentiel des cytokines IL-20 dans la physiopathologie de la BPCO. Comme décrit précédemment, les cytokines IL-20 vont activer différents acteurs de l'inflammation. En effet, la BPCO est souvent caractérisée par son inflammation chronique au niveau pulmonaire. Les neutrophiles sont retrouvés abondamment dans la pathologie, activant de manière constante la voie de signalisation liée à l'EGFR par les oxydants induits par la fumée de cigarette d'une part, et par l'action de l'élastase neutrophilique d'autre part (Barnes, 2016). La stimulation de l'EGFR va induire via l'activation des MAP kinases et l'augmentation des mucines MUC5AC et MUC5B associées à l'hyperplasie des cellules caliciformes, la surproduction de mucus et à l'obstruction bronchique constamment retrouvées chez les patients (Barnes, 2016). De plus, différents travaux réalisés montrent le recrutement et l'activation des lymphocytes T, des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques au cours de cette maladie. Du côté des lymphocytes T, les études de Pichavant & al. ont démontré au cours de la BPCO, un défaut de production des cytokines IL-17 et IL-22 en réponse à l'infection, ces cytokines étant connues pour leur implication dans la clairance bactérienne (Pichavant et al., 2015). Ces résultats peuvent être associés à ceux obtenus par Myles & al. montrant un défaut dépendant de l'IL-20 de production des cytokines IL-17 et IL-22 lors d'une infection des cellules de peau par *S. aureus* (Myles et al., 2013). Enfin, au laboratoire, nous nous intéressons également au rôle des cellules dendritiques dans la BPCO. Les cellules dendritiques exposées à l'extrait de fumée de cigarette vont produire les cytokines IL-20 qui, en réponse à l'infection par le pathogène *Sp*, vont inhiber la maturation des DC notamment en diminuant l'expression des marqueurs CD80 et CD86. De plus, les cellules dendritiques ont une capacité moindre à activer les lymphocytes T. Ensemble, ces données nous éclairent sur le défaut de maturation des lymphocytes en cellules Th17 et donc sur le défaut d'expression des cytokines IL-17 et IL-22. Ces DC immatures produisent moins d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  ce qui altère la production de l'IFN- $\gamma$ . Les blocages de ces deux voies de signalisation occasionnés par l'extrait de fumée de cigarette vont favoriser une clairance bactérienne défectueuse et donc une colonisation de *Sp* (données non publiées). Les résultats obtenus nous mettent sur la piste du défaut de clairance bactérienne pouvant amener les patients BPCO à des risques d'exacerbation de leur pathologie.

## CONCLUSION

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive est un véritable problème de santé publique, car le nombre de patients est en constante augmentation. La recherche nous permet de déceler pas à pas les différents aspects de cette pathologie aux niveaux cellulaire et moléculaire et ainsi développer certains axes thérapeutiques visant à aider les malades. A l'heure actuelle, aucun traitement préventif ou curatif n'est disponible pour traiter la BPCO et l'aspect multifactoriel de la pathologie rend cette tâche d'autant plus complexe.

Actuellement, le plus grand fléau de la BPCO est représenté par les épisodes d'exacerbation que développent les patients lors d'une infection pulmonaire. Il est donc essentiel de pouvoir, soit prévenir ces exacerbations, soit les traiter rapidement car les patients ont une susceptibilité accrue aux infections respiratoires, et des épisodes d'exacerbations répétés peuvent engendrer leur décès. Les patients ont un épithélium respiratoire fragilisé résultant de leur maladie, ce qui a pour conséquence une réponse inflammatoire et immunitaire complètement désorganisée. Au laboratoire, nous nous intéressons de près à ces phénomènes d'exacerbation et pour cela nous avons mis en place différents modèles d'études impliquant les pathogènes *Haemophilus influenzae Non-Typable* et *Streptococcus pneumoniae* qui sont les pathogènes les plus fréquemment retrouvés dans les cas d'exacerbation. Ce travail de thèse nous a permis de constater que la réponse épithéliale à ces deux pathogènes était similaire mais n'avait pas le même degré d'intensité. En effet, de manière globale, la réponse à *NTHi* est beaucoup plus inflammatoire que celle observée suite à l'infection par *Sp* dans nos cultures cellulaires épithéliales.

Concernant le rôle des cytokines IL-20 au niveau du poumon, rien n'est encore décrit à ce jour dans la littérature scientifique. Nous avons contribué à mieux comprendre leur rôle, et à les associer à une réponse inflammatoire diminuée et à une clairance bactérienne altérée chez la souris car l'utilisation d'un anticorps spécifique visant à bloquer la voie de signalisation de ces cytokines, permet de restaurer ces deux phénomènes. Nos données confirment le rôle ambivalent des cytokines IL-20. Globalement elles ont un rôle négatif au cours de l'infection mais elles peuvent néanmoins par certains aspects, protéger l'épithélium respiratoire ou favoriser son maintien. Par notre modèle de réparation cellulaire nous avons montré l'intérêt de celles-ci notamment dans la cicatrisation épithéliale. Des études complémentaires sont nécessaires pour replacer ces effets dans le contexte global de la réponse à l'infection et au cours de la BPCO.

L'objectif à long terme du laboratoire est de développer un traitement pouvant prévenir ou traiter les patients BPCO des exacerbations de leur maladie. Avec les premiers résultats obtenus pendant ces trois années de thèse, l'utilisation de l'anticorps anti-IL-20Rb semble être une approche prometteuse pour prévenir des infections et potentiellement les exacerbations de la BPCO, probablement en association avec d'autres traitements déjà existants. Dans l'idéal, il faudrait pouvoir cibler l'effet thérapeutique sur certains types cellulaires en préservant l'effet bénéfique sur l'épithélium respiratoire.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aaronson, D.S., Horvath, C.M., 2002. A Road Map for Those Who Don't Know JAK-STAT. *Science* 296, 1653–1655. <https://doi.org/10.1126/science.1071545>
- Adam, D., Perotin, J.-M., Lebargy, F., Birembaut, P., Deslée, G., Coraux, C., 2014. Régénération de l'épithélium des voies aériennes. *Rev. Mal. Respir.* 31, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2013.11.001>
- Akira, S., 2000. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 19, 2607–2611. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203478>
- Albiger, B., Dahlberg, S., Sandgren, A., Wartha, F., Beiter, K., Katsuragi, H., Akira, S., Normark, S., Henriques-Normark, B., 2007. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell. Microbiol.* 9, 633–644. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00814.x>
- Alexopoulou, L., Desnues, B., Demaria, O., 2012. Le récepteur Toll-like 8 - Un TLR pas comme les autres. *médecine/sciences* 28, 96–102. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012281023>
- Allain, Y.-M., Roche, N., Huchon, G., 2010. Pollution atmosphérique, facteur de risque des BPCO ? *Rev. Mal. Respir.* 27, 349–363. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2010.02.010>
- Amatngalim, G.D., Schrupf, J.A., Dishchekian, F., Mertens, T.C.J., Ninaber, D.K., Linden, A.C. van der, Pilette, C., Taube, C., Hiemstra, P.S., Does, A.M. van der, 2018. Aberrant epithelial differentiation by cigarette smoke dysregulates respiratory host defence. *Eur. Respir. J.* 51, 1701009. <https://doi.org/10.1183/13993003.01009-2017>
- Amatngalim, G.D., Wijck, Y. van, Mooij-Eijk, Y. de, Verhoosel, R.M., Harder, J., Lekkerkerker, A.N., Janssen, R.A.J., Hiemstra, P.S., 2015. Basal Cells Contribute to Innate Immunity of the Airway Epithelium through Production of the Antimicrobial Protein RNase 7. *J. Immunol.* 1402169. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402169>
- Andersson, A., Malmhäll, C., Houltz, B., Tengvall, S., Sjöstrand, M., Qvarfordt, I., Lindén, A., Bossios, A., 2016. Interleukin-16-producing NK cells and T-cells in the blood of tobacco smokers with and without COPD [WWW Document]. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* <https://doi.org/10.2147/COPD.S103758>
- Ardhanareeswaran, K., Mirotsov, M., 2013. Lung Stem and Progenitor Cells. *Respiration* 85, 89–95. <https://doi.org/10.1159/000346500>
- Arnson, Y., Shoenfeld, Y., Amital, H., 2010. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J. Autoimmun., The Environment, Geoepidemiology and Autoimmune Disease* 34, J258–J265. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.12.003>
- Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J.L., Dubin, P.J., Pilewski, J.M., Myerburg, M.M., Mason, C.A., Iwakura, Y., Kolls, J.K., 2008. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.* 14, 275–281. <https://doi.org/10.1038/nm1710>
- Austrian, R., 1999. The Pneumococcus at the Millennium: Not Down, Not Out. *J. Infect. Dis.* 179, S338–S341. <https://doi.org/10.1086/513841>

- Austrian, R., 1981. Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Rev. Infect. Dis.* 3 Suppl, S1-17.
- Autieri, M.V., 2018. IL-19 and Other IL-20 Family Member Cytokines in Vascular Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00700>
- Ayers, M.M., Jeffery, P.K., 1988. Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *Eur. Respir. J.* 1, 58–80.
- Azuma, Y.-T., Matsuo, Y., Kuwamura, M., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Nakajima, H., Karow, M., Takeuchi, T., 2010. Interleukin-19 protects mice from innate-mediated colonic inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1017–1028. <https://doi.org/10.1002/ibd.21151>
- Badham C. An essay on bronchitis: with a supplement containing remarks on simple pulmonary abscess. 2nd ed. London: J Callow; 1814.
- Baird, A.-M., Gray, S.G., O'Byrne, K.J., 2011. IL-20 is epigenetically regulated in NSCLC and down regulates the expression of VEGF. *Eur. J. Cancer* 47, 1908–1918. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.04.012>
- Balda, M.S., Matter, K., 2009. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., Apical Junctional Complexes Part II* 1788, 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.11.024>
- Balmes, J.R., 2010. When Smoke Gets in Your Lungs. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 7, 98–101. <https://doi.org/10.1513/pats.200907-081RM>
- Bals, R., Hiemstra, P.S., 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur. Respir. J.* 23, 327–333. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00098803>
- Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., Wilson, J.M., 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9541–9546.
- Bansal, S., Yajjala, V.K., Bauer, C., Sun, K., 2018. IL-1 Signaling Prevents Alveolar Macrophage Depletion during Influenza and Streptococcus pneumoniae Coinfection. *J. Immunol.* 200, 1425–1433. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700210>
- Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M.S., Ehrlich, H.P., Brem, H., 2009. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J. Surg. Res.* 153, 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>
- Barceló, B., Pons, J., Ferrer, J.M., Sauleda, J., Fuster, A., Agustí, A.G.N., 2008. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur. Respir. J.* 31, 555–562. <https://doi.org/10.1183/09031936.00010407>
- Barnes, P., 2008. Barnes, P.J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 183-192. <https://doi.org/10.1038/nri2254>
- Barnes, P.J., 2016. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011>
- Barnes, P.J., 1995. Beta-adrenergic receptors and their regulation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152, 838–860. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.152.3.7663795>

- Barthelemy, A., Ivanov, S., Hassane, M., Fontaine, J., Heurtault, B., Frisch, B., Faveeuw, C., Paget, C., Trottein, F., 2016. Exogenous Activation of Invariant Natural Killer T Cells by  $\alpha$ -Galactosylceramide Reduces Pneumococcal Outgrowth and Dissemination Postinfluenza. *mBio* 7, e01440-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01440-16>
- Barthelemy, A., Sencio, V., Soulard, D., Deruyter, L., Faveeuw, C., Goffic, R.L., Trottein, F., 2018. Interleukin-22 Immunotherapy during Severe Influenza Enhances Lung Tissue Integrity and Reduces Secondary Bacterial Systemic Invasion. *Infect. Immun.* 86, e00706-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00706-17>
- Bentham, J.R., Shaw, N.J., 2005. Some chronic obstructive pulmonary disease will originate in neonatal intensive care units. *Paediatr. Respir. Rev.* 6, 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2004.11.005>
- Bergofsky, E.H., 1991. The lung mucosa: A critical environmental battleground. *Am. J. Med., Interventions and Strategies in Patients with Obstructive Airways Disease* 91, S4–S10. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90254-U](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90254-U)
- Bertoncello, I., McQualter, J.L., 2013. Lung stem cells: Do they exist? *Respirology* 18, 587–595. <https://doi.org/10.1111/resp.12073>
- Beshay, M., Kaiser, H., Niedhart, D., Reymond, M.A., Schmid, R.A., 2007. Emphysema and secondary pneumothorax in young adults smoking cannabis. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 32, 834–838. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2007.07.039>
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T<sub>H</sub>17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238. <https://doi.org/10.1038/nature04753>
- Blake, J., 1974. Hydrodynamic calculations on the movements of cilia and flagella I. *Paramecium. J. Theor. Biol.* 45, 183–203. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(74\)90050-2](https://doi.org/10.1016/0022-5193(74)90050-2)
- Bleicher, L., Moura, P.R. de, Watanabe, L., Colau, D., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., Polikarpov, I., 2008. Crystal structure of the IL-22/IL-22R1 complex and its implications for the IL-22 signaling mechanism. *FEBS Lett.* 582, 2985–2992. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.07.046>
- Blue, M.L., 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. <https://doi.org/10.1164/arrd.1978.117.2.317>
- Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W., Grossmann, A., Brender, T., Carollo, S., Eagan, M., Foster, D., Haldeman, B.A., Hammond, A., Haugen, H., Jelinek, L., Kelly, J.D., Madden, K., Maurer, M.F., Parrish-Novak, J., Prunkard, D., Sexson, S., Sprecher, C., Waggle, K., West, J., Whitmore, T.E., Yao, L., Kuechle, M.K., Dale, B.A., Chandrasekher, Y.A., 2001. Interleukin 20: Discovery, Receptor Identification, and Role in Epidermal Function. *Cell* 104, 9–19. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00187-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00187-8)
- Boers, J.E., Ambergen, A.W., Thunnissen, F.B.J.M., 1998. Number and Proliferation of Basal and Parabasal Cells in Normal Human Airway Epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 2000–2006. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.6.9707011>
- Bonet T. Geneva: 1679. Sepulchretum sive anatomia practica ex Cadaveribus Morbo denatis, proponens Histoas' Observations omnium pené humani corporis affectuum, ipsarcomoue Causas recorditas revelans.

- Boniface, K., Bernard, F.-X., Garcia, M., Gurney, A.L., Lecron, J.-C., Morel, F., 2005. IL-22 Inhibits Epidermal Differentiation and Induces Proinflammatory Gene Expression and Migration of Human Keratinocytes. *J. Immunol.* 174, 3695–3702. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3695>
- Botelho, F.M., Gaschler, G.J., Kianpour, S., Zavitz, C.C.J., Trimble, N.J., Nikota, J.K., Bauer, C.M.T., Stämpfli, M.R., 2010. Innate Immune Processes Are Sufficient for Driving Cigarette Smoke–Induced Inflammation in Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 394–403. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0301OC>
- Boucherat, O., Chakir, J., Jeannotte, L., 2012. The loss of Hoxa5 function promotes Notch-dependent goblet cell metaplasia in lung airways. *Biol. Open* 1, 677–691. <https://doi.org/10.1242/bio.20121701>
- Bousoik, E., Montazeri Aliabadi, H., 2018. “Do We Know Jack” About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. *Front. Oncol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00287>
- Brandsma, C.-A., Hylkema, M.N., Geerlings, M., van Geffen, W.H., Postma, D.S., Timens, W., Kerstjens, H.A., 2009. Increased levels of (class switched) memory B cells in peripheral blood of current smokers. *Respir. Res.* 10, 108. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-10-108>
- Brandsma, C.-A., Kerstjens, H.A.M., Geffen, W.H. van, Geerlings, M., Postma, D.S., Hylkema, M.N., Timens, W., 2012. Differential switching to IgG and IgA in active smoking COPD patients and healthy controls. *Eur. Respir. J.* 40, 313–321. <https://doi.org/10.1183/09031936.00011211>
- Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M., Holden, D.W., Paton, J.C., Ehrenstein, M.R., Walport, M.J., Botto, M., 2002. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16969–16974. <https://doi.org/10.1073/pnas.012669199>
- Brusselle, G.G., Joos, G.F., Bracke, K.R., 2011. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* 378, 1015–1026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60988-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60988-4)
- Buisson, A.C., Gilles, C., Polette, M., Zahm, J.M., Birembaut, P., Tournier, J.M., 1996. Wound repair-induced expression of a stromelysins is associated with the acquisition of a mesenchymal phenotype in human respiratory epithelial cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 74, 658–669.
- Burrows, B., Halonen, M., Lebowitz, M.D., Knudson, R.J., Barbee, R.A., 1982. The relationship of serum immunoglobulin E, allergy skin tests, and smoking to respiratory disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.* 70, 199–204. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(82\)90042-2](https://doi.org/10.1016/0091-6749(82)90042-2)
- Caligiuri, M.A., 2008. Human natural killer cells. *Blood* 112, 461–469. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>
- Caparrós, E., Francés, R., 2018. The Interleukin-20 Cytokine Family in Liver Disease. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01155>
- Chen, G., Korfhagen, T.R., Xu, Y., Kitzmiller, J., Wert, S.E., Maeda, Y., Gregorieff, A., Clevers, H., Whitsett, J.A., 2009. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. *J. Clin. Invest.* 119, 2914–2924. <https://doi.org/10.1172/JCI39731>

- Chen, W.-Y., Cheng, B.-C., Jiang, M.-J., Hsieh, M.-Y., Chang, M.-S., 2006. IL-20 Is Expressed in Atherosclerosis Plaques and Promotes Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2090–2095. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000232502.88144.6f>
- Cobleigh, M.A., Robek, M.D., 2013. Protective and Pathological Properties of IL-22 in Liver Disease: Implications for Viral Hepatitis. *Am. J. Pathol.* 182, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.043>
- Colonna, M., 2009. Interleukin-22-Producing Natural Killer Cells and Lymphoid Tissue Inducer-like Cells in Mucosal Immunity. *Immunity* 31, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.008>
- Commins, S., Steinke, J.W., Borish, L., 2008. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1108–1111. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.02.026>
- Coraux, C., Hajj, R., Lesimple, P., Puchelle, E., 2005. Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire. *médecine/sciences* 21, 1063–1069. <https://doi.org/10.1051/medsci/200521121063>
- Cosio, M.G., Saetta, M., Agusti, A., 2009. Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* 360, 2445–2454. <https://doi.org/10.1056/NEJMr0804752>
- Croasdell, A., Lacy, S.H., Thatcher, T.H., Sime, P.J., Phipps, R.P., 2016. Resolvin D1 Dampens Pulmonary Inflammation and Promotes Clearance of Nontypeable Haemophilus influenzae. *J. Immunol.* 196, 2742–2752. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502331>
- Cukic, V., 2013. The Most Common Detected Bacteria in Sputum of Patients with the Acute Exacerbation of COPD. *Mater. Socio-Medica* 25, 226–229. <https://doi.org/10.5455/msm.2013.25.226-229>
- Curran, D.R., Cohn, L., 2010. Advances in Mucous Cell Metaplasia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 268–275. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0151TR>
- Dambacher, J., Beigel, F., Zitzmann, K., Heeg, M.H.J., Göke, B., Diepolder, H.M., Auernhammer, C.J., Brand, S., 2008. The role of interleukin-22 in hepatitis C virus infection. *Cytokine* 41, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.11.016>
- Dambacher, J., Beigel, F., Zitzmann, K., Toni, E.N.D., Göke, B., Diepolder, H.M., Auernhammer, C.J., Brand, S., 2009. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 58, 1207–1217. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.130112>
- De Filippo, K., Neill, D.R., Mathies, M., Bangert, M., McNeill, E., Kadioglu, A., Hogg, N., 2014. A new protective role for S100A9 in regulation of neutrophil recruitment during invasive pneumococcal pneumonia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 3600–3608. <https://doi.org/10.1096/fj.13-247460>
- De Water, R., Willems, L.N., Van Muijen, G.N., Franken, C., Fransen, J.A., Dijkman, J.H., Kramps, J.A., 1986. Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133, 882–890.
- Deknuydt, F., Nordström, T., Riesbeck, K., 2014. Diversion of the host humoral response: a novel virulence mechanism of Haemophilus influenzae mediated via outer membrane vesicles. *J. Leukoc. Biol.* 95, 983–991. <https://doi.org/10.1189/jlb.1013527>



- Dessing, M.C., Hirst, R.A., de Vos, A.F., van der Poll, T., 2009. Role of Toll-like receptors 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice. *PLoS One* 4, e7993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007993>
- Di Stefano, A., Caramori, G., Oates, T., Capelli, A., Lusuardi, M., Gnemmi, I., Ioli, F., Chung, K.F., Donner, C.F., Barnes, P.J., Adcock, I.M., 2002. Increased expression of nuclear factor- $\kappa$ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur. Respir. J.* 20, 556–563. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00272002>
- Dockrell, D.H., Marriott, H.M., Prince, L.R., Ridger, V.C., Ince, P.G., Hellewell, P.G., Whyte, M.K.B., 2003. Alveolar Macrophage Apoptosis Contributes to Pneumococcal Clearance in a Resolving Model of Pulmonary Infection. *J. Immunol.* 171, 5380–5388. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.5380>
- Dockrell, D.H., Whyte, M.K.B., Mitchell, T.J., 2012. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. *Chest* 142, 482–491. <https://doi.org/10.1378/chest.12-0210>
- Domagała-Kulawik, J., Maskey-Warzechowska, M., Hermanowicz-Salamon, J., Chazan, R., 2006. Expression of macrophage surface markers in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 57 Suppl 4, 75–84.
- Drannik, A.G., Pouladi, M.A., Robbins, C.S., Goncharova, S.I., Kianpour, S., Stämpfli, M.R., 2004. Impact of Cigarette Smoke on Clearance and Inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 1164–1171. <https://doi.org/10.1164/rccm.200311-1521OC>
- Duan, M.-C., Huang, Y., Zhong, X.-N., Tang, H.-J., 2012. Th17 Cell Enhances CD8 T-Cell Cytotoxicity via IL-21 Production in Emphysema Mice. *Mediators Inflamm.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/898053>
- Dutton, R.W., Bradley, L.M., Swain, S.L., 1998. T Cell Memory. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 201–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.201>
- Eidenschenk, C., Rutz, S., Liesenfeld, O., Ouyang, W., 2014a. Role of IL-22 in Microbial Host Defense, in: *Interleukin-10 in Health and Disease, Current Topics in Microbiology and Immunology.* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 213–236. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_10)
- Eidenschenk, C., Rutz, S., Liesenfeld, O., Ouyang, W., 2014b. Role of IL-22 in microbial host defense. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 380, 213–236. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_10)
- Eisner, M.D., Balmes, J., Katz, P.P., Trupin, L., Yelin, E.H., Blanc, P.D., 2005. Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environ. Health* 4, 7. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-4-7>
- Ellison, S., Gabunia, K., Kelemen, S.E., England, R.N., Scalia, R., Richards, J.M., Orr, A.W., Traylor, J.G., Rogers, T., Cornwell, W., Berglund, L.M., Goncalves, I., Gomez, M.F., Autieri, M.V., 2013. Attenuation of Experimental Atherosclerosis by Interleukin-19 Significance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2316–2324. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301521>
- Emdad, L., Lebedeva, I.V., Su, Z., Gupta, P., Sauane, M., Dash, R., Grant, S., Dent, P., Curiel, D.T., Sarkar, D., Fisher, P.B., 2009. Historical perspective and recent insights into our understanding of the molecular and biochemical basis of the antitumor properties of mda-7/IL-24. *Cancer Biol. Ther.* 8, 391–400.

- Erjefält, J.S., Erjefält, I., Sundler, F., Persson, C.G., 1995. In vivo restitution of airway epithelium. *Cell Tissue Res.* 281, 305–316.
- Evans, M.J., Cox, R.A., Shami, S.G., Plopper, C.G., 1990. Junctional Adhesion Mechanisms in Airway Basal Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3, 341–347. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/3.4.341>
- Evans, M.J., Plopper, C.G., 1988. The Role of Basal Cells in Adhesion of Columnar Epithelium to Airway Basement Membrane. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138, 481–483. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/138.2.481>
- Fernandes, J.R., Silva, C.C.B.M. da, Silva, A.G. da, Pinto, R.M. de C., Duarte, A.J. da S., Carvalho, C.R., Benard, G., 2018. Effect of an Exercise Program on Lymphocyte Proliferative Responses of COPD Patients. *Lung* 196, 271–276. <https://doi.org/10.1007/s00408-018-0107-9>
- Ferson, M., Edwards, A., Lind, A., Milton, G.W., Hersey, P., 1979. Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *Int. J. Cancer* 23, 603–609. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910230504>
- Finlay, G.A., O’driscoll, L.R., Russell, K.J., D’arcy, E.M., Masterson, J.B., Fitzgerald, M.X., O’connor, C.M., 1997. Matrix Metalloproteinase Expression and Production by Alveolar Macrophages in Emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 240–247. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.1.9612018>
- Fonseca-Camarillo, G., Furuzawa-Carballeda, J., Granados, J., 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. <https://doi.org/10.1111/cei.12285>
- Fonseca-Camarillo, G., Furuzawa-Carballeda, J., Llorente, L., Yamamoto-Furusho, J.K., 2013. IL-10— and IL-20—Expressing Epithelial and Inflammatory Cells are Increased in Patients with Ulcerative Colitis. *J. Clin. Immunol.* 33, 640–648. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9843-4>
- Foronjy, R., Wallace, A., D’Armiento, J., 2008. The Pharmacokinetic Limitations of Antioxidant Treatment for COPD. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 21, 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.10.004>
- Fuhrman, C., Delmas, M.-C., 2010. Épidémiologie descriptive de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) en France. *Rev. Mal. Respir.* 27, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2009.08.003>
- Fujisawa, T., Velichko, S., Thai, P., Hung, L.-Y., Huang, F., Wu, R., 2009. Regulation of Airway MUC5AC Expression by IL-1 $\beta$  and IL-17A; the NF- $\kappa$ B Paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 6236–6243. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900614>
- Fulford, G.R., Blake, J.R., 1986. Muco-ciliary transport in the lung. *J. Theor. Biol.* 121, 381–402. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(86\)80098-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(86)80098-4)
- Fusby, J.S., Kassmeier, M.D., Palmer, V.L., Perry, G.A., Anderson, D.K., Hackfort, B.T., Alvarez, G.K., Cullen, D.M., Akhter, M.P., Swanson, P.C., 2010. Cigarette smoke-induced effects on bone marrow B-cell subsets and CD4+:CD8+ T-cell ratios are reversed by smoking cessation: Influence of bone mass on immune cell response to and recovery from smoke exposure. *Inhal. Toxicol.* 22, 785–796. <https://doi.org/10.3109/08958378.2010.483258>
- Gabunia, K., Ellison, S., Kelemen, S., Kako, F., Cornwell, W.D., Rogers, T.J., Datta, P.K., Ouimet, M., Moore, K.J., Autieri, M.V., 2016. IL-19 Halts Progression of Atherosclerotic Plaque, Polarizes, and Increases Cholesterol Uptake and Efflux in Macrophages. *Am. J. Pathol.* 186, 1361–1374. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.12.023>

- Galdiero, Marilena, Galdiero, Massimiliano, Finamore, E., Rossano, F., Gambuzza, M., Catania, M.R., Teti, G., Midiri, A., Mancuso, G., 2004. Haemophilus influenzae Porin Induces Toll-Like Receptor 2-Mediated Cytokine Production in Human Monocytes and Mouse Macrophages. *Infect. Immun.* 72, 1204–1209. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1204-1209.2004>
- Gallagher, G., 2010. Interleukin-19: Multiple roles in immune regulation and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, IL-10 Family of Cytokines 21, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.08.005>
- Gallego, M., Pomares, X., Espasa, M., Castañer, E., Solé, M., Suárez, D., Monsó, E., Montón, C., 2014. Pseudomonas aeruginosa isolates in severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization and risk factors. *BMC Pulm. Med.* 14, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-103>
- Ganesan, S., Sajjan, U.S., 2013. Repair and Remodeling of airway epithelium after injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Curr. Respir. Care Rep.* 2. <https://doi.org/10.1007/s13665-013-0052-2>
- Gao, J., Zhan, B., 2012. The effects of Ang-1, IL-8 and TGF- $\beta$ 1 on the pathogenesis of COPD. *Mol. Med. Rep.* 6, 1155–1159. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1059>
- Garmendia, J., Morey, P., Bengoechea, J.A., 2012. Impact of cigarette smoke exposure on host–bacterial pathogen interactions. *Eur. Respir. J.* 39, 467–477. <https://doi.org/10.1183/09031936.00061911>
- Gerson, C., Sabater, J., Scuri, M., Torbati, A., Coffey, R., Abraham, J.W., Lauredo, I., Forteza, R., Wanner, A., Salathe, M., Abraham, W.M., Conner, G.E., 2000. The Lactoperoxidase System Functions in Bacterial Clearance of Airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22, 665–671. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.22.6.3980>
- Gomez, J.C., Yamada, M., Martin, J.R., Dang, H., Brickey, W.J., Bergmeier, W., Dinauer, M.C., Doerschuk, C.M., 2014. Mechanisms of Interferon- $\gamma$  Production by Neutrophils and Its Function during Streptococcus pneumoniae Pneumonia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 52, 349–364. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0316OC>
- Gong, W., Wang, X., Zhang, Yuguo, Hao, J., Xing, C., Chu, Q., Wang, G., Zhao, J., Wang, J., Dong, Q., Liu, T., Zhang, Yuanyuan, Dong, L., 2014. Interleukin-20 Promotes Airway Remodeling in Asthma. *Inflammation* 37, 2099–2105. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9944-8>
- Gordon, S., Martinez, F.O., 2010. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* 32, 593–604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- Gough, P., Ganesan, S., Datta, S.K., 2017. IL-20 Signaling in Activated Human Neutrophils Inhibits Neutrophil Migration and Function. *J. Immunol.* 198, 4373–4382. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700253>
- Grigg, J., Walters, H., Sohal, S.S., Wood-Baker, R., Reid, D.W., Xu, C.-B., Edvinsson, L., Morissette, M.C., Stämpfli, M.R., Kirwan, M., Koh, L., Suri, R., Mushtaq, N., 2012. Cigarette smoke and platelet-activating factor receptor dependent adhesion of Streptococcus pneumoniae to lower airway cells. *Thorax* 67, 908–913. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200835>
- Grijalva, C.G., Nuorti, J.P., Arbogast, P.G., Martin, S.W., Edwards, K.M., Griffin, M.R., 2007. Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunisation with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis. *The Lancet* 369, 1179–1186. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60564-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60564-9)

- Grumelli, S., Corry, D.B., Song, L.-Z., Song, L., Green, L., Huh, J., Hacken, J., Espada, R., Bag, R., Lewis, D.E., Kheradmand, F., 2004. An Immune Basis for Lung Parenchymal Destruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Emphysema. *PLOS Med.* 1, e8. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0010008>
- Guseh, J.S., Bores, S.A., Stanger, B.Z., Zhou, Q., Anderson, W.J., Melton, D.A., Rajagopal, J., 2009. Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Dev. Camb. Engl.* 136, 1751–1759. <https://doi.org/10.1242/dev.029249>
- Hallstrand, T.S., Hackett, T.L., Altemeier, W.A., Matute-Bello, G., Hansbro, P.M., Knight, D.A., 2014. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. *Clin. Immunol.* 151, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.12.003>
- Hanash, A.M., Dudakov, J.A., Hua, G., O'Connor, M.H., Young, L.F., Singer, N.V., West, M.L., Jenq, R.R., Holland, A.M., Kappel, L.W., Ghosh, A., Tsai, J.J., Rao, U.K., Yim, N.L., Smith, O.M., Velardi, E., Hawryluk, E.B., Murphy, G.F., Liu, C., Fouser, L.A., Kolesnick, R., Blazar, B.R., van den Brink, M.R.M., 2012. Interleukin-22 Protects Intestinal Stem Cells from Immune-Mediated Tissue Damage and Regulates Sensitivity to Graft versus Host Disease. *Immunity* 37, 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.028>
- Hansdottir, S., Monick, M.M., Hinde, S.L., Lovan, N., Look, D.C., Hunninghake, G.W., 2008. Respiratory Epithelial Cells Convert Inactive Vitamin D to Its Active Form: Potential Effects on Host Defense. *J. Immunol.* 181, 7090–7099. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7090>
- Harrison, O.J., Foley, J., Bolognese, B.J., Long, E., Podolin, P.L., Walsh, P.T., 2008. Airway infiltration of CD4+ CCR6+ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement. *Immunol. Lett.* 121, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.07.011>
- Hartigan-O'Connor, D.J., Hirao, L.A., McCune, J.M., Dandekar, S., 2011. Th17 cells and regulatory T cells in elite control over HIV and SIV. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 221–227. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32834577b3>
- Hartsock, A., Nelson, W.J., 2008. Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 660–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>
- Harvey, C.J., Thimmulappa, R.K., Sethi, S., Kong, X., Yarmus, L., Brown, R.H., Feller-Kopman, D., Wise, R., Biswal, S., 2011. Targeting Nrf2 Signaling Improves Bacterial Clearance by Alveolar Macrophages in Patients with COPD and in a Mouse Model. *Sci. Transl. Med.* 3, 78ra32–78ra32. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002042>
- Hassane, M., Demon, D., Soulard, D., Fontaine, J., Keller, L.E., Patin, E.C., Porte, R., Prinz, I., Ryffel, B., Kadioglu, A., Veening, J.-W., Sirard, J.-C., Faveeuw, C., Lamkanfi, M., Trottein, F., Paget, C., 2017. Neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion regulates the  $\gamma\delta$ T17 cell response in respiratory bacterial infections. *Mucosal Immunol.* 10, 1056–1068. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.113>
- He, S., Xie, L., Lu, J., Sun, S., 2017. Characteristics and potential role of M2 macrophages in COPD [WWW Document]. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* <https://doi.org/10.2147/COPD.S147144>
- Heinzmann, A., Dietrich, H., Deichmann, K.A., 2003. Association of Uteroglobulin-Related Protein 1 with Bronchial Asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 131, 291–295. <https://doi.org/10.1159/000072141>

- Herbold, W., Maus, R., Hahn, I., Ding, N., Srivastava, M., Christman, J.W., Mack, M., Reutershan, J., Briles, D.E., Paton, J.C., Winter, C., Welte, T., Maus, U.A., 2010. Importance of CXC Chemokine Receptor 2 in Alveolar Neutrophil and Exudate Macrophage Recruitment in Response to Pneumococcal Lung Infection. *Infect. Immun.* 78, 2620–2630. <https://doi.org/10.1128/IAI.01169-09>
- Hiemstra, P.S., 2015. Parallel activities and interactions between antimicrobial peptides and complement in host defense at the airway epithelial surface. *Mol. Immunol., Festschrift for Moh Daha* 68, 28–30. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.030>
- Hiemstra, P.S., 2007. THE ROLE OF EPITHELIAL  $\beta$ -DEFENSINS AND CATHELICIDINS IN HOST DEFENSE OF THE LUNG. *Exp. Lung Res.* 33, 537–542. <https://doi.org/10.1080/01902140701756687>
- Hiemstra, P.S., McCray, P.B., Bals, R., 2015. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur. Respir. J.* 45, 1150–1162. <https://doi.org/10.1183/09031936.00141514>
- Hodge, S., Hodge, G., Holmes, M., Reynolds, P.N., 2005. Increased airway epithelial and T-cell apoptosis in COPD remains despite smoking cessation. *Eur. Respir. J.* 25, 447–454. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00077604>
- Hogan, B.L.M., Barkauskas, C.E., Chapman, H.A., Epstein, J.A., Jain, R., Hsia, C.C.W., Niklason, L., Calle, E., Le, A., Randell, S.H., Rock, J., Snitow, M., Krummel, M., Stripp, B.R., Vu, T., White, E.S., Whitsett, J.A., Morrissey, E.E., 2014. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell* 15, 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.07.012>
- Hogg, J.C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W.M., Buzatu, L., Cherniack, R.M., Rogers, R.M., Scieurba, F.C., Coxson, H.O., Paré, P.D., 2004. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 350, 2645–2653. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032158>
- Hogg, J.C., Timens, W., 2009. The Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 4, 435–459. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092145>
- Holgate, S.T., 2007. Epithelium dysfunction in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 1233–1244. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.10.025>
- Holt, P.G., 1987. Immune and inflammatory function in cigarette smokers. *Thorax* 42, 241–249. <https://doi.org/10.1136/thx.42.4.241>
- Hou, J., Sun, Y., Hao, Y., Zhuo, J., Liu, X., Bai, P., Han, J., Zheng, X., Zeng, H., 2013. Imbalance between subpopulations of regulatory T cells in COPD. *Thorax* 68, 1131–1139. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-201956>
- Hsieh, M.-Y., Chen, W.-Y., Jiang, M.-J., Cheng, B.-C., Huang, T.-Y., Chang, M.-S., 2006. Interleukin-20 promotes angiogenesis in a direct and indirect manner. *Genes Immun.* 7, 234–242. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364291>
- Hsu, Y.-H., Chen, W.-Y., Chan, C.-H., Wu, C.-H., Sun, Z.-J., Chang, M.-S., 2011. Anti-IL-20 monoclonal antibody inhibits the differentiation of osteoclasts and protects against osteoporotic bone loss. *J. Exp. Med.* 208, 1849–1861. <https://doi.org/10.1084/jem.20102234>

- Hsu, Y.-H., Hsing, C.-H., Li, C.-F., Chan, C.-H., Chang, M.-C., Yan, J.-J., Chang, M.-S., 2012. Anti-IL-20 Monoclonal Antibody Suppresses Breast Cancer Progression and Bone Osteolysis in Murine Models. *J. Immunol.* 188, 1981–1991. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102843>
- Huang, F., Wachi, S., Thai, P., Loukoianov, A., Tan, K.H., Forteza, R.M., Wu, R., 2008. Potentiation of IL-19 expression in airway epithelia by IL-17A and IL-4/IL-13: Important implications in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1415-1421.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.04.016>
- Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L.A., Huber, F.J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Booth, C.J., Cho, J.H., Ouyang, W., Abraham, C., Flavell, R.A., 2012. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 491, 259–263. <https://doi.org/10.1038/nature11535>
- Hunt, D.W.C., Boivin, W.A., Fairley, L.A., Jovanovic, M.M., King, D.E., Salmon, R.A., Utting, O.B., 2006. Ultraviolet B Light Stimulates Interleukin-20 Expression by Human Epithelial Keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* 82, 1292–1300. <https://doi.org/10.1562/2005-08-31-RA-668>
- Hutchinson, J., 1846. On the capacity of the lungs, and on the respiratory functions, with a view of establishing a precise and easy method of detecting disease by the spirometer. *Medico-Chir. Trans.* 29, 137–252.
- Imai, K., Mercer, B.A., Schulman, L.L., Sonett, J.R., D'Armiento, J.M., 2005. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur. Respir. J.* 25, 250–258. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00023704>
- Inayama, Y., Hook, G.E., Brody, A.R., Cameron, G.S., Jetten, A.M., Gilmore, L.B., Gray, T., Nettesheim, P., 1988. The differentiation potential of tracheal basal cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 58, 706–717.
- Iwaarden, J.F.V., Pikaar, J.C., Storm, J., Brouwer, E., Verhoef, J., Oosting, R.S., Golde, L.M.G. van, Striip, J.A.G. van, 1994. Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochem. J.* 303, 407–411. <https://doi.org/10.1042/bj3030407>
- Janeway, C.A., Bottomly, K., 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76, 275–285. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90335-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90335-2)
- Jeffery, P.K., 1983. Morphologic Features of Airway Surface Epithelial Cells and Glands. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, S14–S20. <https://doi.org/10.1164/arrd.1983.128.2P2.S14>
- Jiang, H., Lin, J.J., Su, Z.Z., Goldstein, N.I., Fisher, P.B., 1995. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene* 11, 2477–2486.
- Jiang, R., Tan, Z., Deng, L., Chen, Y., Xia, Y., Gao, Y., Wang, X., Sun, B., 2011. Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* 54, 900–909. <https://doi.org/10.1002/hep.24486>
- Joffre, O., Nolte, M.A., Spörri, R., Reis e Sousa, C., 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 227, 234–247. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00718.x>
- Jouneau, S., 2006. Facteurs de risque de la BPCO : au-delà de la cigarette. *Rev. Mal. Respir.*, Novembre 2006 - ATS 2006 23, 20–24. [https://doi.org/10.1016/S0761-8425\(06\)71990-8](https://doi.org/10.1016/S0761-8425(06)71990-8)

- Jukosky, J., Gosselin, B.J., Foley, L., Dechen, T., Fiering, S., Crane-Godreau, M.A., 2016. In vivo Cigarette Smoke Exposure Decreases CCL20, SLPI, and BD-1 Secretion by Human Primary Nasal Epithelial Cells. *Front. Psychiatry* 6. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00185>
- Kabha, K., Schmegner, J., Keisari, Y., Parolis, H., Schlepper-Schaeffer, J., Ofek, I., 1997. SP-A enhances phagocytosis of *Klebsiella* by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 272, L344–L352. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1997.272.2.L344>
- Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kasahara, Y., Tuder, R.M., Taraseviciene-Stewart, L., Cras, T.D.L., Abman, S., Hirth, P.K., Waltenberger, J., Voelkel, N.F., 2000. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J. Clin. Invest.* 106, 1311–1319. <https://doi.org/10.1172/JCI10259>
- Kato, A., Favoreto, S., Avila, P.C., Schleimer, R.P., 2007. TLR3- and Th2 Cytokine-Dependent Production of Thymic Stromal Lymphopoietin in Human Airway Epithelial Cells. *J. Immunol.* 179, 1080–1087. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1080>
- Kerstjens, H.A., Rijcken, B., Schouten, J.P., Postma, D.S., 1997. Decline of FEV1 by age and smoking status: facts, figures, and fallacies. *Thorax* 52, 820–827. <https://doi.org/10.1136/thx.52.9.820>
- Khair, O.A., Davies, R.J., Devalia, J.L., 1996. Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur. Respir. J.* 9, 1913–1922.
- Kinnebrew, M.A., Ubeda, C., Zenewicz, L.A., Smith, N., Flavell, R.A., Pamer, E.G., 2010. Bacterial flagellin stimulates toll-like receptor 5—dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J. Infect. Dis.* 201, 534–543. <https://doi.org/10.1086/650203>
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C.W., 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285, 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00398-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00398-0)
- Koch, A., Gaczkowski, M., Sturton, G., Staib, P., Schinköthe, T., Klein, E., Rubbert, A., Bacon, K., Waßermann, K., Erdmann, E., 2007. Modification of surface antigens in blood CD8+ T-lymphocytes in COPD: effects of smoking. *Eur. Respir. J.* 29, 42–50. <https://doi.org/10.1183/09031936.00133205>
- Koch, S., Nusrat, A., 2009. Dynamic Regulation of Epithelial Cell Fate and Barrier Function by Intercellular Junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 220–227. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04025.x>
- Kong, X., Feng, D., Wang, H., Hong, F., Bertola, A., Wang, F.-S., Gao, B., 2012. Interleukin-22 Induces Hepatic Stellate Cell Senescence and Restricts Liver Fibrosis. *Hepatology* 56, 1150–1159. <https://doi.org/10.1002/hep.25744>
- Kotton, D.N., 2012. Next-Generation Regeneration. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 1255–1260. <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0228PP>
- Kragstrup, T.W., Otkjaer, K., Holm, C., Jørgensen, A., Hokland, M., Iversen, L., Deleuran, B., 2008. The expression of IL-20 and IL-24 and their shared receptors are increased in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Cytokine* 41, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.10.004>

- Kreis, S., Philippidou, D., Margue, C., Behrmann, I., 2008. IL-24: a classic cytokine and/or a potential cure for cancer? *J. Cell. Mol. Med.* 12, 2505–2510. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00372.x>
- Kreis, S., Philippidou, D., Margue, C., Rolvering, C., Haan, C., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., Behrmann, I., 2007. Recombinant Interleukin-24 Lacks Apoptosis-Inducing Properties in Melanoma Cells. *PLOS ONE* 2, e1300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001300>
- Krunkosky, T.M., Fischer, B.M., Akley, N.J., Adler, K.B., 1996. Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF $\alpha$ )-Induced ICAM-1 Surface Expression in Airway Epithelial Cells in vitro: Possible Signal Transduction Mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 796, 30–37. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb32564.x>
- Kulkarni, R., Rampersaud, R., Aguilar, J.L., Randis, T.M., Kreindler, J.L., Ratner, A.J., 2010. Cigarette Smoke Inhibits Airway Epithelial Cell Innate Immune Responses to Bacteria. *Infect. Immun.* 78, 2146–2152. <https://doi.org/10.1128/IAI.01410-09>
- Kunz, S., Wolk, K., Witte, E., Witte, K., Doecke, W.-D., Volk, H.-D., Sterry, W., Asadullah, K., Sabat, R., 2006. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Exp. Dermatol.* 15, 991–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00516.x>
- Laan, M., Bozinovski, S., Anderson, G.P., 2004. Cigarette Smoke Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Production of Inflammatory Cytokines by Suppressing the Activation of Activator Protein-1 in Bronchial Epithelial Cells. *J. Immunol.* 173, 4164–4170. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.4164>
- Laënnec RTH. In: A treatise on mediate auscultation and on diseases of the lungs and heart. 4th ed. Herbert T, editor. London: Bailliere; 1837.
- Lau, A.N., Goodwin, M., Kim, C.F., Weiss, D.J., 2012. Stem Cells and Regenerative Medicine in Lung Biology and Diseases. *Mol. Ther.* 20, 1116–1130. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.37>
- Le Rouzic, O., Koné, B., Kluza, J., Marchetti, P., Hennegrave, F., Olivier, C., Kervoaze, G., Vilain, E., Mordacq, C., Just, N., Perez, T., Bautin, N., Pichavant, M., Gosset, P., 2016. Cigarette smoke alters the ability of human dendritic cells to promote anti-*Streptococcus pneumoniae* Th17 response. *Respir. Res.* 17. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0408-6>
- Lee, S.-J., Cho, S.-C., Lee, E.-J., Kim, S., Lee, S.-B., Lim, J.-H., Choi, Y.H., Kim, W.-J., 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, 5539–5552. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.410233>
- Lee, S.-J., Lee, E.-J., Kim, S.-K., Jeong, P., Cho, Y.-H., Yun, S.J., Kim, S., Kim, G.-Y., Choi, Y.H., Cha, E.-J., Kim, W.-J., Moon, S.-K., 2012. Identification of Pro-Inflammatory Cytokines Associated with Muscle Invasive Bladder Cancer; The Roles of IL-5, IL-20, and IL-28A. *PLOS ONE* 7, e40267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040267>
- Lee, S.-R., Kim, W.-T., Kim, T.N., Nam, J.K., Kim, W.J., Leem, S.-H., 2018. Association between the length of the MUC8-minisatellite 5 region and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Genes Genomics* 40, 123–127. <https://doi.org/10.1007/s13258-017-0630-8>



- Lee, W.L., Jayathilake, P.G., Tan, Z., Le, D.V., Lee, H.P., Khoo, B.C., 2011. Muco-ciliary transport: Effect of mucus viscosity, cilia beat frequency and cilia density. *Comput. Fluids* 49, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.compfluid.2011.05.016>
- LeMessurier, K., Häcker, H., Tuomanen, E., Redecke, V., 2010. Inhibition of T Cells Provides Protection against Early Invasive Pneumococcal Disease. *Infect. Immun.* 78, 5287–5294. <https://doi.org/10.1128/IAI.00431-10>
- Leng, R.-X., Pan, H.-F., Tao, J.-H., Ye, D.-Q., 2011. IL-19, IL-20 and IL-24: potential therapeutic targets for autoimmune diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 119–126. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.534461>
- Li, H.-H., Cheng, H.-H., Sun, K.-H., Wei, C.-C., Li, C.-F., Chen, W.-C., Wu, W.-M., Chang, M.-S., 2008. Interleukin-20 targets renal mesangial cells and is associated with lupus nephritis. *Clin. Immunol.* 129, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.07.006>
- Li, H.-H., Lin, Y.-C., Chen, P.-J., Hsiao, C.-H., Lee, J.Y.-Y., Chen, W.-C., Tzung, T.-Y., Wu, J.-C., Chang, M.-S., 2005. Interleukin-19 upregulates keratinocyte growth factor and is associated with psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 153, 591–595. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06665.x>
- Li, J.-D., Dohrman, A.F., Gallup, M., Miyata, S., Gum, J.R., Kim, Y.S., Nadel, J.A., Prince, A., Basbaum, C.B., 1997. Transcriptional activation of mucin by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 967–972. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.3.967>
- Li, J.-X., Fu, W.-P., Zhang, J., Zhang, X.-H., Sun, C., Dai, L.-M., Zhong, L., Yu, L., Zhang, Y.-P., 2018. A functional SNP upstream of the ADRB2 gene is associated with COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 13, 917–925. <https://doi.org/10.2147/COPD.S151153>
- Liang, S.C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., Fouser, L.A., 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. <https://doi.org/10.1084/jem.20061308>
- Liao, Y.-C., Liang, W.-G., Chen, F.-W., Hsu, J.-H., Yang, J.-J., Chang, M.-S., 2002. IL-19 Induces Production of IL-6 and TNF- $\alpha$  and Results in Cell Apoptosis Through TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.* 169, 4288–4297. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4288>
- Lim, C., Savan, R., 2014. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 257–271. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.04.005>
- Lin, H., Qian, Z. (Min), Guo, Y., Zheng, Y., Ai, S., Hang, J., Wang, X., Zhang, L., Liu, T., Guan, W., Li, X., Xiao, J., Zeng, W., Xian, H., Howard, S.W., Ma, W., Wu, F., 2018. The attributable risk of chronic obstructive pulmonary disease due to ambient fine particulate pollution among older adults. *Environ. Int.* 113, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.01.029>
- Liu, X., Zhou, H., Huang, X., Cui, J., Long, T., Xu, Y., Liu, H., Yu, R., Zhao, R., Luo, G., Huang, A., Liang, J.G., Liang, P., 2016. A Broad Blockade of Signaling from the IL-20 Family of Cytokines Potently Attenuates Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol.* 197, 3029–3037. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600399>
- Liu, Y., Verma, V.K., Malhi, H., Gores, G.J., Kamath, P.S., Sanyal, A., Chalasani, N., Gao, B., Shah, V.H., 2017. Lipopolysaccharide downregulates macrophage-derived IL-22 to modulate alcohol-induced hepatocyte cell death. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 313, C305–C313. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00005.2017>

- Logsdon, N.J., Deshpande, A., Harris, B.D., Rajashankar, K.R., Walter, M.R., 2012. Structural basis for receptor sharing and activation by interleukin-20 receptor-2 (IL-20R2) binding cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12704–12709. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117551109>
- Lubkin, D.J., Gaffney, E.A., Blake, J.R., 2007. A Viscoelastic Traction Layer Model of Muco-Ciliary Transport. *Bull. Math. Biol.* 69, 289. <https://doi.org/10.1007/s11538-005-9036-x>
- Lytras, T., Kogevinas, M., Kromhout, H., Carsin, A.-E., Antó, J.M., Bentouhami, H., Weyler, J., Heinrich, J., Nowak, D., Urrutia, I., Martinez-Moratalla, J., Gullón, J.A., Pereira-Vega, A., Raheison-Semjen, C., Pin, I., Demoly, P., Leynaert, B., Villani, S., Gislason, T., Svanes, C., Holm, M., Forsberg, B., Norbäck, D., Mehta, A.J., Probst-Hensch, N., Benke, G., Jogi, R., Torén, K., Sigsgaard, T., Schlünssen, V., Olivieri, M., Blanc, P.D., Vermeulen, R., Garcia-Aymerich, J., Jarvis, D., Zock, J.-P., 2018. Occupational exposures and 20-year incidence of COPD: the European Community Respiratory Health Survey. *Thorax*. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-211158>
- MacNee, W., 2007. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin. Chest Med., Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 28, 479–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2007.06.008>
- MacNeil, J.R., Cohn, A.C., Farley, M., Mair, R., Baumbach, J., Bennett, N., Gershman, K., Harrison, L.H., Lynfield, R., Petit, S., Reingold, A., Schaffner, W., Thomas, A., Coronado, F., Zell, E.R., Mayer, L.W., Clark, T.A., Messonnier, N.E., 2011. Current Epidemiology and Trends in Invasive Haemophilus influenzae Disease—United States, 1989–2008. *Clin. Infect. Dis.* 53, 1230–1236. <https://doi.org/10.1093/cid/cir735>
- Mahanonda, R., Sa-Ard-Iam, N., Eksomtramate, M., Rerkyen, P., Phairat, B., Schaecher, K.E., Fukuda, M.M., Pichyangkul, S., 2009. Cigarette smoke extract modulates human  $\beta$ -defensin-2 and interleukin-8 expression in human gingival epithelial cells. *J. Periodontal Res.* 44, 557–564. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01153.x>
- Manel, N., Unutmaz, D., Littman, D.R., 2008. The differentiation of human T<sub>H</sub>-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ t. *Nat. Immunol.* 9, 641–649. <https://doi.org/10.1038/ni.1610>
- Martin, J.C., Bériou, G., Heslan, M., Chauvin, C., Utraiainen, L., Aumeunier, A., Scott, C.L., Mowat, A., Cerovic, V., Houston, S.A., Leboeuf, M., Hubert, F.X., Hémond, C., Merad, M., Milling, S., Josien, R., 2014. Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol.* 7, 101–113. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.28>
- Martinez, F.J., 2007. Pathogen-directed Therapy in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4, 647–658. <https://doi.org/10.1513/pats.200707-097TH>
- Mathers, C.D., Loncar, D., 2006. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>
- Matzinger, P., 2002. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* 296, 301–305. <https://doi.org/10.1126/science.1071059>
- McCool, T.L., Weiser, J.N., 2004. Limited Role of Antibody in Clearance of Streptococcus pneumoniae in a Murine Model of Colonization. *Infect. Immun.* 72, 5807–5813. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5807-5813.2004>

- McCrea, K.A., Ensor, J.E., Nall, K., Bleecker, E.R., Hasday, J.D., 1994. Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, 696–703. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.150.3.8087340>
- McGee, H.M., Schmidt, B.A., Booth, C.J., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Stevens, S., Flavell, R.A., Horsley, V., 2013. IL-22 Promotes Fibroblast-Mediated Wound Repair in the Skin. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1321–1329. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.463>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Jr, C.A.J., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397. <https://doi.org/10.1038/41131>
- Menezes, M.E., Bhoopathi, P., Pradhan, A.K., Emdad, L., Das, S.K., Guo, C., Wang, X.-Y., Sarkar, D., Fisher, P.B., 2018. Role of MDA-7/IL-24 a Multifunction Protein in Human Diseases. *Adv. Cancer Res.* 138, 143–182. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.02.005>
- Milara, J., Peiró, T., Serrano, A., Cortijo, J., 2013. Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke. *Thorax* 68, 410–420. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-201761>
- Miller, L.S., O'Connell, R.M., Gutierrez, M.A., Pietras, E.M., Shahangian, A., Gross, C.E., Thirumala, A., Cheung, A.L., Cheng, G., Modlin, R.L., 2006. MyD88 Mediates Neutrophil Recruitment Initiated by IL-1R but Not TLR2 Activation in Immunity against *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 24, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.011>
- Mio, T., Romberger, D.J., Thompson, A.B., Robbins, R.A., Heires, A., Rennard, S.I., 1997. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 1770–1776. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.155.5.9154890>
- Miot, C., Beaumont, E., Duluc, D., Guillou-Guillemette, H.L., Preisser, L., Garo, E., Blanchard, S., Fouchard, I.H., Créminon, C., Lamourette, P., Fremaux, I., Calès, P., Lunel-Fabiani, F., Boursier, J., Braum, O., Fickenscher, H., Roingeard, P., Delneste, Y., Jeannin, P., 2015. IL-26 is overexpressed in chronically HCV-infected patients and enhances TRAIL-mediated cytotoxicity and interferon production by human NK cells. *Gut* 64, 1466–1475. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306604>
- Molyneaux, P.L., Mallia, P., Cox, M.J., Footitt, J., Willis-Owen, S.A.G., Homola, D., Trujillo-Torralbo, M.-B., Elkin, S., Kon, O.M., Cookson, W.O.C., Moffatt, M.F., Johnston, S.L., 2013. Outgrowth of the Bacterial Airway Microbiome after Rhinovirus Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 1224–1231. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0341OC>
- Monsó, E., Ruiz, J., Rosell, A., Manterola, J., Fiz, J., Morera, J., Ausina, V., 1995. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152, 1316–1320. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.152.4.7551388>
- Morgagni GB. The seats and causes of disease. In: Alexander B, Miller A, Caldwell T, translators. Investigated by anatomy; in five books, containing a great variety of dissections, with remarks. London: Johnson and Payne; 1769.
- Motz, G.T., Eppert, B.L., Wesselkamper, S.C., Flury, J.L., Borchers, M.T., 2010. Chronic Cigarette Smoke Exposure Generates Pathogenic T Cells Capable of Driving COPD-like Disease in Rag2<sup>-/-</sup> Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 1223–1233. <https://doi.org/10.1164/rccm.200910-1485OC>

- Moura, P.R. de, Watanabe, L., Bleicher, L., Colau, D., Dumoutier, L., Lemaire, M.M., Renaud, J.-C., Polikarpov, I., 2009. Crystal structure of a soluble decoy receptor IL-22BP bound to interleukin-22. *FEBS Lett.* 583, 1072–1077. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.006>
- Murakami, S., Iwaki, D., Mitsuzawa, H., Sano, H., Takahashi, H., Voelker, D.R., Akino, T., Kuroki, Y., 2002. Surfactant Protein A Inhibits Peptidoglycan-induced Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Secretion in U937 Cells and Alveolar Macrophages by Direct Interaction with Toll-like Receptor 2. *J. Biol. Chem.* 277, 6830–6837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106671200>
- Murphy, T.F., Sethi, S., 1992. Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146, 1067–1083. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/146.4.1067>
- Myles, I.A., Fontecilla, N.M., Valdez, P.A., Vithayathil, P.J., Naik, S., Belkaid, Y., Ouyang, W., Datta, S.K., 2013a. 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. <https://doi.org/10.1038/ni.2637>
- Myles, I.A., Fontecilla, N.M., Valdez, P.A., Vithayathil, P.J., Naik, S., Belkaid, Y., Ouyang, W., Datta, S.K., 2013b. 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. <https://doi.org/10.1038/ni.2637>
- Nakagiri, T., Inoue, M., Minami, M., Shintani, Y., Okumura, M., 2012. Immunology Mini-review: The Basics of TH17 and Interleukin-6 in Transplantation. *Transplant. Proc.* 44, 1035–1040. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.12.032>
- Niess, J.H., Hruz, P., Kaymak, T., 2018. The Interleukin-20 Cytokines in Intestinal Diseases. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01373>
- Noda, K., Kodama, S., Umemoto, S., Abe, N., Hirano, T., Suzuki, M., 2010. Nasal vaccination with P6 outer membrane protein and  $\alpha$ -galactosylceramide induces nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific protective immunity associated with NKT cell activation and dendritic cell expansion in nasopharynx. *Vaccine* 28, 5068–5074. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.005>
- Nouri-Shirazi, M., Guinet, E., 2003. Evidence for the immunosuppressive role of nicotine on human dendritic cell functions. *Immunology* 109, 365–373.
- O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O.S., Cherian, T., 2009. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *The Lancet* 374, 893–902. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61204-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61204-6)
- Örtqvist, Å., Hedlund, J., Kalin, M., 2005. *Streptococcus pneumoniae* : Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Features. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 26, 563–574. <https://doi.org/10.1055/s-2005-925523>
- Otkjaer, K., Kragballe, K., Funding, A.T., Clausen, J.T., Noerby, P.L., Steiniche, T., Iversen, L., 2005. The dynamics of gene expression of interleukin-19 and interleukin-20 and their receptors in psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 153, 911–918. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06800.x>
- Ouyang, W., 2010. Distinct roles of IL-22 in human psoriasis and inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, Th17 Cytokines in Host Immunity: A Balancing Act 21, 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.10.007>

- Ouyang, W., Kolls, J.K., Zheng, Y., 2008. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity* 28, 454–467. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.004>
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., Hymowitz, S.G., 2011. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
- Palmer, V.L., Kassmeier, M.D., Willcockson, J., Akhter, M.P., Cullen, D.M., Swanson, P.C., 2011. N-Acetylcysteine Increases the Frequency of Bone Marrow Pro-B/Pre-B Cells, but Does Not Reverse Cigarette Smoking-Induced Loss of This Subset. *PLOS ONE* 6, e24804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024804>
- Pan, C., Tang, J., Wang, X., Wu, F., Ge, J., Chen, F., 2014. Role of Interleukin-22 in liver diseases. *Inflamm. Res.* 63, 519–525. <https://doi.org/10.1007/s00011-014-0727-3>
- Parfieniuk-Kowerda, A., Swiderska, M., Szulzyk, T., Jaroszewicz, J., Lapinski, T.W., Flisiak, R., 2017. Serum Concentrations of Th17-Associated Interleukins and Autoimmune Phenomena are Associated with the Degree of Liver Damage in Alcoholic Liver Disease. *J. Gastrointest. Liver Dis. JGLD* 26, 269–274.
- Park, K.-S., Korfhagen, T.R., Bruno, M.D., Kitzmiller, J.A., Wan, H., Wert, S.E., Khurana Hershey, G.K., Chen, G., Whitsett, J.A., 2007. SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. *J. Clin. Invest.* 117, 978–988. <https://doi.org/10.1172/JCI29176>
- Parkes, G.C., Whelan, K., Lindsay, J.O., 2014. Smoking in inflammatory bowel disease: Impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *J. Crohns Colitis* 8, 717–725. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.02.002>
- Patout, M., Zysman, M., Raheison Semjen, C., Perez, T., Cuvelier, A., Roche, N., 2014. [Epidemiology and COPD screening in France. Workshop from the Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF)]. *Rev. Mal. Respir.* 31, 693–699. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.05.003>
- Paul-Clark, M.J., McMaster, S.K., Sorrentino, R., Sriskandan, S., Bailey, L.K., Moreno, L., Ryffel, B., Quesniaux, V.F., Mitchell, J.A., 2009. Toll-like Receptor 2 Is Essential for the Sensing of Oxidants during Inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 299–306. <https://doi.org/10.1164/rccm.200707-1019OC>
- Pavord, I.D., Jones, P.W., Burgel, P.-R., Rabe, K.F., 2016. Exacerbations of COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 11, 21–30. <https://doi.org/10.2147/COPD.S85978>
- Pela, R., Marchesani, F., Agostinelli, C., Staccioli, D., Cecarini, L., Bassotti, C., Sanguinetti, C.M., 1998. Airways microbial flora in COPD patients in stable clinical conditions and during exacerbations: a bronchoscopic investigation. *Monaldi Arch. Chest Dis. Arch. Monaldi Mal. Torace* 53, 262–267.
- Pestka, S., Krause, C.D., Sarkar, D., Walter, M.R., Shi, Y., Fisher, P.B., 2004. Interleukin-10 and Related Cytokines and Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 929–979. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622>
- Petty, T.L., 2006. The history of COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 1, 3–14.
- Philpott, D.J., Girardin, S.E., 2004. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol. Immunol., Recognition Strategies in the Innate Immune System* 41, 1099–1108. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.012>

- Phipps, J.C., Aronoff, D.M., Curtis, J.L., Goel, D., O'Brien, E., Mancuso, P., 2010. Cigarette Smoke Exposure Impairs Pulmonary Bacterial Clearance and Alveolar Macrophage Complement-Mediated Phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 78, 1214–1220. <https://doi.org/10.1128/IAI.00963-09>
- Pichavant, M., Rémy, G., Bekaert, S., Rouzic, O.L., Kervoaze, G., Vilain, E., Just, N., Tillie-Leblond, I., Trottein, F., Cataldo, D., Gosset, P., 2014. Oxidative stress-mediated *i*NKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunol.* 7, 568–578. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.75>
- Pichavant, M., Sharan, R., Le Rouzic, O., Olivier, C., Hennegrave, F., Rémy, G., Pérez-Cruz, M., Koné, B., Gosset, Pierre, Just, N., Gosset, Philippe, 2015. IL-22 Defect During *Streptococcus pneumoniae* Infection Triggers Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *EBioMedicine* 2, 1686–1696. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.040>
- Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Lehr, H.-A., Hirth, S., Weigmann, B., Wirtz, S., Ouyang, W., Neurath, M.F., Becker, C., 2009. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* 206, 1465–1472. <https://doi.org/10.1084/jem.20082683>
- Pillai, S.G., Ge, D., Zhu, G., Kong, X., Shianna, K.V., Need, A.C., Feng, S., Hersh, C.P., Bakke, P., Gulsvik, A., Ruppert, A., Carlsen, K.C.L., Roses, A., Anderson, W., Investigators, I., Rennard, S.I., Lomas, D.A., Silverman, E.K., Goldstein, D.B., 2009. A Genome-Wide Association Study in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Identification of Two Major Susceptibility Loci. *PLOS Genet.* 5, e1000421. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000421>
- Pizzutto, S.J., Yerkovich, S.T., Upham, J.W., Hales, B.J., Thomas, W.R., Chang, A.B., 2014. Children with Chronic Suppurative Lung Disease Have a Reduced Capacity to Synthesize Interferon-Gamma In Vitro in Response to Non-Typeable *Haemophilus influenzae*. *PLOS ONE* 9, e104236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104236>
- Pohl, C., Hermanns, M.I., Uboldi, C., Bock, M., Fuchs, S., Dei-Anang, J., Mayer, E., Kehe, K., Kummer, W., Kirkpatrick, C.J., 2009. Barrier functions and paracellular integrity in human cell culture models of the proximal respiratory unit. *Eur. J. Pharm. Biopharm., Special Section: Biological Barriers and Nanomedicine- Advanced Drug Delivery and Predictive non vivo Testing Technologies* 72, 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.07.012>
- Pope, C.A., Hansen, M.L., Long, R.W., Nielsen, K.R., Eatough, N.L., Wilson, W.E., Eatough, D.J., 2004. Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ. Health Perspect.* 112, 339–345.
- Pouwels, S.D., Zijlstra, G.J., van der Toorn, M., Hesse, L., Gras, R., ten Hacken, N.H.T., Krysko, D.V., Vandenabeele, P., de Vries, M., van Oosterhout, A.J.M., Heijink, I.H., Nawijn, M.C., 2015. Cigarette smoke-induced necroptosis and DAMP release trigger neutrophilic airway inflammation in mice. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 310, L377–L386. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00174.2015>
- Pratt, S.A., Finley, T.N., Smith, M.H., Ladman, A.J., 1969. A comparison of alveolar macrophages and pulmonary surfactant(?) Obtained from the lungs of human smokers and nonsmokers by endobronchial lavage. *Anat. Rec.* 163, 497–507. <https://doi.org/10.1002/ar.1091630402>
- Puddicombe, S.M., Polosa, R., Richter, A., Krishna, M.T., Howarth, P.H., Holgate, S.T., Davies, D.E., 2000. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 14, 1362–1374.

- Rackley, C.R., Stripp, B.R., 2012. Building and maintaining the epithelium of the lung. *J. Clin. Invest.* 122, 2724–2730. <https://doi.org/10.1172/JCI60519>
- Radaeva, S., Sun, R., Pan, H., Hong, F., Gao, B., 2004. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* 39, 1332–1342. <https://doi.org/10.1002/hep.20184>
- Raquil, M.-A., Anceriz, N., Rouleau, P., 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.
- Rattik, S., Hultman, K., Rauch, U., Söderberg, I., Sundius, L., Ljungcrantz, I., Hultgårdh-Nilsson, A., Wigren, M., Björkbacka, H., Fredrikson, G.N., Nilsson, J., 2015. IL-22 affects smooth muscle cell phenotype and plaque formation in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis* 242, 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.08.006>
- Rawlings, J.S., Rosler, K.M., Harrison, D.A., 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* 117, 1281–1283. <https://doi.org/10.1242/jcs.00963>
- Ray, M., Gabunia, K., Vrakas, C.N., Herman, A.B., Kako, F., Kelemen, S.E., Grisanti, L.A., Autieri, M.V., 2018. Genetic Deletion of IL-19 (Interleukin-19) Exacerbates Atherogenesis in Il19-/-xLdlr-/- Double Knockout Mice by Dysregulation of mRNA Stability Protein HuR (Human Antigen R) Highlights. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 1297–1308. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310929>
- Reséndiz-Hernández, J.M., Ambrocio-Ortiz, E., Pérez-Rubio, G., López-Flores, L.A., Abarca-Rojano, E., Pavón-Romero, G.F., Flores-Trujillo, F., de Jesús Hernández-Zenteno, R., Camarena, Á., Pérez-Rodríguez, M., Salazar, A.M., Ramírez-Venegas, A., Falfán-Valencia, R., 2018. TNF promoter polymorphisms are associated with genetic susceptibility in COPD secondary to tobacco smoking and biomass burning. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 13, 627–637. <https://doi.org/10.2147/COPD.S147688>
- Resman, F., Ristovski, M., Ahl, J., Forsgren, A., Gilsdorf, J.R., Jasir, A., Kaijser, B., Kronvall, G., Riesbeck, K., 2011. Invasive disease caused by *Haemophilus influenzae* in Sweden 1997–2009; evidence of increasing incidence and clinical burden of non-type b strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1638–1645. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03417.x>
- Robbins, C.S., Franco, F., Mouded, M., Cernadas, M., Shapiro, S.D., 2008. Cigarette Smoke Exposure Impairs Dendritic Cell Maturation and T Cell Proliferation in Thoracic Lymph Nodes of Mice. *J. Immunol.* 180, 6623–6628. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6623>
- Rock, J.R., Gao, X., Xue, Y., Randell, S.H., Kong, Y.-Y., Hogan, B.L., 2011. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.003>
- Rogan, M.P., Taggart, C.C., Greene, C.M., Murphy, P.G., O’Neill, S.J., McElvaney, N.G., 2004. Loss of Microbicidal Activity and Increased Formation of Biofilm Due to Decreased Lactoferrin Activity in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Infect. Dis.* 190, 1245–1253. <https://doi.org/10.1086/423821>
- Rogers, A.V., Ädelroth, E., Hattotuwa, K., Dewar, A., Jeffery, P.K., 2008. Bronchial mucosal dendritic cells in smokers and ex-smokers with COPD: an electron microscopic study. *Thorax* 63, 108–114. <https://doi.org/10.1136/thx.2007.078253>
- Rogers, A.V., Dewar, A., Corrin, B., Jeffery, P.K., 1993. Identification of serous-like cells in the surface epithelium of human bronchioles. *Eur. Respir. J.* 6, 498–504.

- Rohde, G., Wiethage, A., Borg, I., Kauth, M., Bauer, T., Gillissen, A., Bufe, A., Schultze-Werningh..., G., 2003. Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax* 58, 37–42. <https://doi.org/10.1136/thorax.58.1.37>
- Romagnani, S., 1999. Th1/Th2 cells. *Inflamm. Bowel Dis.* 5, 285–294.
- Rose, N.R., Bona, C., 1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol. Today* 14, 426–430. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90244-F](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90244-F)
- Rubach, M.P., Bender, J.M., Mottice, S., Hanson, K., Weng, H.Y.C., Korgenski, K., Daly, J.A., Pavia, A.T., 2011. Increasing Incidence of Invasive Haemophilus influenzae Disease in Adults, Utah, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1645–1650. <https://doi.org/10.3201/eid1709.101991>
- Rutz, S., Wang, X., Ouyang, W., 2014. The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 783–795. <https://doi.org/10.1038/nri3766>
- Sa, S.M., Valdez, P.A., Wu, J., Jung, K., Zhong, F., Hall, L., Kasman, I., Winer, J., Modrusan, Z., Danilenko, D.M., Ouyang, W., 2007a. The Effects of IL-20 Subfamily Cytokines on Reconstituted Human Epidermis Suggest Potential Roles in Cutaneous Innate Defense and Pathogenic Adaptive Immunity in Psoriasis. *J. Immunol.* 178, 2229–2240. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2229>
- Sa, S.M., Valdez, P.A., Wu, J., Jung, K., Zhong, F., Hall, L., Kasman, I., Winer, J., Modrusan, Z., Danilenko, D.M., Ouyang, W., 2007b. The Effects of IL-20 Subfamily Cytokines on Reconstituted Human Epidermis Suggest Potential Roles in Cutaneous Innate Defense and Pathogenic Adaptive Immunity in Psoriasis. *J. Immunol.* 178, 2229–2240. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2229>
- Sabat, R., Ouyang, W., Wolk, K., 2014. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 21–38. <https://doi.org/10.1038/nrd4176>
- Saetta, M., Turato, G., Maestrelli, P., Mapp, C.E., Fabbri, L.M., 2001. Cellular and Structural Bases of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 1304–1309. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.6.2009116>
- Sakurai, N., Kuroiwa, T., Ikeuchi, H., Hiramatsu, N., Maeshima, A., Kaneko, Y., Hiromura, K., Nojima, Y., 2008. Expression of IL-19 and its receptors in RA: potential role for synovial hyperplasia formation. *Rheumatology* 47, 815–820. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken061>
- Sana, A., Somda, S.M.A., Meda, N., Bouland, C., 2018. Chronic obstructive pulmonary disease associated with biomass fuel use in women: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open Respir. Res.* 5, e000246. <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2017-000246>
- Sano, H., Sohma, H., Muta, T., Nomura, S., Voelker, D.R., Kuroki, Y., 1999. Pulmonary Surfactant Protein A Modulates the Cellular Response to Smooth and Rough Lipopolysaccharides by Interaction with CD14. *J. Immunol.* 163, 387–395.
- Santulli, P., Borghese, B., Chouzenoux, S., Streuli, I., Borderie, D., de Ziegler, D., Weill, B., Chapron, C., Batteux, F., 2013. Interleukin-19 and interleukin-22 serum levels are decreased in patients with ovarian endometrioma. *Fertil. Steril.* 99, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.055>
- Sarma, J.V., Ward, P.A., 2011. The Complement System. *Cell Tissue Res.* 343, 227–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>



- Schaberg, T., Klein, U., Rau, M., Eller, J., Lode, H., 1995. Subpopulations of alveolar macrophages in smokers and nonsmokers: relation to the expression of CD11/CD18 molecules and superoxide anion production. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 1551–1558. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.5.7735614>
- Schaberg, T., Lauer, C., Lode, H., Fischer, J., Haller, H., 1992. Increased Number of Alveolar Macrophages Expressing Adhesion Molecules of the Leukocyte Adhesion Molecule Family in Smoking Subjects: Association with Cell-binding Ability and Superoxide Anion Production. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146, 1287–1293. [https://doi.org/10.1164/ajrccm/146.5\\_Pt\\_1.1287](https://doi.org/10.1164/ajrccm/146.5_Pt_1.1287)
- Scharf, S., Zahlten, J., Szymanski, K., Hippenstiel, S., Suttorp, N., N'Guessan, P.D., 2012. Streptococcus pneumoniae induces human  $\beta$ -defensin-2 and -3 in human lung epithelium. *Exp. Lung Res.* 38, 100–110. <https://doi.org/10.3109/01902148.2011.652802>
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., Kirschning, C.J., 1999. Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274, 17406–17409. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17406>
- Sedaghat, M.H., Shahmardan, M.M., Norouzi, M., Heydari, M., 2016. Effect of Cilia Beat Frequency on Muco-ciliary Clearance. *J. Biomed. Phys. Eng.* 6, 265–278.
- Seiler, F., Lepper, P.M., Bals, R., Beisswenger, C., 2014. Regulation and function of antimicrobial peptides in immunity and diseases of the lung. *Protein Pept. Lett.* 21, 341–351.
- Šenolt, L., Leszczynski, P., Dokoupilová, E., Göthberg, M., Valencia, X., Hansen, B.B., Cañete, J.D., 2015. Efficacy and Safety of Anti-Interleukin-20 Monoclonal Antibody in Patients With Rheumatoid Arthritis: A Randomized Phase IIa Trial. *Arthritis Rheumatol.* 67, 1438–1448. <https://doi.org/10.1002/art.39083>
- Seong, R.-K., Choi, Y.-K., Shin, O.S., 2016. MDA7/IL-24 is an anti-viral factor that inhibits influenza virus replication. *J. Microbiol.* 54, 695–700. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6383-2>
- Sethi, S., Evans, N., Grant, B.J.B., Murphy, T.F., 2002. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 465–471. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012561>
- Sethi, S., Murphy, T.F., 2008. Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* 359, 2355–2365. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0800353>
- Sethi, S., Murphy, T.F., 2001. Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in 2000: a State-of-the-Art Review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 336–363. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.336-363.2001>
- Shaler, C.R., Horvath, C.N., McCormick, S., Jeyanathan, M., Khera, A., Zganiacz, A., Kasinska, J., Stampfli, M.R., Xing, Z., 2013. Continuous and Discontinuous Cigarette Smoke Exposure Differentially Affects Protective Th1 Immunity against Pulmonary Tuberculosis. *PLOS ONE* 8, e59185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059185>
- Sharan, R., Perez-Cruz, M., Kervoaze, G., Gosset, Pierre, Weynants, V., Godfroid, F., Hermand, P., Trottein, F., Pichavant, M., Gosset, P., 2017. Interleukin-22 protects against non-typeable *Haemophilus influenzae* infection: alteration during chronic obstructive pulmonary disease. *Mucosal Immunol.* 10, 139–149. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.40>

- Shaykhiev, R., Krause, A., Salit, J., Strulovici-Barel, Y., Harvey, B.-G., O'Connor, T.P., Crystal, R.G., 2009. Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Immunol.* 183, 2867–2883. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900473>
- Shaykhiev, R., Otaki, F., Bonsu, P., Dang, D.T., Teater, M., Strulovici-Barel, Y., Salit, J., Harvey, B.-G., Crystal, R.G., 2011. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 877–892. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0500-x>
- Shimamura, M., Yamamura, M., Nabeshima, T., Kitano, N., Elzen, P. van den, Yesilkaya, H., Andrew, P., Illarionov, P., 2017. Activation of invariant natural killer T cells stimulated with microbial  $\alpha$ -mannosyl glycolipids. *Sci. Rep.* 7, 9703. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10309-x>
- Siddiqi, A., Berim, I., Nabi, H., Berenson, C., Sethi, S., 2009. Association of Impaired Mucociliary Clearance with Occurrence of Exacerbations in COPD., in: D13. COPD EXACERBATION -- MECHANISM AND MANAGEMENT, American Thoracic Society International Conference Abstracts. American Thoracic Society, p. A5350. [https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2009.179.1\\_MeetingAbstracts.A5350](https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2009.179.1_MeetingAbstracts.A5350)
- Sleigh, M.A., Blake, J.R., Liron, N., 1988. The Propulsion of Mucus by Cilia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137, 726–741. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/137.3.726>
- Sloane, P.A., Shastry, S., Wilhelm, A., Courville, C., Tang, L.P., Backer, K., Levin, E., Raju, S.V., Li, Y., Mazur, M., Byan-Parker, S., Grizzle, W., Sorscher, E.J., Dransfield, M.T., Rowe, S.M., 2012. A Pharmacologic Approach to Acquired Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Dysfunction in Smoking Related Lung Disease. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039809>
- Smith, D.J., Gaffney, E.A., Blake, J.R., 2008. Modelling mucociliary clearance. *Respir. Physiol. Neurobiol., Respiratory Biomechanics* 163, 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.03.006>
- Sohal, S.S., Reid, D., Soltani, A., Ward, C., Weston, S., Muller, H.K., Wood-Baker, R., Walters, E.H., 2011. Evaluation of epithelial mesenchymal transition in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.* 12, 130. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-130>
- Sohal, S.S., Reid, D., Soltani, A., Ward, C., Weston, S., Muller, H.K., Wood-Baker, R., Walters, E.H., 2010. Reticular basement membrane fragmentation and potential epithelial mesenchymal transition is exaggerated in the airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 15, 930–938. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01808.x>
- Soler, P., Moreau, A., Basset, F., Hance, A.J., 1989. Cigarette Smoking-induced Changes in the Number and Differentiated State of Pulmonary Dendritic Cells/ Langerhans Cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139, 1112–1117. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/139.5.1112>
- Soliman, D.M., Twigg, H.L., 1992. Cigarette smoking decreases bioactive interleukin-6 secretion by alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 263, L471–L478. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1992.263.4.L471>
- Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A., Artis, D., 2011. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.* 12, 383–390. <https://doi.org/10.1038/ni.2025>

- Spina, D., 1998. Epithelium Smooth Muscle Regulation and Interactions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, S141–S145. [https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.supplement\\_2.13tac100a](https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac100a)
- Srivastava, A., Henneke, P., Visintin, A., Morse, S.C., Martin, V., Watkins, C., Paton, J.C., Wessels, M.R., Golenbock, D.T., Malley, R., 2005. The Apoptotic Response to Pneumolysin Is Toll-Like Receptor 4 Dependent and Protects against Pneumococcal Disease. *Infect. Immun.* 73, 6479–6487. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6479-6487.2005>
- Stefano, A.D., Caramori, G., Capelli, A., Gnemmi, I., Ricciardolo, F.L., Oates, T., Donner, C.F., Chung, K.F., Barnes, P.J., Adcock, I.M., 2004. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 24, 78–85. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00080303>
- Stenderup, K., Rosada, C., Worsaae, A., Dagnaes-Hansen, F., Steiniche, T., Hasselager, E., Iversen, L.F., Zahn, S., Wöldike, H., Holmberg, H.L., Rømer, J., Kragballe, K., Clausen, J.T., Dam, T.N., 2009. Interleukin-20 plays a critical role in maintenance and development of psoriasis in the human xenograft transplantation model. *Br. J. Dermatol.* 160, 284–296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08890.x>
- Støy, S., Sandahl, T.D., Dige, A.K., Agnholt, J., Rasmussen, T.K., Grønbæk, H., Deleuran, B., Vilstrup, H., 2013. Highest Frequencies of Interleukin-22-Producing T Helper Cells in Alcoholic Hepatitis Patients with a Favourable Short-Term Course. *PLOS ONE* 8, e55101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055101>
- Striz, I., Mio, T., Adachi, Y., Heires, P., Robbins, R.A., Spurzem, J.R., Illig, M.J., Romberger, D.J., Rennard, S.I., 1999. IL-4 induces ICAM-1 expression in human bronchial epithelial cells and potentiates TNF-alpha. *Am. J. Physiol.* 277, L58–64.
- Strzelak, A., Ratajczak, A., Adamiec, A., Feleszko, W., 2018. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15. <https://doi.org/10.3390/ijerph15051033>
- Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J., Mizoguchi, A., 2008. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* 118, 534–544. <https://doi.org/10.1172/JCI33194>
- Sun, C., Zhu, M., Yang, Z., Pan, X., Zhang, Y., Wang, Q., Xiao, W., 2014. LL-37 secreted by epithelium promotes fibroblast collagen production: a potential mechanism of small airway remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 94, 991–1002. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.86>
- Sun, D.-P., Yeh, C.-H., So, E., Wang, L.-Y., Wei, T.-S., Chang, M.-S., Hsing, C.-H., 2013. Interleukin (IL)-19 promoted skin wound healing by increasing fibroblast keratinocyte growth factor expression. *Cytokine* 62, 360–368. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.03.017>
- Sun, W., Wu, R., Last, J.A., 1995. Effects of exposure to environmental tobacco smoke on a human tracheobronchial epithelial cell line. *Toxicology* 100, 163–174. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)03087-V](https://doi.org/10.1016/0300-483X(95)03087-V)
- Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C., Mills, K.H.G., 2009. Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from  $\gamma\delta$  T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity. *Immunity* 31, 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.001>

- Sykes, A., Mallia, P., Johnston, S.L., 2007. Diagnosis of pathogens in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4, 642–646. <https://doi.org/10.1513/pats.200707-101TH>
- Takatori, H., Kanno, Y., Watford, W.T., Tato, C.M., Weiss, G., Ivanov, I.I., Littman, D.R., O’Shea, J.J., 2009. Lymphoid tissue inducer–like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J. Exp. Med.* 206, 35–41. <https://doi.org/10.1084/jem.20072713>
- Takizawa, H., 1998. Airway epithelial cells as regulators of airway inflammation (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1, 367–445. <https://doi.org/10.3892/ijmm.1.2.367>
- Takizawa, H., Ohtoshi, T., Kikutani, T., Okazaki, H., Akiyama, N., Sato, M., Shoji, S., Ito, K., 1995. Histamine Activates Bronchial Epithelial Cells to Release Inflammatory Cytokines in vitro. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108, 260–267. <https://doi.org/10.1159/000237162>
- Takizawa, H., Tanaka, M., Takami, K., Ohtoshi, T., Ito, K., Satoh, M., Okada, Y., Yamasawa, F., Nakahara, K., Umeda, A., 2001. Increased Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$  1 in Small Airway Epithelium from Tobacco Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 1476–1483. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.6.9908135>
- Tamashiro, E., Xiong, G., Anselmo-Lima, W.T., Kreindler, J.L., Palmer, J.N., Cohen, N.A., 2009. Cigarette Smoke Exposure Impairs Respiratory Epithelial Ciliogenesis. *Am. J. Rhinol. Allergy* 23, 117–122. <https://doi.org/10.2500/ajra.2009.23.3280>
- Tian, Y., Sommerville, L.J., Cuneo, A., Kelemen, S.E., Autieri, M.V., 2008. Expression and Suppressive Effects of Interleukin-19 on Vascular Smooth Muscle Cell Pathophysiology and Development of Intimal Hyperplasia. *Am. J. Pathol.* 173, 901–909. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080163>
- Tiffeneau, R., Pinelli, null, 1947. [Not Available]. *Paris Med.* 37, 624–628.
- Tomlinson, G., Chimalapati, S., Pollard, T., Lapp, T., Cohen, J., Camberlein, E., Stafford, S., Periselneris, J., Aldridge, C., Vollmer, W., Picard, C., Casanova, J.-L., Noursadeghi, M., Brown, J., 2014. TLR-Mediated Inflammatory Responses to *Streptococcus pneumoniae* Are Highly Dependent on Surface Expression of Bacterial Lipoproteins. *J. Immunol. Author Choice* 193, 3736–3745. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401413>
- Travis, S.M., Conway, B.-A.D., Zabner, J., Smith, J.J., Anderson, N.N., Singh, P.K., Peter Greenberg, E., Welsh, M.J., 1999. Activity of Abundant Antimicrobials of the Human Airway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20, 872–879. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.5.3572>
- Tsao, C.-C., Tsao, P.-N., Chen, Y.-G., Chuang, Y.-H., 2016. Repeated Activation of Lung Invariant NKT Cells Results in Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Like Symptoms. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147710>
- Tsao, P.-N., Vasconcelos, M., Izvolsky, K.I., Qian, J., Lu, J., Cardoso, W.V., 2009. Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Dev. Camb. Engl.* 136, 2297–2307. <https://doi.org/10.1242/dev.034884>
- Tuder, J.M.H. and R., 2012. Alpha 1 Anti-Trypsin: One Protein, Many Functions [WWW Document]. *Curr. Mol. Med.* URL <http://www.eurekaselect.com/99923/article> (accessed 7.25.18).

- Van Hove, C.L., Moerloose, K., Maes, T., Joos, G.F., Tournoy, K.G., 2008. Cigarette smoke enhances Th-2 driven airway inflammation and delays inhalational tolerance. *Respir. Res.* 9, 42. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-9-42>
- van Lieshout, M.H.P., de Vos, A.F., Dessing, M.C., de Porto, A.P.N.A., de Boer, O.J., de Beer, R., Terpstra, S., Florquin, S., Van't Veer, C., van der Poll, T., 2018. ASC and NLRP3 impair host defense during lethal pneumonia caused by serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Eur. J. Immunol.* 48, 66–79. <https://doi.org/10.1002/eji.201646554>
- Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Ivanov, S., Porte, R., Deruy, E., Chabalgoity, J.A., Renauld, J.-C., Eberl, G., Benecke, A.G., Trottein, F., Faveeuw, C., Sirard, J.-C., 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. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu106>
- van Wessel, K., Rodenburg, G.D., Veenhoven, R.H., Spanjaard, L., van der Ende, A., Sanders, E.A.M., 2011. Nontypeable *Haemophilus influenzae* Invasive Disease in the Netherlands: A Retrospective Surveillance Study 2001–2008. *Clin. Infect. Dis.* 53, e1–e7. <https://doi.org/10.1093/cid/cir268>
- Van Winkle, L.S., Evans, M.J., Brown, C.D., Willits, N.H., Pinkerton, K.E., Plopper, C.G., 2001. Prior exposure to aged and diluted sidestream cigarette smoke impairs bronchiolar injury and repair. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 60, 152–164.
- Vargas-Alarcón, G., Posadas-Romero, C., Villarreal-Molina, T., Alvarez-León, E., Angeles-Martinez, J., Posadas-Sanchez, R., Monroy-Muñoz, I., Luna-Fuentes, S., González-Salazar, C., Ramirez-Bello, J., Cardoso-Saldaña, G., Medina-Urrutia, A., Kimura-Hayama, E., 2014. IL-24 Gene Polymorphisms Are Associated with Cardiometabolic Parameters and Cardiovascular Risk Factors But Not with Premature Coronary Artery Disease: The Genetics of Atherosclerotic Disease Mexican Study. *J. Interferon Cytokine Res.* 34, 659–666. <https://doi.org/10.1089/jir.2013.0081>
- Vargas-Rojas, M.I., Ramírez-Venegas, A., Limón-Camacho, L., Ochoa, L., Hernández-Zenteno, R., Sansores, R.H., 2011. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 105, 1648–1654. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2011.05.017>
- Wang, H., Peng, W., Weng, Y., Ying, H., Li, H., Xia, D., Yu, W., 2012. Imbalance of Th17/Treg cells in mice with chronic cigarette smoke exposure. *Int. Immunopharmacol.* 14, 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.09.011>
- Wang, H.-H., Hsu, Y.-H., Chang, M.-S., 2018. IL-20 bone diseases involvement and therapeutic target potential. *J. Biomed. Sci.* 25. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0439-z>
- Wang, J., Urbanowicz, R.A., Tighe, P.J., Todd, I., Corne, J.M., Fairclough, L.C., 2013. Differential Activation of Killer Cells in the Circulation and the Lung: A Study of Current Smoking Status and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058556>
- Wang, K., Feng, Y., Wen, F., Chen, X., Ou, X., Xu, D., Yang, J., Deng, Z., 2007. Decreased expression of human aquaporin-5 correlated with mucus overproduction in airways of chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Pharmacol. Sin.* 28, 1166–1174. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00608.x>
- Wang, M., Liang, P., 2005. Interleukin-24 and its receptors. *Immunology* 114, 166–170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02094.x>

- Wegenka, U.M., 2010. IL-20: biological functions mediated through two types of receptor complexes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.08.001>
- Wen, Z., Liao, Q., Zhao, J., Hu, Y., You, L., Lu, Z., Jia, C., Wei, Y., Zhao, Y., 2014. High Expression of Interleukin-22 and Its Receptor Predicts Poor Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 21, 125–132. <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3322-x>
- Whitaker, E.L., Filippov, V.A., Duerksen-Hughes, P.J., 2012. Interleukin 24: Mechanisms and therapeutic potential of an anti-cancer gene. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.08.004>
- Whitsett, J.A., Haitchi, H.M., Maeda, Y., 2011. Intersections between Pulmonary Development and Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 401–406. <https://doi.org/10.1164/rccm.201103-0495PP>
- Whittaker, R., Economopoulou, A., Dias, J.G., Bancroft, E., Ramliden, M., Celentano, L.P., 2017. Epidemiology of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 2007–2014. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 396–404. <https://doi.org/10.3201/eid2303.161552>
- Wilson, R., Cohen, J.M., Jose, R.J., de Vogel, C., Baxendale, H., Brown, J.S., 2015. Protection against *Streptococcus pneumoniae* lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. *Mucosal Immunol.* 8, 627–639. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.95>
- Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K., Sabat, R., 2002. Cutting Edge: Immune Cells as Sources and Targets of the IL-10 Family Members? *J. Immunol.* 168, 5397–5402. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5397>
- Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W.-D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.-D., Sterry, W., Sabat, R., 2006. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* 36, 1309–1323. <https://doi.org/10.1002/eji.200535503>
- Wolk, K., Witte, E., Warszawska, K., Schulze-Tanzil, G., Witte, K., Philipp, S., Kunz, S., Döcke, W.-D., Asadullah, K., Volk, H.-D., Sterry, W., Sabat, R., 2009. The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: A novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* 39, 3570–3581. <https://doi.org/10.1002/eji.200939687>
- Wolk, K., Witte, K., Witte, E., Proesch, S., Schulze-Tanzil, G., Nasilowska, K., Thilo, J., Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.-D., Sabat, R., 2008. Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1181–1193. <https://doi.org/10.1189/jlb.0807525>
- Xing, J., Weng, L., Yuan, B., Wang, Z., Jia, L., Jin, R., Lu, H., Li, X.C., Liu, Y.-J., Zhang, Z., 2016. Identification of a role for TRIM29 in the control of innate immunity in the respiratory tract. *Nat. Immunol.* 17, 1373–1380. <https://doi.org/10.1038/ni.3580>
- Xu, F., Droemann, D., Rupp, J., Shen, H., Wu, X., Goldmann, T., Hippenstiel, S., Zabel, P., Dalhoff, K., 2008. Modulation of the inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in a model of acute lung tissue infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39, 522–529. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0328OC>

- Xu, W., Presnell, S.R., Parrish-Novak, J., Kindsvogel, W., Jaspers, S., Chen, Z., Dillon, S.R., Gao, Z., Gilbert, T., Madden, K., Schlutsmeyer, S., Yao, L., Whitmore, T.E., Chandrasekher, Y., Grant, F.J., Maurer, M., Jelinek, L., Storey, H., Brender, T., Hammond, A., Topouzis, S., Clegg, C.H., Foster, D.C., 2001. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9511–9516. <https://doi.org/10.1073/pnas.171303198>
- Yamada, M., Gomez, J.C., Chugh, P.E., Lowell, C.A., Dinauer, M.C., Dittmer, D.P., Doerschuk, C.M., 2011. Interferon- $\gamma$  Production by Neutrophils during Bacterial Pneumonia in Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 1391–1401. <https://doi.org/10.1164/rccm.201004-0592OC>
- Yamamoto-Furusho, J.K., De-León-Rendón, J.L., de la Torre, M.G., Alvarez-León, E., Vargas-Alarcón, G., 2013. Genetic polymorphisms of interleukin 20 (IL-20) in patients with ulcerative colitis. *Immunol. Lett.* 149, 50–53. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.11.008>
- Yang, X.-J., Lu, H.-Y., Li, Z.-Y., Bian, Q., Qiu, L.-L., Li, Z., Liu, Q., Li, J., Wang, X., Wang, S.-L., 2012. Cytochrome P450 2A13 mediates aflatoxin B1-induced cytotoxicity and apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 300, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.010>
- Ye, J., Ji, Q., Liu, J., Liu, L., Huang, Y., Shi, Y., Shi, L., Wang, M., Liu, M., Feng, Y., Jiang, H., Xu, Y., Wang, Z., Song, J., Lin, Y., Wan, J., 2017. Interleukin 22 Promotes Blood Pressure Elevation and Endothelial Dysfunction in Angiotensin II-Treated Mice. *J. Am. Heart Assoc.* 6, e005875. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005875>
- Yi, P., Liang, Y., Yuan, D.M.K., Jie, Z., Kwota, Z., Chen, Y., Cong, Y., Fan, X., Sun, J., 2017. A tightly regulated IL-22 response maintains immune functions and homeostasis in systemic viral infection. *Sci. Rep.* 7, 3857. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04260-0>
- Yoon, S., Jones, B.C., Logsdon, N.J., Harris, B.D., Deshpande, A., Radaeva, S., Halloran, B.A., Gao, B., Walter, M.R., 2010. Structure and Mechanism of Receptor Sharing by the IL-10R2 Common Chain. *Structure* 18, 638–648. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.02.009>
- You, W., Tang, Q., Zhang, C., Wu, J., Gu, C., Wu, Z., Li, X., 2013. IL-26 Promotes the Proliferation and Survival of Human Gastric Cancer Cells by Regulating the Balance of STAT1 and STAT3 Activation. *PLOS ONE* 8, e63588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063588>
- Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R., Jove, R., 2014. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat. Rev. Cancer* 14, 736–746. <https://doi.org/10.1038/nrc3818>
- Yu, H., Pardoll, D., Jove, R., 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* 9, 798–809. <https://doi.org/10.1038/nrc2734>
- Zahlten, J., Steinicke, R., Bertrams, W., Hocke, A.C., Scharf, S., Schmeck, B., Witzenzath, M., Hammerschmidt, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S., 2013. TLR9- and Src-dependent expression of Krueppel-like factor 4 controls interleukin-10 expression in pneumonia. *Eur. Respir. J.* 41, 384–391. <https://doi.org/10.1183/09031936.00196311>
- Zahm, J.-M., Kaplan, H., Hérard, A.-L., Doriot, F., Pierrot, D., Somelette, P., Puchelle, E., 1997. Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil.* 37, 33–43. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1997\)37:1<33::AID-CM4>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1997)37:1<33::AID-CM4>3.0.CO;2-I)
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., Perussia, B., 1998. Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells. *J. Exp. Med.* 188, 2375–2380.

- Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Stevens, S., Flavell, R.A., 2008. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 29, 947–957. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.003>
- Zhang, L., Li, Z., Wan, Z., Kilby, A., Kilby, J.M., Jiang, W., 2015. Humoral Immune Responses to *Streptococcus pneumoniae* in the Setting of HIV-1 Infection. *Vaccine* 33, 4430–4436. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.077>
- Zhang, W., Case, S., Bowler, R.P., Martin, R.J., Jiang, D., Chu, H.W., 2011. Cigarette smoke modulates PGE(2) and host defence against *Moraxella catarrhalis* infection in human airway epithelial cells. *Respirol. Carlton Vic* 16, 508–516. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01920.x>
- Zhao, D., Long, X.-D., Lu, T.-F., Wang, T., Zhang, W.-W., Liu, Y.-X., Cui, X.-L., Dai, H.-J., Xue, F., Xia, Q., 2015. Metformin decreases IL-22 secretion to suppress tumor growth in an orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 136, 2556–2565. <https://doi.org/10.1002/ijc.29305>
- Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., Sauvage, F.J. de, Ouyang, W., 2008. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* 14, 282–289. <https://doi.org/10.1038/nm1720>
- Zhou, L., Chong, M.M.W., Littman, D.R., 2009. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* 30, 646–655. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.001>
- Zhou, Xianghui, Li, Q., Zhou, Xincan, 2015. Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Cell Biochem. Biophys.* 73, 349–355. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0605-9>



## ANNEXES

### **Annexe 1 : Production of IL-20 cytokines-receptors to limits bacterial clearance and lung inflammation during infection by *Streptococcus pneumoniae***

Fahima Madouri<sup>1, 2, 3, 4\*</sup>, Olivia Barada<sup>1, 2, 3, 4\*</sup>, Gwenola Kervoaze<sup>1, 2, 3, 4</sup>, François Trottein<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Muriel Pichavant<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Philippe Gosset<sup>1, 2, 3, 4</sup>

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

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

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

<sup>4</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, 59019 Lille, France  
CHRU de Lille, 59000 Lille, France

\* Equal contribution for both authors

**Short title:** IL-20 cytokines in pneumonia

#### **Corresponding author:**

Philippe Gosset, PhD; Lung Infection and Innate Immunity (LI3). Team 12, CIIL- Center for Infection and Immunity of Lille. Inserm U1019-CNRS UMR 8204, Univ Lille Nord de France ; Institut Pasteur de Lille- 1, rue du Professeur Calmette- BP245 59019 Lille Cedex, France. Phone: +333 20 87 79 65, Fax: +333 20 87 78 88 [philippe.gosset@pasteur-lille.fr](mailto:philippe.gosset@pasteur-lille.fr)

This article has an online supplement

**Key words:** Pneumonia, cytokines, cytokine receptor, immunomodulation, antimicrobial peptides

**Word count:** 4051

**Abstract***Background*

*Streptococcus pneumoniae* is the leading cause of bacterial pneumonia worldwide. Previous reports showed that IL-20 cytokines (IL-19, IL-20 and IL-24) are induced and have an immuno-regulatory function during cutaneous infection. In the current study, our aim was to demonstrate the implication of IL-20 cytokines and their receptors and their role during experimental pneumococcal infection.

*Methods*

C57BL/6 mice were infected with *S. pneumoniae* by intranasal route. The bacterial burden, the immune response and the cytokine production were evaluated after treatment with an anti-IL-20 receptor-b (IL-20Rb) neutralizing antibody (anti-IL-20Rb).

*Findings*

Of interest, expression of IL-20 cytokines mRNA and protein were transiently increased in the lung tissue during infection. Blocking of the IL-20Rb decreased the bacterial burden both in the bronchoalveolar lavage and the lung whereas there was no significant drop in the blood. This treatment also reduced the pulmonary damages (as shown by the alveolar wall thickening), the recruitment of neutrophils and dendritic cells, and the levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 in the lung. Administration of the anti-IL-20Rb antibody enhanced the synthesis of the antibacterial peptide LCN2. However, this effect is transient and did not affect the survival of the infected mice.

*Interpretation*

Collectively, this study highlights the implication of IL-20 related cytokines during lung infection by *S. pneumoniae* and might have therapeutic applications in bacterial pneumonia.

*Fundings:* This work was supported by CNRS, INSERM, INSERM-transfert, the University of Lille and the Fondation du Souffle (Paris, France).

**Research in context****Evidence before the study**

Exposure to microorganisms might be the cause of respiratory infections which still are a major cause of death and an important health problem. Among bacteria, *Streptococcus pneumoniae* was recognized as a leading cause of pneumonia and hospital-acquired opportunistic infections. The severity of the pneumonia is tightly related to the efficiency of the defense mechanism. Both innate and adaptive immune responses participate in the clearance of the pneumococci. Among the factors orchestrating the defense mechanism, IL-20 cytokines play a major role in the clearance of the bacteria and the lung homeostasis by limiting injury and maintaining tissue integrity. Whereas the role of interleukin(IL)-22 is widely demonstrated, the implication of the other IL-20 cytokines (IL-19, IL-20 and IL-24) acting through different pathways is unknown.

**Added value of this study**

We demonstrated that expression of IL-19, IL-20 and IL-24 were transiently increased in the lung tissue with a peak at 24h post-infection. Blocking the binding of IL-20 cytokines to their receptor improve the bacterial clearance and decrease the inflammatory reaction and the tissue lesions during the first days of the infection. Altogether, this study identified a new mechanism inhibiting the lung defense mechanism against bacterial infection at the opposite of IL-22.

**Implications of all the available evidence**

These data suggest that imbalance between IL-22 and the other IL-20 cytokines might increase the susceptibility to respiratory infection often observed during chronic inflammatory diseases. Thus, targeting IL-20 cytokines might be valuable to improve the control of respiratory bacterial infection.

## Introduction

Pneumococcal lung infections are a real public health problem and are responsible for approximately 2 million deaths and cost hundred billions of dollars per year [1]. *Streptococcus pneumoniae* (*Sp*) is a facultative anaerobic Gram-positive diplococcus for which more than 90 serotypes have been identified [2]. It is the most common cause of bacterial pneumonia and it is also implicated in sinusitis and bacterial meningitis [3, 4]. *Sp* colonizes the nasopharynx and can spread to the lower respiratory tract via the airways [1].

The severity of the pneumonia is tightly related to the efficiency of the anti-bacterial host response. Both innate and adaptive immune responses participate in the clearance of the pneumococci [5]. Among the factors orchestrating the anti-bacterial response, Th17-type cytokines, including interleukin (IL)-17 and IL-22, play a major role in the clearance of *Sp* [6-8] and the lung homeostasis by limiting injury and maintaining tissue integrity, by modulating remodeling and the secretion of antimicrobial peptides [6]. We also previously demonstrated that the increased susceptibility to *Sp* in mice chronically exposed to cigarette smoke was due to a defective IL-22 response [9]. In this situation, alteration of alveolar macrophages and dendritic cell (DC) function leads to a lower secretion of these cytokines by conventional and non-conventional T cells. IL-22 with IL-19, IL-20, IL-24 and IL-26 (IL-26 only present in humans), belong to the IL-20 cytokine subfamily, a subset of the IL-10 family [10-12]. IL-19, IL-20 and IL-24 all bind the type I IL-20 receptor (IL-20R), a heterodimeric receptor composed of the IL-20RA and B chains (IL-20Ra and IL-20Rb). Moreover, IL-20 and IL-24 bind the type II IL-20R a heterodimeric receptor composed of the IL-22 receptor  $\alpha 1$  subunit and IL-20Rb [13]. Thus, IL-20Rb subunit is the common chain to both receptor types recognizing IL-20 cytokines and blocking antibodies against this receptor can efficiently neutralize this pathway [14].

These IL-20Rb-containing receptor complexes are mainly expressed on epithelial cells, mononuclear phagocytes and some lymphocytes. Recent data also revealed that activated neutrophils expressed this receptor [15]. Moreover, the role of IL-20 related cytokines is controversial and exhibited some “anti-inflammatory” effects involved in the cutaneous tissue homeostasis [16]. However, Myles et al. have shown that IL-20 related cytokines (IL-19, IL-20 and IL-24) promote cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice by downregulating IL-17 and IL-22 production [14]. However, their implication in lung bacterial infection has not yet been evaluated.

In this study, our aim was to demonstrate the implication during lung infection by *SP* and their role in this context. We hypothesized that blocking the IL-20 pathway using an anti-IL-20Rb neutralizing antibody could help to control such bacterial lung infection. For this, we first analyzed the production of IL-20-related cytokines and their receptors in lung tissues from mice infected by *Sp*. The impact of the treatment with a blocking anti-IL-20Rb antibody was evaluated on the bacterial clearance and lung inflammation as well as on the survival in mice infected by *Sp*. This study identified IL-20 related cytokines and their receptor as modulators of the host response during *Sp* infection. Thus, targeting IL-20Rb subunit might be valuable to improve the control of *Sp* infection.

## Materials and Methods

### *Animals*

Six- to eight-week-old male wild-type C57BL/6 (H-2Db) mice were purchased from Janvier (SOPF animal facility, 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 16/20,090). Mice were maintained in a temperature-controlled (23°C) facility with a strict 12h light/dark cycle with food and water provided ad libitum.

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

A clinical isolate *S. pneumoniae* serotype 1 (clinical isolate E1586) was obtained from the National Reference Laboratory, Ministry of Health, Uruguay and was grown as described previously [17]. For infection, frozen working stocks were diluted in phosphate-buffered saline (PBS). The quantity of bacteria in the frozen stock was systematically verified in each experiment and the quantity of bacteria was approximately the same before and after frozen. Anesthetized mice (intraperitoneal injection of ketamine (10mg/ml)-xylazine (2mg/ml) (50% of each compound used in proportion) (Rompun 2% xylazine, Bayer and Imalgene 1000, Merial) were intranasally infected with  $2 \times 10^6$  bacteria (in 50 $\mu$ l). For the evaluation of the lung response to *Sp*, mice were sacrificed by cervical dislocation at 12, 24 or 48h post-infection. Bacterial burden was measured by plating serial dilutions of lung extracts (from the middle lobe grinded in 1ml of PBS), broncho-alveolar lavage (BAL) (pure, 1/10 to 1/1000) and blood (1/10 to 1/10000) samples onto chocolate agar plates (Chocolate agar + PolyViteX<sup>TM</sup>, Biomérieux). Colony-Forming Units (CFU) were enumerated 24h later and expressed as CFU/ml. Survival experiments were also performed by measuring the weight loss and the survival in infected mice during 6 days.

### *Treatment of mice with anti-IL-20Rb neutralizing antibody and Isotype control*

Treated animals received the endotoxin-free anti-IL-20Rb neutralizing antibody (clone 20RNTC, 50  $\mu$ g/100 $\mu$ l; eBioscience) by intraperitoneal route, 24 hours before and at day 1 and 3 after *Sp* infection. The 13R4 IgG2a-antibody was used as the isotype control (Evitria).

### *Broncho-alveolar lavage and tissue preparation*

BAL was performed by washing the lungs five times with 0.5 ml of phosphate-buffered saline solution (PBS) plus 2% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). After centrifugation at 400g for 6 min at 4°C, the supernatant (cell-free BAL fluid) was stored at -20°C for cytokine analysis, and the pellet was used for flow cytometry analysis.

The left lobe of the lung were mashed with a sterile blade then digested with collagenase (Collagenase Type VI 17104-019 Gibco by Life technologies) at 37°C. After 15 min of digestion, lungs were homogenized with an 18G needle and digested for 15 min. After centrifugation at 400g 6 min at 4°C, the pellets were resuspended in a 30% Percoll solution (Percoll TM GE Healthcare 17-0891-01) and centrifuged at 500g for 15 min. The pellets were resuspended in red blood cells (RBC) lysis buffer during 5min at 20°C, to remove erythrocytes. The reaction of

RBC lysis was stopped with PBS 2% FBS (Gibco). After centrifugation at 400g for 6 min at 4°C, pulmonary cells were resuspended in PBS 2% FBS, then enumerated and used for flow cytometry.

### ***Flow cytometer reagents***

The cell phenotype on BAL and pulmonary cell suspension were analyzed by flow cytometry using the following antibodies:

Monoclonal antibodies (mAbs) against mouse CD5 (ref130-102-574, FITC-conjugated), Tetramer CD1d (NIH facility, PE-conjugated), NK1.1 (ref 130-103-963, PerCp-Cy5.5-conjugated), CD4 (ref 130-102-411, PE-Cy7-conjugated), CD25 (ref 130-102-550, APC-conjugated), CD69 (ref 561 238, Alexa700-conjugated), TCR $\gamma\delta$  (ref 130-104-016, APC- Vio770 conjugated), TCR- $\beta$  (ref 130-104-815, V450-conjugated), CD8 (ref 130-109-252, V500-conjugated), CD45 (ref BLE103140, BV605-conjugated) (BD Biosciences, Biolegend and Myltenyi Biotech), I-Ab (ref 130-102-168, FITC- conjugated), F4/80 (ref 130-102-422, PE conjugated), CD103 (ref 563 637, PerCP-Cy5.5-conjugated), CD11c (ref 558 079, PE Cy7-conjugated), CD86 (ref 560 581, Alexa-700 conjugated), Ly6G (ref 560 600, APC-H7 conjugated), CD11b (ref 560 455, V450 conjugated), CD45 (ref 130-402-512, V500 conjugated), Ly6C (ref BLE128036, BV605-conjugated) (BD Biosciences, Biolegend and Myltenyi Biotech) and CCR2 (ref FAB 5538A, R&D systems, APC conjugated). Data were acquired on a LSR Fortessa (BD Biosciences) and analysed with FlowJo™ software v7.6.5 (Stanford, CA, USA). Gating strategies are described in supplementary Fig. 1. cDC1 were identified among DC, as CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> cells whereas cDC2 were CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup>.

### ***Lung immunohistochemistry***

For histopathology, the posterior lobe of 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. On these slides, we have measured both lung remodeling and inflammation through the use of lung injury scoring as defined in the supplementary table 1.

For immunohistochemistry, paraffin-embedded lungs sections were deparaffinized into two successive baths of xylene (Acros Organics) during 10 minutes and rehydrated with successive baths of ethanol (successively, two baths of 100%, one bath of 90%, 80% and 50% during 5 minutes for all and one bath of water during 5 minutes). The unmasking of epitope was carried out in pH 6.0 citrate buffer during 15 min at 90 °C. The kit ab80436 – Expose Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (Abcam) was used according to the manufacturer's recommendation for detection of IL-19, IL-20 and IL-24. For IL-20 receptors, Fast Red (SIGMAFAST™ Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablets) is used for revelation. Counterstaining was performed with Hematoxylin (Interchim).

We used as primary antibodies, an anti-IL-19 antibody [EPNCIR168] ab154187 (Abcam); an anti-IL-20 antibody orb13501 (Biorbyt), anti-IL-24 antibody orb228807 (Biorbyt), anti-IL-20Ra antibody bs-2619R (Bioss), anti-IL-20Rb clone 20RNTC (eBiosciences) and an anti-IL-22Ra1 clone 496514 (R&D systems), all at 0.01 mg/ml.

In order to quantify the remodeling within the alveoli, we measured the alveolar wall thickening in the peribronchial area by using the software Image J (NIH). We analyzed at least 10 alveolar walls in the lungs of 4 different mice for each group.

***Cytokine measurement by individual ELISA system kit***

IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-19, and IFN- $\gamma$  (eBiosciences), TNF- $\alpha$  (R&D (Abingdon, UK), IL-20 (Boster Biological Technology) and IL-24 (Elabscience) were determined in BAL and lung homogenates by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using commercial kits according to the manufacturer's recommendations.

***RNA isolation and quantitative RT-PCR***

Total RNA was isolated from homogenized mouse lung (the cranial lobe) using TRIzol<sup>R</sup> Reagent (Ambion) according to manufacturer's instructions and quantified by NanoVue Plus (Healthcare Bio-sciences AB). Reverse transcription (RT) was performed with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. cDNA were subjected to quantitative PCR (QuantStudio 12K Flex Applied Biosystems) using primers for mouse (Supplementary Table 2) (Eurofins Genomics). Relative transcript expression of a gene is given as  $-2^{\Delta\Delta C}$  using GAPDH as a housekeeping gene.

***Statistical analyses***

The experiments evaluating the response to *Sp* infection at 12, 24 and 72h were repeated 3 times with 4–5 mice per group. In addition, two experiments were performed with 10 mice per group for the survival analysis. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Mann-Whitney U analysis and non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns post tests were performed to determine significant differences between groups using GraphPad Prism software version 5.00. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistically significant differences were defined as \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001.

## Results

### Infection with *Sp* initiates a pulmonary inflammatory reaction and triggers septicemia

Mice were infected by intranasal administration of *Sp* (Fig. 1a). Whereas the bacterial counts were unchanged in the BAL at 24 and 48h post-infection (*p.i.*), these numbers were strongly increased at 48h in the lung tissue and the blood as compared to 24h (Fig. 1b). Moreover, total cell numbers were significantly increased in BAL and lungs of infected mice at both time points in comparison to the baseline which was control mice (PBS), associated with neutrophil recruitment (Fig. 1c). The concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IFN- $\gamma$  were significantly increased in the BAL of infected mice particularly at 24h (Fig. 1d). In the lung, the production of these cytokines as well as TNF- $\alpha$  continued to increase until 48h *p.i.* (Fig. 1e). No significant change for these parameters was observed at 12h *p.i.* (data not shown).

### Infection with *Sp* triggers the lung expression of IL-20 cytokines and their receptors

We next investigated the pulmonary amount of IL-20 related cytokines during the course of *Sp* infection. Quantitative RT-PCR analysis indicated enhanced expression of transcripts for *Il-19*, *Il-20* and *Il-24* as well as for *Il-22* at 24h *p.i.*, that decreased at 48h *p.i.* (Fig. 2a). No changes were detected at 12h *p.i.*

Immunohistochemistry staining revealed that IL-20 and IL-24 were nearly undetectable at baseline (PBS condition), whereas airway epithelial cells were strongly positive for IL-19. Infection with *Sp* markedly increased bronchial and peribronchial staining of these cytokines at 24h post-infection. In addition to bronchial epithelial cells, pneumocytes as well as inflammatory cells were positive for these cytokines (Fig. 2b). No staining was reported with the isotype controls as shown in the supplementary figure 2.

Since IL-20 related cytokines were induced after *Sp* infection, we then evaluated the expression of their receptors in the lung tissues of infected mice. In contrast with *Il-22ra* mRNA, expression of *Il-20ra* and *Il-20rb* mRNA were significantly increased in lungs of infected mice at 24h *p.i.*, in comparison to PBS mice. Transcript levels were similar to baseline at 12h and 48h *p.i.* (Fig. 3a). Immunohistochemical analysis revealed the IL-20Ra was strongly expressed by airway epithelial cells at baseline (PBS mice) whereas a light staining was detected for IL-20Rb and IL-22Ra. *Sp* markedly increased bronchial and peribronchial staining of IL-20Rb and with a lower intensity, of IL-22Ra at 24h *p.i.* (Fig. 3b). Some binding was also detected within the inflammatory cells in *Sp* mice. In contrast, the expression of IL-20Ra was unchanged in the airway epithelial cells. Taken together, our data reveals a basal expression for IL-19 and an enhanced expression of IL-20 cytokines in the airways and in the inflammatory peribronchial area early after infection with *Sp*. This is associated with an enhanced expression of IL-20Rb and IL-22Ra mainly in airway epithelial cells whereas IL-20Ra was strongly expressed at baseline and not modulated by the infection.

### Treatment with anti-IL-20Rb antibody decreases the bacterial load and the inflammatory reaction

We next analyzed whether the neutralization of the IL-20Rb sub-unit could affect the outcome of the pulmonary infection by *Sp* (Fig. 4a).

Blocking the IL-20Rb receptor significantly decreased the bacterial burden in the BAL at 24h *p.i.*, and in the BAL



and the lung 48h *p.i* (23% and 38% of inhibition respectively) (Fig. 4b). Treatment with the anti-IL-20Rb antibody also decreased the number of total cells in the BAL at 24h, and in the lung tissues at 48h (Fig. 4c), while there was a trend to decrease the total cell number at the other time point. This was confirmed by the analysis of lung sections. Indeed, histopathological scores exhibited a reduction of lung inflammation and lesions 24h *p.i* (anti-IL-20Rb treated *Sp* mice:  $8.67 \pm 1.58$  vs IgG-treated *Sp* mice:  $13.3 \pm 2.04$ ) and 48h *p.i* (anti-IL-20Rb treated *Sp* mice:  $9.5 \pm 1.41$  vs IgG-treated *Sp* mice:  $13.83 \pm 1.58$ ) compared with uninfected control mice ( $3.4 \pm 0.68$ ). We have also measured the alveolar wall thickness in the three groups and our results showed that *Sp* infection induced a significant thickening in alveolar walls as reported in the supplementary figure 3. Moreover, treatment with the anti-IL-20Rb antibody completely prevent the effect of the infection.

To determine which cell populations were impacted by the treatment, we numbered the major subpopulations of inflammatory cells by flow cytometry. Interestingly, our data revealed that the numbers of neutrophils, and of cDC2 in the BAL were lower in mice treated with anti-IL-20Rb than in infected controls while there was a trend to decrease the number of alveolar macrophages (Fig. 5a). In the lung tissues, treatment with the blocking anti-IL-20Rb antibodies decreased the number of neutrophils and of cDC2 (as well as the total number of DC) at 48h *p.i* (Fig. 5b).

Taken together, blocking the IL-20Rb pathway decreased the bacterial load and the inflammatory cell recruitment (namely of neutrophils and DC) after respiratory infection by *Sp*.

### **Anti-IL-20Rb antibody modulates the production of inflammatory cytokines and anti-microbial peptides**

Since the blockade of the IL-20 pathway altered the inflammatory cell recruitment after infection with *Sp*, the cytokine production was analyzed in the BAL and the lung tissues (Fig. 6).

Treatment using anti-IL-20Rb antibody significantly decreased the concentrations of IL-1 $\beta$  and IL-6 in the BAL collected at 24h *p.i*. in infected mice, in association with a trend for lower levels of IFN- $\gamma$  (Fig. 6a). In the lung tissues, the treatment with the anti-IL-20Rb antibody only reduced IL-1 $\beta$  (Fig. 6b). We also measured the levels of Th17 cytokines in these samples and we did not observe any modulation of the levels for IL-17 protein and IL-22 mRNA after blocking the IL-20 pathway (supplementary Figure 4).

We also checked the impact of the treatment with the anti-IL-20Rb antibody on the expression of IL-20 cytokines themselves and on their receptors. Compared to IgG-treated mice, administration of anti-IL-20Rb antibody reduced the mRNA expression of IL-20 and IL-24 without impacting IL-22 mRNA expression at 24h *p.i*. (Fig. 7). This treatment also affects the expression of IL-20Ra. This was confirmed and extended by the immunohistochemistry analysis. The administration of the anti-IL-20Rb antibody decreased the peribronchial and bronchial expression of IL-19, IL-20 and IL-24 (Fig. 2b), and, IL-20Ra, IL-20Rb, and IL-22Ra (Fig. 3b). It also diminished the expression of IL-20Rb in airway epithelial cells.

We also analyzed the expression of anti-microbial peptides involved in the anti-infectious defense in the lung by RT-PCR. *Sp* infection amplified the expression of *Defb2* and *Defb3* mRNA at 24h *p.i*. (Fig. 6c) but not the expression of *S100a8* and *Lcn2* mRNA (Fig. 6d) as well as *S100a9* mRNA (supplementary Figure 5). Administration of anti-IL-20Rb neutralizing antibody enhanced the *Lcn2* mRNA expression while there was a trend for *S100A8* and *S100a9*, mainly 48h *p.i*. This suggests that IL-20Rb blockade amplifies the expression some antimicrobial peptides which in turn, can facilitate the bacterial clearance.

### **Anti-IL-20Rb antibody did not affect the weight loss and the survival in mice infected by *Sp***

In order to determine the impact of the treatment with anti-IL-20Rb antibody on the evolution of the infection in mice, we analyzed the weight loss and the survival during 6 days. Control mice lose more than 20% of their weight at 4-5 days p.i. and the treatment with anti-IL-20Rb antibody did not affect this drop (supplementary Figure 6). In parallel, some mice died at the same period and once again, the treatment did not significantly modify their survival.

## Discussion

It has been described previously that IL-20 related cytokines and their receptors play a role in promoting *S.aureus* skin infections [14]. Moreover, it is known that IL-20 family cytokines are expressed in lung epithelial cells [18], suggesting their implication in the lung. We have demonstrated that infection by *Sp* promotes the production of mostly IL-19 and IL-20, as well as the expression of IL-20Rb subunit of the receptor. We also showed that the peak of IL-20 cytokine expression was concomitant with an effect of these cytokines on the bacterial clearance and the inflammatory reaction, particularly by decreasing neutrophil and dendritic cell influx. Altogether, we have uncovered a critical role for IL-20 receptors.

*Sp* colonizes the lower respiratory tract via its spreading through the airways. Recognition of bacterial cell wall components of *Sp* (lipoteichoic acids; LTA and peptidoglycan; PG) by Toll-like receptor 2 (TLR2) [19, 20] induces the activation of the canonical nuclear factor (NF)- $\kappa$ B pathway in antigen presenting cells [1]. The activation of this pathway leads to the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ . Our data concerning the evaluation of the inflammation and the cytokines in the BAL and lung tissues of mice validated our experimental model with a production of pro-inflammatory cytokines between 24 and 48h *p.i*. We have shown that IL-20 related cytokines (IL-19, IL-20, and IL-24 as well as IL-22) are induced during this cytokine burst, at 24h *p.i* both at the protein and the mRNA levels. However, the mRNA expression of *Il-19*, *Il-20*, *Il-22*, *Il-24*, *Il-20ra*, *Il-20rb* and *Il-22ra* mRNA nearly returns to baseline levels at 48h *p.i*. whereas these levels were not significantly different to the PBS controls 12h *p.i*. As previously described for the majority of NF- $\kappa$ B dependent cytokines in the lung, the protein expression for these cytokines rapidly declines [8]. Recent data underlines that the production of IL-20 cytokines is dependent on NF- $\kappa$ B [16] and could be induced by TLR2 and TLR4 stimulation, both receptors being mobilized by *Sp* [19, 20]. At the mRNA level, the production of IL-19 and IL-20 is markedly increased, despite no significant effect for IL-24. Interestingly some recent data showed that this cytokine is induced by respiratory viruses suggesting that it could be more associated with viral infection [22]. Interestingly, we detected a strong expression of IL-19 in the bronchial epithelium of control mice whereas we did not detect a difference between the mRNA expression of *Il-19*, *Il-20* and *Il-24* in the lung tissue as well as in bronchial epithelial cell cultures at baseline (data not shown). This suggests that IL-19 is tightly post-transcriptionally regulated and that the protein might be stored within the cytoplasm of these cells. After *Sp* challenge, we detected an increased expression in airway epithelial cells (within the bronchi and the alveoli) as well as in the inflammatory infiltrate. DC and macrophages are able to produce these cytokines and we observed that monocyte-derived DC secretes these cytokines after activation by *Sp* (manuscript in preparation). Of note, using multiple *Sp* inocula in our experiments instead of a lethal dose of *Sp* could have also been informative to better decipher the role of IL-20 cytokines.

It has been shown in a model of cutaneous infection, that IL-20 family cytokines are initially secreted by infiltrating innate immune cells and lymphocytes 24h after challenge [14]. Most research has been focused on IL-22, but we know that during inflammation, IL-19, IL-20 and IL-24, binding to their receptors, induce cell recruitment (neutrophils, dendritic cells and T cells), antimicrobial peptides expression ( $\beta$ -defensin or S100A peptides) as well as chemokines and cytokines production [16]. Among the cytokines produced, the binding of IL-20 related cytokines to their receptors allow a positive autocrine loop expression of IL-19, IL-20 and IL-24, which amplify their effect during inflammation [16, 23]. Our data showing that neutralization of IL-20Rb subunit decreases the expression of IL-20 family cytokines (IL-19, IL-20 and IL-24) and their receptors could potentially be explained

by an autocrine loop. Interestingly, the inflammatory cell recruitment (specifically, neutrophils and DC as well as AM in the BAL) due to *Sp* infection is reduced after blocking the IL-20 pathway suggesting that this process might also participate in the lower level IL-20 cytokine expression. Moreover, this decreased recruitment was associated with a lower production of pro-inflammatory cytokines like IL-1 $\beta$ , IL-6 and IFN- $\gamma$ . Indeed, inflammatory cells are potential sources for these cytokines. Myles et al. reported that IL-20 related cytokines promote cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice by downregulating the Th17 cytokines-dependent pathway [14]. Since we are unable to detect an increased production of IL-17/IL-22 and pro-Th17 cytokines (such as IL-1 $\beta$  and IL-6) in lung tissues of *Sp* mice treated with anti-IL-20Rb neutralizing antibody, we speculate that IL-20 family cytokines boost the anti-bacterial activity of these effector cells as shown *in vitro* in neutrophils [15]. Indeed, blocking IL-20Rb pathway promotes bacterial clearance in BAL and lung of treated mice, although it decreases the influx of neutrophils and macrophages. Additional experiments are required to analyze the effector function within these cells in infected mice treated with the anti-IL-20Rb blocking antibody. The treatment with the anti-IL-20Rb antibody also amplifies the mRNA expression of selected antimicrobial peptides including *Lcn2* while there was a trend for *S100a8* mRNA. Administration of the anti-IL-20Rb antibody did not modulate the  $\beta$ -defensin mRNA expression (*Defb2*, *Defb3*) which are usually produced by pulmonary epithelial cells and neutrophils during *Sp* infection [24]. Interestingly, it has been shown that S100 anti-microbial peptides (expressed by neutrophils, monocytes and activated endothelial and epithelial cells) control bacterial clearance by inducing lung recruitment of neutrophils and macrophages during *Sp* infection [25, 26]. *Lcn2*-deficient animals also exhibit higher susceptibility to infection compared to control animals [27].

The understanding of the mechanisms underlying the beneficial effects of the treatment using anti-IL-20Rb antibody is ongoing and will be helpful to limit pulmonary bacterial infections. Interestingly, this effect is associated with a lower histopathological score measuring both the inflammation and the airway remodeling as illustrated in the figures 2b and 3b, a result confirmed at the level of neutrophils, dendritic cells and macrophages by flow cytometry analysis. However, this effect was not associated with a significant impact on mice survival and loss weight which is prominent after day 3 *p.i.* This is probably related to the drop in the production of IL-20 cytokines observed at day 2 *p.i.* in our acute model of infection. These data suggest that it is necessary to associate this treatment with another therapeutic approach such as antibiotic, in order to improve the efficiency of the anti-IL-20Rb blocking antibody.

In conclusion, we show that IL-20 related cytokines and their receptors are induced during *Sp* lung infection and that the treatment using an anti-IL-20Rb neutralizing antibody limits inflammation due to *Sp*. Moreover, combined treatment of lung infection associating a molecule blocking the IL-20 pathway with antibiotics might be helpful to accelerate bacterial clearance and to prevent the tissue lesions associated with uncontrolled inflammation.

## References

- [1] Dockrell DH, Whyte MKB, Mitchell TJ. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. *Chest*. 2012;142:482-91.
- [2] van Lieshout MHP, de Vos AF, Dessing MC, de Porto A, de Boer OJ, de Beer R, et al. ASC and NLRP3 impair host defense during lethal pneumonia caused by serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Eur J Immunol*. 2018;48:66-79.
- [3] Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2008;359:2355-65.
- [4] Xu F, Droemann D, Rupp J, Shen H, Wu X, Goldmann T, et al. Modulation of the inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in a model of acute lung tissue infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;39:522-9.
- [5] Zhang L, Li Z, Wan Z, Kilby A, Kilby JM, Jiang W. Humoral immune responses to *Streptococcus pneumoniae* in the setting of HIV-1 infection. *Vaccine*. 2015;33:4430-6.
- [6] Eidenschenk C, Rutz S, Liesenfeld O, Ouyang W. Role of IL-22 in microbial host defense. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:213-36.
- [7] Le Rouzic O, Kone B, Kluza J, Marchetti P, Hennegrave F, Olivier C, et al. Cigarette smoke alters the ability of human dendritic cells to promote anti-*Streptococcus pneumoniae* Th17 response. *Respir Res*. 2016;17:94.
- [8] Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov S, 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.
- [9] Pichavant M, Sharan R, Le Rouzic O, Olivier C, Hennegrave F, Remy G, et al. IL-22 Defect During *Streptococcus pneumoniae* Infection Triggers Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *EBioMedicine*. 2015;2:1686-96.
- [10] Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:1108-11.
- [11] Kunz S, Wolk K, Witte E, Witte K, Doecke WD, Volk HD, et al. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Exp Dermatol*. 2006;15:991-1004.
- [12] Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:71-109.
- [13] Wegenka UM. IL-20: biological functions mediated through two types of receptor complexes. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:353-63.
- [14] Myles IA, Fontecilla NM, Valdez PA, Vithayathil PJ, Naik S, Belkaid Y, et al. Signaling via the IL-20 receptor inhibits cutaneous production of IL-1beta and IL-17A to promote infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Immunol*. 2013;14:804-11.
- [15] Gough P, Ganesan S, Datta SK. IL-20 Signaling in Activated Human Neutrophils Inhibits Neutrophil Migration and Function. *J Immunol*. 2017;198:4373-82.
- [16] Rutz S, Wang X, Ouyang W. The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:783-95.
- [17] 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;78:4226-33.
- [18] Gong W, Wang X, Zhang Y, Hao J, Xing C, Chu Q, et al. Interleukin-20 promotes airway remodeling in asthma. *Inflammation*. 2014;37:2099-105.
- [19] Dessing MC, Hirst RA, de Vos AF, van der Poll T. Role of Toll-like receptors 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice. *PLoS One*. 2009;4:e7993.
- [20] Tomlinson G, Chimalapati S, Pollard T, Lapp T, Cohen J, Camberlein E, et al. TLR-mediated inflammatory responses to *Streptococcus pneumoniae* are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins. *J Immunol*. 2014;193:3736-45.
- [21] Zahlten J, Steinicke R, Bertrams W, Hocke AC, Scharf S, Schmeck B, et al. TLR9- and Src-dependent expression of Krueppel-like factor 4 controls interleukin-10 expression in pneumonia. *Eur Respir J*. 2013;41:384-91.
- [22] Seong RK, Choi YK, Shin OS. MDA7/IL-24 is an anti-viral factor that inhibits influenza virus replication. *J Microbiol*. 2016;54:695-700.
- [23] Sakurai N, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Hiramatsu N, Maeshima A, Kaneko Y, et al. Expression of IL-19 and its receptors in RA: potential role for synovial hyperplasia formation. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:815-20.
- [24] Scharf S, Zahlten J, Szymanski K, Hippenstiel S, Suttorp N, N'Guessan PD. *Streptococcus pneumoniae* induces human beta-defensin-2 and -3 in human lung epithelium. *Exp Lung Res*. 2012;38:100-10.
- [25] De Filippo K, Neill DR, Mathies M, Bangert M, McNeill E, Kadioglu A, et al. A new protective role for S100A9 in regulation of neutrophil recruitment during invasive pneumococcal pneumonia. *Faseb J*. 2014;28:3600-8.
- [26] 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;180:3366-74.  
[27] Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature.* 2004;432:917-21.

### **Acknowledgements**

We thank Fiordiliegia Casilag for proofreading. We also thank the Bio Imaging Center platform (Bicel) for the microscopy and flow cytometry part, especially Sophie Salome-Desnoullez and Hélène Bauderlique. We would also like to thank the animal Biosafety Level-2 facility, in strict accordance with Lille Pasteur Institute guidelines on animal care. We also thank Oncovet Clinical Research for the histological analysis of lung sections.

### **Funding Sources**

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), INSERM-transfert (Paris, France), the University of Lille and Fondation du Souffle (Paris, France). Funders had no role in study design, data collection, data analysis, interpretation, and writing of the report.

### **Declaration of interests**

All the authors have no conflict of interests.

### **Author contributions**

F.M. & O.B worked together for all experiments. GK performed colony-forming units (CFU) experiments. P.G & M.P. participated to the experiments and supervised the project with FT. The manuscript was written by F.M and O.B under the supervision of P.G. and M.P.

### Figure legends

**Figure 1:** Infection with *Streptococcus pneumoniae* induces a pro-inflammatory response and bacterial dissemination in the blood.

All data were represented at 24 and 48 hours post-infection with *S. pneumoniae* (*Sp*,  $2.10^6$  CFU). **(a)** Protocol of infection by *Sp*. **(b)** Bacterial load in BAL, lung tissues and blood as CFU counts per mL. **(c)** Total cell count in BAL and lung tissues (obtained from the middle right lobe), and neutrophils (PMN) number in lung tissue evaluated by flow cytometry. **(d-e)** IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  levels in BAL **(d)** and lung lysates (the cranial lobe) **(e)**, evaluated by ELISA (pg/mL). Results were expressed as mean  $\pm$  SEM and statistical analyses were performed by Mann-Whitney U analysis and non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns posttest in comparison with PBS control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . Three independent experiments have been performed with 4-5 mice in each group.

**Figure 2:** *Streptococcus pneumoniae* infection triggers IL-20 cytokine expression in the lung.

Lungs from PBS group and from mice infected with *S. pneumoniae* (*Sp*,  $2.10^6$  CFU) were collected at 12, 24 and 48h p.i.. **(a)** *Il-19*, *Il-20*, *Il-22* and *Il-24* mRNA levels were evaluated by RT-qPCR in lung tissue (the cranial lobe) of *Sp* infected mice and controls. Results were expressed as fold increase compared to the mice exposed to PBS and using expression of *Gapdh* as a housekeeping gene. **(b)** Expression of IL-19, IL-20 and IL-24 was evaluated on lung sections by immunohistochemistry (magnification x200) at 24h p.i. Lung sections were prepared from not infected mice (PBS), mice infected with *Sp* and infected with *Sp* and treated by anti-IL-20Rb antibody (*Sp* + anti-IL-20). Results were expressed as mean  $\pm$  SEM and statistical analyses were performed by Mann-Whitney U analysis and non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns posttest in comparison with PBS controls, or with *Sp* at 48h p.i. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ . Three independent experiments have been performed with 4-5 mice in each group.

**Figure 3:** Expression of L-20 receptors in amplified in lungs from mice infected with *Streptococcus pneumoniae*.

Lungs from PBS group and from mice infected with *S. pneumoniae* (*Sp*,  $2.10^6$  CFU) were collected at 12, 24 and 48h p.i.. **(a)** *Il-20ra*, *Il-20rb* and *Il-22ra* mRNA levels in lung tissue of *Sp* infected mice were evaluated by RT-qPCR in lung tissue of *Sp* infected mice and controls. Results were expressed as fold increase compared to the mice exposed to PBS and using expression of *Gapdh* as a housekeeping gene. **(b)** Expression of the IL-20Ra, IL-20Rb and IL-22Ra was evaluated by immunohistochemistry (magnification x200) on lung sections collected at 24h p.i. Lung sections were prepared from not infected mice (PBS), mice infected with *Sp* (*Sp*) and infected with *Sp* and treated by anti-IL-20Rb antibody (*Sp* + anti-IL-20). Results were expressed as mean  $\pm$  SEM and statistical analyses were performed by Mann-Whitney U analysis and non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns posttest in comparison with PBS controls. \* $P < 0.05$ , and \*\* $P < 0.01$ . Three independent experiments have been performed with 4-5 mice in each group.

**Figure 4: Anti-IL-20Rb neutralizing antibody increases bacterial clearance in *Streptococcus pneumoniae* - infected mice and limits the inflammatory reaction.**

(a) Protocol of infection by *Sp* and treatment with anti-IL-20Rb neutralizing antibody or the isotype control. (b) CFU counts per mL in BAL, lung tissues (middle lobe) and blood 24h p.i. (c) Total cell count in BAL and lung tissues (left lobe). Results were expressed as mean  $\pm$  SEM and statistical analyses were performed by Mann-Whitney U analysis and non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns posttest in comparison with PBS controls or with *Sp* + IgG. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001. Three independent experiments have been performed with 4-5 mice in each group.

**Figure 5: Anti-IL-20Rb neutralizing antibody limits cell infiltration in BAL and lung of treated mice.**

Natural Killer T (NKT) cells, polymorphonuclear neutrophils (PMN), alveolar macrophages (AM), dendritic cells (DC), and resident DC (cDC1) and inflammatory DC (cDC2) were numbered by flow cytometry in the BAL (a) and the lung tissues (b) at 24h p.i. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM of absolute numbers calculated using the corresponding total cell counts. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM and statistical analyses were performed by Mann-Whitney U analysis and non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns posttest in comparison with PBS controls, or with *Sp* + IgG. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001. Three independent experiments have been performed with 4-5 mice in each group.

**Figure 6: Anti-IL-20Rb neutralizing antibody modulates the production of pro- inflammatory cytokines and anti-microbial peptides.**

(a-b) IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  levels evaluated by ELISA (pg/mL) in BAL (a) and lung lysates (b) 24h p.i. (c-d) mRNA level of the antimicrobial peptides  $\beta$ -defensins (*Defb2* and *Defb3*) (c) and S100a8 and lipocalin-2 (*lcn2*) (d) were evaluated by RT-qPCR in lung tissues (cranial lobe) at 24h p.i. Results were expressed as fold increase compared to the mice exposed to PBS and using expression of GAPDH as a housekeeping gene. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM and statistical analyses were performed by Mann-Whitney U analysis and non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns posttest in comparison with PBS controls, or with *Sp* + IgG. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001. Three independent experiments have been performed with 4-5 mice in each group.

**Figure 7: Anti IL-20Rb neutralizing antibody reduces the expression of IL-20 cytokines and their receptors in the lung of *Streptococcus pneumoniae* -infected mice.**

mRNA levels of the IL-20 related cytokines (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24) and their receptors (IL-20Ra, IL-20Rb and IL-22Ra) in lung tissue of mice infected with *Sp* evaluated by RT-qPCR. Results were expressed as fold increase compared to the mice exposed to PBS and using expression of GAPDH as a housekeeping gene. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM and statistical analyses were performed by Mann-Whitney U analysis and non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunns posttest in comparison with PBS controls, or with *Sp* + IgG. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001. Three independent experiments have been performed with 4-5 mice in each group.



Figure 1

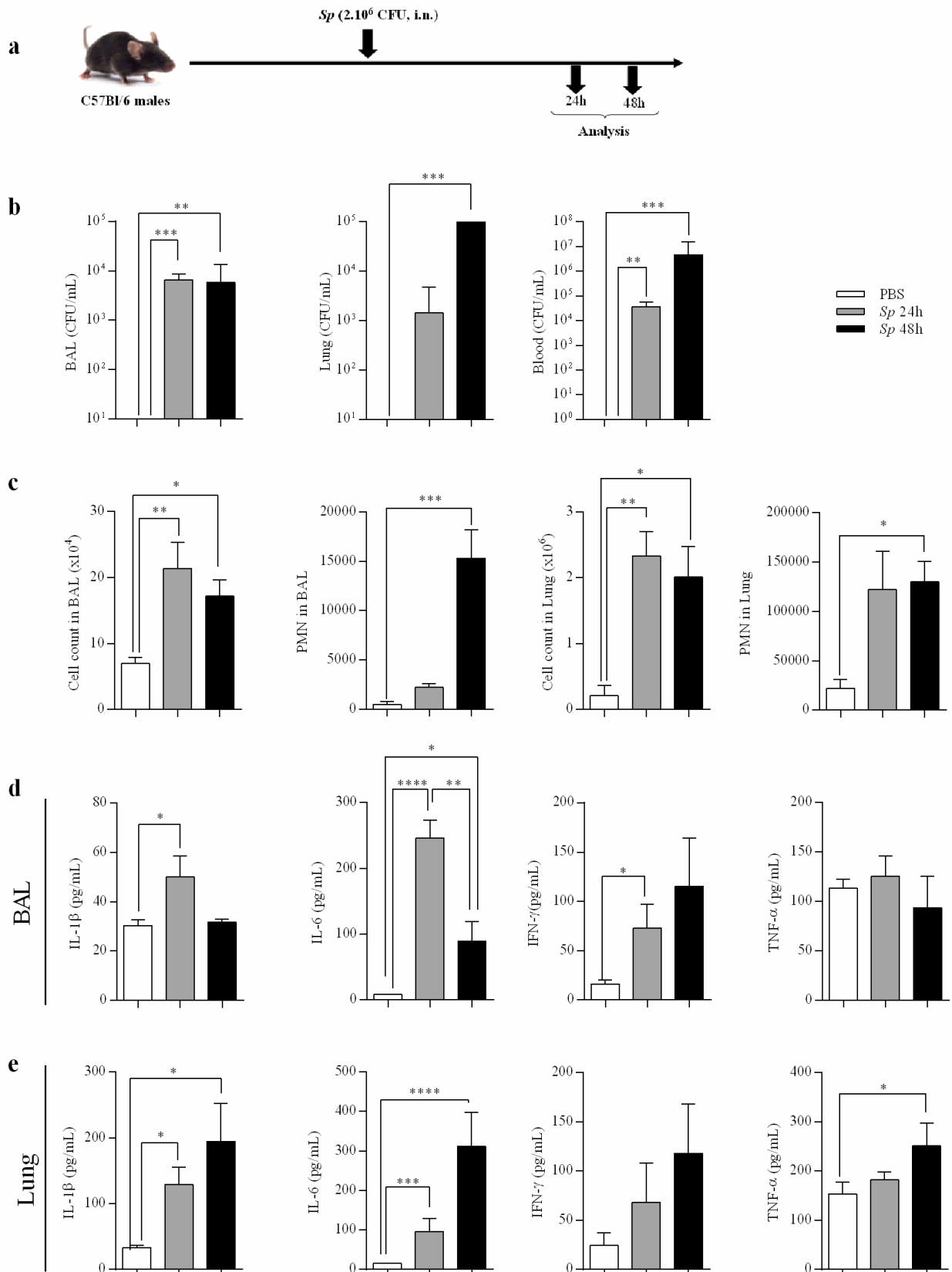


Figure 2

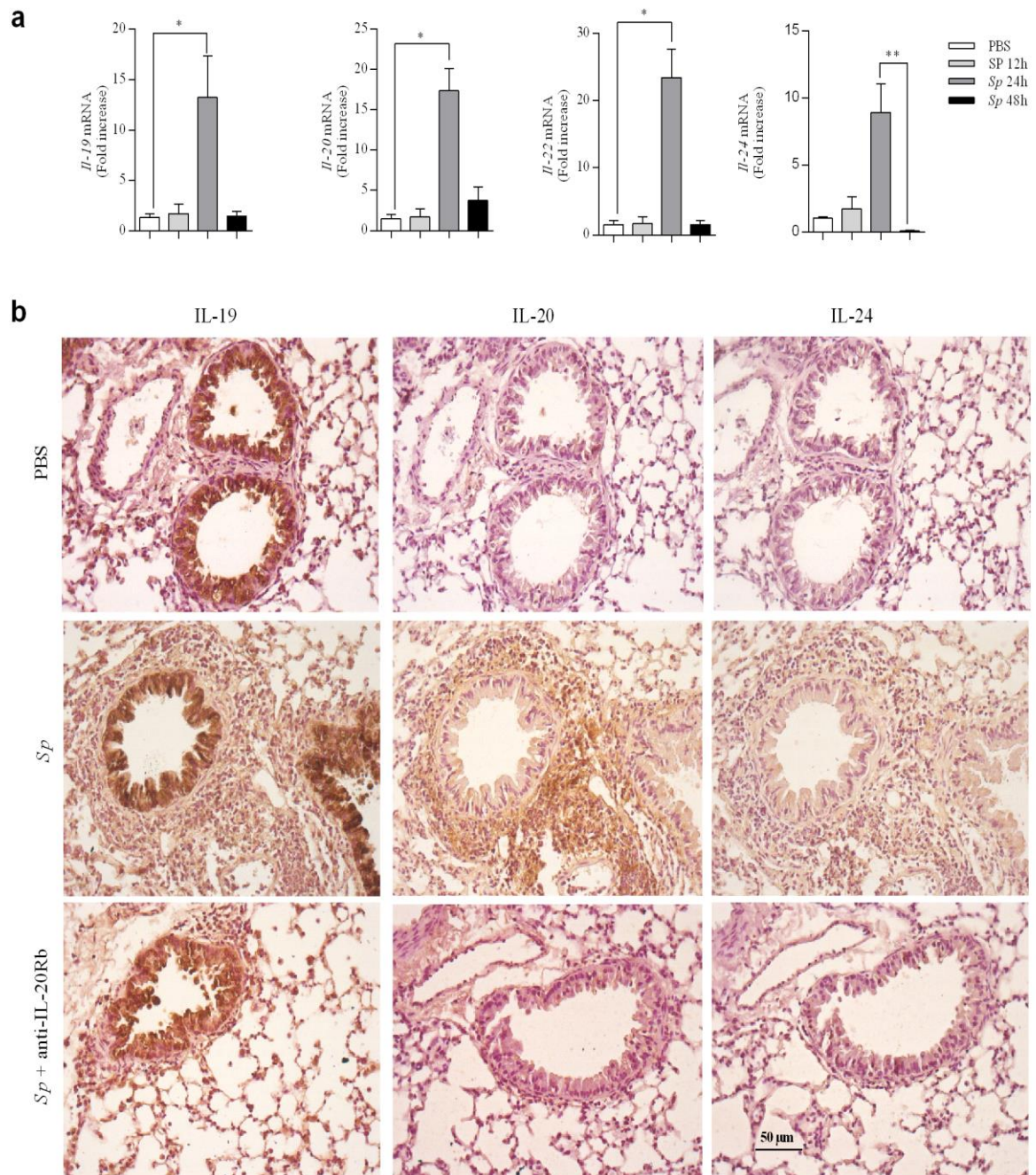


Figure 3

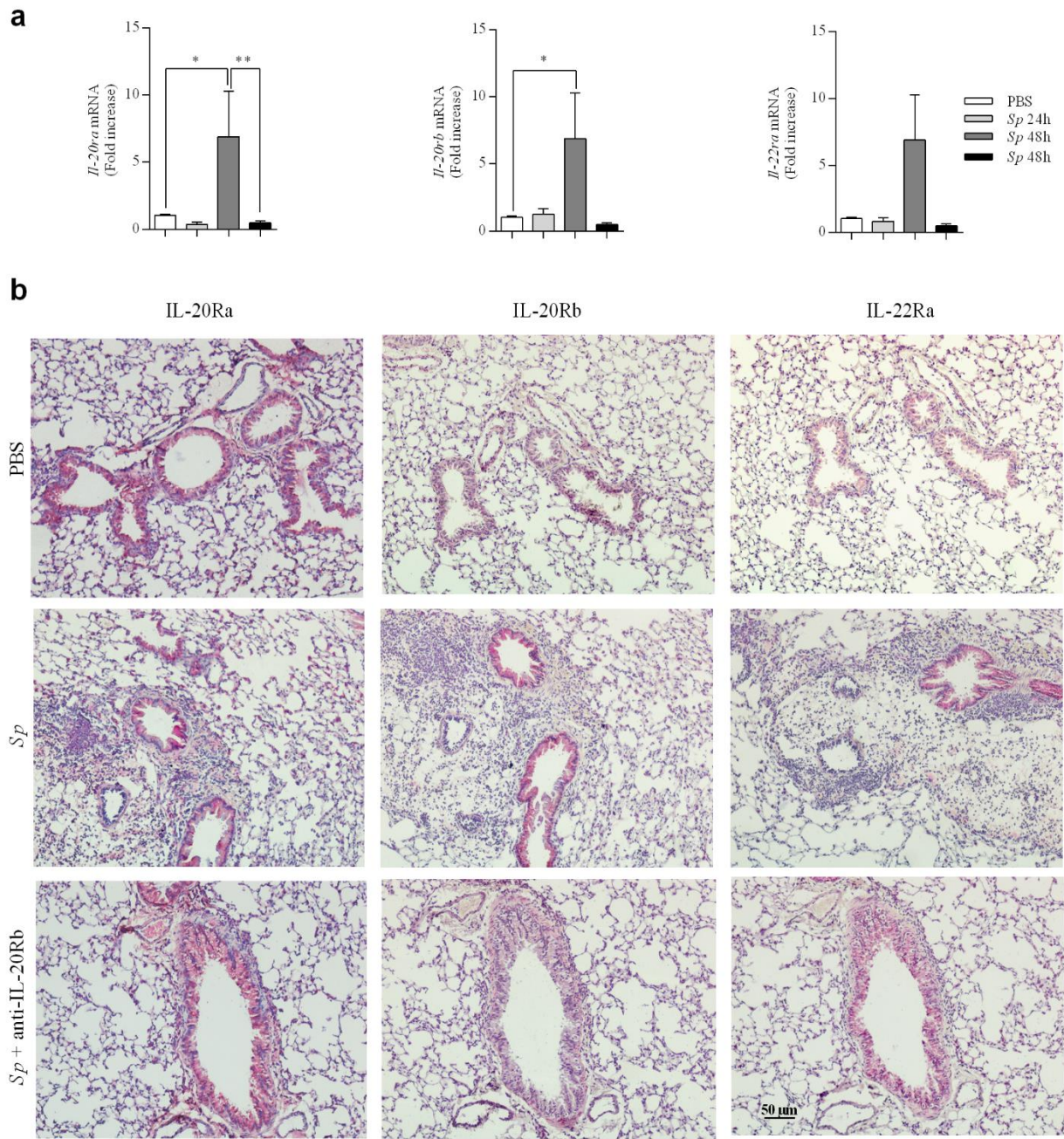


Figure 4

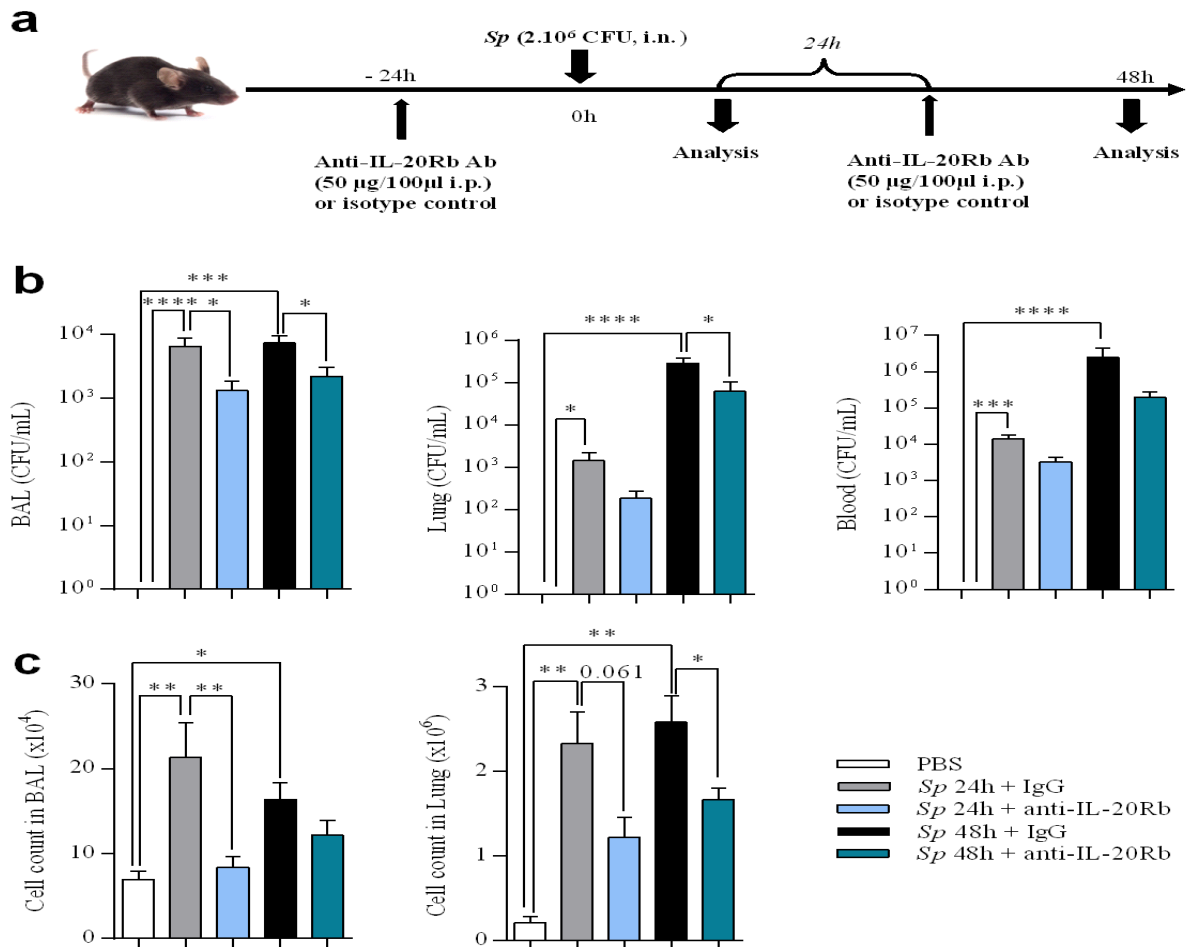


Figure 5

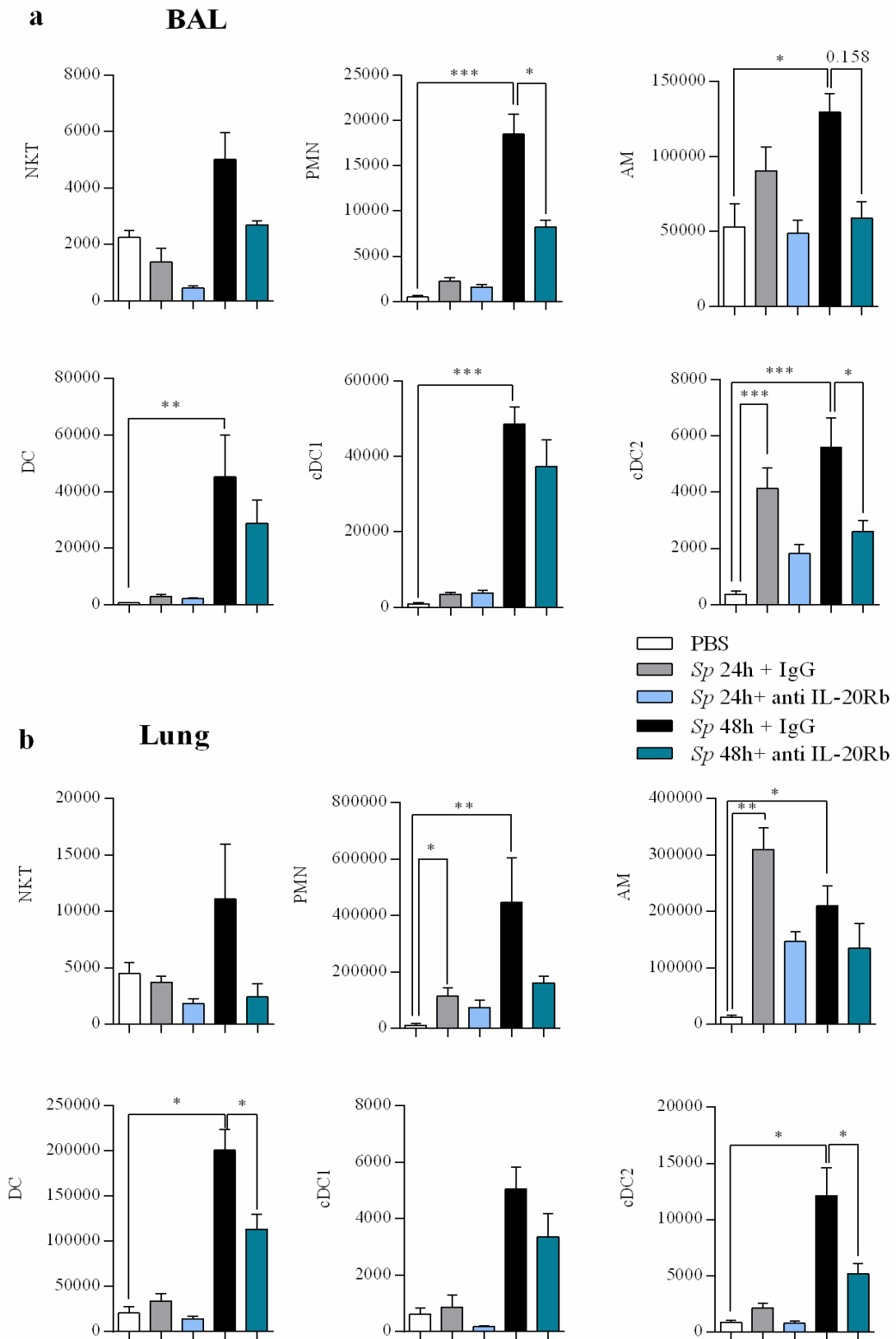


Figure 6

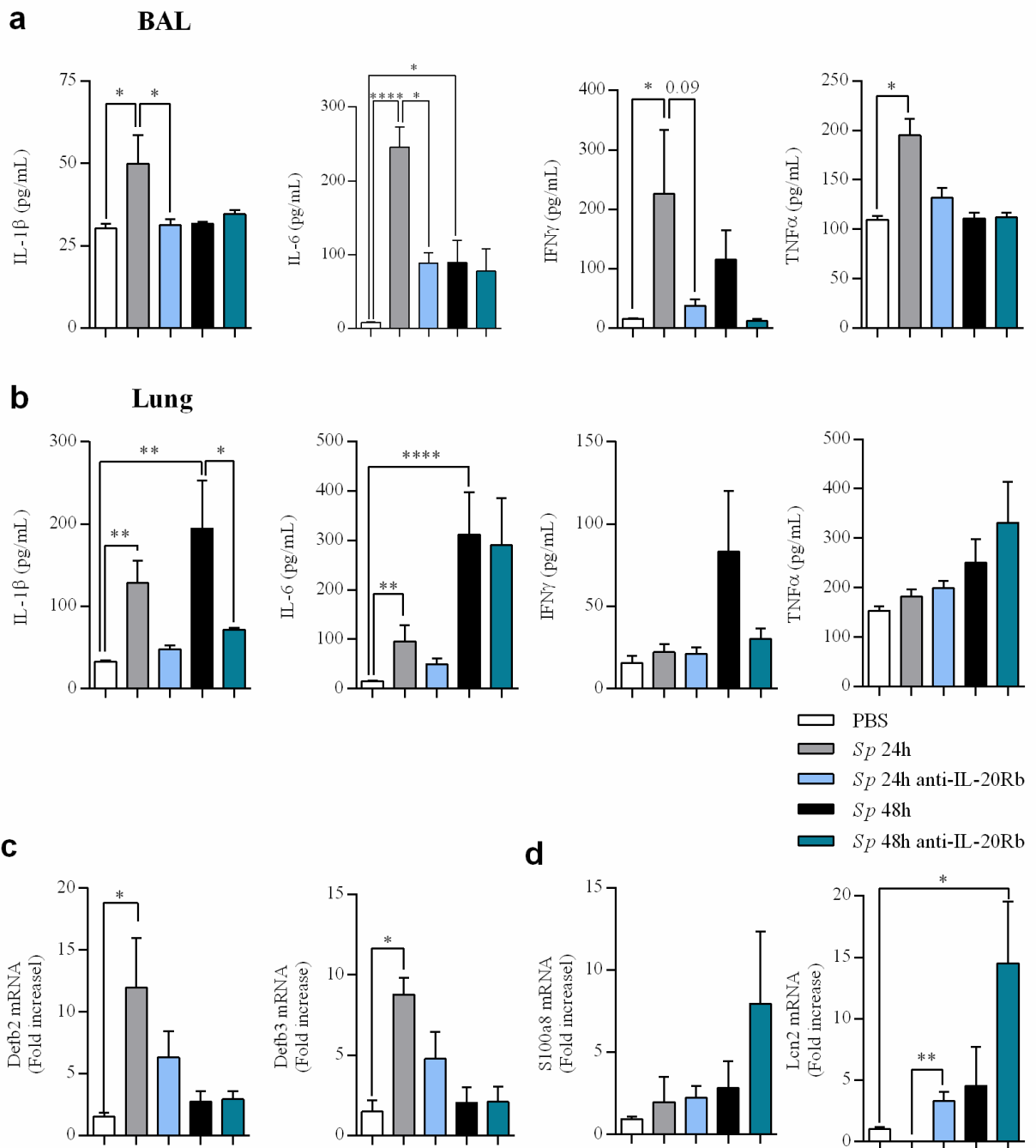
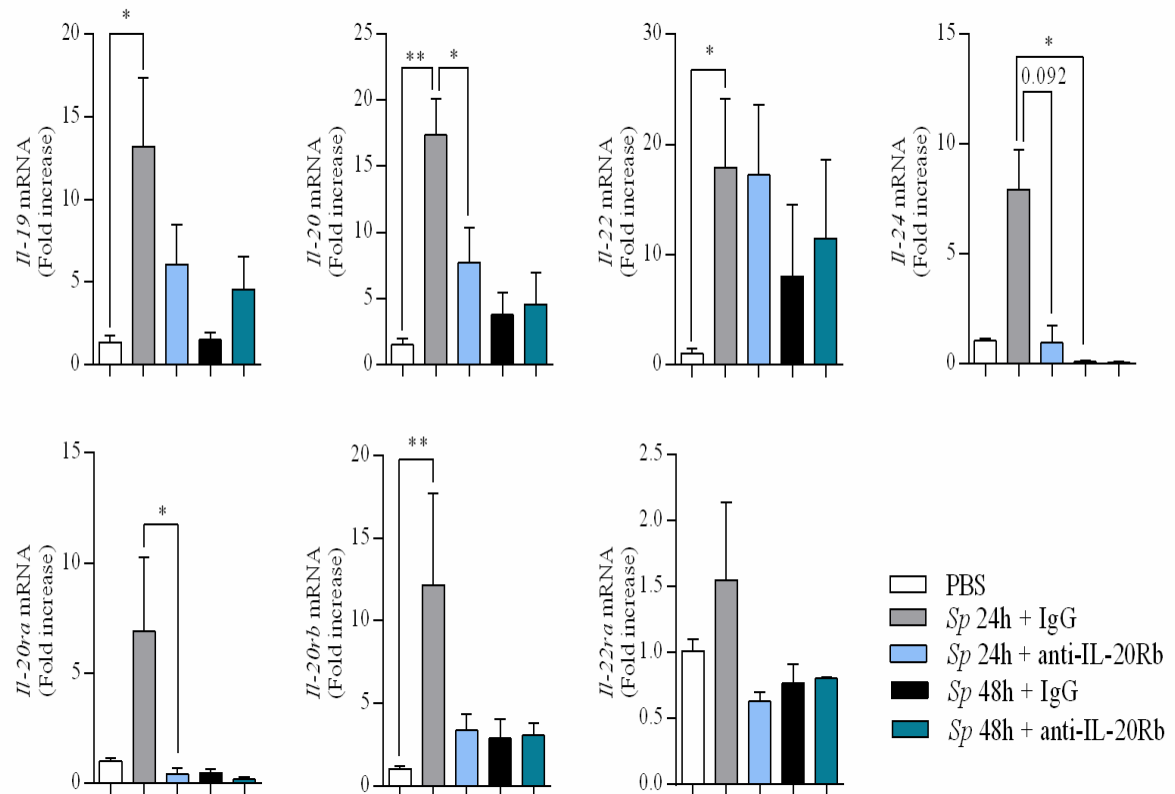


Figure 7



**Table 1: Number of cells expressing IL-20 related cytokines and their receptors in peribronchial area from lung sections**

Immunohistological staining of IL-20 related cytokines (IL-19, IL-20, and IL-24) and their receptors (IL-20Ra, IL-20Rb, IL-22Ra) were performed on lung tissues of PBS - , *Sp* – infected mice and *Sp* - infected mice treated with the anti-IL-20Rb neutralizing antibody. Bronchial epithelial cells were not included in the count since most of them are positive particularly for IL-19 and IL-20Ra. The results are expressed as the mean number per mm<sup>2</sup> of positive cells in 3 to 5 fields with standard deviation.

	IL-19	IL-20	IL-24	IL-20Ra	IL-20Rb	IL-22Ra
PBS	24.8 ± 2.3	9.6 ± 1.6	13.9 ± 1.5	70.6 ± 5.2	33.2 ± 11.9	31.4 ± 4.8
<i>Sp</i>	84.4 ± 1.0	55.4 ± 5.9	64.5 ± 28.2	85.3 ± 2.3	51.9 ± 3.2	85.3 ± 2.3
<i>Sp</i> + anti-IL20Rb	62.9 ± 5.3	32.9 ± 5.5	56.5 ± 3.2	42.8 ± 9.8	25.3 ± 7.9	15.6 ± 2.1



**Production of IL-20 cytokines limits bacterial clearance and lung inflammation during infection by *Streptococcus pneumoniae*.**

Fahima Madouri<sup>1, 2, 3, 4\*</sup>, Olivia Barada<sup>1, 2, 3, 4\*</sup>, Gwenola Kervoaze<sup>1, 2, 3, 4</sup>, François Trottein<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Muriel Pichavant<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Philippe Gosset<sup>1, 2, 3, 4</sup>

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

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

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

<sup>4</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, 59019 Lille, France  
CHRU de Lille, 59000 Lille, France

\* Equal contribution for both authors

**Short title:** IL-20 cytokines in pneumonia

**Supplementary Tables and Figures**

**Supplementary Table 1:** Lung injury scoring.

The cumulative score ranged from 0 to 30 was evaluated in a blind fashion.

Lung injury	Score				
Scale	0	1	2	3	4
Extent of lung injury	Absence	<25 %	26 to 50 %	51 to 75 %	>75 %
Alveolar wall thickness	≤ 1 rbc	> 1 ≤ 2 rbc	3 to 5 rbc	6 to 10 rbc	> 10 rbc
Hyaline membranes	Absence	Presence	NA	NA	NA
Neutrophilic alveolitis	Absence	<10 neutrophils/HPF	10 to 20 / HPF	21 to 50 / HPF	> 50 / HPF
Suppuration	Absence	Presence	NA	NA	NA
Bronchial epithelial degeneration	Absence	Presence	NA	NA	NA
Neutrophilic peribronchitis	Absence	<10 neutrophils/HPF	10 to 20 / HPF	21 to 50 / HPF	> 50 / HPF
Lymphohistiocytic peribronchitis	Absence	<10 mononuclear cells/HPF	10 to 20 / HPF	21 to 50 / HPF	> 50 / HPF
Vasculitis	Absence	Presence	NA	NA	NA

Abbreviations: rbc: red blood cell; HPF: high power field; NA: not applicable

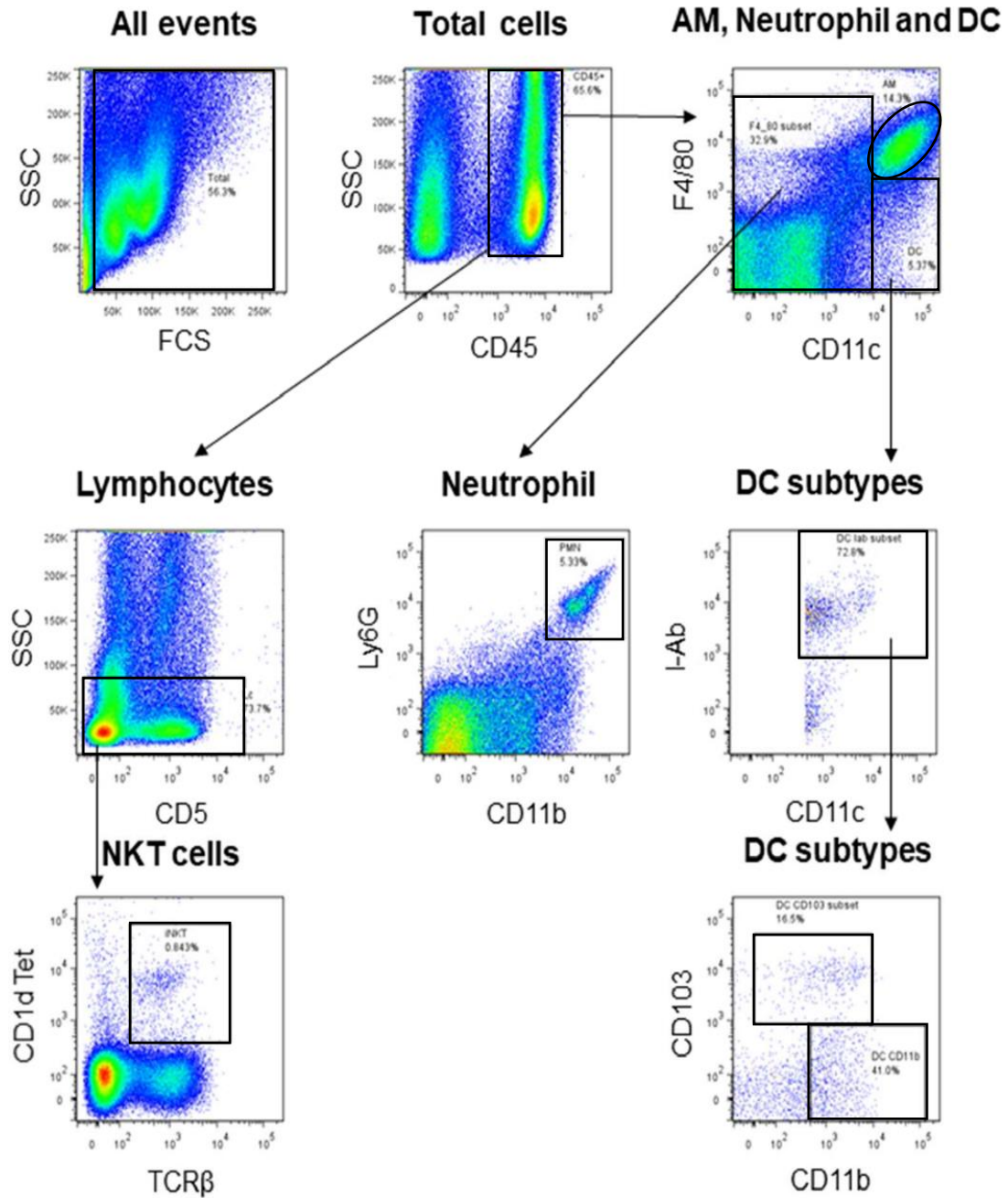
**Supplementary Table 2:** Sequence of primer used for RT-qPCR

Forward and reverse sequences of primer used during RT-qPCR experiment are represented in this table.

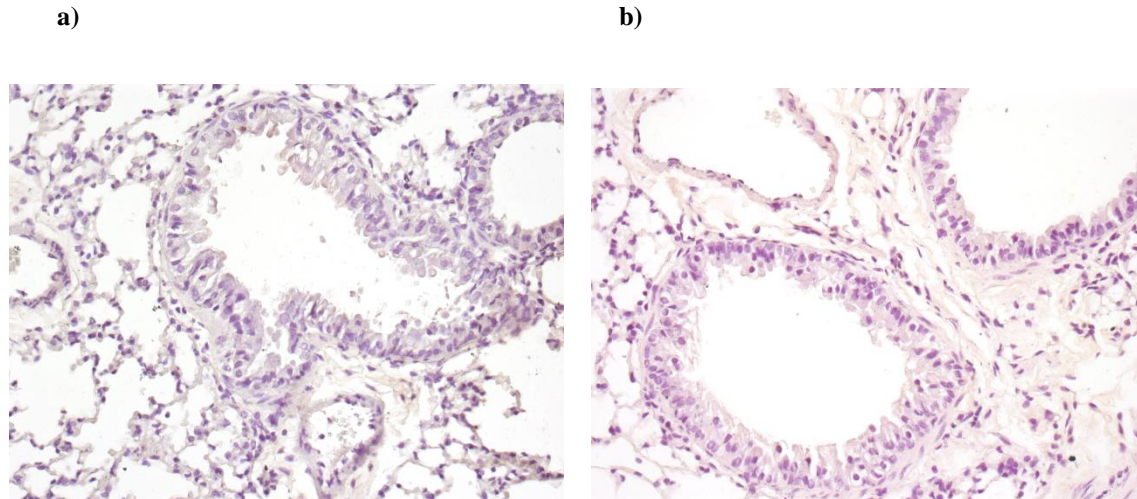
Target	Primer	Sequence
Mouse GAPDH	Forward	5'-TGTTTCCTCGTCCCGTAGACAA
	Reverse	5'-GGCAACAATCTCCACTTTGCC
Mouse IL-19	Forward	5'-TGGTGCTGCATGACCAACAA
	Reverse	5'-GGCAATGCTGCTGATTCTCCT
Mouse IL-20	Forward	5'-TCTGCTTTGGACTGTTCTCC
	Reverse	5'-GTTTGCAGTAATCACACAGCTTC
Mouse IL-22	Forward	5'-AGCCGGACGTCTGTGTTGTTA
	Reverse	5'-TTGAGGTGTCCAACCTCCAGCA
Mouse IL-24	Forward	5'-CCACTCTGGCCAACAACCTTCAT
	Reverse	5'-TCTGCGGAACAGCAAAAACC
Mouse IL-20Ra	Forward	5'-CTGGCCGCTTCGGGACGC
	Reverse	5'-AACCACAGACACAAGGAACTG
Mouse IL-20Rb	Forward	5'-CAGGTGCTTCCAGTCCGTCT
	Reverse	5'-CTCTCCTGGAATCCCCAAAGT
Mouse IL-22Ra	Forward	5'-ATATTGTCCAAGGAAAGTGCCC
	Reverse	5'-AGCCGACGAGGAAACCCAT

**Supplementary Figure 1:**

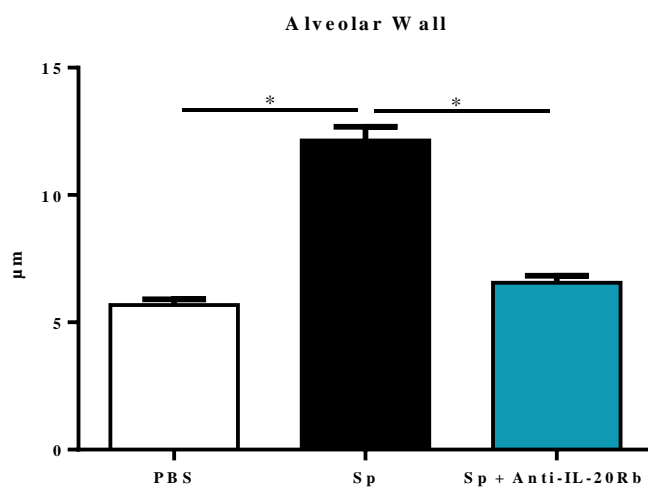
Gating strategy in order to identify NKT cells, Alveolar macrophages (AM), neutrophils and dendritic cells (DC) (Cdc1 (DC CD11b<sup>+</sup>) and cDC2 (DC CD103<sup>+</sup>)).



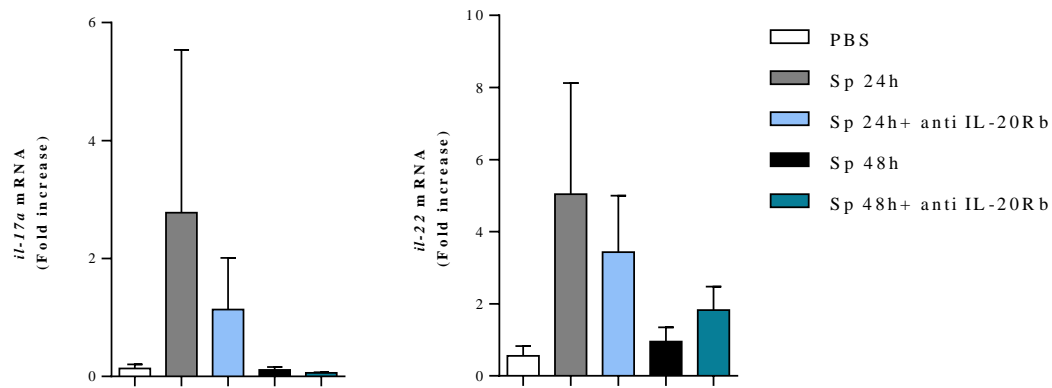
**Supplementary Figure 2: Lack of staining was obtained with the isotype control.** Lung sections were evaluated by immunohistochemistry a) with the isotype control for the antibodies against the cytokines and b) with the isotype control for the antibodies against the receptors (magnification x200) on lung collected at 24h after the challenge. These samples were prepared from not infected mice (PBS).



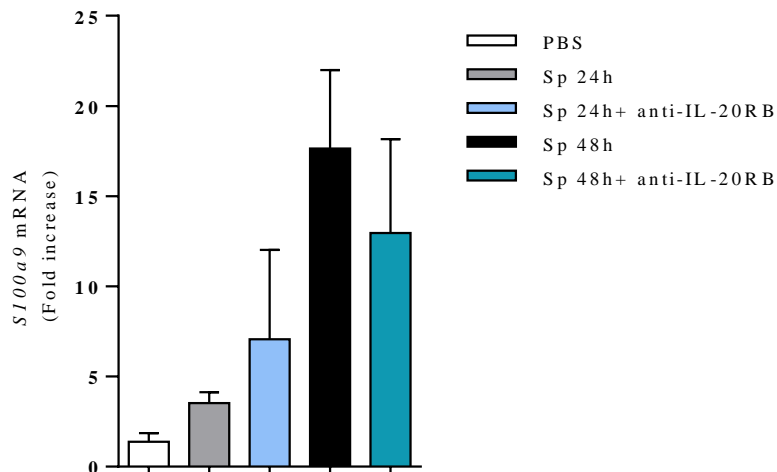
**Supplementary Figure 3: Treatment with the anti-IL-20Rb antibody completely prevent the alveolar wall thickening in mice infected by *Sp*.** We have measured the alveolar wall thickness in control mice (PBS) as well as in mice infected with *Sp* treated or not with the anti-IL-20Rb antibody. Alveolar wall thickening was measured in the peribronchial area by using the software Image J (NIH). We analyzed at least 10 alveolar walls in the lungs of 4 different mice for each group.



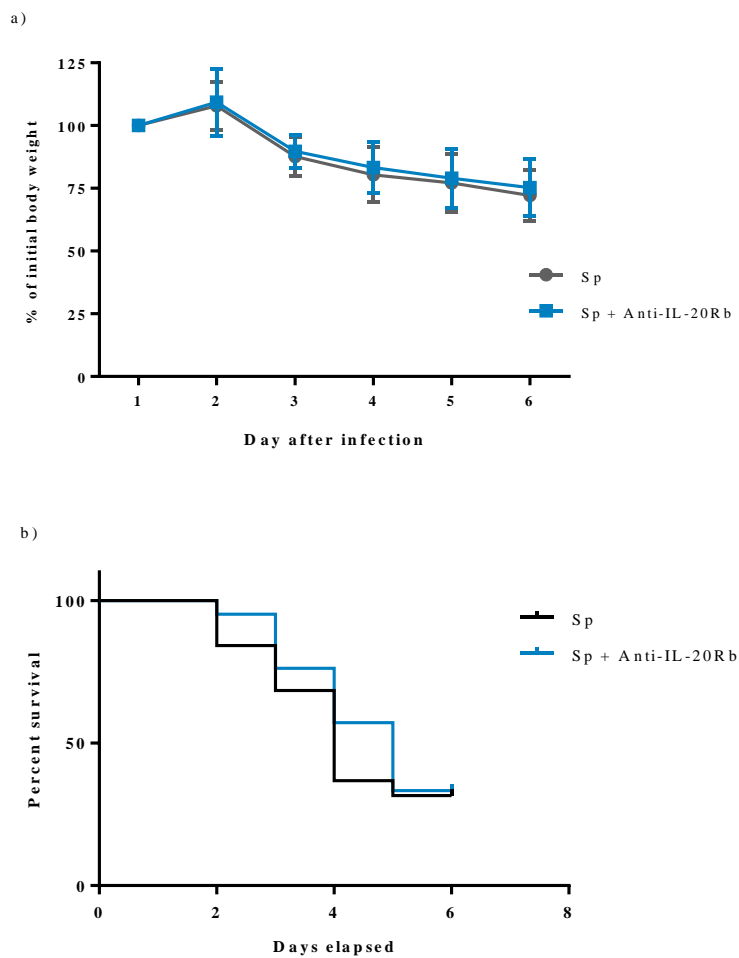
**Supplementary Figure 4 : Anti-IL-20Rb neutralizing antibody did not modulate the production of IL-17 and IL-22.** mRNA level for the cytokines IL-17 and IL-22 were evaluated by RT-qPCR in lung tissue at 24h *p.i.* Results were expressed as fold increase compared to the mice exposed to PBS and using expression of GAPDH as a housekeeping gene. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. There was no significant difference between each group.

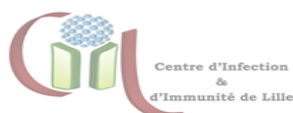


**Supplementary Figure 5 : Anti-IL-20Rb neutralizing antibody did not modulate the production of S100A9** mRNA level for the antimicrobial peptide S100A9 were evaluated by RT-qPCR in lung tissue at 24h *p.i.* Results were expressed as fold increase compared to the mice exposed to PBS and using expression of GAPDH as a housekeeping gene. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. There was no significant difference between each group.



**Supplementary Figure 6: Treatment with the anti-IL-20Rb antibody did not affect the weight loss and the survival in mice infected by *Sp*.** a) the weight was measured during 6 days after the infection and the results were expressed as the percentage of the initial weight. b) the percentage of the surviving mice was reported in the same experiments. The experiment was repeated 2 times with ten mice per group. There was no significant difference between each group.





Inserm

Université  
de Lille

**Lung Infection and Innate Immunity (LI3). Team 12**  
**Center of Infection and Immunity of Lille- CIIL**  
**INSERM U 1019 - CNRS UMR 8204**  
**Institut Pasteur de Lille**  
**Dr Philippe Gosset**

Tel : (33) 320 87 79 65

E-mail : Philippe.Gosset@pasteur-lille.fr

Lille, le 16 Aout 2018

Madame, Monsieur,

Par la présente, je confirme que Mlle Olivia Barada a activement participé dans le cadre de son doctorat au projet portant sur le rôle des cytokines IL-20 dans la réponse pulmonaire aux infections bactériennes respiratoires et dans le cadre des exacerbations de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (EXACOPD). En effet, elle est intervenue dans l'élaboration et la réalisation des expériences, en particulier avec les modèles animaux d'exposition à la fumée de cigarette et d'infections bactériennes, les modèles de culture cellulaires d'épithélium respiratoires, l'analyse et l'interprétation des résultats ainsi que dans la rédaction de certains articles en découlant. Cette implication justifie pleinement sa position de co-premier auteur sur l'article en révision à E-Biomedicine intitulé "Upregulation of IL-20 cytokines during *Streptococcus pneumoniae* infection limits bacterial clearance and inflammatory cell recruitment".

Résumé de cet article:

*Streptococcus pneumoniae* is the leading cause of bacterial pneumonia worldwide. Previous reports showed that IL-20 cytokines (IL-19, IL-20 and IL-24) are induced and have an immune regulatory function during cutaneous infection. In the current study, we investigated the role of IL-20 related cytokines and their receptors during experimental pneumococcal infection. C57BL/6 mice were infected with *S. pneumoniae* by intranasal route. The bacterial burden, the immune response and the cytokine production were evaluated after treatment with an anti-IL-20 receptor-B neutralizing antibody (anti-IL-20Rb). Of interest, IL-20 cytokines expression and production were transiently increased in the lung tissue during infection. Blocking the IL-20Rb receptor decreased the production of IL-20 cytokines in the lung. In parallel, this treatment reinforces the host defense and reduced the bacterial burden in the lungs and in the blood. Administration of this antibody reduced the pulmonary damage, the inflammatory cell recruitment and the cytokine expression, whereas it enhanced the expression of antibacterial peptides. Collectively, this study highlights for the first time the importance of IL-20 related cytokines in the pulmonary defense against *S. pneumoniae* infection and might have therapeutic applications in bacterial pneumonia.

Je vous prie, Madame, Monsieur, de recevoir mes respectueuses salutations.

Dr Philippe Gosset

Responsable de groupe



### **Communications scientifiques (Posters)**

- *European Respiratory Society (Paris, France, Septembre 2018)*

**Barada O.**, Coraux C., Kervoaze G., Polette M., Deslée G., Pichavant M., Gosset P., Expression and function of IL-20 cytokines and their receptors on the airway epithelium during Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

- *Biennale de l'espace francophone de pneumologie (Québec, Canada, Octobre 2017)*

**Barada O.**, Kervoaze G., Madouri F., Coraux C., Birembaut P., Polette M., Pichavant M., Gosset P., Expression et fonction des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs au niveau de l'épithélium respiratoire lors d'une infection pulmonaire et dans un contexte pulmonaire de Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

- *Journée Hors Site du CIIL (Marcq en Baroeul, France, Octobre 2017)*

**Barada O.**, Kervoaze G., Madouri F., Coraux C., Birembaut P., Polette M., Pichavant M., Gosset P., Expression et fonction des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs au niveau de l'épithélium respiratoire lors d'une infection pulmonaire et dans un contexte pulmonaire de Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

- *Journée André Verbert (Lille, France, Septembre 2017)*

**Barada O.**, Madouri F., Kervoaze G., Coraux C., Birembaut P., Polette M., Pichavant M., Gosset P., Expression and function of IL-20 cytokines and their receptors in airway epithelium during pulmonary infection and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

- *Journée de Recherche Respiratoire (Marseille, France, Janvier 2016)*

**Barada O.**, Madouri F., Marquant Q., Koné B., Pichavant M., Gosset P., Expression et fonction des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs dans un contexte pulmonaire infectieux et dans un contexte de Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

- *Journée de Recherche Respiratoire (Nice, France, Octobre 2016)*

**Barada O.**, Madouri F., Marquant Q., Koné B., Pichavant M., Gosset P., Expression et fonction des cytokines IL-20 et de leurs récepteurs dans un contexte pulmonaire infectieux et dans un contexte de Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)