



HAL
open science

Rôle des cytokines IL-20 au cours des exacerbations virales de la BPCO et des surinfections bactériennes

Méline Le Roux

► **To cite this version:**

Méline Le Roux. Rôle des cytokines IL-20 au cours des exacerbations virales de la BPCO et des surinfections bactériennes. Santé. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS012 . tel-03981753

HAL Id: tel-03981753

<https://theses.hal.science/tel-03981753>

Submitted on 10 Feb 2023

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 de Lille
École Doctorale Biologie Santé



THÈSE

Pour l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue par

Mélina LE ROUX

Le 4 février 2022

Rôle des cytokines IL-20 au cours des exacerbations virales de la BPCO et des surinfections bactériennes

Devant le jury composé de :

| | |
|--|------------------------|
| Mme Le Professeur Karine FAURE | Présidente du jury |
| Mme Le Docteur Catherine DUEZ | Rapporteur |
| M. le Docteur Valérian DORMOY | Rapporteur |
| Mme. Le Docteur Isabelle COUILLIN | Examineur |
| M. Le Professeur Gilles DUVERLIE | Examineur |
| Mme Le Docteur Ilka ENGELMANN | Invité |
| M. Le Docteur Thomas TRIAN | Invité |
| M. Le Docteur Philippe GOSSET | Directeur de thèse |
| Mme Le Docteur Muriel PICHAVANT | Co-directrice de thèse |

Centre d'infection et d'immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille,

INSERM U1019, CNRS UMR 9017, Université de Lille

Equipe « Infections Opportunistes, Immunité, Environnement & Maladies Pulmonaires »

Ce travail a été réalisé au sein de :

L'équipe OpInFIELD : Infections opportunistes, Immunité, Environnement et Maladies Pulmonaires, Centre d'infection et d'immunité de Lille, INSERM U1019 – CNRS UMR 9017 - Institut Pasteur de Lille



Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'étudier et d'évaluer ce travail de thèse, en particulier le professeur **Karine Faure**, la présidente du jury, les docteurs **Catherine Duez** et **Valérian Dormoy**, les rapporteurs, le docteur **Isabelle Couillin** et le professeur **Gilles Duverlie**, les examinateurs ainsi que les docteurs **Ilka Engelmann** et **Thomas Trian** les invités.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide des différents financeurs. Je tiens ainsi à remercier :

- Le **Centre Hospitalo-Universitaire de Lille** et la **Région Haut-de-France** pour avoir co-financé mes 3 premières années de thèse
- La **fondation du Souffle** qui m'a permis de réaliser une 4^{ème} année pour finaliser mes travaux de recherche.



Je remercie particulièrement les membres de l'équipe *OpInFIELD* :

- Le Docteur **Philippe Gosset**, mon directeur de thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée depuis mon premier stage de Master 1. Merci pour l'encadrement dont vous avez su faire preuve toute au long de mon parcours.
- Le Docteur **Muriel Pichavant** pour son co-encadrement pendant ma thèse. Ses nombreux conseils et sa positivité à toute épreuve se seront révélés très précieux tout au long de ces années et en particulier au cours de la rédaction de l'article et du mémoire de thèse.
- **Gwenola Kervoaze**, technicienne exceptionnelle, pour ton aide pendant mes stages de Master et pendant ma thèse. Merci pour tes conseils techniques, ton œil averti en culture cellulaire. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses « petites » questions, pour ton enthousiasme à chaque lancement d'Happy-Friday et pour ta bonne humeur à « presque » toute épreuve.

- **Anaïs Ollivier**, technicienne, pour ta contribution dans les nombreuses expériences effectuées depuis ton arrivée. Merci pour les analyses ELISA, les processings, les PCR, la fumette et la gestion de l'élevage notamment pour les souris IL-20Rb KO.
- Le Docteur **Loyal Massara**, régulièrement surnommée « La petite », de m'avoir appris quelques mots libanais. Merci pour toutes les petites histoires qui animent le bureau au quotidien. Le sourire cure-dent n'est pas encore un réflexe chez moi, mais je vais essayer de prendre la pose à la libanaise pour les prochaines photos. Dernier point, NON le croissant n'est pas libanais !
- Docteur **Stéphanie Lejeune**, binôme du projet nouveau-né, pour ces virées scientifiques en Belgique qui t'auront finalement fait craquer pour l'achat d'un Cookéo. Merci aussi pour tes conseils et ton soutien.
- **Karine Serrure**, notre gestionnaire pour ton aide et ta réactivité dans la gestion, l'édition des documents administratifs, des commandes...

Mes remerciements vont également à :

- L'ensemble des chercheurs de l'équipe : **Oliver Le Rouzic, Odile Poulain, Corinne Glineur, Emilie Fréalle, Eric Kipnis, Rodrigue Dessein, Rémy Leguern** pour leur bienveillance et leurs conseils scientifiques.
- Les personnes du bureau, **Anne-Charlotte Lompret-Bryck, Blanche Daunou**, et tous les stagiaires qui y sont passés, pour leur bonne humeur et les conversations diverses et variées que l'on a pu aborder.
- Aux autres membres de l'équipe travaillant sur le site du CHU de Lille : **Teddy Grandjean, Morgane..., Ava Diara...** qui ne manqueront pas de prendre leur revanche sur la team Pasteur après leur défaite au laser-game.
- Les **stagiaires** que j'ai pu encadrer et qui ont contribué à l'avancement du projet. Ainsi, j'ai pu transmettre mes connaissances et cela m'a permis d'explorer un autre aspect de la recherche.
- **Daphnée Soulard** et **Valentin Sencio** d'abord collègues, puis amis. Merci pour ces nombreux moments gastronomiques de 12h et de 16h autour d'un kitkat ou d'un burger. Merci aussi pour ces soirées raclettes et autres menus gastronomiques.

Enfin, je tiens à témoigner toute ma gratitude à :

- Mon conjoint, **Efflam**, pour son soutien quotidien indéfectible et dont les encouragements m'ont accompagné toute au long de mon parcours.
- **Mes parents**, qui m'ont toujours soutenu dans mes projets. Leur soutien à la fois moral et économique, m'a permis de réaliser les études que je souhaitais et par conséquent ce mémoire.

Communications et productions scientifiques

Brevet :

Antibodies specific for il20-rb and uses thereof for the treatment of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (EP19306068.8)

Congrès et séminaires :

Lors de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à différents congrès et séminaires d'envergure. Tout d'abord, j'ai pu présenter oralement mon projet de thèse à l'occasion du « **Lungstorming** » à Marseille. J'ai également pu participer à deux reprises **aux journées de recherche respiratoire** en 2018 à Marseille et en 2019 à Bruxelles. À cette occasion, j'ai présenté via un poster, l'avancement de mes travaux. J'ai également participé aux « **journées André Verbert** » organisées annuellement par l'École Doctorale de Lille. À la fin de ma deuxième année, j'y ai présenté mes résultats de thèse par le biais d'un poster. Enfin, j'ai participé à un congrès international : le **17th Lung Science Conference in a Pulmonary & Respiratory Medicine Conference** à Estoril (Portugal) dans lequel j'ai eu l'opportunité de présenter oralement mes résultats de thèse.

Challenge Doc :

J'ai participé à l'édition 2020 du Challenge Doc dont le principe consiste à réunir des doctorants de différentes disciplines et de les mobiliser sur un projet innovant. À cette occasion, avec les membres de mon équipe, nous avons travaillé et imaginé des solutions pour la création d'un appareil associant l'analyse de la réponse rétinienne à la prise d'image du fond d'œil. Ce travail a été récompensé par l'attribution du prix de l'innovation.

Résumé

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une cause majeure de mortalité et de morbidité. Selon l'OMS, la BPCO est la troisième cause de décès dans le monde. Caractérisée par une limitation progressive et irréversible du débit d'air, le principal facteur de risque de développer une BPCO est le tabagisme. L'exposition chronique à la fumée de cigarette (Cigarette Smoke (CS)) déclenche des processus inflammatoires qui finissent par altérer la fonction respiratoire et les mécanismes de défense immunitaire de cette muqueuse, entraînant une susceptibilité accrue aux infections respiratoires. Ces exacerbations de la BPCO peuvent aussi bien être déclenchées par des champignons, des bactéries ou encore des virus.[1].

L'IL-22 joue un rôle important dans les mécanismes de défense contre les pathogènes, notamment en intervenant comme un élément protecteur de l'épithélium [2–4]. Alors que l'IL-22 agit via un récepteur spécifique dépendant de la sous-unité IL-10Rb, l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24 se lient au récepteur IL-20 de type I (IL-20R), un récepteur hétérodimérique composé de l'IL-20Ra et de l'IL-20Rb. L'IL-20 et l'IL-24 se lient également au récepteur de type II composé de la sous-unité $\alpha 1$ du récepteur IL-22 et de l'IL-20Rb [5]. Ces différents récepteurs sont fortement exprimés au niveau pulmonaire, notamment sur les cellules épithéliales des voies aériennes (AEC) [6]. Le blocage de la sous-unité IL-20Rb peut neutraliser efficacement la réponse aux cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) [6] et limiter les infections bactériennes cutanées et pulmonaires [6,7].

Étant donné que l'expression des cytokines IL-20 est associée au développement de la BPCO [8] et de l'infection virale [9,10], notre objectif était d'évaluer leur rôle physiopathologique lors de l'exacerbation virale de la BPCO et des surinfections bactériennes. Pour cela, nous avons utilisé le modèle murin mimant la BPCO après l'exposition chronique à la fumée de cigarette et le rôle des cytokines IL-20 a été évalué lors de l'infection par des virus respiratoires grâce à l'utilisation de souris IL-20Rb KO et le traitement par un anticorps bloquant l'IL-20Rb. Pour se rapprocher de la clinique, un modèle de surinfection post-grippale par *Streptococcus pneumoniae* a aussi été utilisé.

Ainsi, nos données révèlent que l'exposition à la fumée de cigarette et l'infection virale ont un effet additif sur l'expression des cytokines IL-20. La déficience en IL-20Rb, au cours de l'exacerbation viro-induite de souris BPCO, facilite la préservation de l'intégrité de la barrière épithéliale pulmonaire notamment via le maintien de l'expression de la protéine de jonction E-cadhérine. Dans le contexte de la surinfection bactérienne, les cytokines IL-20 ne semblent pas avoir un effet majeur sur le contrôle de l'infection virale ou bactérienne mais elles participent également dans le développement des lésions épithéliales. L'ensemble des données, acquises au cours de cette thèse, a permis de mettre au jour le rôle délétère des cytokines IL-20 au cours de la physiopathologie de l'exacerbation virale de la BPCO ; désignant ainsi le récepteur aux cytokines IL-20 (IL-20Rb) comme cible thérapeutique potentielle dans le traitement des exacerbations virales de la BPCO.

Abstract

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a major cause of mortality and morbidity worldwide. According to the WHO, COPD is the third leading cause of death in the world. Characterized by a progressive and irreversible limitation of air flow, the main risk factor for developing COPD is smoking. Chronic exposure to cigarette smoke (Cigarette Smoke (CS)) triggers inflammatory processes that eventually alter the functions of the pulmonary epithelial barrier and reduce immune defense mechanisms, resulting in increased susceptibility to respiratory infections. These exacerbations of COPD can also be triggered by fungi, bacteria or viruses [1].

IL-22 plays an important role in antimicrobial mechanisms, in particular by its protective role on epithelium [2]-[4]. IL-22 along with IL-19, IL-20 and IL-24 belong to the IL-20 cytokine subfamily. While IL-22 acts through a specific receptor dependent on the IL-10Rb subunit, IL-19, IL-20 and IL-24 bind to the type I receptor (IL-20R), a heterodimeric receptor composed by IL-20Ra and IL-20Rb. IL-20 and IL-24 also bind to the type II receptor composed by the $\alpha 1$ subunit of the IL-22 receptor and IL-20Rb [5]. Interestingly, these receptors are highly expressed in airway epithelial cells (AECs) [6]. Blockade of the IL-20Rb subunit can effectively neutralize the response to IL-20 cytokines (IL-19, IL-20 and IL-24) [6] and limit bacterial infections of the skin and lungs [6], [7].

Since the expression of IL-20 cytokines is associated with the development of COPD [8] and viral infection [9], [10], the objective of my thesis work was to evaluate the pathophysiologic role of IL-20 cytokines during viral exacerbations of COPD. For this, mice were chronically exposed to cigarette smoke in order to mimic COPD and then infected with respiratory viruses. The role of IL-20 cytokines was evaluated using IL-20Rb KO mice or treatment with a blocking anti-IL-20Rb antibody during viral infection or a post-flu bacterial infection.

Thus, our data demonstrate that cigarette smoke exposure and viral infection have an additive effect on IL-20 cytokine expression. Interestingly, the IL-20Rb deficiency during virus-induced exacerbation of COPD mice, facilitates the preservation of the integrity of the pulmonary epithelial barrier, especially via the maintenance of the expression of the E-

cadherin junction protein. During post-flu bacterial superinfection, these cytokines are not essential for the control of viral or bacterial replication although they are involved in the development of epithelial lesions in this context.

All of the data acquired during this thesis helped to shed light on the deleterious role of IL-20 cytokines in the pathophysiology of viral exacerbation of COPD; thus, designating the cytokine receptor IL-20 (IL-20Rb) as a potential therapeutic target during viral infections and their bacterial surinfections in the context of COPD.

Résumé grand public

La bronchopneumopathie chronique obstructive est la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde. Cette pathologie est souvent liée au tabagisme. Elle associe une inflammation chronique et une altération irréversible et progressive des fonctions respiratoires. Les traitements actuels sont symptomatiques et permettent de ralentir son évolution. Malgré ces traitements, les patients BPCO sont sujets à des infections respiratoires majoritairement d'origine infectieuse qui sont responsables de la progression de la pathologie et nécessitent la mise en place d'ajustements thérapeutiques et de mesures de prévention. Ainsi, il est nécessaire d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques afin de contrôler ou de prévenir ces exacerbations. Notre équipe de recherche s'intéresse aux cytokines IL-20, des molécules dont la production est augmentée au cours d'infections bactériennes, virales et de la BPCO. L'étude du rôle de ces cytokines dans le contexte des exacerbations d'origine infectieuse au cours de la BPCO vise à proposer, à terme, de nouvelles stratégies permettant de limiter les conséquences des infections chez les patients BPCO.

Summary for the general public

Chronic obstructive pulmonary disease is the third leading cause of death in the world. This pathology is often linked to smoking. It characterizes by a chronic inflammation and irreversible and progressive impairment of respiratory functions. The current treatments are symptomatic and make it possible to slow down its evolution. Despite these treatments, COPD patients are subject to respiratory infections, mainly of infectious origin, which are responsible for the progression of the pathology and require the implementation of therapeutic adjustments and preventive measures. Thus, it is necessary to identify new therapeutics in order to control or prevent these exacerbations. Our research team is interested in IL-20 cytokines, molecules whose production is increased during bacterial, viral infections and COPD. Studying the role of these cytokines in the context of exacerbations of infectious origin in COPD aims to ultimately propose new strategies to limit the consequences of infections in COPD patients.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS | 16 |
| LISTE DES FIGURES | 18 |
| LISTE DES TABLEAUX | 20 |
| INTRODUCTION..... | 21 |
| 1. LE POUMON | 22 |
| 1.1. <i>Structure pulmonaire</i> | 22 |
| 1.2. <i>Fonction pulmonaire</i> | 23 |
| 1.3. <i>Poumon et environnement</i> | 23 |
| 2. LA BRONCHOPNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE (BPCO) : | 25 |
| 2.1. <i>Histoire de la BPCO</i> | 25 |
| 2.2. <i>Définition et épidémiologie</i> | 25 |
| 2.3. <i>Les signes cliniques de la BPCO</i> | 26 |
| 2.4. <i>Facteurs de risques</i> | 28 |
| 2.4.1. Facteurs de risques environnementaux | 28 |
| 2.4.1.1. Le tabac, premier coupable | 28 |
| 2.4.1.2. Pollution professionnelle et pollution atmosphérique | 28 |
| 2.4.1.3. Maturité pulmonaire | 29 |
| 2.4.2. Facteurs endogènes | 29 |
| 2.4.2.1. Facteurs de risques génétiques | 29 |
| 2.4.2.2. Sexe | 30 |
| 2.4.2.3. L'âge | 30 |
| 2.5. <i>Traitement de la BPCO</i> | 31 |
| 3. IMMUNITE ET BPCO | 33 |
| 3.1. <i>Physiopathologie de la BPCO</i> | 33 |
| 3.2. <i>Réponse immunitaire innée</i> | 35 |
| 3.2.1. L'épithélium respiratoire | 35 |
| 3.2.2. Les neutrophiles | 38 |
| 3.2.3. Les macrophages | 39 |
| 3.2.4. Les cellules dendritiques : À l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative !..... | 41 |
| 3.3. <i>Activation de la réponse adaptative</i> | 44 |
| 3.4. <i>La réponse immunitaire adaptative</i> | 45 |
| 3.4.1. Les lymphocytes T | 45 |
| 3.4.2. Les lymphocytes B | 46 |
| 4. PLACE DES EXACERBATIONS DANS LA BPCO | 48 |
| 4.1. <i>Arrêt des traitements de fond</i> | 49 |
| 4.2. <i>Pollution</i> | 49 |

| | |
|--|------------|
| 4.3. Les infections microbiennes..... | 50 |
| 4.3.1. Les infections fongiques | 50 |
| 4.3.2. Les infections bactériennes | 51 |
| 4.3.2.1. Zoom sur <i>Haemophilus influenza non typable</i> (NTHI) | 51 |
| 4.3.2.2. Zoom sur <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Sp)..... | 52 |
| 4.3.2.3. Réponse immunitaire antibactérienne | 54 |
| 4.3.3. Les infections virales..... | 55 |
| 4.3.3.1. Zoom sur le virus de la grippe Influenza A (IAV : Influenza virus type A)..... | 56 |
| 4.3.3.2. Zoom sur le virus respiratoire syncytial (VRS) | 56 |
| 4.3.3.3. Réponse immunitaire antivirale | 57 |
| 4.3.4. Les co-infections bactérie/virus..... | 60 |
| 5. LA SOUS-FAMILLE DES CYTOKINES IL-20 | 62 |
| 5.1. Les récepteurs de la sous-famille des IL-20 | 63 |
| 5.2. Voies de signalisations des cytokines IL-20 | 64 |
| 5.3. Implications physiopathologiques des cytokines de la sous-famille des IL-20 | 66 |
| 5.3.1. Implications dans la réparation tissulaire..... | 66 |
| 5.3.2. Implications dans les pathologies chroniques | 67 |
| 5.3.2.1. Cancers | 67 |
| 5.3.2.2. Pathologies inflammatoires..... | 68 |
| 5.3.2.2.1. Pathologies rénales..... | 68 |
| 5.3.2.2.2. Psoriasis | 69 |
| 5.3.2.2.3. Polyarthrite rhumatoïde | 69 |
| 5.3.2.2.4. Maladies inflammatoires de l'intestin | 70 |
| 5.3.2.2.5. Pathologies associées à l'allergie | 71 |
| 5.3.2.2.6. BPCO | 72 |
| 5.3.3. Implications dans les pathologies infectieuses..... | 72 |
| OBJECTIFS | 74 |
| RESULTATS | 78 |
| CHAPITRE 1 : IMPLICATION DES CYTOKINES IL-20 SUR LES LESIONS EPITHELIALES DANS UN MODELE MURIN D'EXACERBATION VIRALE DE LA BPCO | 79 |
| CHAPITRE 2 : ANTICORPS SPECIFIQUES DE L'IL-20RB ET UTILISATION POUR LE TRAITEMENT DE L'EXACERBATION AIGUË DE LA BRONCHOPNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE | 101 |
| CHAPITRE 3 : ROLE DES CYTOKINES IL-20 DANS LES SURINFECTIONS POST-GRIPPALES AU COURS DE LA BPCO | 109 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... | 127 |
| CONCLUSION..... | 139 |
| BIBLIOGRAPHIE | 142 |

| | |
|--|------------|
| ANNEXES..... | 178 |
| ANNEXE 1 : ARTICLE : IL-20 CYTOKINES ARE INVOLVED IN EPITHELIAL LESIONS ASSOCIATED WITH VIRUS INDUCED COPD EXACERBATION IN MICE | 179 |
| ANNEXE 2 : DOCUMENTS RELATIFS AU BREVET : EP19306068.8 | 202 |

Liste des abréviations

AAT : Alpha 1 antitrypsine
 ACE-2 : Angiotensin-Converting Enzyme 2
 ADN : Acide désoxyribonucléique
 ARN : Acide ribonucléique
 AVC : Accident vasculaire cérébral
 BAFF : B-cell activation factor
 BALT : Bronchus-Associated Lymphoid Tissue
 BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive
 CCR : C-C chemokine receptor
 CD : Cluster de différenciation
 cGAS : cyclic GMP-AMP synthase
 CMH : Complexe majeur d'histo-compatibilité
 CO₂ : dioxyde de carbone
 CV : Capacité vitale
 CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand
 DAMPs : Damage-associated molecular patterns
 DC : Cellules dendritiques
 ERK : extracellular signal-regulated kinases
 GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
 GOLD : Global initiative for Chronic Obstructive Lung disease
 HDAC2 : Histone désacétylase 2
 HO-1 : Heme oxygenase-1
 IAV : Influenza A virus ou Virus influenza de type A
 Ig : Immunoglobuline
 iNKT : invariant natural killer T
 IRF : Interferon regulatory factor
 ISG : Interferon stimulated gene
 JAK/STAT : Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription
 JNK : Jun N-terminal kinase
 KGF : Keratinocyte growth factor
Kp : *Klebsiella pneumoniae*
 LB : Lymphocyte B
 LCN2 : Lipocalin 2
 LOS : lipooligosaccharide
 LT : Lymphocyte T
 MAMPs : Microbe-associated molecular pattern
 MAVS : Mitochondrial antiviral-signaling protein
 MDA-5 : melanoma differentiation-associated protein 5
 MDA-7 : Melanoma differentiation-associated gene 7
 MICI : Maladie inflammatoire chronique intestinale
 MMP : Matrix metalloprotease ou Metalloprotéase matricielle
 MPO : Myeloperoxydase
 MRC : Maladie rénale chronique
 mTOR : mammalian target of rapamycin

NETs : Neutrophil extracellular traps
NF- κ B : nuclear factor-kappa B
NGAL : Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NK : Natural killer
NKT : Natural Killer T
NLR : Nod-like receptor
NO₂ : dioxyde d'azote
NOD : nucleotide-binding oligomerization domain 2
NTHI : Non-typable haemophilus influenzae
O₃ : Ozone
OMS : Organisation mondiale de la santé
ORL : Oto-rhino-laryngée
p38 MAPK : p38 mitogen-activated protein kinase
Pa : Pseudomonas aeruginosa
PAMPs : Pathogen associated molecular pattern
PBMC : Peripheral Blood mononuclear cells
PCR : Polymerase chain reaction
pDC : cellules dendritique plasmacytoïde
PR : Polyarthrite rhumatoïde
PRR : Pattern recognition receptor
PVM : Pneumonia virus of mice
RANKL : receptor activator of nuclear factor kappaB (NF- κ B) ligand
RCH : Recto-colite hémorragique
RIG-I : retinoic acid-inducible gene I
RLR : RIG-like-receptor
ROS : Reactive oxygen species ou espèce réactive à l'oxygène
SH2 : Src Homology
SIDA : Syndrome d'immuno-déficience acquise
SNP : Single nucleotide polymorphisms
SO₂ : Dioxyde de soufre
SOCs : suppressor of cytokine signaling proteins
Sp : Streptococcus pneumoniae
STAT : Signal transducer and activator of transcription
TGF- β : Tumor growth factor- β
TLR : Toll-like-receptor
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α*
TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
VEGF-A : *Vascular endothelial growth factor A*
VEMS : Volume expiratoire maximal par seconde
VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine-1
VRS : Virus respiratoire syncytial

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Appareil respiratoire | 22 |
| Figure 2 : Les aérocontaminants ont des sources multiples ! | 24 |
| Figure 3 : Réponse immunitaire lors de l'exposition à la fumée de cigarette | 35 |
| Figure 4 : Composition cellulaire de l'épithélium respiratoire | 36 |
| Figure 5 : Altérations fonctionnelles des macrophages par la fumée de cigarette..... | 41 |
| Figure 6 : Marqueurs des cellules dendritiques..... | 43 |
| Figure 7 : Synapse immunologique et activation de la réponse adaptative..... | 45 |
| Figure 8 : Cercle vicieux de l'infection et de l'inflammation chronique au cours de la BPCO . | 48 |
| Figure 9 : Facteurs d'aggravation et de déclenchement de la BPCO | 49 |
| Figure 10 : PRR et voie de signalisation | 58 |
| Figure 11 : Récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-10 | 63 |
| Figure 12 : Expression, signalisation et cibles des cytokines de la sous-famille IL-20..... | 65 |
| Figure 13 : Le PVM exacerbe la BPCO | 87 |
| Figure 14 : L'infection par le PVM induit une inflammation pulmonaire | 89 |
| Figure 15 : L'infection par le PVM module les l'expression des cytokines IL-20 | 91 |
| Figure 16 : L'infection virale induit une réponse antivirale et inflammatoire plus faible chez les souris IL-20Rb KO exposées au CS | 93 |
| Figure 17 : L'infection virale module l'inflammation pulmonaire des souris WT et IL-20RB KO | 94 |
| Figure 18 : L'infection par le PVM module la perméabilité pulmonaire et l'expression d'E-cadhérine..... | 97 |
| Figure 19 : Liaison de l'anticorps anti-IL-20Rb recombinant (B7 natifs et B7 mutés) produit sous forme d'IgG2a murin à l'IL-20Rb humain recombinant | 103 |
| Figure 20 : Compétition entre les deux anticorps anti-IL-20Rb : Notre anticorps humain anti-IL-20Rb (B7 natif) et l'anticorps monoclonal de rat anti-IL-20Rb (clone 20RNTC) | 104 |
| Figure 21 : Compétition entre les anticorps anti-IL-20Rb : Notre anticorps humain anti-IL-20Rb (B7), l'anticorps muté (B7 muté) et l'anticorps monoclonal de rat anti-IL-20Rb (clone 20RNTC)..... | 105 |

| | |
|---|-----|
| Figure 22 : Capacité des anticorps anti-IL-20Rb dont le 20RNTC, l'A7 et les clones B7 dans l'inhibition de la réponse aux cytokines IL-20 sur l'épithélium des voies respiratoires humaines (la lignée cellulaire BEAS-2B)..... | 106 |
| Figure 23 : Capacité des anticorps anti-IL-20Rb dont le 20RNTC, l'A7 et les clones B7 pour inhiber la réponse aux cytokines IL-20 sur des cellules épithéliales primaires issues de trachée de souris..... | 106 |
| Figure 24 : Effet du traitement par les différents anticorps anti-IL-20Rb en comparaison avec un contrôle isotypique (IgG) sur l'infection par <i>Streptococcus pneumoniae</i> chez des souris exposées de façon chronique à la fumée de cigarette. | 107 |
| Figure 25 : Effet du traitement par les anticorps anti-IL-20Rb (20RNTC, B7 natif en comparaison avec un contrôle isotypique (IgG) sur le recrutement de cellules inflammatoires lors d'une infection par <i>Streptococcus pneumoniae</i> chez la souris exposée de façon chronique | 108 |
| Figure 26 : L'exposition à la fumée de cigarette module la réponse antivirale, l'inflammation sans impacter la charge bactérienne | 117 |
| Figure 27 : L'exposition à la fumée de cigarette augmente le recrutement cellulaire dans les LBA lors de l'infection virale mais pas lors de la surinfection bactérienne | 119 |
| Figure 28 : L'expression des cytokines IL-20 est induite lors de la surinfection bactérienne chez les souris CS..... | 120 |
| Figure 29 : L'expression des cytokines IL-20 est induite dans les cellules épithéliales humaines exposées au CSE lors de la surinfection bactérienne..... | 121 |
| Figure 30 : Le traitement par l'anticorps anti-IL-20Rb facilite la réplication du virus H1N1 et l'expression d'ifn- β 10 jours post-infection | 122 |
| Figure 31 : Le traitement par l'anti-IL-20Rb ne module pas le recrutement cellulaire..... | 123 |
| Figure 32 : L'exposition au CS exacerbe l'expression des cytokines IL-20 lors de l'infection grippale par la souche H3N2 chez la souris..... | 129 |
| Figure 33 : L'exposition à de l'extrait de fumée de cigarette (CSE) réduit la réponse antivirale des cellules bronchiques humaines BEAS-2B stimulées par la souche grippale H3N2..... | 130 |
| Figure 34 : Induction de l'expression de l'IL-24 par les cellules épithéliales trachéales primaires lors de l'infection à VRS et de l'exposition au CSE..... | 132 |
| Figure 35 : Méthode d'étude du rôle des cytokines IL-20 sur des cultures de cellules épithéliales trachéales murines cultivées en interface Air-liquide..... | 133 |

| | |
|---|-----|
| Figure 36 : Méthode d'étude ex-vivo du rôle des cytokines IL-20 sur des cultures de cellules épithéliales pulmonaires humaines cultivées en interface Air-liquide..... | 135 |
| Figure 37 : Méthode d'étude du rôle des cytokines IL-20 sur les interactions épithélium/cellules immunitaires | 136 |
| Figure 38 : Charge bactérienne lors de la surinfection post-PVM..... | 137 |

Liste des Tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Classification des stades de sévérité de la BPCO en fonction de la VEMS (classification GOLD) | 26 |
| Tableau 2 : Classification par sévérité clinique de la BPCO | 27 |
| Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour la qPCR | 85 |
| Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour la qPCR | 115 |

Introduction

1. Le poumon

Le poumon fait partie d'un système complexe permettant l'apport d'oxygène à l'organisme. Ce système complexe est l'appareil respiratoire (Figure 1). Celui-ci est composé de différents organes et tissus dont le but est de permettre les échanges gazeux entre le corps et son environnement.

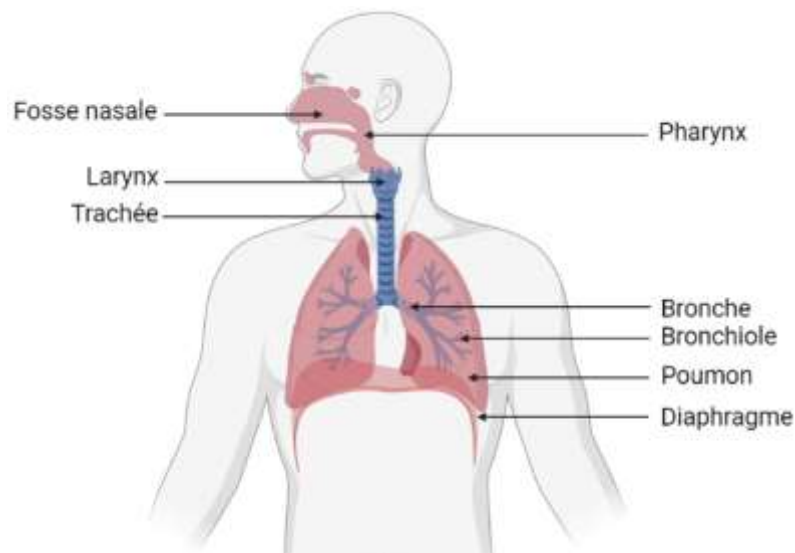


Figure 1 : Appareil respiratoire

Les voies respiratoires sont composées de différents organes permettant l'arrivée de l'air jusqu'aux alvéoles pulmonaires. L'extension du diaphragme va permettre de faire entrer l'air inspiré dans les fosses nasales où il sera réchauffé. L'air va ensuite traverser différents canaux dont le pharynx, le larynx, la trachée, les bronches puis les bronchioles. À la contraction des muscles diaphragmatiques, l'air pauvre en oxygène, est expiré pour être relargué à l'extérieur.

1.1. Structure pulmonaire

En entrant dans les narines, l'air passe dans un premier temps dans les fosses nasales (premier conduit du système respiratoire). Celles-ci sont tapissées de cellules ciliées permettant la filtration de l'air. La forte irrigation de ce conduit permet le réchauffement et l'humidification de l'air. L'air peut également pénétrer dans l'appareil respiratoire par la bouche.

Avant d'atteindre le larynx, l'air circule par le pharynx qui est un organe commun à l'appareil respiratoire et digestif. L'air traverse ensuite l'épiglotte, clapet situé dans le larynx et capable de s'ouvrir pour permettre le passage de l'air vers la trachée. La trachée est un conduit constitué d'anneaux cartilagineux. Il fait le lien entre les voies aérodigestives et les poumons. C'est dans les poumons que les échanges gazeux vont pouvoir s'effectuer. Ceux-ci sont situés dans la cage thoracique. On distingue le poumon droit constitué de trois lobes et

le poumon gauche constitué de deux lobes. C'est dans les poumons que la trachée s'arborise pour se diviser d'abord en bronches puis en bronchioles et enfin en alvéoles.

1.2. Fonction pulmonaire

Le système respiratoire a deux fonctions. La première, est mécanique. Elle permet l'inspiration et l'expiration. Ces mouvements respiratoires favorisent la circulation de l'air dans les poumons permettant ainsi le renouvellement de l'air. Ainsi, cela permet l'approvisionnement en dioxygène (O_2) et l'élimination du dioxyde de carbone (CO_2). Ces phénomènes mécaniques sont dirigés grâce à la contraction et à la décontraction des muscles intercostaux et à l'action du diaphragme.

La seconde fonction, physiologique, correspond aux échanges gazeux. Celle-ci permet l'alimentation des cellules en oxygène et facilite parallèlement l'élimination du CO_2 . En effet, c'est le phénomène de diffusion qui permet ces échanges entre l'environnement et les cellules. Le dioxygène, emmagasiné lors de l'inspiration, se retrouve dans les alvéoles pulmonaires. La grande surface de contact entre ces alvéoles et le sang facilite alors le passage du dioxygène dans le sang. Ainsi, cet oxygène sera acheminé dans l'ensemble des cellules de l'organisme. Pour l'élimination du CO_2 , c'est le chemin inverse qui est fait.

1.3. Poumon et environnement

Les poumons sont en contact direct et permanent avec l'environnement extérieur. Cette particularité rend cet organe vulnérable aux agressions extérieures (Figure 2) qui peuvent être chimiques (dioxyde de carbone, ozone...), physiques (particules fines, poussières...) ou biologiques (pollen, moisissure, virus...).

Ainsi, l'exposition à ces aérocontaminants naturels ou liés à l'activité humaine peut être responsable du développement de pathologies pulmonaires aiguës telles que des bronchites ou des pneumonies. Lorsque l'exposition à ces polluants est prolongée cela peut favoriser l'apparition de pathologies chroniques comme les cancers, la fibrose pulmonaire, l'asthme ou encore la BPCO.

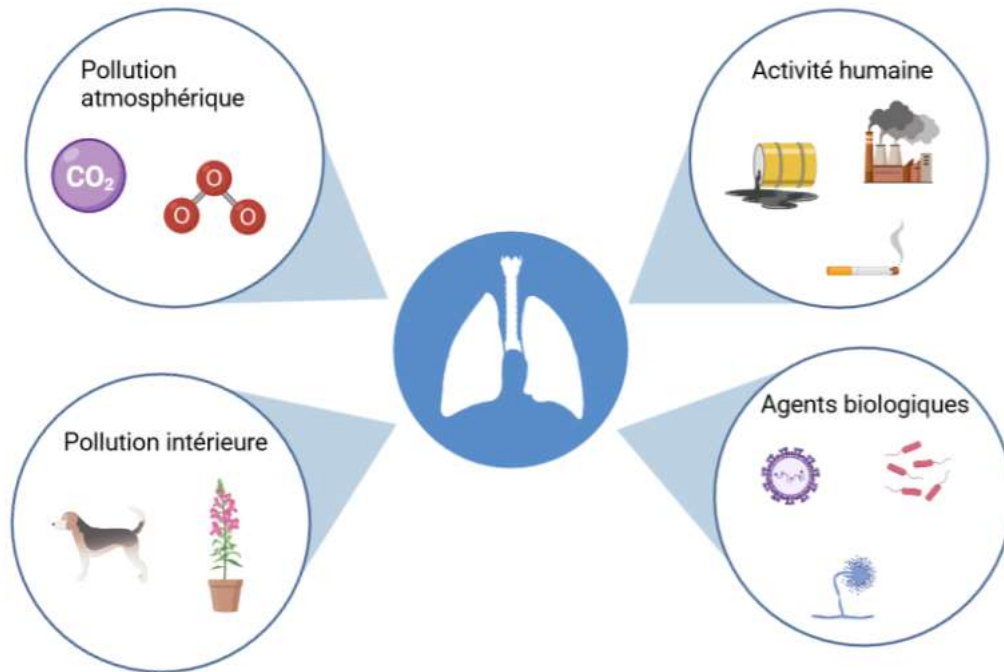


Figure 2 : Les aérocontaminants ont des sources multiples !

L'air que l'on respire est chargé en particules de diverses origines qui peuvent affecter les poumons. Outre la pollution atmosphérique liée au CO₂, ou aux particules fines par exemple, l'air contient également d'autres aérocontaminants qui peuvent être responsables de nombreuses pathologies. Les allergènes et les pollens sont souvent associés à l'apparition de maladies allergiques ou à l'asthme. Les agents biologiques tels que les bactéries, virus ou champignons sont responsables de maladies infectieuses respiratoires et les polluants chimiques liés à des activités industrielles ou le tabagisme peuvent être responsables de maladie comme les cancers ou la BPCO.

2. La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) :

2.1. Histoire de la BPCO

C'est au xvii^e siècle que la BPCO a été décrite pour la première fois comme « poumon volumineux » par le médecin Bonet. Plus d'un siècle plus tard, Braille publie les premières illustrations de « poumons emphysémateux ». Ce n'est qu'en 1814 que Badham évoque une toux chronique et une hypersécrétion bronchique comme symptôme associé à la bronchite chronique observé au cours de la BPCO. En 1821 le médecin français Laënnec fait la description anatomopathologique de l'emphysème (destruction des parois alvéolaires) associé à la BPCO.

2.2. Définition et épidémiologie

Aujourd'hui, la physiopathologie de la BPCO est beaucoup mieux connue. En effet, elle est définie par l'OMS (l'Organisation Mondiale de la Santé) comme une pathologie chronique inflammatoire, lentement progressive et se caractérisant par une diminution des débits aériens. Hautement invalidante pour les patients, les parois bronchiques s'épaississent et une sécrétion de mucus apparaît limitant ainsi le passage de l'air dans les voies aériennes. Dans ses formes les plus sévères, une destruction alvéolaire est également observée. Ce phénomène est appelé emphysème. L'ensemble de ces lésions induit chez le patient une gêne respiratoire à l'effort qui peut s'aggraver et devenir persistante.

À l'heure actuelle, on estime que deux tiers des personnes souffriraient de BPCO sans le savoir. De plus, il n'existe aucun traitement curatif pour la BPCO. Seuls des traitements permettant l'amélioration des conditions de vie peuvent être mis en place pour soulager les patients. Il s'agit donc d'un problème majeur de santé publique.

En effet, selon les dernières estimations sanitaires mondiales de l'OMS, la BPCO a provoqué, en 2019, 6 % des décès mondiaux et est passée en 3^{ème} position des causes de décès derrière les affections cardiovasculaires telles que les cardiopathies ischémiques et les AVC (Accident Vasculaire Cérébral) [1]. La BPCO concernerait plus de 300 millions de personnes dans le monde [12] dont environ 3,5 millions en France [13]. Les taux de mortalité liés à la BPCO les plus élevés en France sont observés dans les régions Hauts-de-France, Grand-Est, à la Réunion ou encore en Bretagne [14]. Une étude réalisée entre 2011 et 2013,

dans les villes de Lille et Dunkerque, a démontré une prévalence de trouble respiratoire obstructif qui variait entre 9,5 % et 16 % [15].

2.3. Les signes cliniques de la BPCO

Les signes cliniques de la BPCO varient en fonction du stade de la pathologie. Le comité scientifique GOLD (Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) propose une classification en fonction de l'obstruction bronchique des patients. Elle est déterminée grâce à la mesure spirométrique s'appuyant sur deux indicateurs :

- **Le volume expiratoire maximal par seconde (VEMS)** qui correspond au volume d'air expiré pendant la première seconde d'une expiration forcée après une inspiration profonde,
- **La capacité vitale (CV)** correspondant au volume d'air maximum contenu dans les poumons entre une inspiration et une expiration.

Ainsi, un patient est dit BPCO lorsque le rapport VEMS/CV est inférieur à 70 %. C'est-à-dire lorsque le patient n'est pas capable d'expirer au moins 70 % du volume de ses poumons en une seconde. Les stades de la BPCO sont ensuite déterminés grâce à la mesure du VEMS (tableau 1).

| VEMS/CV | Grade | Sévérité | VEMS | Symptôme(s) associé(s) |
|----------------|--------|------------------------------------|--------|---|
| <70% | GOLD 1 | Obstruction bronchique légère | ≥80% | Dyspnée lors d'effort important |
| | GOLD 2 | Obstruction bronchique modérée | 50-80% | Dyspnée lors d'activité de la vie quotidienne |
| | GOLD 3 | Obstruction bronchique sévère | 30-49% | Dyspnée lors d'effort minime |
| | GOLD 4 | Obstruction bronchique très sévère | <30% | Insuffisance respiratoire |

Tableau 1 : Classification des stades de sévérité de la BPCO en fonction de la VEMS (classification GOLD)

Cette classification a évolué afin d'intégrer des paramètres cliniques comme la sévérité de la dyspnée (échelle mMRC) ainsi que la fréquence et la gravité des exacerbations.

La classification mMRC se distingue par 5 catégories allant de 0 à 4 :

- Stade 0 : essoufflement lors d'efforts importants,
- Stade 1 : essoufflement lors de la marche rapide sur terrain plat ou pente douce,
- Stade 2 : marche plus lente que la plupart des gens ou obligation de s'arrêter plus fréquemment,
- Stade 3 : obligation de s'arrêter pour reprendre son souffle après 100 m ou quelques minutes de marche,
- Stade 4 : essoufflement permanent ou essoufflement pour les gestes du quotidien (habillage par exemple).

Les patients BPCO sont sujets à des phases d'aggravation (les exacerbations) de la pathologie qui peuvent être d'origines diverses, notamment infectieuses. La fréquence et la gravité des exacerbations permettent également d'affiner le pronostic de la BPCO. Ainsi, lorsqu'un patient est sujet à plus de 2 exacerbations annuelles, le pronostic est dit défavorable. Lorsque le patient est hospitalisé au moins une fois par an pour une exacerbation, il s'agit alors d'un élément dit de mauvais pronostic. Ainsi, la sévérité clinique de la BPCO est classée de la manière suivante (Tableau 2) :

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

La radiographie pulmonaire va également permettre d'évaluer la gravité des lésions pulmonaires.

| | | Groupes | |
|---------------|---|------------------|---------------|
| Exacerbations | ≥ 2 / an ou ≥ 1 / an avec hospitalisation | C | D |
| | 0 ou 1 / an sans hospitalisation | A | B |
| | | mMRC < 2 | mMRC ≥ 2 |
| | | Dyspnée d'effort | |

Tableau 2 : Classification par sévérité clinique de la BPCO

2.4. Facteurs de risques

Les facteurs de risque pour le développement de la BPCO sont nombreux. Ils peuvent être intrinsèques (prédisposition génétique) ou extrinsèques (environnementaux pour les plus fréquents).

2.4.1. Facteurs de risques environnementaux

2.4.1.1. Le tabac, premier coupable

Le tabagisme est de loin de facteur de risque le plus important. En effet, 80 % des cas de BPCO sont liés à l'exposition prolongée à la fumée de cigarette. Quand une cigarette brûle, plus de 4 000 produits chimiques et additifs dont certains sont hautement toxiques pour l'organisme, sont relargués dans les fumées [16–18]. Ces composés irritants vont alors atteindre les poumons et provoquer une inflammation et une diminution des défenses immunitaires responsable d'infections chez les patients BPCO. Cette maladie met généralement plusieurs dizaines d'années pour se développer et de ce fait, elle touche essentiellement les personnes de plus de 50 ans. De plus, seulement 20 à 30 % des fumeurs développeront une BPCO bien que le tabagisme favorise aussi grandement l'apparition de cancers (1^{ère} cause de cancers du poumon ou ORL). Bien que l'incidence de la maladie soit plus importante chez les fumeurs actifs, le tabagisme passif peut également favoriser le développement de la BPCO. En effet, des atteintes pulmonaires liées au tabac durant l'enfance, peuvent provoquer des formes spécifiques de BPCO chez l'adulte jeune. Des chercheurs de l'American Cancer Society ont démontré un risque augmenté de plus de 30 % de développement de la BPCO lorsque les personnes non-fumeuses ont grandi avec des personnes fumeuses. De plus, l'exposition *in utero* à la fumée de cigarette contribue à la susceptibilité aux infections par le VRS [19].

2.4.1.2. Pollution professionnelle et pollution atmosphérique

Bien que le tabac soit le principal responsable de la survenue de la BPCO, d'autres facteurs environnementaux peuvent intervenir. L'exposition à des aérocontaminants liés aux activités professionnelles peut également contribuer au déclenchement ou à l'aggravation

post-tabagique de la BPCO. Les milieux agricoles et industriels sont particulièrement impactés. Parmi les secteurs où l'on observe un lien de causalité, on retrouve : l'industrie minière, le bâtiment et les travaux publics, l'industrie du textile, le milieu céréalier... [20].

Même si le lien entre pollution atmosphérique et BPCO du non-fumeur n'est pas clairement établi, de plus en plus d'études s'accroissent en ce sens. En effet, une étude anglaise de grande ampleur démontre un lien entre la concentration en particules fines PM_{2.5}, le déclin de la fonction pulmonaire et la BPCO [21]. La pollution de l'air par le dioxyde de soufre émis lors de procédés industriels ou par les chauffages résidentiels par exemple, pourrait être responsable de 8 à 15 % des cas de BPCO [22]. De la même manière, la pollution atmosphérique intérieure peut également favoriser l'apparition de la BPCO. Une étude rétrospective mondiale démontre que l'exposition liée à l'inhalation de fumée de biocombustible solide augmente le risque de BPCO en particulier dans les régions en voie de développement comme l'Afrique ou l'Asie [23].

2.4.1.3. Maturité pulmonaire

Les facteurs influençant le développement pulmonaire *in utero* ou au cours de l'enfance pourraient également favoriser l'apparition de la BPCO à l'âge adulte. En effet, l'exposition pré ou post-natale à la fumée de cigarette, au polluant ou encore les infections pulmonaires à répétition pourrait prédisposer au développement de la BPCO [24].

2.4.2. Facteurs endogènes

2.4.2.1. Facteurs de risques génétiques

Le déficit en alpha 1 antitrypsine (AAT) qui est le plus étudié, représente seulement 1 à 2 % des cas de BPCO. Ce défaut favorise l'apparition précoce de la pathologie. L'AAT est une anti-protéase qui permet la protection des tissus pulmonaires contre les protéases produites par les neutrophiles (cellules particulièrement augmentées chez les patients BPCO et très riche en protéases (MMP et cathepsines)) [25]. Ainsi, le défaut de production d'AAT favorise la destruction des tissus pulmonaires par le neutrophile et cause ainsi le développement des signes cliniques.

Certains polymorphismes génétiques peuvent aussi agir comme co-facteurs du développement de la BPCO. C'est ce qui semble être le cas pour des SNP de récepteurs de la nicotine comme la sous-unité alpha-5 du récepteur (un des composants essentiels de la dépendance au tabac) qui sont fréquemment associés au développement de BPCO [26] ou de cancer chez les fumeurs. De plus, une étude de grande ampleur anglaise a identifié en 2017, 43 nouvelles variations génétiques associées à la BPCO [27].

L'environnement peut également affecter le génome et entraîner la mise en place de mécanismes épigénétiques qui vont contribuer à la modification d'expression des gènes. La modification des phénomènes d'hypo et d'hyper-méthylation des histones est associée à des altérations épigénétiques impliquées dans l'expression de gènes associés au cancer dans des cultures de cellules épithéliales bronchiques ayant été en contact avec de la fumée de cigarette [28]. La diminution de l'activité enzymatique HDAC2 (Histone Désacétylase 2) dans les poumons de patient BPCO est associée à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 et à l'augmentation de l'acétylation de son promoteur [29].

2.4.2.2. Sexe

Plus sensibles au méfait du tabac, les femmes sont plus susceptibles de développer la maladie de manière précoce. Elles sont sujettes à des symptômes plus sévères que leurs homologues masculins et le taux de mortalité lié à la BPCO est plus élevé chez les femmes [30].

2.4.2.3. L'âge

L'apparition de la BPCO est multifactorielle et dépend principalement de la durée et de la consommation tabagique du patient (ou à l'exposition environnementale). La BPCO est une pathologie qui survient plutôt tardivement et sa prévalence augmente avec l'âge. D'après l'OMS, les premiers symptômes de la maladie apparaissent généralement vers l'âge de 45 ans.

2.5. Traitement de la BPCO

La BPCO est une maladie évolutive débutant souvent par des symptômes banals et souvent considérés comme anodins par le patient (toux, crachat par exemple). S'ils ne sont pas pris en charge rapidement, ces symptômes vont s'aggraver progressivement et devenir de plus en plus gênants pour la vie quotidienne de la personne malade. Afin de mieux répondre aux besoins du patient, les traitements seront différents et de plus en plus lourds en fonction de la sévérité des symptômes et du stade de la pathologie [31].

La BPCO étant dans la plupart des cas provoquée par l'inhalation de fumée de tabac, le sevrage tabagique est dans tous les cas le premier traitement indispensable pour éviter la progression de la BPCO. Si la maladie est liée à l'inhalation de toxiques respiratoires, cette exposition doit également être suspendue le plus rapidement lorsque c'est possible (changement de poste lorsque la BPCO est liée à son environnement de travail par exemple).

Lorsque les traitements de première intention ont été instaurés et que les sources de la maladie ont été, dans la mesure du possible, évitées, des traitements médicamenteux peuvent être mis en place. Afin de faciliter la respiration, la prescription de bronchodilatateur est logiquement sollicitée. Il en existe deux types : les bronchodilatateurs à courte durée d'action sont utilisés lorsque la BPCO est légère ou modérée et que les symptômes sont ponctués par des périodes d'essoufflements. Lorsque la maladie s'aggrave, les bronchodilatateurs à longue durée d'action peuvent être donnés au patient.

L'administration de corticoïdes inhalés peut être associée à la prise de bronchodilatateurs. L'action anti-inflammatoire des corticoïdes permet surtout de diminuer le risque d'exacerbation notamment dans les stades les plus sévères de la pathologie. Cependant, leur usage est restreint, car ce traitement peut dans le même temps altérer les défenses anti-infectieuses et ainsi faciliter les épisodes infectieux.

Dans les cas les plus extrêmes, de l'oxygénothérapie ou une ventilation non-invasive peuvent être proposées. Ce sont des traitements lourds nécessitant une utilisation d'environ 15 h par jour pour améliorer la survie des patients. En dernier recours et lorsque l'emphysème est trop important aboutissant à une insuffisance respiratoire majeure, certains patients peuvent bénéficier de transplantations pulmonaires.

De plus en plus utilisée, la réhabilitation respiratoire est une approche multi et transdisciplinaire associant l'exercice musculaire, l'éducation thérapeutique et la kinésithérapie. Elle est souvent utilisée dès le stade II de la maladie, lorsque le patient présente une intolérance à l'effort et que cela engendre une limitation dans les activités quotidiennes du malade.

Enfin, la vaccination antigrippe et anti-pneumocoque est conseillée afin de prévenir les infections respiratoires responsables des exacerbations.

Malgré les mesures existantes, il n'existe aucun traitement curatif contre la BPCO. L'efficacité des traitements utilisés dépend uniquement de la précocité du diagnostic et de la prise en charge de la pathologie. L'ensemble des mesures, ne permettent qu'une amélioration des conditions de vie des patients. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour répondre aux besoins actuels.

3. Immunité et BPCO

L'exposition à la fumée de cigarette entraîne, au niveau pulmonaire, l'installation de mécanismes immunitaires complexes faisant intervenir de nombreux types de cellules. Le recrutement important de cellules immunitaires innées va contribuer à l'initiation et à la perpétuation de l'inflammation chronique responsable de la modification structure/fonction des poumons. Cette inflammation sera amplifiée par la mise en place d'une immunité adaptative [32].

3.1. Physiopathologie de la BPCO

L'inhalation de gaz toxique prolongée (pollution, fumée de cigarette...) va entraîner une inflammation chronique des voies aériennes. Cette inflammation continue va contribuer à l'installation de mécanismes physiopathologiques retrouvés chez les patients. Bien que la physiopathologie de la BPCO soit complexe et contienne encore des versants non explorés à ce jour, de nombreuses études ont permis de faire la lumière et de décrire certains mécanismes impliqués dans la BPCO (Figure 3) [33].

L'effet toxique de la fumée de cigarette va engendrer un stress oxydatif au niveau pulmonaire. Le stress oxydatif consiste en la libération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) par les cellules endommagées. Ce phénomène est fréquemment retrouvé lors de syndromes inflammatoires chroniques telles que la BPCO, participant ainsi à la genèse et/ou à l'entretien de l'inflammation dans ces pathologies. La production d'espèces réactives à l'oxygène va induire, indirectement, l'activation et le recrutement de macrophages alvéolaires, en mobilisant d'autres voies de signalisation intracellulaires dont NF- κ B comme indiqué ci-dessous [34] et de neutrophiles qui vont à leur tour produire des ROS. Ces mécanismes sécrétoires vont être responsables de l'altération des fonctions épithéliales et notamment de l'altération de la clairance mucociliaire, de la destruction tissulaire responsable de l'emphysème et de l'hypersécrétion de mucus [35,36].

Les lésions occasionnées par le stress oxydatif vont entraîner la libération de facteurs associés aux dommages cellulaires (DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns) [37]. Ils vont être pris en charge par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires et

activer la réponse immunitaire innée. Ces récepteurs sont les PRR (Pattern Recognition Receptor) [38]. Il en existe plusieurs catégories qui peuvent être membranaires (Toll-like-receptor, récepteur scavenger...) ou cytoplasmiques (RIG-like-receptor ou RLR ou Nod-like receptor ou NLR). Les composés contenus dans la fumée de cigarette vont également pouvoir activer les TLR-2 et 4 sur l'épithélium et les cellules immunitaires respiratoires [39,40]. Ces récepteurs vont activer la voie de signalisation dépendante de MyD-88 aboutissant à l'activation de NFκB et permettant ainsi la synthèse de cytokines et de chimiokines (IL-8, TNF-α, IL-1β, CXCL1, IL-6...)[41]. Cette réponse inflammatoire non contrôlée, va contribuer au recrutement et à l'activation de cellules immunitaires telles que les macrophages, les monocytes, les neutrophiles, les cellules natural killer (NK) [25]. Ces cellules et les médiateurs qu'ils produisent vont être responsables du déséquilibre de la balance protéase/anti-protéase. En effet, elles sécrètent des protéases telles que : l'élastase [42], des métalloprotéinases de matrice (MMP par exemple MMP-9 [43] et MMP-12[44]) et des peroxydases (comme le MPO : Myeloperoxydase)[45,46]. Cette perte d'homéostasie va participer à la destruction des parois alvéolaires responsable de l'emphysème [25]. De plus, la sécrétion de MMP-9 par les macrophages va favoriser le clivage du TGF-β pour induire sa forme active qui est responsable de l'hyperplasie des muscles lisses pulmonaires, une caractéristique du remodelage pulmonaire observé au cours de la BPCO [47,48].

Cette inflammation persistante, impliquant des cellules de l'immunité innée, va être aggravée par l'apparition d'une réponse immunitaire adaptative. En effet, le recrutement de cellules dendritiques (DC) au niveau pulmonaire va permettre l'activation de cellules immunitaires plus spécifiques d'antigène comme les lymphocytes B et T. Les cellules dendritiques sont des cellules sentinelles à l'interface entre la réponse immunitaire innée et adaptative. En effet, les cellules dendritiques sont capables de capturer les antigènes dans les tissus périphériques afin de les présenter aux lymphocytes T CD4 et T CD8. L'activation de cette réponse adaptative au niveau des organes lymphoïdes secondaires nécessite plusieurs signaux : l'expression, au niveau de la membrane, des molécules de présentation appelées CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de type 1 ou de type 2 et de molécules de costimulation telles que le CD86 ou le CD40 [49,50]. La libération de cytokines pro-inflammatoires de type IL-12, CXCL10 ou TNF-α va fournir le troisième signal d'activation et dans le même temps orienter leur différenciation, pour des T CD4 naïfs en lymphocytes

T Th1 (T helper 1) et en lymphocytes T CD8 effecteurs contribuant un peu plus à l'état inflammatoire incontrôlé des patients BPCO. Cependant, le profil de sécrétion des cytokines par les DC peut orienter cette différenciation vers d'autres phénotypes (Th2, Th17, Th9).

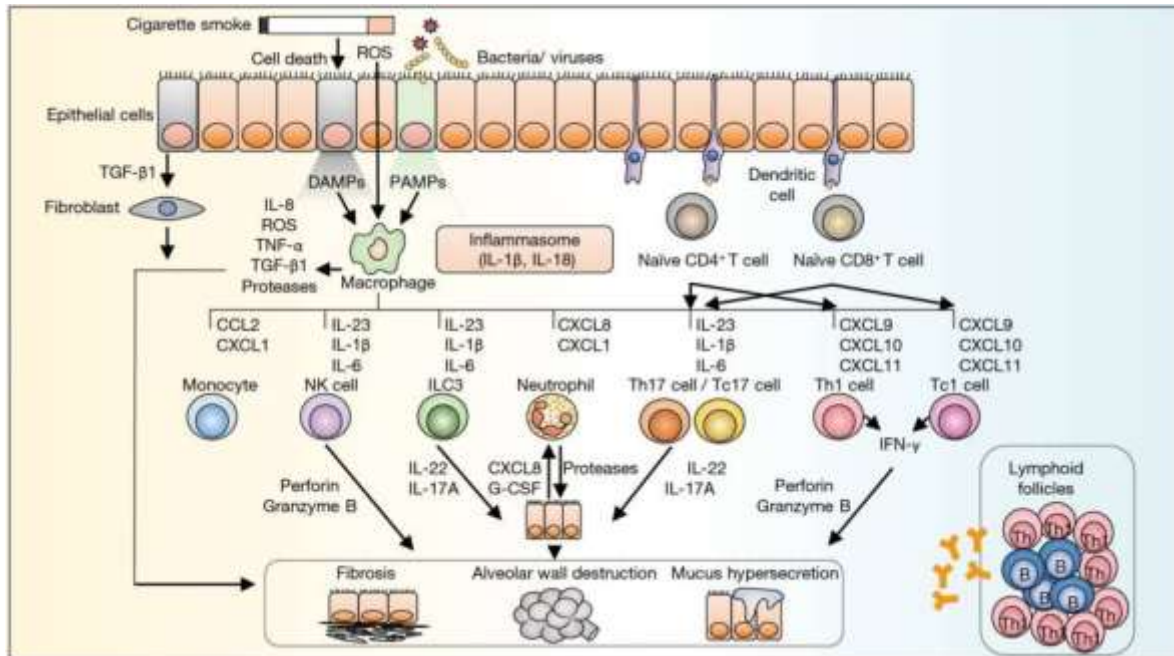


Figure 3: Réponse immunitaire lors de l'exposition à la fumée de cigarette

L'inhalation de fumée de cigarette va altérer la barrière épithéliale pulmonaire et induire l'activation de cellules sentinelles : les macrophages. L'initiation de cette réponse immunitaire conduit à la production de médiateurs pro-inflammatoires qui vont permettre le recrutement de cellules immunitaires dont les neutrophiles. Ces derniers sont à l'origine de la production de protéases responsables de la destruction des parois alvéolaires qui conduit à l'emphysème. L'hypersécrétion de mucus et la fibrose associées à cette réponse inflammatoire chronique contribuent à la diminution de la fonction respiratoire observée au cours de la BPCO (Hikichi et al, 2019).

3.2. Réponse immunitaire innée

3.2.1. L'épithélium respiratoire

L'épithélium respiratoire est constitué de cellules jointives liées entre elles par des jonctions serrées. Ancré sur une lame basale par des jonctions adhérentes, l'épithélium est composé de cellules polarisées (Figure 4). L'épithélium respiratoire est dit pseudostratifié et comporte différents types cellulaires dont des cellules basales, de cellules caliciformes responsables de la sécrétion de mucus, de cellules Club et de cellules ciliées [51]. La composition de l'épithélium respiratoire est différente en fonction de la localisation dans l'arbre bronchique. Très présente au niveau proximal, la proportion de cellules caliciformes diminue progressivement lorsque l'on descend vers les alvéoles pulmonaires. Les cellules

Club, sont quant à elles retrouvées au niveau des bronchioles. L'épithélium alvéolaire est constitué de pneumocytes de type I et II.

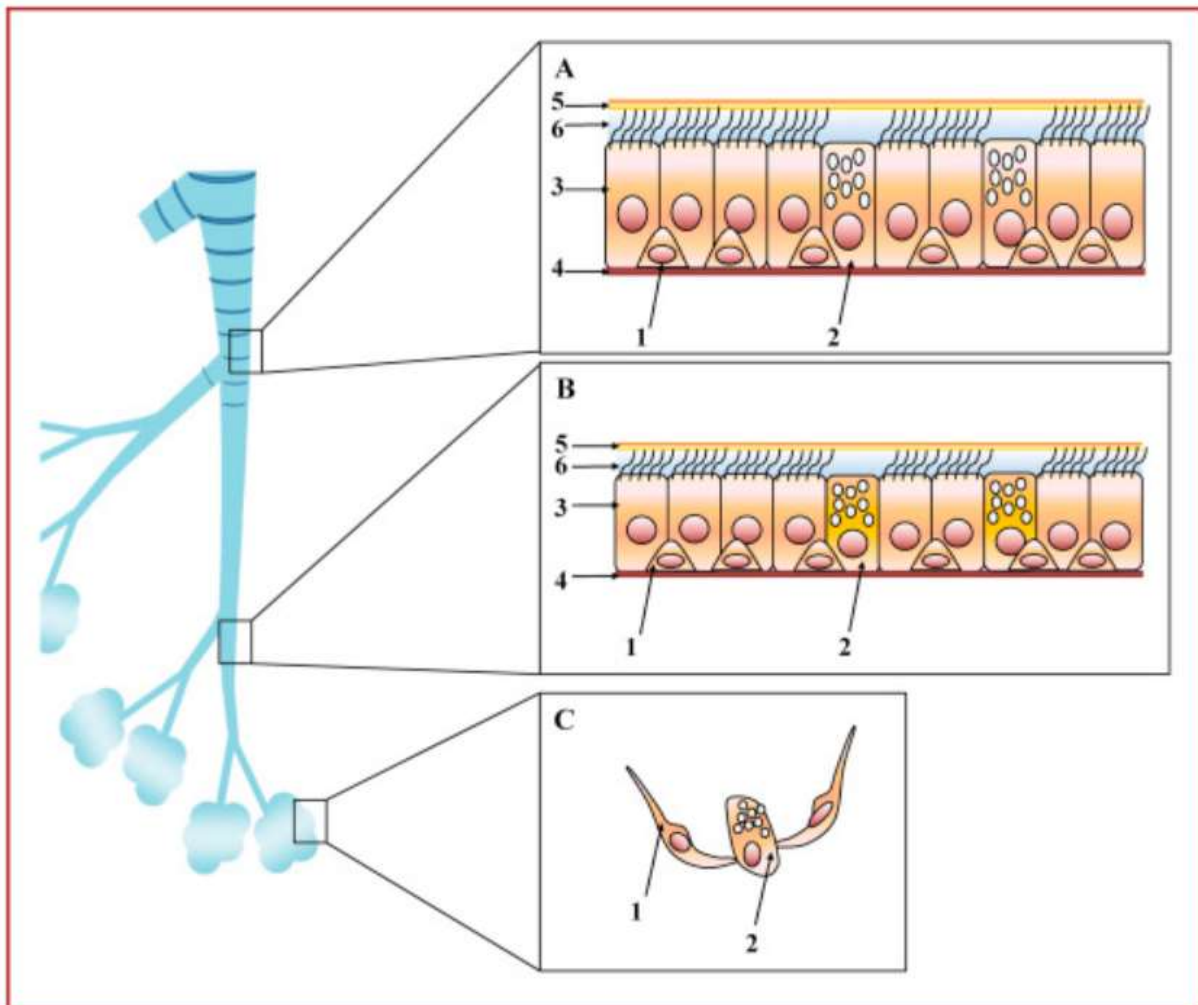


Figure 4 : Composition cellulaire de l'épithélium respiratoire

A : l'épithélium bronchique est constitué de cellules basales (1), de cellules caliciformes (2), de cellules ciliées (3) reposant sur la membrane basale. L'épithélium est recouvert de deux phases de mucus : la phase viscoélastique (5) et la phase péréciliaire (6). B : composition de l'épithélium bronchiolaire. C : l'épithélium alvéolaire est composé de pneumocytes de type I et II.

À la fois barrière physique et barrière immunitaire face aux agressions extérieures (pathogène, particules...), l'épithélium forme le tout premier rempart pour la défense pulmonaire avec les macrophages alvéolaires.

En réponse à la fumée de cigarette, l'épithélium respiratoire subit de nombreux changements morphologiques responsables du remodelage observé chez les patients. En effet, l'exposition à la fumée de cigarette favorise la transition épithélio-mésenchymateuse [52] et la reprogrammation des gènes codant pour des jonctions intercellulaires de l'épithélium entraînant une diminution de la résistance trans-épithéliale [53]. De plus, le stress occasionné par la fumée de cigarette induit l'augmentation de l'expression des

protéines régulatrices du cycle cellulaire : p16^{ink4a} et p21^{CIP/WAF} ce qui favorise la sénescence cellulaire chez les patients BPCO [54]. Le remodelage tissulaire observé au cours de la pathogenèse est associé à une diminution de l'activation de la voie de signalisation Hedgehog et du facteur de transcription Gli2 [55] responsable de l'altération de la différenciation des cellules épithéliales ciliées. Ce mécanisme conduit à un remplacement des cellules multiciliées par des cellules primaires ciliées non-mobiles ayant pour conséquence une diminution de la fréquence de battements ciliaires dans les voies aériennes [56,57]. Associées à une hypersécrétion de mucus, les modifications morphologiques et fonctionnelles, engendrées par l'exposition à la fumée de cigarette, sont responsables de l'altération de la clairance mucociliaire [58] qui facilite l'entrée des pathogènes dans les tissus et l'apparition des exacerbations chez les patients [59–62]. Les cellules épithéliales sont également productrices de protéases dont les MMP-2 et MMP-9 [54] qui participent à la genèse de l'emphysème en favorisant la destruction des parois alvéolaires. En revanche, la production de TGF- β va contribuer à l'apparition de la fibrose sous-épithéliale et à l'épaississement des parois bronchiques [63].

Les cellules épithéliales ont également un rôle de barrière immunitaire. De nombreux médiateurs de l'immunité libérés par l'épithélium peuvent être modulés par la fumée de cigarette. En effet, l'épithélium bronchique est capable de libérer des facteurs pro-inflammatoires tels que de l'IL-1 β , de l'IL-6, du CXCL8 et du GM-CSF après activation du TLR4 [54,64]. Cette sécrétion va permettre le recrutement local de monocytes et de neutrophiles [65] et contribuer à l'installation et à la pérennisation de l'inflammation pulmonaire. Ainsi, ces données permettent de définir un mécanisme par lequel la cigarette induit une inflammation au niveau pulmonaire.

Comme indiqué précédemment, l'exposition à la fumée de cigarette augmente l'incidence des infections respiratoires. Ce phénomène pourrait être, en partie, lié à modification de la réponse antimicrobienne de l'épithélium. En effet, l'épithélium respiratoire constitue la première cible des virus respiratoires au sein duquel ils se répliquent généralement, mais également des bactéries. L'exposition à de l'extrait de fumée de cigarette diminue la production épithéliale de différents peptides antimicrobiens comme CCL20 [66], de β -défensines, de peptide de la famille des S100 et de lipocaline2 (LCN2) [67–70]. De plus, la diminution de production de S100A8 est corrélée à la sévérité de la

pathologie plus particulièrement avec l'apparition de l'emphysème [69]. À l'inverse, la protéine S100A9 est augmentée dans les lavages broncho-alvéolaires. L'augmentation des protéines S100 au cours de la BPCO pourrait favoriser les dommages tissulaires associés à l'exposition à la fumée de cigarette [70,71]. L'inhibition de S100A9 dans un modèle murin de BPCO réduit la production de la protéine MMP-3 associée à l'emphysème et l'inflammation [71]. La réponse antivirale est également modifiée au cours de la BPCO. Différents modèles *in vitro* d'infection par des virus démontrent une altération de la réponse antivirale des cellules épithéliales exposées à la cigarette. Dans ces modèles, on retrouve, une diminution de la reconnaissance virale liée à l'altération de l'expression des récepteurs de motifs viraux tels que le TLR3 et le RIG-I [72–74]. Ceci, conduit à la diminution de la production d'interférons de type I, II et III [75–78] associée à une diminution des systèmes de phosphorylation des voies STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) [76,79] : mécanismes permettant l'activation de l'expression des molécules régulatrices des interférons comme les IRF (Interferon Regulatory Factor) et les ISG (Interferon Stimulated Gene) [72,77,79]. La diminution de la réponse interféron au virus est accompagnée d'une diminution de molécules pro-inflammatoire comme l'IL-6, l'IL-8 ou CXCL10 [74,75]. Plus récemment, une étude démontre une augmentation de l'expression du récepteur ACE2 dans les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires de patient BPCO ce qui pourrait faciliter l'entrée du SARS-CoV-2 dans les poumons [80].

3.2.2. Les neutrophiles

Les neutrophiles font partie des cellules de première ligne dans la défense antimicrobienne, car ils sont rapidement mobilisés lors d'une agression. Ces cellules possèdent une capacité de phagocytose et de bactéricidie et elles sont capables de libérer des cytokines permettant d'amplifier la réponse inflammatoire. Les neutrophiles ont un rôle central dans la pathogenèse de la BPCO. Constamment recrutés au niveau des petites voies aériennes, leur présence corrèle avec le déclin de la fonction pulmonaire [81–83]. La libération de facteurs neutrophiliques contribue à l'apparition des caractéristiques physiopathologiques observées dans différents modèles animaux et cellulaires. En effet, la fumée de cigarette favorise l'activation des neutrophiles, via le TLR9 induisant une production importante de CXCL8 [84]. Ils sont également responsables de la libération de

nombreuses autres protéines dont du NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin)[45], des protéases (MMP9 [82], MMP12 [44]), de l'élastase [85] et de la peroxydase (MPO) [82] qui participent à l'aggravation de l'inflammation [84,85], et à la genèse des lésions tissulaires conduisant au remodelage bronchique et à l'emphysème [86] [45]. Le recrutement et l'activation des neutrophiles dans les poumons conduit à la formation de NETs (Neutrophil Extracellular Traps) lors de la mort de ces cellules [87]. Composé d'ADN et de diverses protéines, ils permettent de piéger les micro-organismes pathogènes lors d'une infection. Au cours de la BPCO, leur présence est associée à une aggravation des capacités respiratoires [88] et participerait à l'apparition des exacerbations chez les patients [88,89].

Malgré une présence importante de neutrophiles au niveau pulmonaire et systémique chez les malades [81,90–92], les patients BPCO sont sujet à de nombreuses infections pulmonaires, pouvant être liées à une dysfonction des propriétés antimicrobiennes des neutrophiles. En effet, les neutrophiles présentent une imprécision migratoire en réponse aux signaux chimioattractants même s'ils migrent plus rapidement [93]. Cette imprécision chez les neutrophiles, pourrait favoriser l'augmentation de dommages tissulaire observés chez les patients en augmentant et en complexifiant leur parcours dans l'organisme ainsi qu'en retardant la capture des pathogènes. De plus, la capacité de phagocytose des neutrophiles est altérée chez les patients BPCO comparativement aux sujets sains [94,95]. Associés à une diminution de l'activité bactéricide [96] ces défauts fonctionnels des neutrophiles pourraient favoriser le développement d'exacerbations infectieuses chez les patients.

Du fait de la chronicité de la pathologie, le nombre de neutrophiles circulant augmente et pourrait être un marqueur de pronostic de sévérité et d'exacerbation de la BPCO [88,90].

3.2.3. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules mononucléées phagocytaires présents dans de nombreux tissus périphériques tels que : le sang, l'ensemble des muqueuses y compris la peau et les poumons et les organes lymphoïdes. À l'état physiologique, les macrophages

sont les cellules immunitaires les plus représentées dans les poumons. En effet, les macrophages font partie du premier rempart face à une agression extérieure. Leur rôle est la capture des agents pathogènes, des débris cellulaires, et des particules afin d'orchestrer et surtout de limiter la réponse immunitaire innée et adaptative subséquente. Bien que leur rôle soit essentiellement lié au maintien de l'homéostasie, les macrophages sont capables, lorsque c'est nécessaire, de libérer des médiateurs de la réponse inflammatoire afin de stimuler le recrutement d'autres cellules au niveau local. Ils peuvent également jouer le rôle de présentateur d'antigènes pour les lymphocytes T.

Il existe plusieurs types de macrophages au niveau pulmonaire : les macrophages alvéolaires, les macrophages interstitiels et les macrophages dérivés de monocytes [97]. Les facteurs environnementaux vont contribuer à la différenciation des macrophages comme pour les macrophages alvéolaires qui sont adaptés à leur environnement pauvre en nutriments et riche en oxygène. De plus, les médiateurs influent sur le phénotype de ces cellules vers un phénotype pro-inflammatoire pour le M1 (IFN- γ , GM-CSF) alors que la polarisation M2 (par les cytokines Th2 et le M-CSF) favorise une réponse anti-inflammatoire des macrophages. Ces différents types cellulaires peuvent être soit bénéfiques soit délétères en fonction des conditions physiopathologiques.

Au cours de la BPCO et lors de l'exposition à la fumée de cigarette, un recrutement massif de macrophages est observé au niveau des poumons [34]. Ce recrutement cellulaire est associé à un changement dynamique des profils macrophagiques retrouvés dans les différents compartiments pulmonaires [98]. Alors qu'un profil de type M2, majoritairement, est observé dans les lavages broncho-alvéolaires, le « switch » de la balance M1/M2 favorise l'apparition des macrophages pro-inflammatoires (M1) dans l'épithélium bronchique des patients. Ces macrophages vont être responsables de la production de protéase, notamment la MMP9 [43] contribuant ainsi à l'inflammation et au remodelage pulmonaire observé chez les patients.

Malgré cet important recrutement de cellules au niveau pulmonaire, la fumée de cigarette favorise le déclin de l'activité des macrophages (Figure 5). En effet, l'expression des marqueurs de reconnaissance CD91, CD44, and CD71, et l'activité phagocytaire et bactéricide des macrophages est restreinte chez les fumeurs [97,99,100]. La contamination fréquente des patients BPCO par des virus respiratoires peut être évoquée, certains virus

ayant la capacité d'inhiber la phagocytose bactérienne des macrophages et de réduire leur activité HDAC2 (Histone déacétylase 2). De plus, il a été observé une diminution de la production de TNF- α , d'IL-6, CXCL10 associée à une réduction de l'expression du TLR3 par les macrophages chez les fumeurs [101,102]. Ces altérations fonctionnelles des macrophages au cours de la BPCO vont contribuer à l'entretien de l'inflammation et à la mise en place d'un terrain favorisant les colonisations microbiennes aggravant le remodelage tissulaire et favorisant les exacerbations.

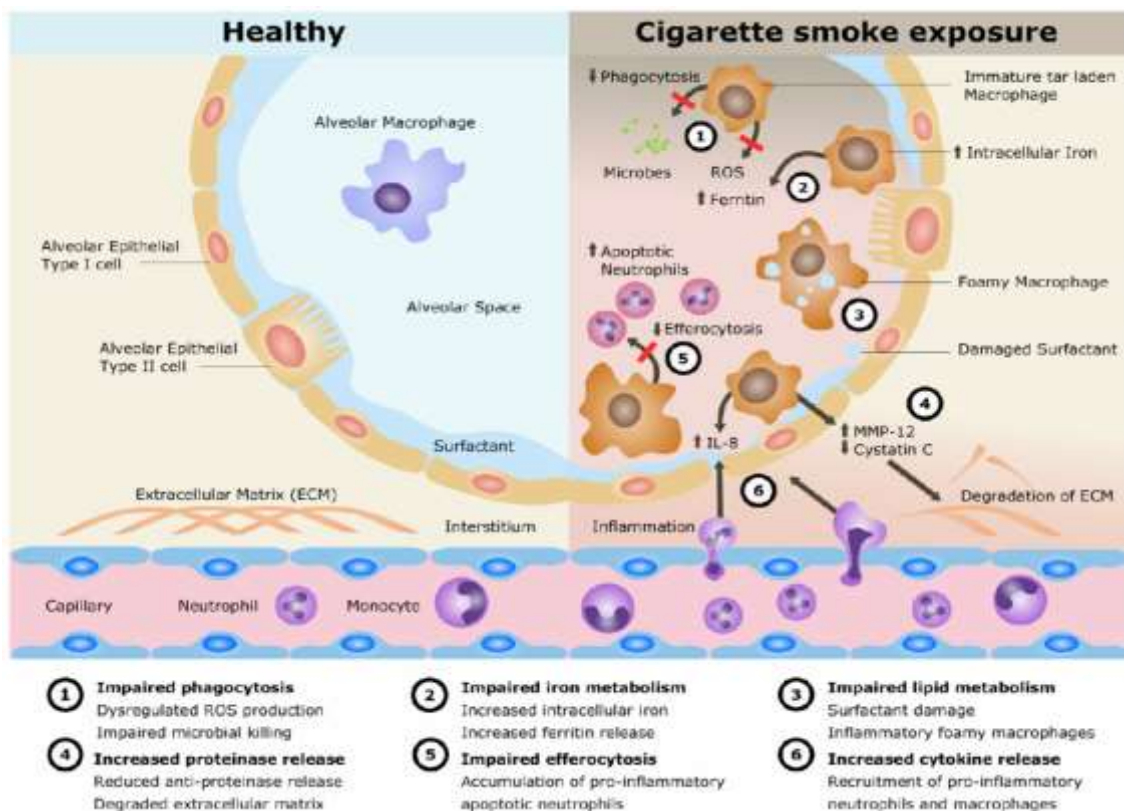


Figure 5 : Altérations fonctionnelles des macrophages par la fumée de cigarette

La fumée de cigarette altère l'activité phagocytaire des macrophages et contribue à l'augmentation de facteurs pro-inflammatoires et de métalloprotéase qui vont participer à la dégradation tissulaire et favoriser l'entrée des pathogènes au niveau pulmonaire (Lugg et al, 2021).

3.2.4. Les cellules dendritiques : À l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative !

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Ces cellules font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Présentes dans le sang, les muqueuses et les organes lymphoïdes pour repérer les signaux de danger dont les agents infectieux, elles libèrent des médiateurs biochimiques pour alerter les cellules de premières lignes. Une fois le pathogène intégré, elles sont capables de

présenter à leur surface un fragment (épitope) de ce pathogène sous forme d'antigène. Cet antigène sera présenté au lymphocyte T et B naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires afin d'initier l'activation de la réponse adaptative.

Il existe différentes sous-populations de DC ayant des fonctions différentes (Figure 5). À l'état basal, on distingue les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) caractérisées par l'expression du CD11c et du CMH II (Complex majeur d'histo-compatibilité de classe II) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Siglec-H) chez la souris. Leur différenciation en DC matures dépend du Flt3L (fms-like tyrosine kinase 3 ligand).

Les pDC sont considérées comme des cellules résidentes pouvant être recrutées en périphérie lors de la réponse inflammatoire. Les pDC se caractérisent principalement par l'expression des CD45B- B220 et siglec-H par exemple et sont spécialisées dans la reconnaissance de motifs viraux et la sécrétion d'interféron de type I [103].

Parmi les cDC, on distingue deux sous-types, les cDC1 et les cDC2, différenciables par un certain nombre de marqueurs (Figure 6) et par leur localisation. Alors que les cDC1 dépendent de l'expression du facteur de transcription *batf3* et vont aboutir à une réponse immunitaire de type 1, les cDC2 dépendantes de l'expression d'*IRF4* vont favoriser le déclenchement d'une réponse TH2 et TH17 [104,105].

Au niveau de l'épiderme et de certaines muqueuses, il existe une population cellulaire appelée cellules de Langerhans. Semblable au macrophage, elles vont capter les antigènes arrivant à traverser la peau.

Enfin, une dernière population de DC a récemment été mise en évidence : les cellules dendritiques inflammatoires (iDC) [106]. Contrairement aux cellules dendritiques « classiques » issus de la maturation de pré-DC, les iDC proviennent de la différenciation dépendante du M-CSF [107] de monocytes recrutés au site de l'inflammation [106]. Ainsi, il est facile de comprendre leur absence en dehors de tout contexte inflammatoire. Elles expriment des marqueurs de cellules dendritiques notamment CMH-II et CD11c. Cette population a par la suite été plus étudiée et retrouvée dans de nombreux contextes pathologiques comme des maladies inflammatoires (asthme par exemple), maladies infectieuses virales, bactériennes, parasitaires... [106,108,109].

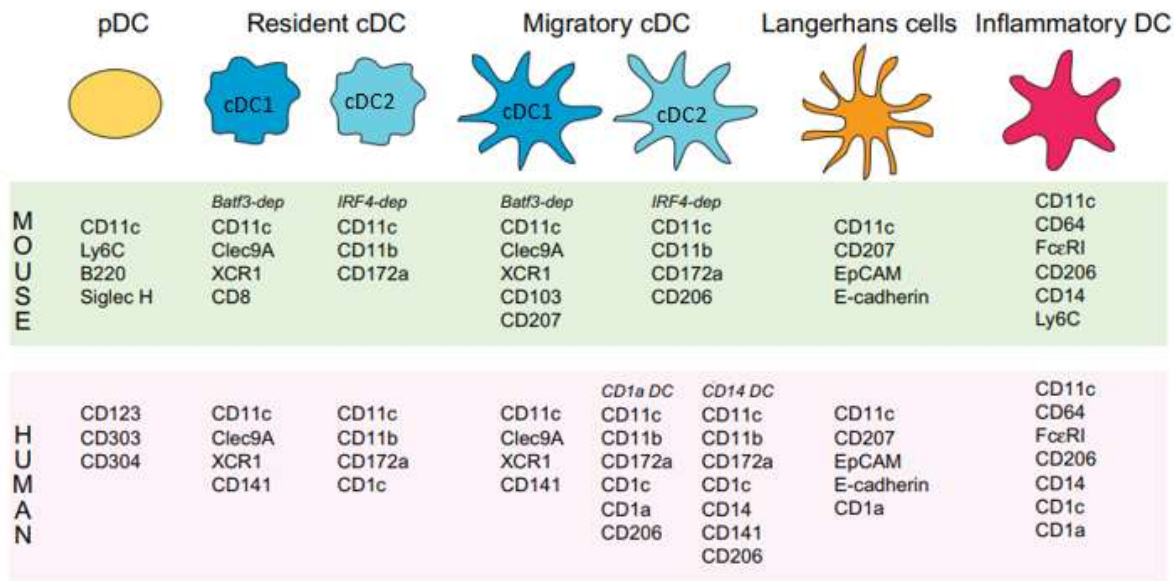


Figure 6 : Marqueurs des cellules dendritiques

Il existe différents types de cellules dendritiques, toutes ayant des fonctions qui leur sont propres. En effet, en fonction de l'état physiopathologique dans lequel se trouve l'organisme les DC vont exprimer, à leur surface différents marqueurs. Ainsi, on distingue différentes catégories dont les DC conventionnelles, les pDC experts dans la réponse antivirale, les cellules de Langerhans, principalement, présentent au niveau cutané et les DC inflammatoires issues de la différenciation de monocytes. Ces différentes populations existent chez l'homme et la souris même si certains marqueurs diffèrent (adapté de segura et Amigorena, 2015) [105].

Les données concernant les cellules dendritiques au cours de la physiopathologie de la BPCO sont nombreuses, mais restent assez discordantes. En effet, un certain nombre d'études démontrent que l'exposition à la fumée de cigarette induit un recrutement de cellules dendritiques au niveau pulmonaire [109–114] et notamment des iDC durant l'exacerbation virale par H1N1 [115]. Cette accumulation est associée à une augmentation de l'expression du CCL20 (C-C motif chemokine ligand 20) chez les patients [114]. Cependant, d'autres études ont démontré une diminution du nombre de DC au niveau pulmonaire [116,117], dans les muqueuses bronchiques [118] et dans le compartiment nasosinusal [113] lors de l'exposition à la fumée de cigarette. Dans cette dernière étude, la diminution des DC concernait la sous-population cDC2 puisque la population de cDC1 était augmentée. Ces résultats contradictoires pourraient suggérer que la proportion des différentes sous-populations de cellules dendritiques au cours de la BPCO dépend du compartiment étudié.

Les DC présentent également une altération de leurs différentes fonctions au cours de la BPCO. En effet, plusieurs études ont mis en évidence un défaut de maturation des DC lié à la diminution d'expression des marqueurs CD83 [119,120], CD80, CD86 et CMH-II [117]. La libération d'élastase par les neutrophiles au cours de la pathogenèse de la BPCO pourrait

être responsable de la dégradation de ces peptides de surface [121]. Au contraire, d'autres études révèlent une augmentation de ces mêmes marqueurs. Ce phénomène serait la résultante de l'effet direct de la nicotine sur les DC favorisant une maturation précoce des cellules devenant moins efficaces pour la capture des antigènes et la stimulation de la réponse T [122–124]. Les données sur le statut tabagique des patients n'étant pas forcément accessibles, il est difficile de dire si les discordances inter-études concernant l'expression de ces molécules sont liées à la poursuite du tabac par les patients ou à la BPCO elle-même. Cependant, que les marqueurs soient diminués ou augmentés, les résultats convergent tous vers une altération fonctionnelle des cellules dendritiques. En effet, une étude *in vitro* démontre l'influence de la durée d'exposition sur la relation expression des marqueurs de maturation et fonction cellulaire. Ainsi, l'exposition à court terme favorise une maturation précoce des cellules associée à l'augmentation des marqueurs d'activation (CMH-II, CD83, CD86, CD40) aboutissant à la réduction de la capacité de capture des antigènes alors que l'exposition à long terme entraîne la diminution de ces marqueurs et inhibe la capacité des DC à stimuler les lymphocytes T [125]. Ainsi, les altérations fonctionnelles provoquées par les effets toxiques de la cigarette pourraient contribuer au défaut de l'activation de la réponse immunitaire adaptative spécifique pouvant faciliter la dissémination des pathogènes chez les patients [126].

3.3. Activation de la réponse adaptative

Les cellules présentatrices d'antigènes possèdent, à leur surface, un grand nombre de récepteurs et de molécules de jonctions, de costimulation et de communication leur permettant d'interagir avec d'autres cellules et d'organiser la réponse appropriée face aux signaux perçus. Lorsque l'antigène a été internalisé, il sera dégradé pour pouvoir être présenté par le CMH-II aux lymphocytes naïfs. L'intégration du signal antigénique et la perception des signaux environnementaux vont favoriser la maturation des cellules dendritiques et leur migration dans les ganglions lymphatiques drainant grâce à l'expression de récepteurs pour les chimiokines dont le CCR7 (C-C chemokine receptor 7) [127]. L'interaction des DC avec les lymphocytes T naïfs se fait par l'intermédiaire d'une synapse immunologique faisant intervenir 3 signaux distincts nécessaires à la différenciation des lymphocytes T (Figure 7). Le premier signal consiste en la présentation de l'antigène par les

molécules du CMH. La reconnaissance des DAMPs et des MAMPs va induire la maturation des DC et favoriser l'expression de molécules de co-stimulation telles que le CD80 et le CD86 (signal 2). Enfin, la sécrétion de cytokines spécifiques va permettre la polarisation de la réponse adaptative. Ainsi, la libération d'IL-12 orientera vers une réponse de type Th1, la libération d'IL-4 vers une réponse Th2, la libération d'IL-1 β et d'IL-23 vers une polarisation Th17 par exemple [128]. Ainsi, les cellules dendritiques pourraient jouer un rôle central dans la polarisation Th1/Th17 des patients BPCO [110,129–131].

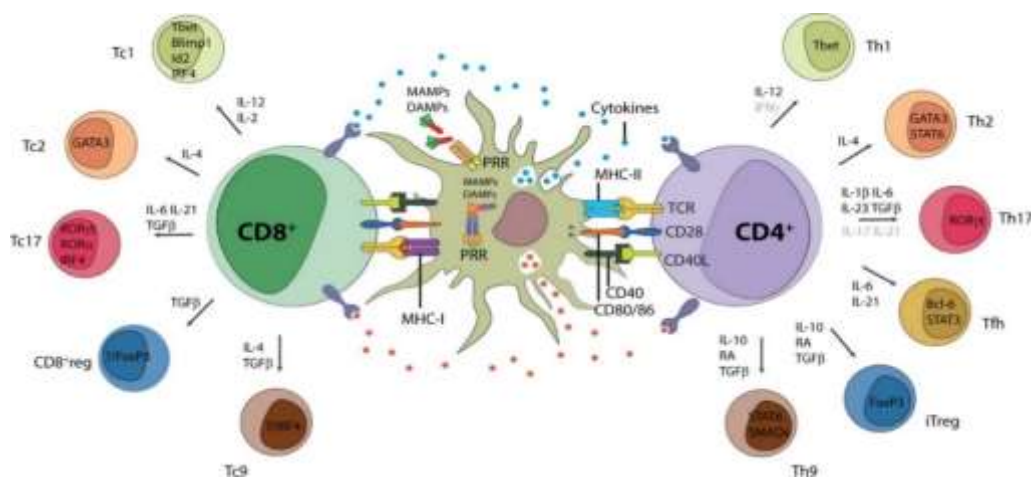


Figure 7 : Synapse immunologique et activation de la réponse adaptative

L'activation de la réponse immunitaire adaptative se déroule en 3 étapes et nécessite l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T naïfs. Signal 1 : présentation de l'antigène par les DC au LT via la molécule du CMH. Signal 2 : expression des molécules de costimulation dont le CD80 et le CD86 qui facilitent l'activation des lymphocytes T. Signal 3 : sécrétion de cytokines spécifiques qui permettent la polarisation des LT (Muñoz-Wolf et Lavelle, 2018).

3.4. La réponse immunitaire adaptative

Lorsque la réponse innée n'est pas suffisante, l'organisme met en place une réponse complexe faisant intervenir les lymphocytes T et B. Bien que la réponse immunitaire adaptative ne soit pas indispensable à la mise en place de l'inflammation et de l'emphysème au cours de la BPCO [132], elles pourraient participer à l'amplification de l'inflammation et à la susceptibilité des patients aux infections pulmonaires [133].

3.4.1. Les lymphocytes T

Le nombre de lymphocytes T CD4+ et T CD8+ augmente chez les patients BPCO [129,134]. Au cours de la maladie, on retrouve une polarisation lymphocytaire T de type Th1 et Th17 [129–131]. Cette réponse, à la fois pulmonaire et systémique, se caractérise par une

sécrétion importante de médiateurs inflammatoires comme l'IL-17 et l'IFN γ [129,131,135,136]. Cependant, elle ne serait pas uniquement liée à une augmentation du nombre de lymphocytes, mais à une activation anormale des cellules [137,138] qui est associée à une augmentation de l'expression des TLR [139]. Cette réaction aberrante de la réponse immunitaire contribue à l'apparition des exacerbations chez les patients [133,134]. De plus, la BPCO entraîne, au niveau pulmonaire, la dérégulation de la balance Th17/Treg favorisant la disparition du profil régulateur au profit d'un profil inflammatoire de plus en plus présent au cours du temps [140,141]. Ainsi, l'augmentation de l'inflammation Th17 et la perte des mécanismes de régulation sont responsables de l'aggravation de la pathologie et pourraient favoriser les exacerbations chez les patients [142].

De plus, l'accumulation locale de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques est corrélée à une diminution de la fonction pulmonaire [143]. Ce phénomène est induit par la mise en place de deux mécanismes parallèles contribuant à la survie cellulaire [144,145] et à leur accumulation dans les poumons : l'induction de l'autophagie [145] et la diminution de l'apoptose cellulaire [143]. Il a également été démontré que les lymphocytes T CD8+ participaient activement au recrutement des macrophages, favorisaient l'inflammation et la production de métalloprotéinases (MMP-9 et MMP-2) [146]. Associés à la sécrétion d'enzymes protéolytiques comme le granzyme B et la perforine [147,148] les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques font partie des acteurs majeurs impliqués dans la genèse de l'emphysème.

Les lymphocytes T constituent donc des acteurs majeurs dans la progression de la pathologie, une fois que l'inflammation liée à la réponse immune innée est bien installée.

3.4.2. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B participent à la réponse humorale en fabriquant des anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques. Ces anticorps sont principalement dirigés contre les agents pathogènes, mais dans certaines conditions, ils peuvent aussi reconnaître des antigènes du soi modifiés : les auto-antigènes. Ainsi, il a été émis l'idée qu'une réaction auto-immune pouvait participer à la progression de la BPCO. En effet, chez les patients une augmentation de lymphocytes B activés circulants est observée [149]. Les cellules vont alors

migrer au niveau pulmonaire pour former des follicules lymphoïdes dans les poumons dont la présence corrèle avec la sévérité de la pathologie [150]. La libération de protéines de structure dégradées par les MMP peut aussi favoriser l'émergence d'auto-anticorps comme l'anti-élastine. La diminution de la production de la protéine antioxydante HO-1 (Heme oxygenase-1) par la cigarette [151,152] et la sécrétion de facteurs d'activation des cellules B (BAFF : B-cell activation factor) par les neutrophiles [153,154] favorisent l'infiltration lymphocytaire et la formation des follicules lymphoïdes secondaires (BALT). Chargés en lymphocytes B, ils sont associés à une production élevée d'IgA, notamment dans les stades les plus avancés de la pathologie [140,155]. De plus, au cours d'une infection par *Helicobacter pylori*, l'activité tolérogène des lymphocytes B régulateurs (CD24+, CD38+) producteurs d'IL-10 est diminuée chez les fumeurs [156]. Connus pour leur rôle inhibiteur de la réponse T pro-inflammatoire dans certaines maladies chroniques [157] les lymphocytes B régulateurs pourraient ainsi contribuer à l'augmentation de l'inflammation observée chez les patients BPCO au cours des exacerbations. Ces mécanismes permettent de mieux comprendre l'implication des lymphocytes B dans l'entretien de l'inflammation pulmonaire et la genèse de l'emphysème [153,154,156].

4. Place des exacerbations dans la BPCO

L'état inflammatoire chronique et les altérations pulmonaires favorisent chez les patients l'apparition de nombreuses infections respiratoires. Ces infections correspondent à des épisodes aigus d'aggravation de la maladie (exacerbations) dont la prise en charge médicale doit être spécifique, car elles conduisent très souvent à une hospitalisation. Une phase d'exacerbation entraînant souvent une autre [158], elles marquent l'entrée dans un cercle vicieux délétère pour le patient (Figure 8). En effet, les facteurs déclenchant la BPCO tels que la fumée de cigarette, altèrent les défenses innées au niveau pulmonaire (réponse immunitaire, épuration mucociliaire, barrière épithéliale...). Cet affaiblissement des défenses immunitaires facilite les colonisations microbiennes qui vont elles-mêmes aggraver les lésions déjà présentes au niveau pulmonaire. De plus, ces infections vont majorer la réponse inflammatoire chronique déjà en place (par le recrutement de cellules immunitaires de type neutrophile, macrophage, NK...[159,160]) et contribuer un peu plus au déséquilibre protéase/anti-protéase responsable de la destruction des parois alvéolaires [44–46]. Ainsi, l'espérance de vie d'un patient BPCO ayant présenté une exacerbation sévère est diminuée d'environ 50 % après 4 ans [161,162].

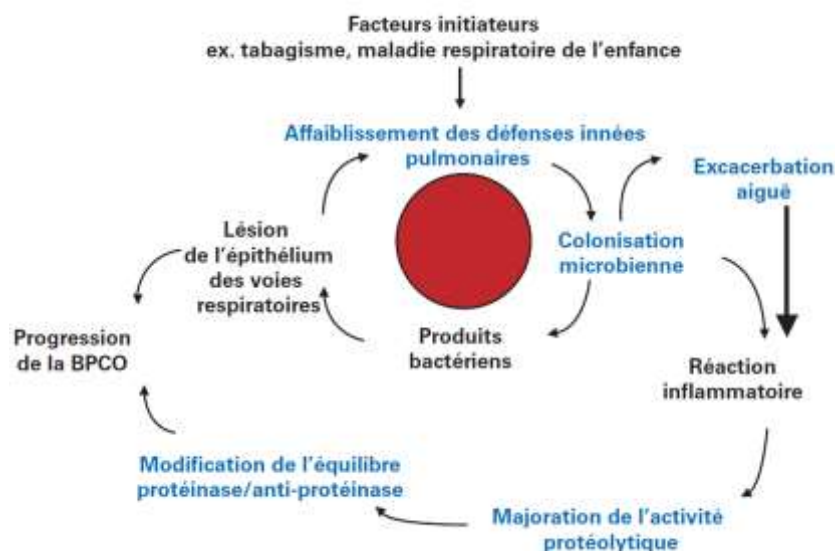


Figure 8 : Cercle vicieux de l'infection et de l'inflammation chronique au cours de la BPCO

L'état inflammatoire chronique, les altérations pulmonaires et l'affaiblissement des défenses innées facilitent les infections respiratoires. Ces épisodes d'aggravation de la pathologie appelés exacerbations entraînent la majoration de l'inflammation et des lésions tissulaires et contribuent à la progression de la BPCO (sethi, et al. 2008).

Les sources de déclenchement des exacerbations sont multiples [163,164] et la gravité de celles-ci sera favorisée par la présence de comorbidités (Figure 9).

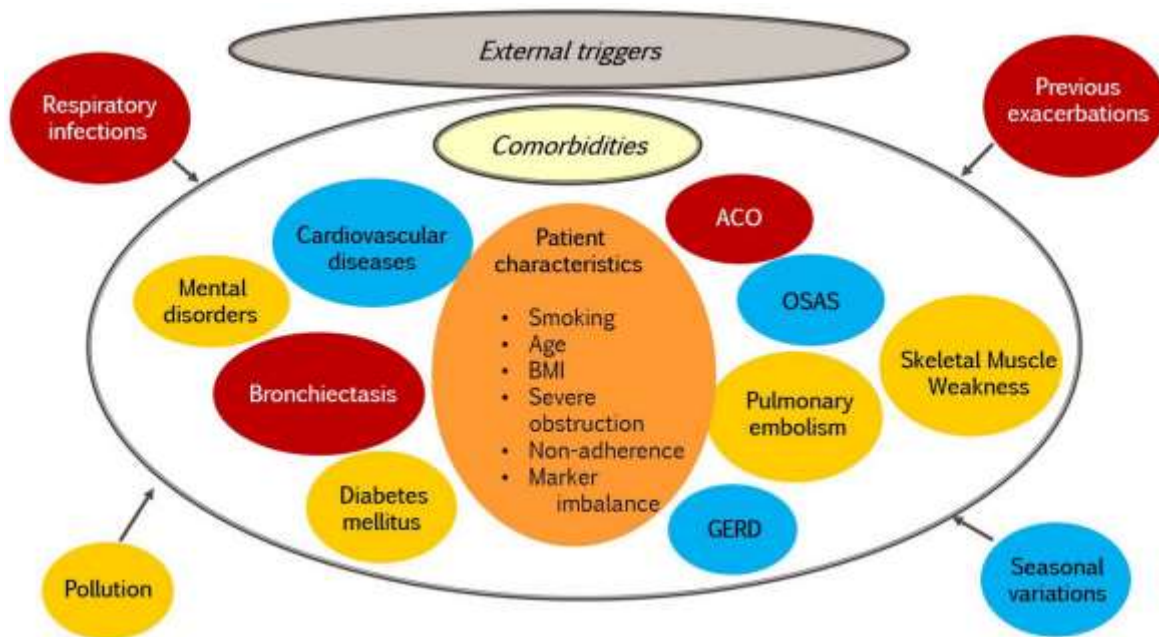


Figure 9 : Facteurs d'aggravation et de déclenchement de la BPCO

Les sources de déclenchement de la BPCO et de ces exacerbations sont multiples et la sévérité de la pathologie peut être favorisée par la présence de facteurs de comorbidités tels que le diabète, l'obésité, maladies cardiaques (Hogea et al, 2020).

4.1. Arrêt des traitements de fond

Les exacerbations peuvent être liées à l'arrêt des traitements de fond ou à la reprise tabagique favorisant ainsi l'aggravation des symptômes et les hospitalisations chez les patients [165,166]. La reprise du tabac contribue au déclin de la fonction respiratoire [167].

4.2. Pollution

Une étude régionale (PolluBPCO) a récemment mis en évidence un lien significatif entre qualité de l'air et pic de consultation de patients BPCO. En effet, l'étude menée par le CHU d'Amiens-Picardie et l'observatoire de l'air (ATMO) des Hauts de France, a démontré une augmentation des cas d'hospitalisation quelques jours suivant le début des pics de pollution associés aux particules fines (PM10) ou des pics de pollution par l'ozone, passant d'un taux annuel moyen de 0,65 à un taux pouvant atteindre les 1,07 [168].

Différents polluants atmosphériques peuvent être la cause d'exacerbations. Outre les particules de diamètre inférieur à 10 μm , d'autres molécules comme l'ozone (O_3), le dioxyde

de soufre (SO₂) ou le dioxyde d'azote (NO₂) peuvent être responsables de l'aggravation de la maladie [169]. Leur forte réactivité chimique leur permet d'interagir avec les fluides mucociliaires présents le long de l'arbre bronchique. Ces interactions spécifiques vont favoriser l'apparition de radicaux libres contribuant au stress oxydatif, à l'inflammation et au remodelage déjà présent au niveau pulmonaire chez ces patients.

4.3. Les infections microbiennes

Au cours de la BPCO, l'altération des défenses innées au niveau pulmonaire facilite la colonisation et le développement de nombreux pathogènes parmi les 3 grandes catégories : champignons, bactéries et virus. Les infections fongiques étant de loin les moins fréquentes et présentant des formes très diverses, nous nous focaliserons sur les infections bactériennes et virales.

4.3.1. Les infections fongiques

Les champignons ne sont pas les pathogènes les plus retrouvés chez les patients BPCO en exacerbation. Cependant, ils peuvent être responsables de la colonisation des voies respiratoires et être responsables de formes sévères d'exacerbation [170,171]. Différentes espèces de champignons peuvent être retrouvées chez les patients en exacerbation [172,173]. L'*Aspergillus fumigatus* est le champignon filamenteux le plus fréquemment rencontré et peut être responsable de formes invasives d'aspergillose. Lorsqu'une colonisation par *A.fumigatus* est observée, elle est signe de pronostic défavorable [170,172,174]. Chez les patients BPCO, la sensibilisation fongique, liée à une augmentation d'IgE spécifique, et l'augmentation des interactions fongiques sont associées à des exacerbations fréquentes [170,174]. Les sources d'exposition aux allergènes fongiques sont multiples et sont retrouvées aussi bien dans l'environnement extérieur qu'intérieur des patients exacerbateurs [170].

Les mécanismes permettant de comprendre pourquoi les infections fongiques sont souvent associées à des formes sévères de la pathologie ne sont pas encore complètement élucidés. Cependant, ils pourraient impliquer des modifications de la fonction des macrophages. En effet, les macrophages dérivés de monocytes de patient BPCO démontrent

une altération de la capacité de clairance des spores fongiques [175]. Ces résultats sont confirmés par une étude *in vivo* qui met en évidence un défaut de la phagocytose des conidies d'*A. fumigatus* par les macrophages associé à une altération de l'activation de la voie TLR2/Akt et de l'expression de cytokines pro-inflammatoire [176].

4.3.2. Les infections bactériennes

Il est fréquent de retrouver des bactéries dans les voies aériennes de patients BPCO à l'état stable. L'acquisition d'une nouvelle souche bactérienne pourrait contribuer au déclenchement de l'exacerbation [177]. Ainsi, les infections bactériennes peuvent représenter plus de 50 % des causes d'exacerbations de la BPCO [178,179]. Bien que la prévalence de chaque souche varie en fonction des études, les bactéries les plus souvent isolées dans les expectorations des patients en exacerbation sont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*. Dans les stades les plus avancés de la pathologie *Pseudomonas aeruginosa* est également retrouvé [179]. Plus rarement certaines souches bactériennes comme *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus parainfluenzae* et des *Enterobacteriaceae* peuvent être identifiées.

4.3.2.1. Zoom sur *Haemophilus influenzae non typable* (NTHI)

Aussi appelé Bacille de Pfeiffer et découvert en 1892, *Haemophilus influenzae* est une bactérie de la famille des Pasteurellaceae. Il s'agit d'un coccobacille Gram négatif qui peut être encapsulé (typable) ou non encapsulé (non typable). Les souches dites non typable sont des bactéries commensales de la sphère ORL, mais elles peuvent être responsables d'infections bénignes telles que des otites, pharyngites, infections respiratoires... qui peuvent devenir sévères en particulier chez les personnes immunodéprimées.

La bactérie NTHI adhère à la surface des muqueuses où elle est internalisée et va coloniser les voies aériennes de manière discrète le plus souvent. Pour cela, cette bactérie est capable d'utiliser différentes stratégies lui permettant d'échapper au système immunitaire. En effet, la bactérie est capable de lier certaines protéines de l'hôte comme les mucines [180]. Les mucines sont des protéines retrouvées dans les voies aériennes. L'attachement de la bactérie aux mucines permet premièrement de faciliter l'adhésion de

NTHI à l'épithélium des muqueuses. Dans un second temps, ces protéines, utilisées comme point d'ancrage, forment un « bouclier » pour la bactérie, limitant ainsi sa reconnaissance par le système immunitaire. NTHI est également capable de créer des interactions spécifiques avec le facteur H humain [181] ou de modifier la structure de son lipooligosaccharide (LOS) présent sur sa membrane [182] afin d'échapper au système du complément de l'hôte. Il peut aussi se lier à la vitronectine permettant à la bactérie de faire face à l'action lytique du sérum [183]. La mise en place d'un système de biofilm par la bactérie, lui permet d'échapper à la reconnaissance par les cellules immunitaires et ainsi de persister dans l'organisme [184,185]. À l'heure actuelle, seul un vaccin adsorbé conjugué de polysaccharide pneumococcique et de protéine D de NTHi (le synflorix™) est homologué chez l'enfant. Bien qu'il soit principalement utilisé dans la prévention contre les otites moyennes aiguës causées par différents sérotypes de pneumocoque, son administration permet également de réduire l'incidence des otites induites par NTHI [186]. Actuellement, plusieurs études évaluent l'efficacité de vaccins pouvant prévenir les infections par NTHI. En effet, une immunothérapie sublinguale (MV130) fait actuellement l'objet d'une étude d'efficacité et d'innocuité de phase 3 en double aveugle, contrôlée par placebo, chez des patients atteints BPCO, dans le but de réduire le nombre d'exacerbations de BPCO [187]. Enfin, un vaccin expérimental associant des protéines de surface issus de NTHI et de *Moraxella catarrhalis* entraîne une bonne immunogénicité notamment chez des personnes ayant des antécédents tabagiques [188]. Ce vaccin est actuellement en phase 2 pour des essais sur des patients BPCO modérés, sévères ou très sévères.

4.3.2.2. Zoom sur *Streptococcus pneumoniae* (Sp)

Le pneumocoque est une bactérie observée sous forme de diplocoque capsulé à Gram positif. Présent naturellement dans les muqueuses des voies aériennes, il peut être responsable d'infections respiratoires et serait la première cause pneumonie bactérienne. Comme pour NTHI, les infections à *Streptococcus pneumoniae* touchent principalement les jeunes enfants et les personnes immunodéprimées ou atteintes de pathologies chroniques telles que la BPCO. Il existe plus de 90 sérotypes de pneumocoque et contrairement à la bactérie NTHI, la vaccination anti-pneumococcique cible jusqu'à 23 sérotypes, les plus

fréquemment responsables des pathologies liées à cette bactérie. Ainsi, la vaccination permet de prévenir jusqu'à 80 % des maladies imputables au pneumocoque.

Le Sp possède de nombreux facteurs de virulences lui permettant d'échapper au système immunitaire et coloniser les voies respiratoires [189]. Des éléments présents à la surface de la bactérie comme la capsule et la présence des protéines de surface PspA et PspC [190,191] participent à l'effet délétère de l'infection en entravant la phagocytose et en interférant avec la voie du complément respectivement. La présence de l'adhésine (PsaA) et de peptides perméases (AmiA et PlpA) facilite l'adhésion des bactéries à l'épithélium [189]. Lorsque la lyse bactérienne intervient, la bactérie libère une endotoxine nommée pneumolysine. Son effet cytotoxique sur les cellules contribue à la destruction de l'épithélium respiratoire et facilite l'expansion de la bactérie.

Outre les facteurs de virulence, le pneumocoque a acquis ces dernières décennies de nombreuses antibiorésistances. En effet, naturellement sensible aux antibiotiques, certains antibiotiques deviennent de moins en moins efficaces. Leur mauvaise utilisation a favorisé les mécanismes de transformation bactérienne, permettant les échanges de facteurs de résistances entre bactéries présentes au niveau local. Ces échanges vont conduire à des variations génétiques pouvant entraîner la modification de protéines bactériennes conduisant à l'acquisition de ces résistances. Par exemple, la résistance à certaines β lactamines est la résultante d'une modification génétique, entraînant la modification de la protéine liant la pénicilline (PLP) diminuant ainsi l'affinité bactérienne vis-à-vis de l'antibiotique [192]. Ce mécanisme conduit à une perte d'efficacité de l'action bactéricide de l'antibiotique. Ainsi, au fil des années, le Sp a développé de nombreuses résistances parmi lesquelles, on retrouve la pénicilline, l'érythromycine, la tétracycline. Ce phénomène particulièrement inquiétant nécessite la mise en place de plan d'action pour adapter la prise en charge en particulier chez les patients atteints de BPCO puisque la bactérie *S.pneumoniae*, peut représenter 10 à 30 % des causes d'exacerbations [179,193]. La sensibilisation à la vaccination anti-pneumoncoque chez les patients BPCO peut contribuer à limiter les exacerbations liées à ce type d'infection [194,195].

4.3.2.3. Réponse immunitaire antibactérienne

Lors des infections respiratoires bactériennes, l'épithélium et les macrophages vont constituer la première ligne de défense. Les bactéries libèrent des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) qui vont être reconnus par des récepteurs : les PRR (Pattern Recognition Receptor). L'activation des PRR va initier la mise en place de l'immunité innée puis adaptative [196].

Parmi les PRR, les TLR sont des récepteurs clés de la réponse antibactérienne chez les mammifères. Les TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 et TLR-9 font partie des récepteurs activables par les bactéries [41]. La fixation des signaux antigéniques (PAMPs) du NTHI ou du *S.pneumoniae* aux récepteurs va entraîner l'activation des voies de signalisation NF- κ B dépendante de MyD88 ou de TRIF conduisant à la libération de molécules pro-inflammatoires (cytokines et chimiokines) permettant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptée [189,197,198]. Ainsi, la libération de facteurs tels que le TNF- α , de CXCL1, d'IL-6 ou de CCL2 [199–201] va permettre le recrutement de macrophages, de neutrophiles permettant la phagocytose bactérienne. D'autres cellules de la réponse innée peuvent être stimulées très rapidement lors de l'infection. C'est le cas des iNKT qui peuvent être stimulés par des glycolipides bactériens [202] et des lymphocytes $\gamma\delta$ nécessaires à la réponse contre le pneumocoque [203].

Lorsque l'infection pulmonaire persiste et que la réponse immunitaire innée n'est pas suffisante, la réponse adaptative se met en place. Au cours d'une infection à NTHI, un recrutement de T CD4+ et de T CD8+ exprimant le granzyme B est observé [204]. Ce recrutement cellulaire participe à l'activité cytotoxique des cellules effectrices. La réponse anti-bactérienne est associée à une augmentation de la réponse Th17 [126,205,206] et/ou Th1 [207] caractérisée par la libération soit d'IL-17 et d'IL12 soit d'IFN- γ et d'IL-12. La réponse T est accompagnée d'une réponse humorale associée à un recrutement pulmonaire de lymphocyte B [208] sécrétant des anticorps spécifiques [152].

Au cours de la BPCO, l'incidence des infections bactériennes augmente. En effet, les exacerbations par NTHI et par *S.pneumoniae* peuvent représenter plus de 40 % et 10 à 30 % des causes d'exacerbations respectivement et sont associées à une diminution de la fonction respiratoire [178,179,193] et à une augmentation de l'inflammation pulmonaire [133]. Cependant, de nombreuses études démontrent une altération des défenses

antimicrobiennes chez les patients BPCO lors de l'exacerbation bactérienne. En effet, la BPCO est associée à une diminution des récepteurs de reconnaissance bactériens tels que le TLR-4 et NOD-2 par les monocytes circulants [209] ou du TLR-5 par les cellules épithéliales [210] conduisant à une réduction de la production de TNF- α , d'IL1 β , d'IL-23 [124,209]. Cependant, ces données sont controversées. De plus, la capacité de phagocytose des cellules de première intention comme les neutrophiles et les macrophages et la production d'anticorps spécifiques sont diminuées par la cigarette [96,100,133].

Au-delà de la modulation de la réponse cellulaire, la pathogenèse de l'exacerbation bactérienne, est associée à la modulation de différents facteurs impliqués dans la réponse antimicrobienne. Au laboratoire, les données ont montré que les infections par *Sp* et *NTHI* au cours de la BPCO sont favorisées par la diminution de l'activation de la voie IL-17/IL22 [124], des cytokines ayant un rôle majeur au cours de ces infections. En effet, l'expression de la cytokine IL-22 est diminuée au cours de la réponse antibactérienne chez la souris BPCO dans différents types cellulaires, en particulier les cellules NK et NKT [4,124]. Ce défaut de réponse est la conséquence d'un défaut de maturation des DC conduisant à une diminution de la réponse Th1 et Th17 anti-*S.pneumoniae* en partie due à une production plus faible de l'IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23) [126]. De plus, la maturation des DC dérivées de monocytes humains induite par *Sp* est altérée par la cigarette et la réponse, *in vitro*, de monocytes issus de patients BPCO vis-à-vis de cette bactérie est également altérée [126]. La stimulation du TLR-5 (PRR impliqué dans la reconnaissance du flagelle bactérien) par la flagelline permet de restaurer la réponse anti-*Sp* au cours de la BPCO [211]. Cet adjuvant étant testé pour des applications cliniques, l'administration de flagelline favorise la production d'IL-22 et de peptides antimicrobiens (S100A8 et S100A9) et diminue l'incidence de l'infection par *Sp* au cours de la BPCO [211].

4.3.3. Les infections virales

Historiquement, les bactéries étaient considérées comme les principales causes des exacerbations. En 1978, grâce à des techniques de mise en évidence sérologique des virus, Busho et al détectaient la présence de virus dans environ 20 % des cas d'exacerbation [212]. L'amélioration des techniques de culture et surtout le développement des techniques de détection des virus par PCR (Polymerase Chain Reaction), ont permis de mettre en évidence

une implication beaucoup plus fréquente des virus au cours des exacerbations. En effet, des études plus récentes détectent la présence de virus dans les expectorations ou les prélèvements nasaux de 30 à 56 % des patients en exacerbation [213–215]. Tout comme pour les bactéries, la prévalence des virus dépend des études réalisées, de leur disparité géographique, mais aussi de la saisonnalité de certains virus [214]. Ainsi, les virus les plus fréquemment retrouvés chez les patients sont les rhinovirus, le virus respiratoire syncytial (VRS), les virus Influenza (IAV), la para-influenza virus et les coronavirus. Cependant, la disponibilité de vaccins, notamment pour le virus responsable de la grippe saisonnière diminue fortement son impact sur les exacerbations.

4.3.3.1. Zoom sur le virus de la grippe Influenza A (IAV : Influenza virus type A)

L'IAV est un virus de la famille des Orthomixoviridae. Ce virus enveloppé est constitué d'un génome ARN monocaténaire négatif. Il existe un grand nombre de sous-types identifiables grâce aux antigènes présents à la surface de son enveloppe : l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N). Ainsi, les sous-types de virus les plus fréquents peuvent être H1N1 ou H3N2 par exemple. Ces deux glycoprotéines sont impliquées de la multiplication virale. En effet, la protéine H est nécessaire à l'adhésion du virus aux cellules et la neuraminidase joue un rôle dans le détachement des bourgeons lors de la formation de néovirions. Il existe 18 types d'hémagglutinines et 11 types de neuraminidases.

Les virus IAV sont responsables d'épidémies saisonnières et de pandémies (exemple de la grippe espagnole à la fin de la 1^{ère} guerre mondiale). Selon Santé Publique France, la grippe touche 2 à 6 millions de personnes en France et entraînerait environ 10 000 décès chaque année. Au cours de la BPCO, le virus IAV serait responsable d'environ 7 % des causes d'exacerbations [215].

4.3.3.2. Zoom sur le virus respiratoire syncytial (VRS)

D'abord isolé chez le chimpanzé enrhumé en 1956, le VRS est isolé un an plus tard par Robert M. Chanock chez des jeunes enfants atteints de pneumopathie [216]. Comme le virus de la grippe, le VRS est un virus enveloppé à ARN simple brin de polarité négative. Il appartient à la famille des Pneumoviridae et fait partie du genre Orthopneumovirus. Bien

qu'il soit la principale cause de bronchiolite du nourrisson (selon Santé Publique France, on retrouve à chaque période hivernale 15 à 35 % de positivité au VRS) le VRS peut également toucher des populations adultes en particulier les personnes âgées, les personnes immunodéprimées ou ayant déjà une pathologie pulmonaire telle que la BPCO. En effet, le VRS peut être responsable de 10 % des exacerbations de la BPCO [213,217,218] avec une mortalité pouvant atteindre plus de 12 % chez ces patients [219]. Il n'existe pas à l'heure actuelle de vaccin pouvant prévenir les infections à VRS.

Chez la souris, la sensibilité aux souches humaines de VRS dépend de la souche murine et de l'âge des animaux utilisé. En effet, les souris BALB/c, qui présentent une susceptibilité intermédiaire au virus, développent une sensibilité plus importante lorsque les animaux sont âgés [220]. Le VRS étant peu infectant dans les poumons chez la souris [221], il est nécessaire d'administrer de fortes doses (généralement supérieures à 10^6) pour induire des signes cliniques d'infection [220,222,223]. Par contre, il existe chez le rongeur, un virus pulmonaire spécifiquement murin et homologue du VRS : le PVM (Pneumonia Virus of Mice). Initialement découvert dans les poumons de souris de laboratoire non infectées, un isolat infectieux a été obtenu après des passages en série de souris à souris [224]. Comme pour le VRS, la sensibilité au PVM dépend de la souche murine utilisée. En effet, les souris de type C57BL/6 sont plus résistantes au virus que les BALB/c [225]. Capable de se répliquer dans les voies aériennes inférieures, il permet, même avec des doses réduites (200 PFU), le développement d'une pathologie similaire à la bronchiolite associée au VRS chez les nourrissons [226]. On retrouve dans ces modèles, une perte de poids, une altération des fonctions respiratoires, une augmentation de la réponse inflammatoire [226–228]. Ainsi, l'utilisation du PVM offre une bonne alternative pour l'étude des infections pulmonaires chez son hôte naturel : la souris.

4.3.3.3. Réponse immunitaire antivirale

Comme les virus sont des pathogènes intracellulaires, leur détection par les PRR se fait principalement par des récepteurs situés dans les cellules (Figure 10) [229]. Parmi ces récepteurs, on retrouve les TLR de la membrane endosomale : les TLR-3, TLR-7 et TLR-8, TLR-9 et des PRR cytosoliques comme RIG-I (retinoic acid-inducible gene I), MDA-5 (melanoma differentiation-associated protein 5) et les capteurs cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) [230].

Ces PRR reconnaissent les acides-nucléiques viraux (ARN et ADN) simples ou doubles brins dont les caractéristiques biochimiques les différencient des ARN endogènes de l'hôte. L'activation de ces senseurs viraux va conduire à l'activation de voies de signalisation permettant la phosphorylation d'IRF (Interferon Regulatory Factor) dont l'IRF-3 et l'IRF7 et conduire à la production d'interférons de type I (IFN- β , IFN- α) et III (IFN- λ) [231–233] et de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, IL-1 β , CXCL1...[233–235]. L'induction de la réponse inflammatoire va initier le recrutement de cellules effectrices de la réponse innée comme les NK, les neutrophiles ou les macrophages [233,234]. Les IFN de type I et III vont à leur tour induire une réponse spécifique antivirale via la production de gènes dépendant des interférons (ISG) favorisant la production d'effecteur antiviraux dont la viperine, Mx, OAS.

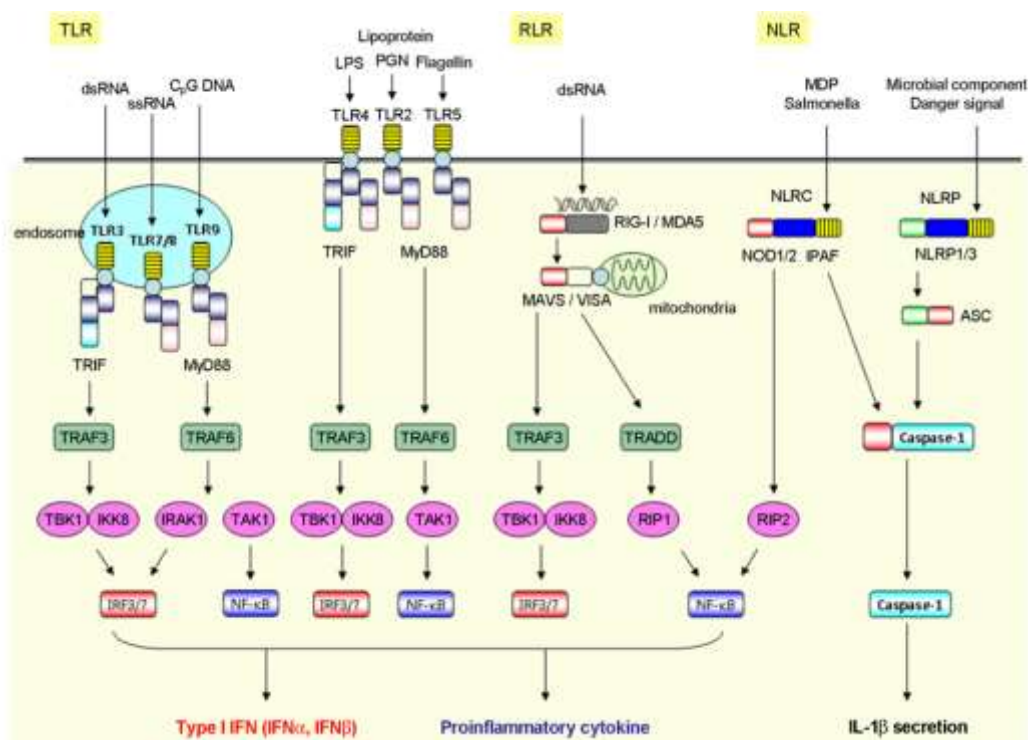


Figure 10 : PRR et voie de signalisation

Les agents microbiens sont reconnus par les cellules grâce à des récepteurs qui peuvent être membranaires ou intracellulaires. Les virus étant des pathogènes intracellulaires, ils sont reconnus par des récepteurs situés sur la membrane endosomale (TLR-3, TLR7/8 et TLR-9) et dans le cytoplasme (RIG-I, MDA-5). L'activation de ces récepteurs par des motifs génétiques viraux entraîne une signalisation cellulaire conduisant à la production d'interféron et de cytokines pro-inflammatoires (Hong et al, 2011).

Tout comme pour les bactéries, si la réponse innée n'est pas suffisante pour la clairance virale, l'immunité adaptative spécifique se met en place. Ainsi, un recrutement de lymphocytes T CD4 $^{+}$ et T CD8 $^{+}$ est observé au cours des infections virales [234,236]. Ce recrutement cellulaire est favorisé par la production d'IFN de type I et III qui participent à leur différenciation et à leur maturation [236–238].

Au cours de la BPCO, les infections virales, vont contribuer à l'exacerbation de l'inflammation pulmonaire, favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires comme CXCL-10, CXCL-1, IL-6, TNF- α ...[75,239,240]. Ce pic cytokinique va entraîner l'afflux massif de neutrophiles, macrophages, et lymphocytes au niveau pulmonaire [239–242] qui est favorisé par la stimulation de la voie ST2/IL-33 [240]. L'infection virale, l'infiltration cellulaire, et la toxicité de la fumée de cigarette vont fragiliser, de manière synergique, la barrière épithéliale [75,239]. En effet, lors des infections, les virus IAV et VRS entraînent la production de métalloprotéinases (dont MMP-8, MMP-12, MMP-2) et de cathepsines G, Z, S et W [239] qui est associée à une apoptose des cellules épithéliales [239,243]. Les atteintes tissulaires observées au cours des infections virales contribuent au déclin de la fonction pulmonaire et à la sévérité des symptômes durant l'exacerbation [244].

La réponse adaptative est également altérée au cours des exacerbations virales puisque la cigarette freine l'expansion cellulaire T et la production d'anticorps spécifiques [116]. L'altération de la réponse antivirale spécifique pourrait être liée à une diminution d'expression du senseur viral TLR-7 par les cellules dendritiques plasmacytoïdes [245]. Cette perte d'homéostasie pulmonaire est également associée à la diminution d'autres récepteurs et transducteurs de signaux viraux comme RIG-I [74], MAVS (Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein)[234,246]. La diminution des systèmes de reconnaissance des virus participe à la diminution de production des interférons de type I et de type III [75,79,246,247] et contribue à l'expansion virale [248]. Ensemble, ces données permettent de mettre en évidence quelques mécanismes permettant de mieux comprendre la susceptibilité des patients BPCO vis-à-vis des infections virales.

Cependant, la plupart des études concernant les exacerbations virales de la BPCO étudient des modèles basés sur les infections à IAV ou à Rhinovirus. Très peu d'études évaluent la réponse immunitaire au cours de l'exacerbation par le VRS chez la souris. En effet, deux études, *in vivo*, démontrent que l'infection par le VRS exacerbe l'inflammation pulmonaire liée à l'exposition à la fumée de cigarette, avec un recrutement de macrophages, de neutrophiles et de lymphocytes [239,243]. Cette observation est associée à un remodelage des voies aériennes et à une production de protéases (notamment MMP-12, MMP-8, MMP-2) [239,243]. Un autre modèle basé sur l'administration d'élastase démontre également une exacerbation de l'inflammation associée à l'augmentation de dommages

pulmonaires lors d'une infection par le VRS humain [233]. De la même manière, l'exposition *in utero* de souris à la fumée de cigarette, favorise l'augmentation de l'inflammation pulmonaire lors de l'infection post-natale au VRS. Le développement de l'infection, dans ce modèle, est favorisé par une réduction de la réponse T CD8+ spécifique [19]. Comme le VRS n'est pas un pathogène naturel de la souris, les modèles cités précédemment ont nécessité l'administration de fortes doses de virus ou l'administration répétée du virus au cours du protocole d'exposition. Ainsi, l'étude de la réponse au virus dans son hôte naturel serait possible grâce à l'utilisation du PVM. De plus, aucune caractérisation de la réponse immunitaire n'a été réalisée dans un modèle murin d'exacerbation par le PVM.

4.3.4. Les co-infections bactérie/virus

Les infections virales provoquent un affaiblissement du système immunitaire favorisant l'apparition de surinfection bactérienne. Particulièrement documenté pour les surinfections post-grippales, il est maintenant bien établi que la mortalité liée à la grippe espagnole en 1918 était liée à l'importance des surinfections bactériennes. Les virus de type IAV ne sont pas les seuls virus pouvant être suivis de surinfection bactérienne [249–251]. De plus, les co-infections bactéries/virus sont fréquentes chez les patients BPCO [252,253].

L'altération de la barrière épithéliale par l'inflammation chronique et l'infection virale, facilite l'entrée des bactéries dans les tissus. De plus, l'inhibition de la réponse Th17 dépendante de la production d'interféron de type I [124,254] et l'altération de la réponse antimicrobienne des cellules NK et des macrophages favoriseraient l'expansion bactérienne post-grippale [255]. Bien que la plupart de ces études concernent les surinfections post-influenza des publications récentes ont démontré que l'infection expérimentale de patients BPCO modérés par un rhinovirus entraîne une infection et une inflammation beaucoup plus importante que chez les sujets sains [256,257]. De manière intéressante, cette réaction conduit à une modification importante du microbiote pulmonaire chez ces patients BPCO avec une expansion de la charge bactérienne globale et à l'émergence d'une colonisation par *H. influenza* [258]. Bien que les mécanismes conduisant à ce développement bactérien ne soient pas élucidés, ces données montrent que les infections virales altèrent les défenses anti-bactériennes plus spécifiquement chez les patients BPCO.

Ainsi, l'altération des mécanismes de défense anti-infectieuse au cours de la BPCO fait intervenir de nombreux mécanismes parallèles. La perte d'intégrité de la barrière épithéliale, amplifiée lors des infections virales des patients BPCO, constitue le mécanisme primaire permettant l'apparition de ces surinfections. Ce phénomène est amplifié par une altération de la réponse Th17 et des phénomènes d'immunodépression [124,259,260]. En effet, la supplémentation en IL-22 réduit l'incidence des surinfections post-grippales [260], en renforçant la barrière épithéliale et les défenses antimicrobiennes. L'IL-22, qui appartient à la famille de cytokines IL-20 (IL-19, IL-20, IL-24 et IL-26), est fortement diminué au cours de l'exposition à la fumée de cigarette [124,260]. De manière intéressante, Myles et al ont démontré que les cytokines de la famille IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) étaient impliquées dans la régulation des défenses anti-infectieuses notamment en diminuant la réponse IL-22 [261]. De cette manière, les cytokines de la famille IL-20 pourraient contribuer à la pathogenèse des exacerbations induite par les virus au cours de la BPCO.

5. La sous-famille des cytokines IL-20

Les cytokines constituent un ensemble hétérogène de protéines dont la masse moléculaire oscille entre 8 et 50 kDa. Ces messagers solubles vont permettre la communication à distance entre les cellules du système immunitaire. Elles sont généralement synthétisées en réponse à un signal activateur contrairement aux hormones dont la sécrétion est continue bien que modifiable par les conditions physiologiques de l'organisme [262]. Chaque cytokine peut être sécrétée par de nombreux types cellulaires et leur activité est permise grâce à la présence de récepteurs sur les cellules cibles. Ainsi, les cytokines peuvent agir de différentes manières :

- Autocrine : la cytokine agit sur la cellule qui l'a synthétisée,
- Juxtacrine : la cytokine va agir sur les cellules adjacentes de la cellule ayant libéré la cytokine,
- Paracrine : la cytokine va agir sur les cellules se situant à proximité de la cellule sécrétrice,
- Endocrine : la cytokine va agir à distance de la cellule sécrétrice après avoir été véhiculée par le sang.

La liaison d'une cytokine à son récepteur va enclencher une série de signaux permettant l'activation, la prolifération, différenciation ou la mort cellulaire [262]. L'action des cytokines peut être redondante puisqu'une même réponse cellulaire peut être obtenue par l'action de cytokines différentes chacune se fixant sur son récepteur spécifique.

Les cytokines IL-20 font partie de la grande famille de cytokines IL-10 [5]. On peut diviser cette famille en trois groupes distincts :

- L'IL-10 qui est une protéine aux propriétés régulatrices dont l'action va conduire à la réduction de la réponse inflammatoire,
- La sous-famille des IL-20 est composée de 5 membres comprenant l'IL-19, l'IL-20, l'IL-22, l'IL-24 et l'IL-26. La cytokine IL-22 est la plus connue, car la plus étudiée. Reconnu pour son rôle dans la défense anti-infectieuse, dans le contrôle de la réponse inflammatoire et dans les mécanismes de réparation épithéliale [2,3,124,263],
- La sous-famille des interférons de type 3 composée de l'IFN- λ 1 (IL-29), l'IFN- λ 2 (IL-28A) et l'IFN- λ 3 (IL-28B). Cette famille particulière se distingue par son rôle dans la réponse antivirale.

5.1. Les récepteurs de la sous-famille des IL-20

L'ensemble des membres de la famille des cytokines IL-10 signale par des récepteurs hétérodimériques transmembranaires. Toutes les cytokines n'utilisent cependant pas les mêmes sous-unités (Figure 11). En effet, l'IL22 et l'IL-26 signalent par des récepteurs qui leur sont propres, composés de la sous-unité IL-10R β . Pour l'IL-22, la première sous-unité est associée à l'IL-22R α alors que le récepteur à l'IL-26 est composé de l'IL-20R α . L'interleukine-22 est également capable de fixer une forme soluble du récepteur IL-22R α nommé IL-22BP. Bien que sa fonction soit encore mal connue, sa forte affinité avec l'IL-22 confère à ce récepteur particulier un rôle d'antagoniste de l'IL-22 [264]. Les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 signalent, quant à elles, par deux récepteurs distincts tous deux composés de la sous-unité IL-20R β . Le récepteur de type 1 s'associe à la sous-unité IL-20R α et est capable de reconnaître l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24. Le récepteur de type 2 lui, ne reconnaît que l'IL-20 et l'IL-24 est associé à la sous-unité IL-22R α [265].

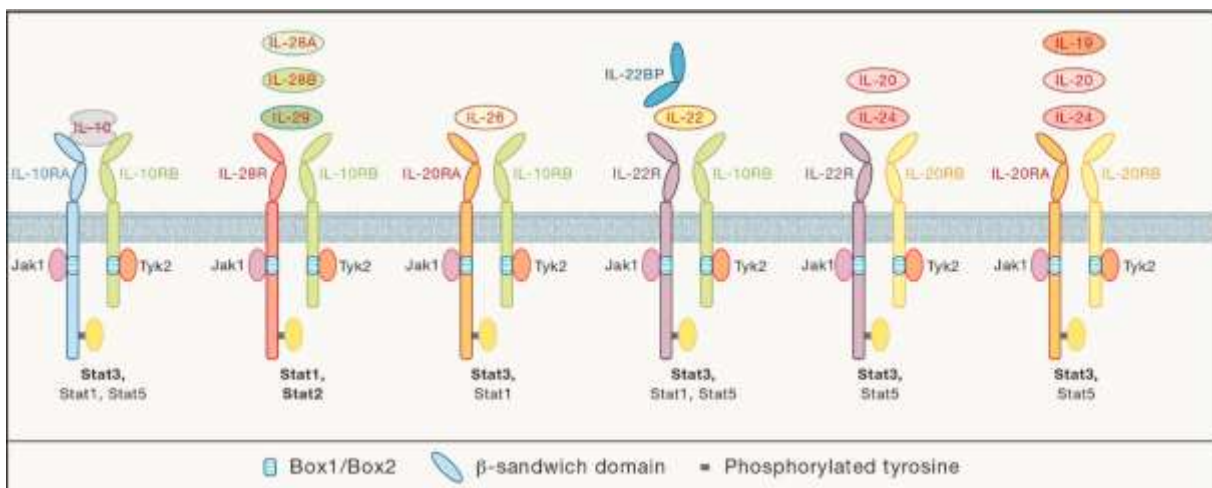


Figure 11 : Récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-10

Les récepteurs de la famille IL-10 sont des récepteurs hétérodimériques. Les sous-unités IL-10R β , IL-22R et IL-20R β sont des sous-unités communes à différents récepteurs de la famille. La sous-unité IL10R β permet la reconnaissance des cytokines IL-10, l'IL-28A (IFN- λ 2), l'IL-28B (IFN- λ 3), l'IL-29 (IFN- λ 1), l'IL-26 et l'IL-22. L'IL-20R β permet la reconnaissance des cytokines de la sous-famille de l'IL-20 dont l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24.

5.2. Voies de signalisations des cytokines IL-20

Les cytokines de la sous-famille des IL-20 expriment leurs fonctions grâce à l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT. Ce système de transduction de signal n'est pas exclusif aux cytokines IL-20 et induit des mécanismes cellulaires variés permettant le développement et le maintien de l'homéostasie. Ainsi, cette voie de signalisation est impliquée dans l'apoptose, la prolifération, la différenciation cellulaire, l'oncogenèse, la réponse immunitaire... [266].

Lorsque les cytokines se lient à leur récepteur, ce dernier change de conformation. La multimérisation du récepteur induit la transphosphorylation de la tyrosine kinase JAK (Janus Kinase) associé aux récepteurs. Parmi la famille des enzymes JAK, on recense 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. L'autophosphorylation des enzymes JAK va induire l'arrimage aux protéines STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) aux acides aminés tyrosine phosphorylée du récepteur. Chez les mammifères, il existe 7 protéines STAT : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. L'arrimage des protéines STAT au récepteur est possible grâce à la région conservée SH2 (Src Homology 2). La phosphorylation intracellulaire du facteur de transcription STAT permet le détachement de ces protéines qui vont alors former un dimère. Ce dimère va alors transloquer dans le noyau cellulaire afin d'induire une cascade de transduction responsable de l'activation (parmi lesquels SOCS 1 et 3) ou de l'inhibition de gènes spécifiques [266]. La voie JAK/STAT peut être inhibée par le système SOCs (suppressor of cytokine signaling proteins) qui comprend 8 membres (CISH, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6 et SOCS7).

Les cytokines de sous-famille des IL-20 signalent principalement par STAT3 (Figure 12) [5,267–269]. Cependant, la stimulation de lignées cellulaires humaines issues de carcinome de vessie par l'IL-20 induit aussi la phosphorylation de JAK-1, JAK-2, STAT-1 et STAT-2 et de MAPK (ERK1/2 et p38). L'activation de ces voies conduit à la production de MMP-9 et favorise la migration cellulaire [270]. Dans un modèle d'étude d'angiogenèse, l'IL-20 induit également la phosphorylation des STAT-5, ERK1/2 et AKT favorisant la formation de tubes de cellules endothéliales [271]. Cependant, les connaissances concernant la signalisation de la sous-famille des IL-20 restent limitées. La mobilisation de la voie JAK/STAT suggère un rôle important des cytokines de la sous-famille des IL-20 dans le remodelage et la réparation tissulaire. L'IL-22, cytokine la plus connue, car la plus étudiée, bénéficie de

données plus détaillées. Ainsi, l'IL-22 est capable d'induire différentes voies de signalisation dont les voies JAK-STAT (STAT-1, STAT-3, STAT-5), ERK (extracellular signal-regulated kinases) (MEK1/2 et ERK-1/2), JNK (Jun N-terminal kinase) et p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) [5,272].

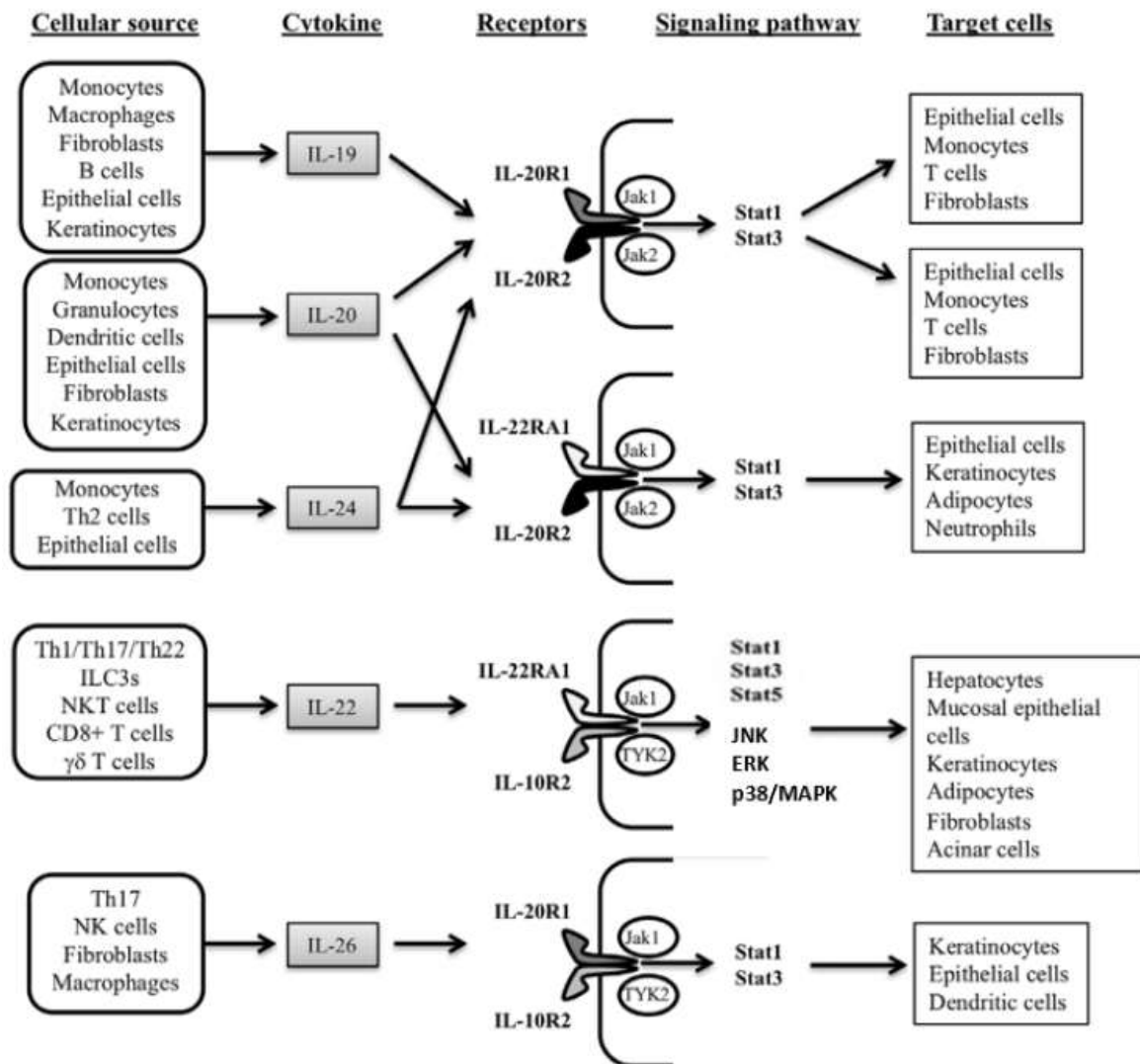


Figure 12 : Expression, signalisation et cibles des cytokines de la sous-famille IL-20
 La production des cytokines IL-20 est induite par différents types cellulaires et va conduire à l'activation des voies de signalisation dont JAK/STAT par leurs cellules cibles (Adapté de Caparros. E et Phd.RF, 2018).

5.3. Implications physiopathologiques des cytokines de la sous-famille des IL-20

Les sources de production des cytokines de la sous-famille des IL-20 sont nombreuses (Figure 12). Ainsi, les cellules myéloïdes (monocytes, macrophage), les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales représentent les principales cellules productrices des cytokines IL-20. Les processus par lesquels les cytokines sont régulées ne sont pas encore complètement élucidés. Cependant, leur présence est associée à différentes pathologies infectieuses, inflammatoires chroniques ou aiguës [5].

5.3.1. Implications dans la réparation tissulaire

Les mécanismes de réparation cellulaire sont nécessaires à l'homéostasie tissulaire et impliquent de nombreuses étapes dont la vascularisation, l'inflammation, l'hémostase, l'angiogenèse, et le remodelage [5]. Au cours de certaines pathologies inflammatoires ou d'infections, les cytokines IL-20 peuvent participer à différents aspects impliqués dans les processus de réparation. Les cytokines IL-20, IL-22 et IL-24 sont induites durant les processus de réparation de la peau chez les souris et chez l'homme [273–275]. L'IL-19 [273], l'IL-20 [276] et l'IL-22 [277] favorisent la ré-épithélialisation en induisant la production de KGF (Keratinocyte Growth Factor) [273] responsable de la prolifération des kératinocytes. L'IL-19 peut agir directement sur la migration des kératinocytes alors que l'IL-24 inhibe leur migration [273,275]. L'effet de l'IL-24 sur la migration de kératinocytes est lié à son effet inhibiteur de la production de TGF- α [275,278]. L'effet biologique de l'IL-24 semble dépendre du type cellulaire sur lequel il agit puisque le traitement par l'IL-24 recombinant favorise la migration endothéliale [279]. Dans le cadre de pathologies inflammatoires, les souris neutropéniques ont un défaut de cicatrisation lors d'une blessure de la cornée et l'administration d'IL-20 recombinant restaure la réparation tissulaire dans ce modèle murin [276]. De plus, le traitement par les cytokines IL-20 sur un épiderme humain reconstitué est associé à la régulation de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation et les processus de réparation tissulaire qui sont augmentés au cours du psoriasis [277]. La surexpression d'IL-20 chez la souris est responsable d'une différenciation épidermique aberrante [280] et l'hyperplasie associée à psoriasis est dépendante de l'activation de l'IL-20Rb [281]. L'IL-22 quant à elle induit l'expression de gènes de matrice extra-cellulaire et la différenciation

myofibroblastique cutanée [274]. L'hypoxie ischémique est associée à une augmentation de l'angiogenèse et de l'inflammation. L'IL-19 favorise la revascularisation en entraînant la polarisation M2 des macrophages. Ce phénomène a pour effet l'augmentation du facteur pro-angiogénique VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) et diminue la production de médiateur anti-angiogénique comme l'IL-12 [282]. Les patients diabétiques sont sujets à de nombreuses complications dont des ulcères bacterio-induits qui peuvent aboutir à des amputations. Dans ce contexte, les cytokines, IL-20, IL-24 et surtout la cytokine IL-22 favorisent la ré-épithélialisation, le remodelage tissulaire et l'induction de peptides anti-microbiens chez des souris diabétique db/db [283]. De cette manière, la cytokine IL-22 contribue à limiter les conséquences des infections bactériennes en limitant la propagation des bactéries via l'induction de peptides antimicrobiens et en favorisant la réparation tissulaire [4,211,259,263,274,283].

5.3.2. Implications dans les pathologies chroniques

5.3.2.1. Cancers

L'intérêt des cytokines de la sous-famille des IL-20 est issu de la découverte des propriétés antiprolifératives de l'IL-24 dans une lignée cellulaire humaine cancéreuse issue de mélanome. Ainsi, l'IL-24 était initialement nommée Melanoma Differentiation-Associated gene 7 (MDA-7) [284]. Depuis cette découverte, l'activité antitumorale de l'IL-24 a été confirmée dans de nombreux types de cancers [285]. Les effets anti-cancéreux de l'IL-24 sont liés à l'induction de mécanismes variés incluant, l'induction du stress du réticulum endoplasmique, la production de ROS, l'apoptose ou encore l'autophagie [286]. Cependant, les autres membres de cette sous-famille, ne semblent pas partager les propriétés antiprolifératives de l'IL-24, bien au contraire ! En effet, l'IL-20 favorise la prolifération de cellules de cancer oral [287], d'adénocarcinome pancréatique [288], de cancer de la prostate [289], de cancer du sein [290], d'hépatocarcinome [291]. Le blocage de l'IL-20 par un anticorps monoclonal supprime la prolifération cellulaire. L'IL-19, l'IL-22 et l'IL-26 favorisent également certains cancers dont le cancer du sein [292], des cancers intestinaux [293], le cancer gastrique [294]. La présence de médiateurs inflammatoires (LCN2, protéines MMP, IL-1 β , IL-6...), induits par les cytokines IL-20, dans le microenvironnement tumoral pourrait faciliter la progression tumorale [287,290,292,295]. L'expression et l'activation du récepteur

IL-20Ra sont impliquées dans la prolifération tumorale et dans l'apparition de métastases dans un modèle de cancer colorectal [295]. De plus, la signalisation des cytokines de sous-familles des IL-20 passe par la voie STAT-3 et son activation favorise la transcription de facteurs pro-oncogéniques comme Bcl-2, c-myc [294,296].

Malgré l'utilisation de récepteurs et de voies de signalisation communes, les cytokines IL-20 ont des effets distincts sur la croissance tumorale. Cependant, les mécanismes par lesquels certains membres de cette famille vont induire des effets antiprolifératifs et d'autres vont faciliter la progression des tumeurs, restent à déterminer.

5.3.2.2. Pathologies inflammatoires

5.3.2.2.1. Pathologies rénales

Un taux élevé d'IL-20 est retrouvé chez les patients souffrant de maladie rénale chronique (MRC). Dans un modèle de rat MRC, l'IL-20 est fortement exprimé dans divers organes dont les poumons, le cœur, le foie et les reins [297]. Également exprimée par les cellules glomérulaires mésangiales l'IL-20 favorise la production des médiateurs pro-inflammatoires CCL-2 (ou MCP1), CXCL-10, CCL5, IL-6 qui vont induire le recrutement de monocytes et de lymphocytes T. De plus, l'IL-20 entraîne l'activation de la caspase 3 responsable de la mort des cellules épithéliales tubulaires [298]. L'inflammation, le stress oxydatif et l'apoptose cellulaire induite par l'IL-20 sont responsables de la dysfonction rénale associée aux maladies rénales [298,299]. La cytokine IL-24 peut être utilisée comme biomarqueur de dysfonctionnement rénal aigu. En effet, un taux élevé d'IL-24 est détecté dans le sérum et dans les urines chez les patients [300]. Et l'expression de la sous-unité IL-20Rb est augmentée dans les biopsies rénales de patients pathologiques [301]. Dans un modèle murin de néphropathie obstructive, la déplétion de l'IL-20Rb diminue l'expression de marqueurs pro-fibrotiques [301].

5.3.2.2.2. Psoriasis

Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau visualisée par l'apparition de plaques rouges qui se desquament. Elle est caractérisée par une prolifération excessive de kératinocytes anormalement différenciés. La réaction immunitaire associée est médiée par une réponse Th1/Tc1, Th17 et Th22. En effet, l'expression locale d'IL-22 est corrélée avec un taux élevé de cette cytokine dans le plasma des patients [302]. L'analyse de biopsies de patients démontre que les cytokines IL-19, IL-20, d'IL-24 et leurs récepteurs sont également sur-exprimés au cours de la pathologie [281,303]. Cette expression, qui est induite par l'IL-23 [281] va conduire à l'activation nucléaire persistante de STAT-3 dans les kératinocytes [277,280]. Ce phénomène va conduire à la surexpression de nombreux gènes associés au psoriasis comme : des chimiokines impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires, des peptides antimicrobiens de la famille des S100, β défensine [277]. De plus, les souris transgéniques pour l'IL-24 présentent une hyperplasie épidermique et une différenciation anormale des kératinocytes associée à une infiltration de macrophages intradermiques [304]. L'inhibition de la sous-unité IL-20Rb réduit l'hyperplasie de l'épiderme [281]. Ces données tendent à confirmer le rôle des cytokines IL-20 dans la perte d'homéostasie de la peau contribuant ainsi à la physiopathologie du psoriasis.

5.3.2.2.3. Polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une pathologie inflammatoire chronique des articulations. Elle est associée à une inflammation synoviale, à une production d'auto-anticorps conduisant à une destruction des os et des cartilages [305]. Les cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-8 mais aussi, les cytokines IL-20 sont retrouvées en abondance dans les tissus synoviaux des patients [305].

Chez les patients, la cytokine IL-19, les sous-unités IL-20Ra et IL-20Rb [306] et l'IL-26 [307] sont détectées dans les sérums et les tissus synoviaux de patients PR. Dans ce contexte, la majorité des cellules exprimant l'IL-19 et l'IL-26 sont des fibroblastes et des macrophages. L'activation des voies de signalisation impliquant STAT-3 va conduire à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , TNF- α) et faciliter la génération de lymphocytes T Th17 [306,307]. La réduction de l'apoptose des fibroblastes synoviaux par l'IL-19 pourrait contribuer à l'hyperplasie synoviale [306]. L'ostéoclastogenèse est un

phénomène particulièrement étudié dans la PR. Les ostéoclastes sont des cellules qui participent à la physiologie osseuse en favorisant la dégradation de l'os ancien pendant que l'os nouveau se génère. Récemment, Kyung-Ann Lee, et al, ont mis en évidence la participation de l'IL-26 dans l'ostéoclastogenèse. L'induction de l'expression de RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor KappaB (NF- κ B) Ligand) par l'IL-26 favorise la différenciation ostéoclastique d'une lignée fibroblastique assimilée aux synoviocytes. De cette manière, l'IL-26 pourrait contribuer à la physiopathologie de la PR en favorisant la production de cellules destructrices des tissus osseux [308]. L'expression d'IL-20 et d'IL-24 est également augmentée dans le plasma et dans le liquide synovial des patients PR. Leur expression est associée à la production de la molécule chimio-attractante MCP1 (ou CCL2) qui favorise le recrutement de neutrophiles dans le modèle [309]. *In vitro*, l'expression d'IL-20 est réduite par l'irradiation infrarouge des cultures cellulaires, ce qui pourrait présenter un intérêt thérapeutique [310].

5.3.2.2.4. Maladies inflammatoires de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), maladie de Crohn (MC) et recto-colite hémorragique (RCH) se caractérisent par une inflammation du tube digestif. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif pour ces pathologies et le rôle des cytokines IL-20 dans l'immunopathogénèse des MICI n'est pas encore élucidé.

Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, une étude démontre que le taux d'IL-19 est diminué [311]. La diminution de l'IL-19 entraîne la perte des effets immunosuppresseurs de la cytokine. Ce mécanisme contribue à l'induction et au maintien de l'inflammation observée dans un modèle murin de colite [312]. Cependant, le rôle de l'IL-19 dans les MICI reste controversé. En effet, une étude réalisée chez 113 personnes atteintes de MICI démontre une augmentation de l'expression colique de l'IL-19 en particulier chez les patients atteints par la maladie de Crohn [313]. Les cytokines IL-24 et IL-26 sont quant à elles augmentées au cours des MICI. Dans ce contexte, ces deux cytokines sont responsables de l'induction de médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8 ou l'IL-1 β . L'effet de ces cytokines est principalement dépendant de l'activation de la voie impliquant STAT-3 [313–316] mais l'activation des voies de signalisation telles que JNK, ERK1/2 par l'IL-24 et l'IL-26 favorise également l'inflammation dans les MICI [314,316]. L'échec de la résolution de

l'inflammation chez ces patients est lié à des dysfonctions des systèmes de drainage lymphatique. La surexpression du facteur mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) qui orchestre la transmigration leucocytaire à travers la barrière endothéliale est favorisée par l'activation de l'IL-20Ra. Ce mécanisme facilite la migration des cellules immunitaires à travers l'endothélium lymphatique et contribue à l'inflammation chronique observée chez les patients [317].

Ainsi, la participation des cytokines IL-20 dans les MICI n'est pas encore clairement établie et nécessite plus d'investigations afin de mieux comprendre leur rôle dans les mécanismes de la pathogénie de ces maladies intestinales.

5.3.2.2.5. Pathologies associées à l'allergie

Les pathologies allergiques sont liées à un dérèglement du système immunitaire qui conduit à la perte de mécanisme de tolérance vis-à-vis de substances normalement inoffensives : les allergènes. Les allergies peuvent toucher différents organes (la peau : dermatite, les voies respiratoires : l'asthme et la rhinite...) et sont multifactorielles impliquant des facteurs génétiques (l'atopie) et environnementaux (liés à une exposition d'allergènes et à la pollution). L'inflammation chronique retrouvée dans les maladies allergiques est souvent associée à une polarisation de type Th2 et Th17 [318]. Ainsi, la production d'IL-13 et d'IL-17A au cours des maladies allergiques est responsable de la production d'IL-19 [319,320] et d'IL-24 [321,322]. Associée au développement de l'hypersensibilité de contact induit par le Para-Phenylenediamine (PP), la déplétion de l'IL-22ra, de l'IL-20Rb ou de l'IL-24 dans un modèle murin de dermatite allergique protège partiellement les souris de l'épaississement et l'infiltration cutanée de neutrophiles induite par l'administration de PP [323]. La surexpression d'IL-24 et l'activation de STAT-3 au niveau cutanée sont responsables de la dysfonction de la barrière épidermique liée à la diminution de l'expression de la filaggrine par les kératinocytes [322]. Dans l'asthme allergique, l'IL-19 est également induite dans le sérum de souris exposées aux acariens. L'inhibition de la sous-unité IL-20Ra ou de l'IL-19 par des anticorps bloquants atténue l'inflammation observée dans ces modèles murins d'asthme [324]. Chez l'homme, des niveaux élevés d'IL-19 dans le sang périphérique de patients atteints de rhinite allergique sont corrélés avec la sévérité des signes cliniques chez ces patients [325]. Ainsi, les cytokines IL-20 participent à la

pathogénèse des maladies allergiques mais les mécanismes d'action par lesquels elles exercent leurs effets délétères ne sont pas encore élucidés.

5.3.2.2.6. BPCO

L'implication des cytokines IL-20 dans la physiopathologie de la BPCO est très peu étudiée et leur rôle dans ce contexte n'est pas encore connu. Cependant, le niveau d'IL-19 sérique et d'IL-26 dans les sputa de patient corrèle avec la progression de la pathologie. À l'inverse, les niveaux protéiques de ces cytokines sont inversement corrélés à la fonction respiratoire au cours de la BPCO [8,326]. La libération d'IL-26 au cours de l'exposition chronique à la fumée de cigarette pourrait contribuer à la mobilisation neutrophilique pulmonaire retrouvée chez les patients [327]. Ces données suggèrent un rôle de ces cytokines de la sous-famille des IL-20 et la BPCO, bien que les mécanismes physiopathologiques restent à déterminer. Leurs rôles dans les exacerbations n'ont pas été abordés bien que des données du laboratoire montrent leur implication dans les épisodes induits par des infections bactériennes (EP19306068.8).

5.3.3. Implications dans les pathologies infectieuses

La cytokine IL-22 est la cytokine de la famille des IL-20 la plus étudiée et son rôle protecteur contre de nombreux pathogènes extra-cellulaires est, à ce jour, plutôt bien documenté notamment contre des pathogènes pulmonaires tels que *S.pneumoniae* et *NTHI* [4,5,259,260,328]. Cependant, l'implication des autres membres de cette famille dans les mécanismes anti-infectieux reste encore floue. À l'inverse des propriétés antibactériennes de l'IL-22, les cytokines IL-20 sont responsables de la modulation de la réponse immunitaire spécifique et favorisent diverses infections bactériennes. En effet, elles sont impliquées dans l'expansion de bactéries comme *Staphylococcus aureus* (*Sa*) dans la peau [7,329], de *Sp* dans les poumons [6], de *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*) dans le sang [330], de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) dans la cornée [331] ou *Neisseria meningitidis* (*Nm*) dans les cellules gliales [332]. Dans ces modèles, l'inhibition de la signalisation dépendante de l'IL-20Rb facilite la migration des neutrophiles [6,329] et favorise la clairance bactérienne [6,7,329,330]. À l'inverse, l'IL-24 et l'IL-26 favorisent leur recrutement lors d'une stimulation bactérienne

[333,334]. Les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 sont également associées aux formes actives de la tuberculose. En effet, la stimulation antigénique de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) de patients tuberculeux favorise l'apparition de lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ exprimant ces cytokines [335]. La production des cytokines IL-20, dans ces modèles d'infections bactériennes, contribue à la libération de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IFN- γ [336] et à l'inhibition de la production de peptides antimicrobiens tels que les S100A9/8, LCN2, diminuant ainsi la clairance des bactéries [6,331]. L'activité immunosuppressive des cytokines IL-20 lors des infections bactériennes pourrait être liée à leur action inhibitrice de l'IL-1 β et les réponses Th1/Tc1 et Th17/Tc17 [261,321,332,335].

Similaire à une infection virale, la stimulation des TLR-3, -7 et -8 favorise la production d'IL-26 par les cellules épithéliales bronchiques. L'IL-17 et l'IL-22 peuvent agir, de manière synergique, sur la production de cette cytokine particulière de la sous-famille [337]. En effet, l'IL-26 est exprimée chez l'homme, mais n'est pas retrouvée chez la souris et sa fonction reste très peu connue ne ciblant pas spécifiquement les muqueuses contrairement aux autres cytokines IL-20. L'IL-26 n'est pas la seule cytokine de cette famille à être impliquées dans la réponse au virus. En effet, les variations génétiques des gènes IL-19 et IL-20 sont associées à des toux récurrentes post-infection à VRS chez l'enfant [9]. L'IL-24, également induite par des virus tels que les virus grippaux [338] ou le VIH-1 (Virus de l'Immunodéficience Humaine-1) [339], est associée à une diminution de l'activité cytolytique induite par les virus. À l'inverse, l'inhibition de l'IL-24 par ARN interférant (siRNA) favorise la multiplication virale intra-cellulaire *in vitro* [338]. Cet effet est favorisé par l'activation de la voie IRF3 et par l'induction de l'expression molécule antivirale comme *mxr*, *ifn- β* , *oas* [338]. De plus, cette cytokine est associée à l'augmentation des marqueurs d'apoptoses dans des cellules infectées par le virus du SIDA [339]. Ainsi, l'action de l'IL-24 sur la production de médiateurs antiviraux et la mort des cellules infectées permet de mettre en évidence des mécanismes par lesquels cette cytokine pourrait limiter les infections virales.

Objectifs

La BPCO est récemment passée en 3^{ème} position des causes de mortalité dans le monde et concernerait plus de 300 millions de personnes au niveau mondial, ce qui en fait un problème majeur de santé publique [11,12]. Cette maladie inflammatoire pulmonaire chronique se caractérise par une obstruction non complètement réversible des bronches, une hypersécrétion de mucus et une destruction des parois alvéolaires conduisant à une diminution des capacités respiratoires. Les patients atteints de BPCO, sont particulièrement sujets aux infections pulmonaires qui peuvent être fongiques, bactériennes ou virales et qui sont à l'origine d'épisodes d'aggravation aiguë des symptômes respiratoires (les exacerbations). Ces épisodes d'exacerbation, marquent l'entrée dans un cercle vicieux dont l'évolution peut devenir fatale pour les patients.

Le défaut d'expression d'IL-22 au cours de la BPCO participe à la susceptibilité des patients vis-à-vis des infections bactériennes [4,124]. De récentes données montrent que l'IL-22 joue un rôle important dans les mécanismes d'élimination de bactéries pathogènes respiratoires comme *Pseudomonas aeruginosa*, NTHi ou *Streptococcus pneumoniae*, notamment par la régulation de la production de peptides antimicrobiens [5,124,259,328,340]. De plus, cette cytokine intervient comme un élément protecteur de l'épithélium dans les infections par le virus Influenza de type A (IAV). Ainsi, l'IL-22 permet de limiter les conséquences de l'infection par IAV et de prévenir la survenue de surinfections [2,259,263]. De manière intéressante, Myles et al, ont démontré que la surexpression des cytokines de la sous-famille des IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) facilite les infections cutanées par *S. aureus* [7]. La suppression de leur fonction par l'inhibition de la signalisation dépendante de l'IL-20Rb réduit l'expansion bactérienne par *S. aureus* [7] et par *S. pneumoniae* [6]. Bien que les récepteurs et les cytokines IL-20 soient fortement exprimés dans le poumon après infection, leur rôle dans les mécanismes de défense pulmonaire antivirale n'est pas connu. Seul un travail récent montre l'expression de l'IL-24 dans l'épithélium pulmonaire infecté par IAV et le rôle protecteur de cette cytokine vis-à-vis de ce virus [338]. Les données préliminaires du laboratoire démontrent que les cytokines IL-20 sont également surexprimées lors de l'exposition à la fumée de cigarette et lors d'infections virales par le VRS.

Dans ce contexte, nous formulons l'hypothèse que les cytokines IL-20 participent, lors des exacerbations virales, à la progression de la BPCO en favorisant la surinfection bactérienne des voies aériennes.

Pour étudier cette hypothèse, mon projet comporte plusieurs étapes :

1) Préciser le degré d'expression des cytokines IL-20 au cours des infections virales dans la BPCO. Deux approches sont utilisées : les souris C57BL/6 déficientes en IL-20RB (IL-20RB^{-/-}) et un anticorps bloquant le récepteur IL-20RB permettant l'inhibition de la fonction des IL-20 (clone 20RNTC),

2) Préciser le rôle de ces cytokines dans la survenue de surinfection chez les souris BPCO en utilisant les mêmes outils.

Ces approches ont pour but de mieux comprendre la physiopathologie de ce type d'exacerbations de la BPCO et de proposer de nouveaux outils thérapeutiques.

Objectif 1 : La première partie de ce travail de thèse a consisté à mettre au point le modèle murin d'exacerbation de la BPCO par les virus. Le VRS étant l'un des virus les plus fréquemment retrouvé chez les patients en exacerbation, nous avons évalué l'impact d'une infection par le PVM (homologue murin du VRS) chez des souris C57BL/6 chroniquement exposées à la fumée de cigarette. Nous avons analysé l'inflammation pulmonaire, le recrutement cellulaire et la réponse antivirale afin de valider notre modèle d'exacerbation. Dans un second temps, nous avons analysé l'expression des cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24). Des dosages de RT-qPCR et ELISA ont permis d'analyser l'expression globale des cytokines IL-20 de leur récepteur au niveau pulmonaire et systémique. Les marquages immuno-histochimiques sur des sections de poumon nous ont permis de localiser l'expression des cytokines IL-20 au cours de la BPCO, de l'infection par le PVM et lors de l'exacerbation. Enfin, nous avons évalué le rôle des cytokines IL-20 au cours de l'exacerbation virale de la BPCO. Pour cela, des souris IL-20Rb KO ont été utilisées afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de la fonction des cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) sur l'inflammation pulmonaire, le recrutement cellulaire et la réponse antivirale. Des expériences avec des souris traitées par anti-IL-20Rb seront par la suite réalisées pour conforter ses résultats.

Objectif 2 : La deuxième partie de ce travail de thèse a consisté à mettre au point le modèle murin de surinfection bactérienne au cours de de la BPCO. En effet, il est maintenant bien établi que les infections virales facilitent le développement d'infections bactériennes secondaires. Ce phénomène est particulièrement documenté dans le contexte d'infection post-grippale. Basé sur le modèle de surinfection post-grippale utilisé par l'équipe de François TROTTEIN, nous avons adapté ce modèle aux souris exposées à la fumée de cigarette. Ainsi, nous avons évalué l'expression des cytokines IL-20 et analysé l'impact de la BPCO et du traitement anti-IL-20Rb sur la réponse à la surinfection bactérienne par l'intermédiaire de différentes techniques. En effet, l'inflammation a été analysée par cytométrie en flux et ELISA. La réponse antivirale a été analysée par RT-qPCR. La charge bactérienne a été évaluée grâce à l'étalement des échantillons sur gélose chocolat.

Nous avons également débuté la mise au point d'un modèle de surinfection post-PVM afin d'évaluer l'impact de l'exposition à la fumée de cigarette et du traitement IL-20Rb sur l'expansion bactérienne.

Résultats

Chapitre 1 : Implication des cytokines IL-20 sur les lésions épithéliales dans un modèle murin d'exacerbation virale de la BPCO

Article accepté dans *biomedicines* (MDPI) le 02/12/2021 (**Annexe 1**)

Mélina Le Roux, Anaïs Ollivier, Gwenola Kervoaze, Thimothé Becke, Laurent Gillet, Muriel Pichavant and Philippe Gosset

Résumé :

Contexte : Les infections virales sont fréquentes chez les patients atteints de BPCO. Ces infections respiratoires sont responsables d'épisodes d'exacerbation entraînant secondairement la progression de la pathologie. Des études précédentes ont démontré que les cytokines IL-20 facilitent les infections pulmonaires bactériennes, mais leur rôle au cours de la BPCO et des infections virales n'a pas encore été étudié. **Méthodes** : Des souris C57BL/6 WT et IL-20Rb KO ont été chroniquement exposées à l'air (Air) ou à de la fumée de cigarette (CS) pour mimer la BPCO. La réponse antivirale, l'inflammation et les dommages tissulaires ont été évalués après l'infection par le PVM en comparant les souris WT et IL-20Rb KO. **Résultats** : L'exposition chronique à la fumée de cigarette est associée à une augmentation de la charge virale pulmonaire et de la réponse antivirale. Chez les souris CS, l'infection par le PVM augmente l'expression d'IFN- γ , l'inflammation et les lésions tissulaires comparativement aux souris Air. L'infection par le PVM et l'exposition à la fumée de cigarette induisent l'expression des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 et de leurs récepteurs. Par ailleurs, la délétion de la sous-unité IL-20Rb diminue l'expression de la réponse interféron et des gènes associés (IFN- λ 2/3 induisant la production de *rsad-2*) comparativement aux souris WT. Cependant, cela n'impacte pas la réplication virale au niveau pulmonaire. La diminution de l'inflammation et des lésions tissulaires est associée à une augmentation de l'expression d'E-cadherine dans l'épithélium chez les souris IL-20Rb KO associée à une perméabilité pulmonaire et une perte de poids réduite. **Conclusion** : L'infection à PVM exacerbe l'inflammation et la réponse antivirale chez les souris CS et induit l'expression des cytokines IL-20. Notre modèle, qui mime les exacerbations virales de la BPCO, nous a permis d'identifier la voie des IL-20 comme une potentielle cible thérapeutique.

Mots clés : BPCO, Cigarette, infection virale, cytokines IL-20, poumon

Introduction :

La BPCO (Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive) est une cause majeure de mortalité et de morbidité dans le monde. Selon l'OMS, la BPCO est la troisième cause de décès dans le monde, causant 3,23 millions de décès en 2019. Caractérisée par une limitation progressive et irréversible du débit d'air, le principal facteur de risque de développer une BPCO est le tabagisme. L'exposition chronique à la fumée de cigarette (CS) déclenche des processus inflammatoires qui finissent par altérer les fonctions de la barrière pulmonaire et réduire les mécanismes de défense immunitaire, entraînant une susceptibilité accrue aux infections respiratoires causées à la fois par des bactéries et des virus [1]. De telles infections aggravent l'état clinique des patients et sont responsables d'épisodes d'exacerbation aiguë (AE-BPCO). Ces épisodes initient l'entrée dans un cercle vicieux diminuant ainsi le taux de survie des patients passant de 80 % à 30 % sur une période de cinq ans après la première exacerbation [161]. Bien que les exacerbations soient majoritairement associées à des infections bactériennes, les infections virales par le virus de la grippe A (IAV), le virus respiratoire syncytial (RSV) et le rhinovirus (RV) sont également fréquentes.

L'issue de l'infection est étroitement liée à l'efficacité de la réponse antimicrobienne de l'hôte. Les réponses immunitaires innées et adaptatives participent au contrôle de l'infection virale [230,238]. La réponse immunitaire contre les virus implique principalement la production d'interféron (IFN). Alors que l'effet antiviral de l'IFN de type II (IFN- γ) est limité, les IFN de types I (α et β) et de type III (λ ou IL-28/IL-29) induisent la transcription de plusieurs centaines de gènes potentiellement antiviraux [341]. De plus, des cytokines de type Th17, dont l'interleukine (IL)-22, sont également produites lors d'infections virales liées à l'IAV et au VRS. Cette cytokine contrôle la réaction inflammatoire et préserve l'homéostasie pulmonaire en maintenant l'intégrité de la barrière épithéliale des voies respiratoires limitant ainsi les lésions tissulaires [2,260]. Les cytokines IL-17 et IL-22 sont également essentielles pour empêcher l'invasion bactérienne secondaire. En effet, elles orchestrent la réponse antibactérienne en modulant la sécrétion de peptides antimicrobiens [211]. L'IL-22 avec l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24 et l'IL-26 appartiennent à la sous-famille des cytokines IL-20. Alors que l'IL-22 agit via un récepteur spécifique dépendant de la sous-unité IL-10Rb, l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24 se lient au récepteur IL-20 de type I (IL-20R), un récepteur hétérodimérique composé de l'IL-20Ra et de l'IL-20Rb. L'IL-20 et l'IL-24 se lient également au

récepteur type II composé de la sous-unité $\alpha 1$ du récepteur IL-22 et de l'IL-20Rb [5]. Fait intéressant, ces récepteurs sont fortement exprimés dans les cellules épithéliales des voies aériennes (AEC) [6]. Le blocage de la sous-unité IL-20Rb peut neutraliser efficacement la réponse aux cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) [6] et limiter les infections bactériennes cutanées et pulmonaires [6,7]. Étant donné que les cytokines IL-20 sont associées à une augmentation des signes cliniques de la BPCO [8] et de l'infection virale [9,10], notre objectif était d'évaluer leur rôle physiopathologique lors de l'exacerbation virale de la BPCO en utilisant des souris WT et IL-20Rb KO. Nous avons analysé l'inflammation des voies respiratoires après une infection par le PVM (Pneumonia Virus of Mice ; famille Paramyxoviridae), un agent pathogène naturel de la souris reproduisant la pathogenèse du VRS [226,228]. Contrairement au VRS, le PVM est capable de se répliquer dans les cellules épithéliales bronchiques des souris [228]. Étant donné que les infections virales sont capables d'induire l'expression des cytokines IL-20 dans les AEC et en raison de la forte expression des IL-20R sur ces cellules, nous avons concentré notre étude sur l'impact de l'infection par PVM sur les cellules épithéliales. Dans cette étude, nous avons d'abord démontré que l'infection à PVM induit la production de cytokines IL-20, principalement IL-24, un processus amplifié par l'exposition au CS, et participe à la fois à la réaction inflammatoire et au développement des lésions épithéliales pulmonaires.

Matériels et méthodes :

Modèle animal de BPCO :

Toutes les expérimentations ont été réalisées en appliquant les réglementations européennes sur l'expérimentation animale en vigueur. Les animaux sont hébergés dans une installation agréée dont la température (20-24°C), l'hygrométrie (45 %-65 %) et le cycle jour/nuit (12h) sont contrôlés. Les souris ont accès à de la nourriture et de l'eau fournies à volonté. Tous les travaux utilisant les animaux sont conformes aux directives du comité de protection et d'utilisation des animaux du Nord-Pas-de-Calais (agrément n° AF 16/20,090).

Le modèle murin de BPCO a été établi selon le modèle décrit par Pichavant et al [342]. En résumé, des souris C57BL/6, mâles ou femelles, âgées de 6-8 semaines de type sauvage (WT) (Janvier Animalerie SOPF, Le Genest-St.-Isle, France) ou invalidées pour le gène

codant pour la sous-unité du récepteur aux cytokines IL-20 (IL-20Rb KO) (générées par le groupe Wegenka UM [343] et généreusement données par le Pr J. Niels) ont été utilisées.

Ces souris ont été exposées à la fumée de 5 cigarettes (1R6F, Université de Kentucky) par jour, 5 jours par semaine pendant 12 semaines (Chambre d'exposition Emka, Scireq, Montreal, QC, Canada). Au bout de ces 12 semaines, les souris présentent des altérations de la fonction pulmonaire associée à une inflammation.

Modèle animale d'exacerbation virale de la BPCO :

Au terme de l'exposition et afin d'exacerber la pathologie, les souris sont exposées, par voie intranasale (i.n 50 µL) et après anesthésie (i.p 150 µL de solution contenant de la xylazine (2 mg/ml, Bayer Santé) et de la kétamine (10 mg/ml, Merial) en PBS), à une dose sub létale de virus PVM (200 PFU) en PBS. Les souris « contrôle » ont reçu 50 µL de PBS.

Collecte et traitement des échantillons :

Les souris ont été euthanasiées 3, 6, 9 ou 12 jours après l'infection. Les fluides de lavage bronchoalvéolaire (LBA), les poumons, la rate et les échantillons de sang ont été collectés et conservés sur de la glace jusqu'au traitement ou congelés immédiatement dans de l'azote liquide. Les LBA ont été réalisés en instillant cinq fois 0,5 ml (volume final 2,5 ml) de PBS stérile. Après centrifugation à 400 g pendant 6 min à 4 °C, le surnageant (liquide BAL sans cellules) a été conservé à -20 °C pour l'analyse des cytokines (ELISA) et le culot cellulaire a été utilisé pour l'analyse en cytométrie en flux.

Le lobe gauche du poumon a été écrasé avec une lame stérile puis digéré avec de la collagénase (Collagénase Type VI 17104-019 Gibco par Life technologies) à 37 °C. Après 15 min de digestion, les poumons ont été homogénéisés avec une aiguille 18G et encore digérés pendant 15 min. Après centrifugation à 400 g 6 min à 4 °C, les culots ont été remis en suspension dans une solution de Percoll à 30 % (Percoll TM GE Healthcare 17-0891-01) et centrifugés à 500 g pendant 15 min. Les cellules spléniques totales ont également été isolées de la rate broyée et centrifugée à 400 g pendant 6 min à 4 °C. Les culots de poumon et de rate ont été remis en suspension dans un tampon de lyse des globules rouges (RBC) pendant

5 min à température ambiante, pour éliminer les érythrocytes. La réaction de lyse des globules rouges a été arrêtée avec du PBS à 2 % SVF (sérum de veau fœtal, Gibco). Après centrifugation à 400 g pendant 6 minutes à 4 °C, les cellules pulmonaires et spléniques ont été remises en suspension dans du PBS 2 % de SVF, puis dénombrées et utilisées pour la cytométrie en flux.

Cytométrie en flux :

Différents types cellulaires présents dans les LBA, les poumons et la rate ont été analysés par cytométrie en flux (LSR Fortessa, BD Biosciences) après incubation de 30 minutes en PBS plus 2 % SVF avec les anticorps suivants : CD5 (ref130-102-574, conjugué au FITC), Tetramer CD1d (installation NIH, conjugué au PE), NK1.1 (ref 130-103-963, conjugué au PerCp-Cy5.5), CD4 (ref 130-102-411, conjugué au PE-Cy7), CD25 (ref 130-102-550, conjugué à l'APC), CD69 (ref 561,238, conjugué à l'Alexa700), TCR $\gamma\delta$ (ref 130-104-016, conjugué à l'APC-Vio770), TCR- β (ref 130-104-815, conjugué au V450), CD8 (ref 130-109-252, conjugué au V500), CD45 (ref BLE103140, conjugué au BV605) (BD Bio-sciences , Biolegend et Myltenyi Biotech), I-Ab (réf 130-102-168, conjugué au FITC), F4/80 (réf 130-102-422, conjugué au PE), CD103 (réf 563 637, conjugué au PerCP-Cy5.5), CD11c (ref 558 079, conjugué au PE Cy7), CD86 (ref 560,581, conjugué à l'Alexa-700), Ly6G (ref 560 600, conjugué à l'APC-H7), CD11b (ref 560 455, conjugué au V450), CD45 (ref 130-402 -512, conjugué au V500), Ly6C (ref BLE128036, conjugué au BV605) (BD Biosciences, Biolegend et Myltenyi Biotech) et CCR2 (ref FAB 5538A, R&D systems, conjugué à l'APC). Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo™ v7.6.5 (Stanford, CA, USA). Les nombres absolus de cellules ont été calculés en fonction du nombre total de cellules et de la fréquence des cellules immunitaires CD45+. La stratégie de gating a déjà été décrite [4,211].

Histologie pulmonaire :

Pour l'analyse histopathologique, le lobe postérieur du poumon a été fixé avec du paraformaldehyde (PFA 4 %). Les poumons ont ensuite été déshydratés et inclus dans de la paraffine et les sections pulmonaires ont été colorées à l'hématoxyline-éosine. Le score

histologique a été calculé sur le remodelage et l'inflammation tels que définis dans l'article de Kone et al. [211]. Les lésions de l'épithélium bronchique ont également été déterminées par l'évaluation de la desquamation cellulaire, des lésions cellulaires et de la dissociation des jonctions intercellulaires. Le pourcentage d'épithélium altéré a été déterminé en utilisant le logiciel Image J (NIH).

Pour l'immunohistochimie (IHC), les sections de poumons incluses en paraffine ont été déparaffinées avec deux bains successifs de safesolv (labonord ref 00699464) et réhydratées avec des bains successifs d'éthanol (deux bains de 100 %, un de 90 %, un de 80 %, d'un de 50 %) puis un d'eau pendant 5 min pour chacun. Le démasquage d'épitopes a été réalisé dans un tampon citrate pH 6,0 pendant 15 min à 90 °C. Nous avons utilisé comme anticorps primaires, un anticorps anti-IL-19 [EPNCIR168] ab154187 (Abcam), un anticorps anti-IL-20 orb13501 (Biorbyt), un anticorps anti-IL-24 orb228807 (Biorbyt). Afin de quantifier les dommages épithéliaux, nous avons utilisé des anticorps de lapin anti- β -caténine (ref 71-2700), anti-E-cadhérine (ref61-7300) et anti-ZO-1 (ref PA5-19479) (ThermoFischer). Le kit UltraTek HRP anti-polyvalent Lab Pack (histo-line laboratories) a été utilisé selon les recommandations du fabricant. La contre-coloration a été réalisée avec de l'hématoxyline (Interchim).

Quantification protéique par ELISA :

Les niveaux protéiques d'IFN- γ , de CXCL-1, d'IFN- λ 2/3, d'IL-20, d'IL-24 (R&D) et d'IL-19 (invitrogen) ont été déterminés par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) dans le LBA, les lysats pulmonaires et le sérum de chaque souris en utilisant les recommandations du fabricant.

Expression d'ARN et RT-qPCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) :

L'ARN total a été isolé du poumon de souris en utilisant le réactif NucleoZol (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. La transcription inverse (RT) a été réalisée avec le kit de transcription inverse d'ADNc (Applied Biosystems) selon les recommandations du fabricant.

L'ADNc a été quantifié par PCR quantitative (QuantStudio 12 K Flex, Applied Biosystems) avec en utilisant le réactif SYBRGreen (eBiosciences) pour tous les gènes à l'exception de la détection du PVM (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). Les amorces (Eurofins Genomics) utilisées dans cette étude sont décrites dans le tableau 3. Les résultats sont exprimés en expression relative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculés par rapport à la condition contrôle en utilisant *hprt1* comme gène de référence.

| <i>Gene</i> | Sequences |
|---------------|--|
| <i>hprt1</i> | Sens : 5' TCC TCC TCA GAC CGC TTT T 3' Antisens : 5' CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC 3' |
| <i>il-19</i> | Sens : 5' TGT GTG CTG CAT GAC CAA CAA 3' Antisens : 5' GGC AAT GCT GCT GAT TCT CCT 3' |
| <i>il-20</i> | Sens : 5' TCT TGC CTT TGG ACT GTT CTC 3' Antisens : 5' GTT TGC AGT AAT CAC ACA GCT TC 3' |
| <i>il-24</i> | Sens : 5' AGC ACT GGC CCT TTC TTC AA 3' Antisens : 5' TGG CAA GAC CCA AAT CGG AA 3' |
| <i>rig-i</i> | Sens : 5' TGC GGA AAT ACA ACG ATG CA 3' Antisens : 5' GCT CGG TCT CAT CGA ATG CTG 3' |
| <i>rsad-2</i> | Sens : 5' TGC TGG CTG AGA ATA GCA TTA GG 3' Antisens : 5' GCT GAG TGC TGT TCC CAT CT 3' |
| <i>pvm</i> | Sens : 5' GCC GTC ATC AAC ACA GTG TGT 3' Antisens : 5' GCC TGA TGT GGC AGT GCT T 3' Probe : 5'[FAM] C GCT GAT AAT GGC CTG AG CA [TAM] 3' |

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour la qPCR

Analyses statistiques :

Les données sont exprimées en moyenne \pm sem. Les analyses statistiques des variances ont été conçues avec le logiciel Prism (GraphPad version 9). La comparaison multiple des données a été réalisée en utilisant une analyse ANOVA à deux voies suivies d'un test Tukey pour déterminer l'effet significatif du virus (en comparaison avec les souris non infectées ou PBS) ou d'un test Sidak pour déterminer l'effet de l'exposition à la fumée de cigarette (CS) (en comparaison avec les souris Air) ou l'effet de la délétion de l'IL-20Rb (en comparaison avec les souris WT). Les données sont considérées significatives lorsque la p value (p) est inférieure à 0,05 ($p < 0,05$). Un effet significatif du virus est symbolisé par * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Un effet significatif du CS ou de l'IL-20Rb KO est symbolisé par # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ and #### $p < 0.0001$.

Résultats :**L'infection par le PVM exacerbe l'inflammation et la réponse antivirale induite par l'exposition à la fumée de cigarette**

Un modèle expérimental d'exacerbation de la BPCO a été établi chez des souris chroniquement exposées à la fumée de cigarette en utilisant le PVM comme facteur déclencheur. L'effet de l'infection intranasale par le PVM a été analysé 3, 6, 9 et 12 jours après l'infection. Au vu de la cinétique d'infection par le virus avec un pic de la charge virale pulmonaire se situant 7 jours post-infection et un pic d'inflammation 10 jours post-infection, nous avons décidés de focaliser nos analyses sur les temps 9 et 12 jours (Figure 13a). Dans ce modèle, l'ARN du PVM a été détecté dans les poumons des souris Air avec un pic 9 jours post-infection et une augmentation significative a été observée chez les souris CS. La réplication virale pulmonaire est associée à une induction de la réponse antivirale dans les poumons des souris Air et CS 9 jours après l'infection. En effet, une surexpression des ARNm de *rig-i*, *irf-7*, et *rsad-2* a été observée dans les tissus pulmonaires, montrant ainsi, l'induction des récepteurs de reconnaissance de motif moléculaire (PRR), et l'expression de gène inducteur d'interféron (ISG, Interferon Stimulated Gene). De plus, cette observation coïncide avec une production élevée d'IFN- λ 2/3 notamment chez les souris CS. En résumé, une réplication plus élevée de PVM est vraisemblablement à l'origine d'une réponse antivirale accrue chez les souris exposées au CS (figure 13b). L'examen histologique des tissus pulmonaires a montré que l'infection par PVM induisait un recrutement cellulaire à la fois dans la zone péribronchique et alvéolaire chez les souris infectées (Figure 13c). Ce recrutement cellulaire est observable 9 et 12 jours après le début de l'infection virale. L'infection à PVM et l'exposition à la fumée de cigarette induisent des dommages importants au niveau des cellules vasculaires et au niveau des cellules épithéliales bronchiques. Cependant, l'exposition à la fumée de cigarette favorise le remodelage vasculaire et les dommages épithéliaux qui deviennent significativement plus importants chez les souris infectées par le PVM (comme illustré sur la figure 13d).

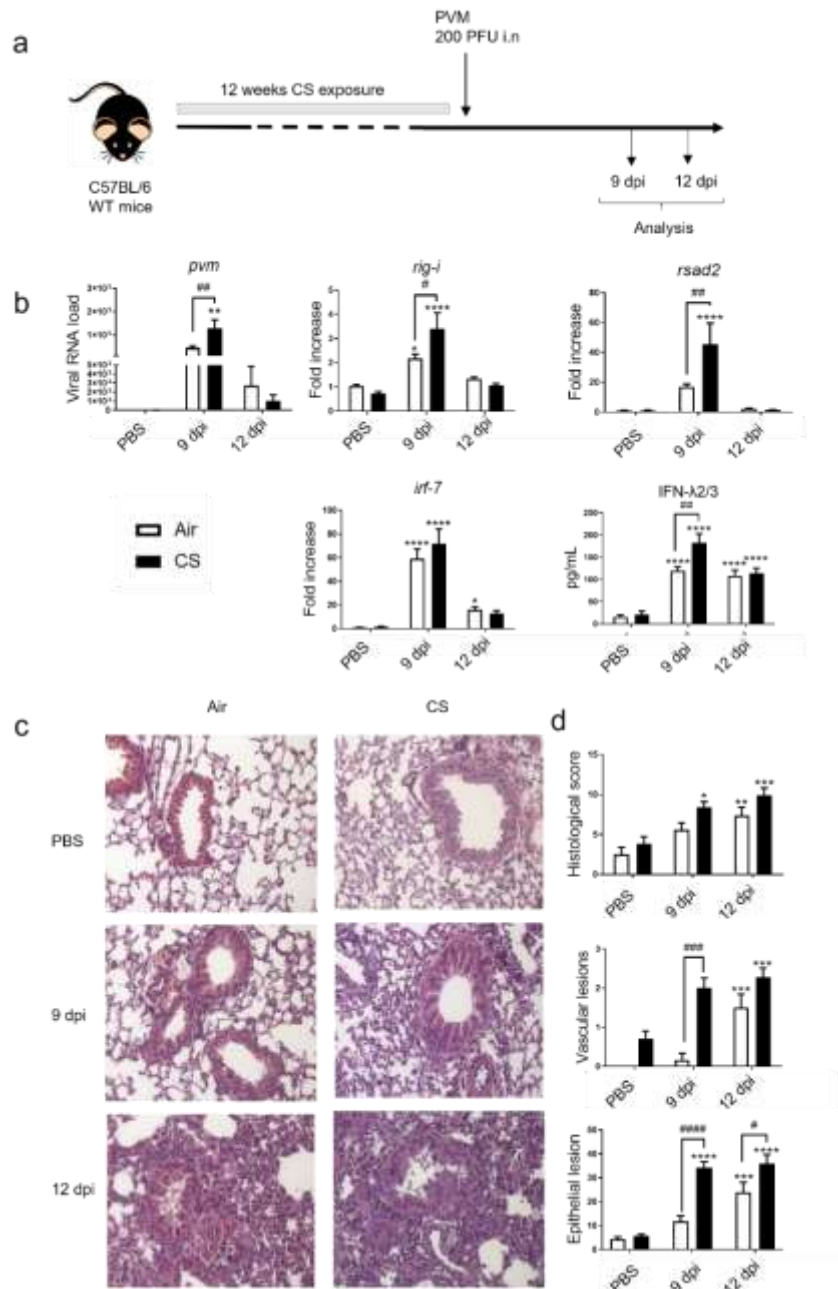


Figure 13 : Le PVM exacerbe la BPCO

Le jour de l'infection a été défini comme le jour 0 indiquant également la fin du protocole d'exposition à la fumée de cigarette (CS), qui a consisté à exposer les souris à l'Air ambiant (Air) ou au CS (5 cigarettes/jour, 5 jours/semaine) pendant 12 semaines. Les analyses ont été réalisées 9 et 12 jours après l'infection. **(b)** la charge virale et la réponse antivirale incluant l'expression de *rig-i*, *rsad-2*, *irf-7* a été évalué par RT-qPCR dans les tissus pulmonaires. Les résultats sont exprimés en expression relative en comparaison avec les souris Air non infectées. Le gène *hprt1* a été utilisé comme gène de référence. Le niveau d'IFN-λ2/3 a été évalué par ELISA (pg/mL) **(c)** Les changements histologiques ont été évalué 9 et 12 jours après l'infection par le PVM. Des photos représentatives sont représentées après une coloration HE. **(d)** Le score histologique inclut l'évaluation des lésions vasculaires et des dommages épithéliaux. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Les souris Air sont représentées par les barres blanches et les souris CS par des barres noires. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ et **** $P < 0.0001$ correspondent à un effet significatif du virus (PVM vs. PBS). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $P < 0.001$ et #### $P < 0.0001$ correspondent à un effet significatif du CS (CS vs. Air).

L'infection par le PVM est associée à une augmentation du recrutement cellulaire dans les LBA et les poumons 9 et 12 jours post-infection (Figure 14). Cependant, ce recrutement n'est pas affecté chez les souris CS. La caractérisation des populations cellulaires a démontré une infiltration de cellules NK, et de cellules dendritiques cDC2 dès 9 jours après l'infection alors que les cellules de type NKT et lymphocyte T sont observées au jour 12 dans les poumons et les LBA des souris Air. L'exposition à la fumée de cigarette a augmenté le recrutement des cellules de type NKT, mais n'a pas impacté le recrutement des lymphocytes T et des cDC2 dans les poumons des souris non infectées. 9 jours après l'infection virale, l'exposition au CS est responsable d'une diminution du recrutement des cellules NK et de cDC2 dans les poumons. En revanche, dans le LBA, l'infection par PVM a augmenté le recrutement de cellules NK, et de NKT chez les souris CS. L'infection à PVM est également responsable de l'augmentation de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IFN- γ et l'IL-1 β dans les LBA et les poumons principalement au jour 9 (Figure 14). Aucun effet significatif de l'exposition au CS n'a été observé sur ces paramètres.

Au niveau systémique, aucun changement majeur n'est observé dans la rate, excepté pour le nombre de cellules NKT qui sont diminuées après l'exposition à la fumée de cigarette. Le niveau d'IFN- γ est augmenté dans le sérum des souris infectées et cette expression est majorée chez les souris exposées à la fumée de cigarette. En revanche, l'IL-1 β n'est pas induite dans le sérum des souris exposées au PVM (Figure supplémentaire 1 : Annexe 1).

Ensemble, ces données montrent que le PVM se réplique de manière plus importante chez les souris exposées à la fumée de cigarette conduisant à une augmentation de l'inflammation et des lésions pulmonaires. Cependant, cette réponse n'est pas associée à des modifications majeures du recrutement cellulaire.

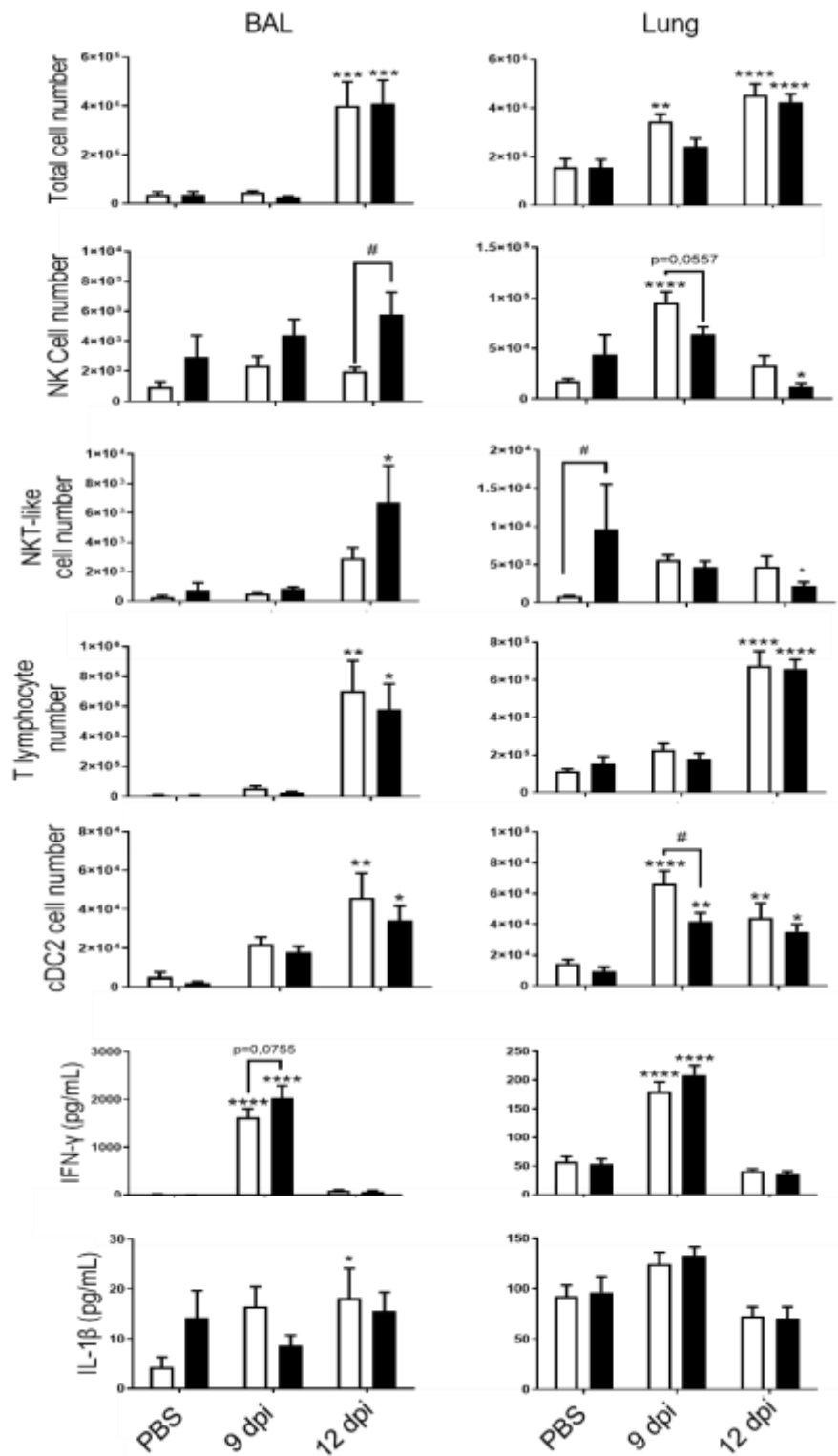


Figure 14 : L'infection par le PVM induit une inflammation pulmonaire

Nombre total de cellules, le nombre de cellules NK CD45+/TCRβ-/NK1.1+, de cellules de type NKT CD45+/TCRβ+/NK1.1+, de lymphocytes T CD45+/TCRβ+ et de cellules dendritiques (cDC2) CD45+/ F4/80-/ CD11c+ ont été évalués dans les LBA (gauche) et les poumons (droites) des souris Air (barres blanches) et des souris CS (barres noires). Les niveaux d'IFN-γ et d'IL-1β ont été analysés par ELISA dans les LBA (gauche) et dans les poumons (droite) des souris Air et CS. Les données sont représentées en moyenne ± SEM. *P<.05, **P<.01, ***P<.001 et ****P<.0001 correspondent à un effet significatif du PVM (PVM vs PBS). # p<0.05 correspond à un effet significatif du CS (CS vs. Air).

Le PVM module l'expression des cytokines IL-20

Nous avons tout d'abord analysé l'expression des ARNm des cytokines IL-20 dans les poumons. Indépendamment, l'exposition au CS et l'infection par le PVM augmentent, de manière non significative, l'expression de l'IL-19, de l'IL-20 et de l'IL-24 dans les poumons (figure 15a). Les souris exposées à la fumée de cigarette semblent exprimer, de manière plus importante, les cytokines IL-20 au cours de l'infection virale. En parallèle, nous avons évalué l'expression des ARNm des sous-unités IL-20Ra et IL-20Rb qui a été induite lors de l'infection dans les poumons notamment 9 jours post-infection. En revanche, l'exposition au CS n'a pas impacté l'expression pulmonaire des sous-unités IL-20Ra et IL-20Rb.

L'expression protéique des cytokines IL-20 a ensuite été analysée par immunohistochimie (Figure 15b). Ceci nous a permis de déterminer leur niveau d'expression et de visualiser leur localisation. Ainsi, l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24 ont été détectés chez les Air et CS. L'exposition au CS a tendance à augmenter l'expression d'IL-19 principalement dans les cellules épithéliales bronchiques alors que la coloration semble plus prononcée dans l'infiltrât péribronchique et dans les parois alvéolaires pour l'IL-20 et l'IL-24. Après 9 jours d'infection, les souris Air présentent une diminution de l'expression de cytokines IL-20 au sein des cellules épithéliales alors que l'expression de l'IL-20 et de l'IL24 semble augmenter dans l'infiltrât inflammatoire péribronchique et dans les parois alvéolaires. De plus, les souris exposées à la fumée de cigarette et infectées par le PVM sont caractérisées par une infiltration cellulaire importante qui exprime l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24. Pour confirmer ces données, les niveaux protéiques des cytokines IL-20 ont également été analysés dans les LBA et le sérum (figure 15c). Dans les LBA, la sécrétion des 3 cytokines a été augmentée par l'infection. L'augmentation d'expression d'IL-19 et d'IL-24 est observable 9 jours après l'infection alors que pour l'IL-20 l'augmentation est significative à partir du jour 12. Cependant, l'exposition au CS n'a pas modifié leurs concentrations les lavages broncho-alvéolaires. Dans les sérums, aucun changement significatif n'a été observé pour l'IL-19 et l'IL-24. Comme dans le BAL, les niveaux périphériques d'IL-20 ont été augmentés de manière transitoire avec un maximum à 9 jours post-infection sans changement chez les souris exposées au CS.

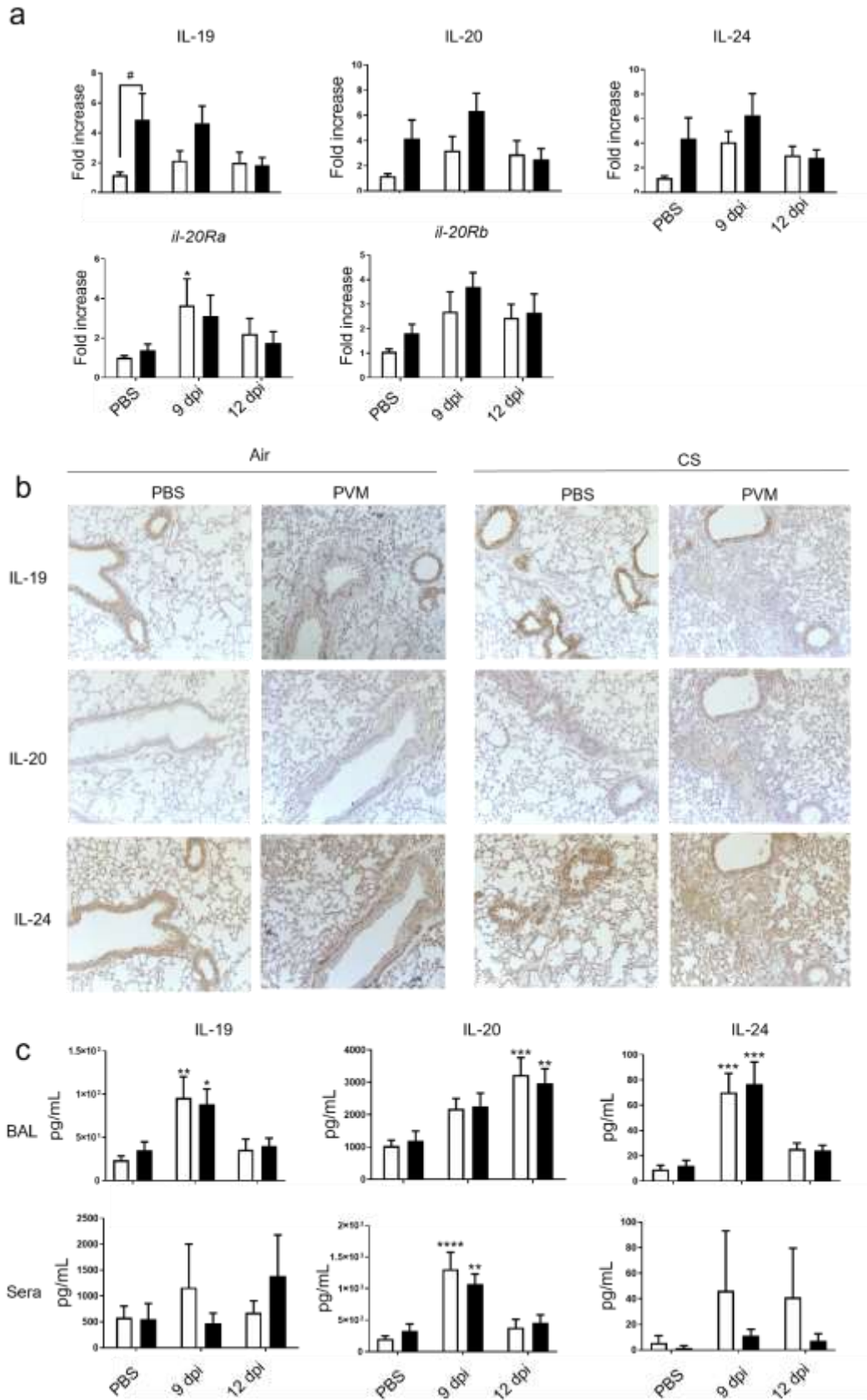


Figure 15 : L'infection par le PVM module les l'expression des cytokines IL-20

(a) les ARNm de l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24, l'IL-20ra et l'IL-20rb ont été évalués par RT-qPCR dans les poumons 9 et 12 jours après l'infection virale. Les résultats sont exprimés en expression relative comparativement aux souris Air exposé au PBS. L'expression du gène *hprt1* comme gène de référence (b) L'expression d'IL-19, d'IL-20 et d'IL-24 a été évaluée sur des sections pulmonaires par immunohistochimie 12 jours post-infection chez les souris Air et CS. (c) Les niveaux d'expression

protéique d'*Il-19*, d'*Il-20*, et d'*Il-24* ont été analysés dans les LBA et dans les sérums par ELISA (pg/mL). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. *P<.05, **P<.01, ***P<.001 et ****P<.0001 correspondent à l'effet du virus (PVM vs PBS). # p<0.05 correspond à l'effet du CS (CS vs. Air).

Les cytokines IL-20 modulent la réponse antivirale chez les souris CS

Pour évaluer le rôle des cytokines IL-20 lors de l'exacerbation virale de la BPCO, nous avons exposé des souris IL-20Rb KO et des souris WT, à la fumée de cigarette et nous les avons infectées avec le PVM en utilisant le même protocole que celui décrit dans la figure 13a. Comme prévu, l'ARNm de PVM a été détecté dans le poumon de souris CS WT. Cependant, la déplétion en IL-20Rb n'a pas affecté l'expression d'ARNm de PVM dans le poumon (figure 16a). Concernant la réponse antivirale dans le compartiment pulmonaire, l'expression de *rig-1* et *rsad-2* et la production d'IFN- λ 2/3 dans le LBA ont été réduites chez les souris IL-20Rb KO par rapport aux souris WT (Figure 16a). En revanche, l'expression d'*irf-7* n'a pas été modulée chez les souris IL-20Rb KO (données non présentées).

L'analyse histologique a révélé qu'il n'y avait pas de différence entre les souris WT et IL-20Rb non infectées exposées à la fumée de cigarette. En revanche, cette analyse a confirmé que l'infection par PVM était associée à une forte inflammation chez les souris CS WT 12 jours post-infection. De plus, l'infection par le PVM était associée à des dommages épithéliaux et vasculaires chez les souris WT exposées au CS. Fait intéressant, l'infiltrat inflammatoire dans la zone péribronchique et alvéolaire ainsi que les lésions tissulaires induites lors de l'infection par le PVM ont été nettement réduits chez IL-20Rb KO (Figure 15b). Ceci a été confirmé par une diminution du score histologique et de la surface des lésions épithéliales (Figure 16b) alors que les dommages vasculaires ne sont pas modulés (données non présentées).

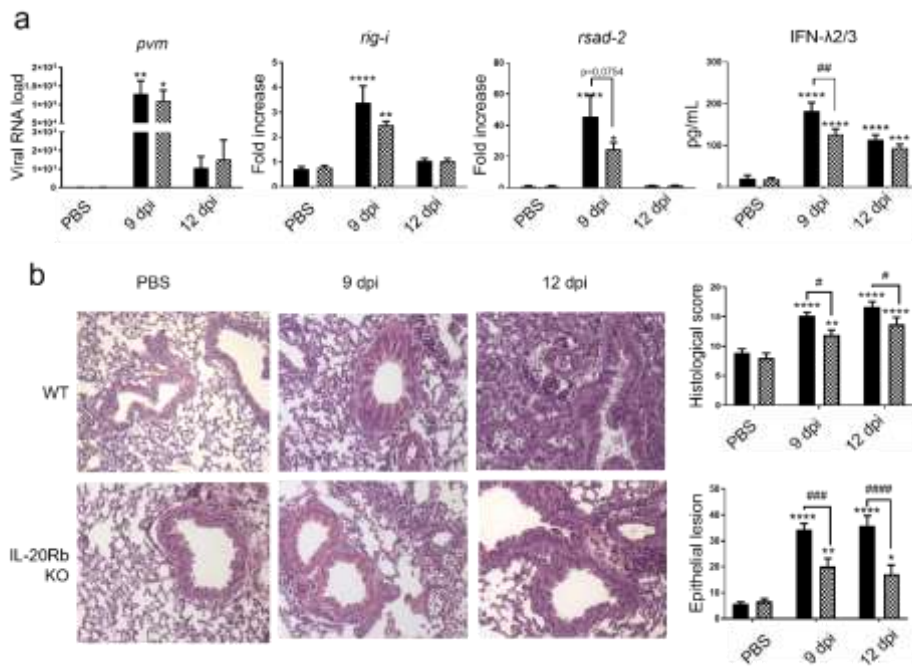


Figure 16 : L'infection virale induit une réponse antivirale et inflammatoire plus faible chez les souris IL-20Rb KO exposées au CS

(a) La charge virale et la réponse antivirale incluant l'expression de *rig-1* et *rsad-2*, ont été évaluées par RT-PCR dans les tissus pulmonaires. Les résultats sont exprimés en expression relative en comparaison avec les souris Air non infectées. L'expression du gène *hprt1* a été utilisée comme gène de référence. Le niveau d'IFN-λ2/3 a été étudié par ELISA (pg/mL) (b) Les changements histologiques ont été analysés 9 et 12 jours après l'infection virale. Le score histologique incluant les dommages épithéliaux a été exprimé en moyenne ± SEM. Les souris WT CS sont représentées par les barres noires et les souris CS IL-20Rb KO sont représentées par les barres quadrillées. *P<.05, **P<.01, ***P<.001 et ****P<.0001 correspondent à un effet significatif du virus (PVM vs. PBS). # p<0.05, ## p<0.01, ###P<.001, ####P<.0001 correspondent à un effet significatif de l'IL-20Rb KO (IL-20Rb KO vs. WT).

Le recrutement des cellules inflammatoires a été mesuré dans les LBA et dans les tissus pulmonaires (Figure 17). Le nombre total de cellules était inférieur dans les LBA des souris IL-20Rb KO par rapport aux souris WT. Cependant, aucune modulation significative du nombre de lymphocytes, cDC2, de NK ou de NKT n'a été observée chez les souris KO par rapport aux souris WT. L'analyse des cytokines immunomodulatrices a montré une augmentation du niveau d'IFN-γ dans le LBA et les tissus pulmonaires 9 jours après l'infection chez les souris WT, alors que les concentrations d'IL-1β n'étaient pas modulées de manière significative (Figure 17). Chez les souris IL-20Rb KO, le niveau d'IFN-γ est significativement diminué dans les poumons, mais pas dans le LBA. En revanche, le niveau d'IL-1β n'était pas modulé par la délétion d'IL-20Rb.

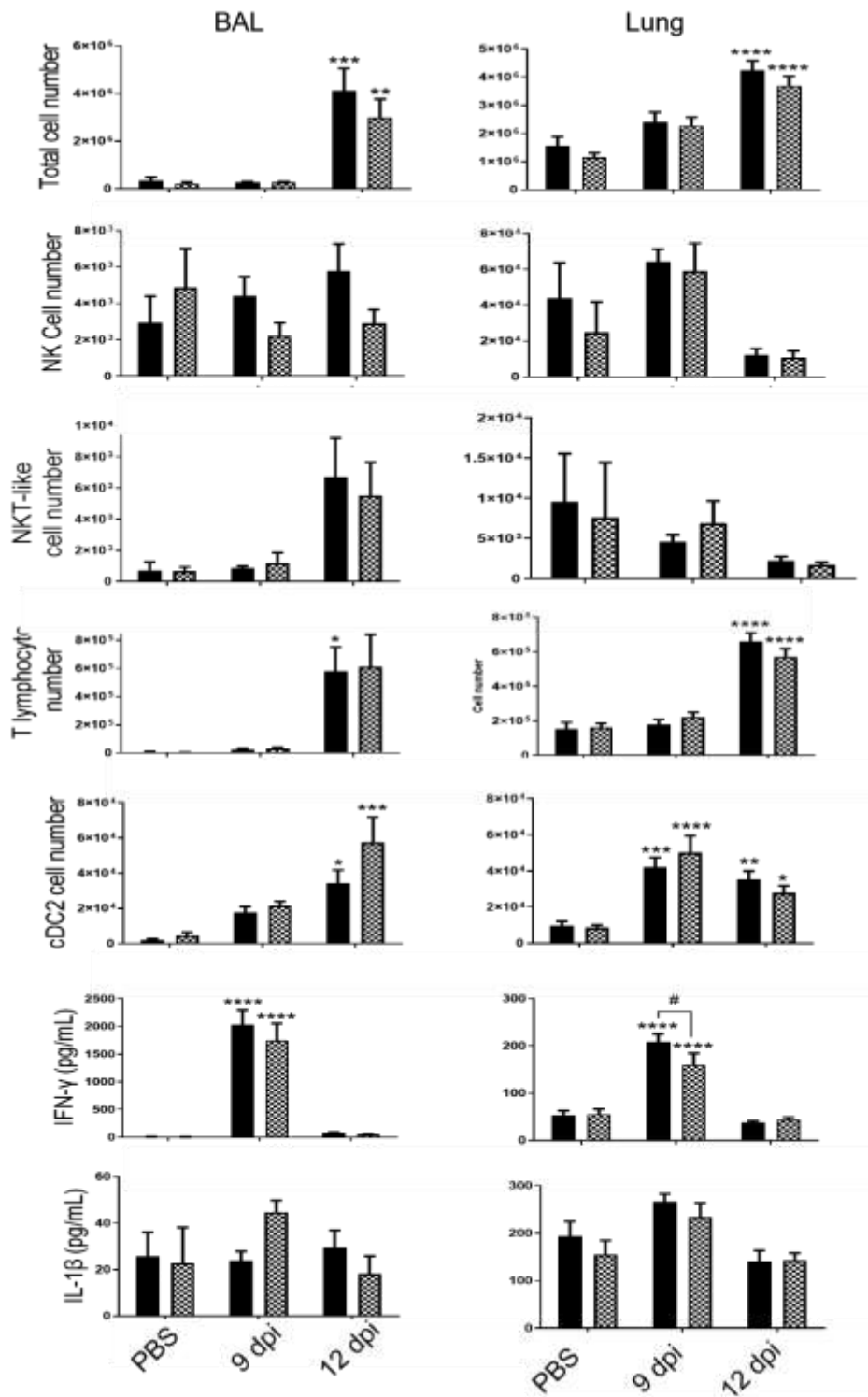


Figure 17 : L'infection virale module l'inflammation pulmonaire des souris WT et IL-20RB KO

Nombre total de cellules, le nombre de cellules NK CD45+/TCRβ⁻/NK1.1+, de cellules de type NKT CD45+/TCRβ⁺/NK1.1+, de lymphocytes T CD45+/TCRβ⁺ et de cellules dendritiques (cDC2) CD45+/ F4/80⁻/ CD11c⁺ ont été évalués dans les LBA (gauche) et les poumons (droite) des souris WT CS (barres noires) et des souris IL-20Rb KO CS (barres quadrillées). Les niveaux d'IFN-γ et d'IL-1β ont été analysés par ELISA dans les LBA (gauche) et dans les poumons (droite) des souris Air et CS. Les données sont représentées en moyenne ± SEM. *P<.05, **P<.01, ***P<.001 et ****P<.0001 correspondent à un effet significatif du PVM (PVM vs PBS). # p<0.05 correspond à un effet significatif de l'IL-20Rb KO (IL-20Rb KO vs. WT).

Dans la rate, l'exposition à la fumée de cigarette est associée à une augmentation du nombre de NK et de NKT chez les souris IL-20Rb KO. Dans le sérum, l'induction de l'IFN- γ par le PVM est diminuée chez les souris IL-20Rb KO alors que les niveaux d'IL-1 β n'ont pas été modifiés (Figure supplémentaire 2).

Ces données suggèrent que les cytokines IL-20 jouent un rôle dans l'exacerbation induite par le PVM notamment en modulant l'inflammation tissulaire, les lésions épithéliales et la réponse antivirale.

Implication des cytokines IL-20 chez les souris contrôle Air

Pour déterminer si le rôle des cytokines IL-20 est similaire chez les souris témoins, nous avons effectué le même protocole chez les souris exposées à l'air. Comme prévu, l'infection par PVM a induit une forte réponse antivirale avec un pic à 9 jours après l'infection associée à une réaction inflammatoire et à des lésions du tissu pulmonaire (Figure 3 supplémentaire : annexe 1). La suppression du récepteur IL-20Rb chez les souris exposées à l'air a amplifié la réplication de PVM et l'expression de *rsad-2* uniquement au jour 9 mais pas de *rig-i* et IFN-2/3, alors que les niveaux étaient similaires à 12dpi pour ces trois cibles. Concernant les lésions pulmonaires, nous n'avons pas observé d'effet significatif sur le score histologique, résultat associé à l'absence d'effet sur l'infiltrat cellulaire et la production de cytokines dans le poumon (Figures supplémentaires 3-4 : annexe 1). Néanmoins, le blocage de l'IL-20Rb a également diminué de manière significative les lésions épithéliales chez les souris Air à 12 dpi (Figure supplémentaire 3b : Annexe1).

Dans l'ensemble, ces données ont montré que la suppression de l'IL-20Rb augmente de manière transitoire la réplication de la PVM chez les souris Air sans altérer la réaction inflammatoire. Comme observé chez les souris exposées au CS, il a également diminué les lésions épithéliales à 12 dpi.

Les cytokines IL-20 jouent un rôle dans la perméabilité pulmonaire

Étant donné que les souris IL-20Rb KO ont moins de dommages épithéliaux, nous avons évalué la perméabilité pulmonaire en mesurant la concentration en protéines dans les LBA. Comme prévu, l'infection par PVM chez les souris WT a fortement amplifié la concentration de protéines dans le LBA 9 et 12 jours après l'infection. Fait intéressant, la délétion de l'IL-20-Rb est associée à des niveaux plus faibles de protéines chez les souris infectées, mais pas chez les souris non infectées (figure 18a). Après l'infection par PVM, les souris WT et IL-20Rb KO perdent du poids (figure 18b). Seules les souris IL-20Rb KO avaient repris du poids 12 jours post-infection. Comme chez les souris CS, l'infection par le PVM est également responsable d'une augmentation de la perméabilité pulmonaire et d'une importante perte de poids chez les souris Air (Figure supplémentaire 5 : Annexe1). Cependant, la délétion de l'IL-20Rb n'a pas modulé ces paramètres dans ce contexte.

Comme suspectée, l'infection à PVM était associée à une désorganisation des protéines de jonction à la fois dans l'épithélium bronchique et alvéolaire, comme l'illustre la coloration à l'E-cadhérine 9 jours après l'infection. Chez les souris WT infectées, la coloration était plus diffuse et ne se limitait pas au côté apical des cellules épithéliales bronchiques et ces altérations étaient plus prononcées chez les souris exposées au CS que chez les souris Air (Figure 18 et figure supplémentaire 3). La coloration était également présente dans les cellules inflammatoires. En revanche, chez les souris IL-20Rb KO l'infection par le PVM a fortement réduit ces altérations à la fois chez les souris exposées à l'air et au CS.

Ensemble, ces données révèlent que la surexpression des cytokines IL-20 est associée à une augmentation de la perméabilité pulmonaire induite par l'infection virale. Ce processus est accompagné d'une désorganisation de l'expression des protéines de jonction.

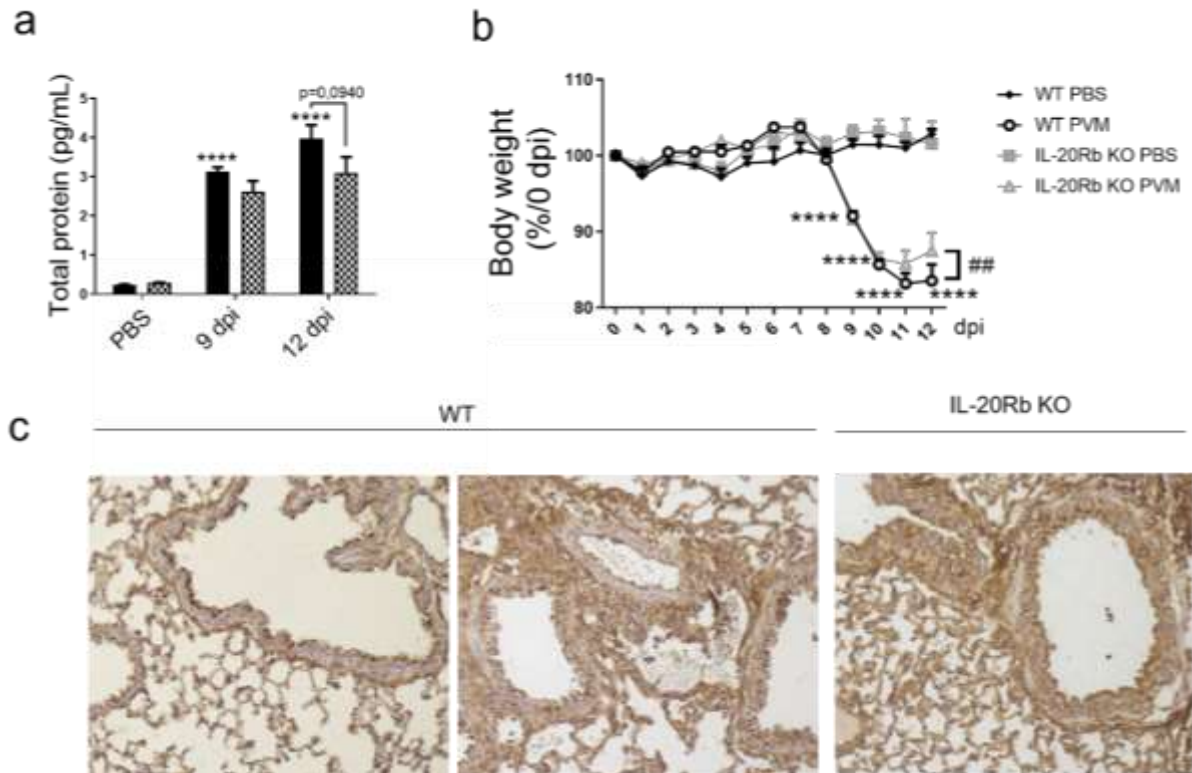


Figure 18 : L'infection par le PVM module la perméabilité pulmonaire et l'expression d'E-cadhérine (a) La perméabilité pulmonaire a été évaluée par la quantification des protéines totales présentes dans les LBA (pg/mL). (b) Suivi du poids exprimé en pourcentage par rapport au jour 0 (c) l'expression d'E-cadhérine a été évaluée sur des sections pulmonaires par immunohistochimie chez des souris CS WT (Barres noires) et CS IL-20Rb KO (Barres quadrillées). Les données sont représentées en moyenne \pm SEM. **** $P < .0001$ correspond à l'effet significative du virus (PVM vs PBS) et ## $p < 0.01$ correspond à un effet significatif de l'IL-20Rb KO (IL-20Rb KO vs. WT).

Discussion

Une exacerbation est un événement marquant chez le patient BPCO puisqu'elle initie le déclin rapide de la fonction pulmonaire [163]. L'infection par un virus tel que le VRS représente l'un des principaux facteurs responsables d'épisode d'exacerbation de la BPCO [215]. En raison des conséquences de l'infection sur la progression de la maladie [213], il est essentiel d'établir le mécanisme par lequel l'exacerbation induite par le VRS entraîne un déclin de la fonction pulmonaire [253]. Le VRS n'étant pas un pathogène naturel pour la souris, nous avons utilisé le PVM, qui infecte la souris et induit une pathologie très proche de celle induite par le VRS chez l'homme [226] pour étudier le mécanisme impliqué dans l'EA-BPCO. Dans notre modèle imitant la BPCO, l'infection par le PVM a entraîné une plus grande prolifération virale associée à une inflammation accrue et des dommages épithéliaux au niveau pulmonaire. Les médiateurs de la réponse antivirale étaient principalement induits à 9 jours post-infection lorsque la charge virale était maximale dans les poumons, et la

réponse inflammatoire a été observée plus tard à 12 jours. Cette étude est la première qui a examiné l'impact de l'infection à PVM chez des souris chroniquement exposées au CS et démontre un rôle pathogène des cytokines IL-20.

La réponse antivirale et notamment la réponse interféron est nécessaire pour limiter la réplication virale [344]. La BPCO est associée à une diminution de la voie antivirale conduisant à une augmentation de la susceptibilité à l'infection virale [74,78,345,346]. À l'état stable de la pathologie, les patients présentent une diminution d'expression de certains ISG et de l'IFN- β , en particulier dans les stades les plus sévères de la maladie [346,347]. De plus, il a été démontré que l'extrait de fumée de cigarette atténue la réponse à anti-IAV des PBMC humains, en limitant la production d'IFN- β , d'IFN- γ et en diminuant l'expression du détecteur d'ARN viraux : RIG-I [74]. Dans notre modèle murin d'exacerbation de la BPCO par le PVM, et contrairement à l'IAV, nous avons observé une augmentation significative de la réponse antivirale. Cette augmentation de la voie antivirale incluant RIG-I, Rsad-2 et IFN- λ 2/3 était liée à une détection accrue de PVM dans les poumons des souris exposées au CS. Ces observations étaient cohérentes avec d'autres études qui ont démontré une expression accrue d'éléments antiviraux tels que MDA-5, IFN- β , IFN- λ 1 par les cellules épithéliales bronchiques de patients atteints de BPCO et stimulées par le rhinovirus ou le VRS [247,257]. De la même manière que notre modèle, cette augmentation de la réponse antivirale était associée à une augmentation de la charge virale chez les souris exposées au CS [239]. Comme pour le VRS, l'infection par le PVM est associée à une augmentation de l'inflammation pulmonaire, des dommages périvasculaires et bronchiques chez les souris exposées au CS [239]. L'infiltration de cellules immunitaires au cours de l'infection par PVM consiste principalement à un afflux de macrophages, de neutrophiles, de NK, de lymphocytes et de cDC2 [225,348,349] et est associée à une production plus importante d'IFN- γ chez les souris exposées au CS, comme observé dans un modèle murin d'exacerbation par le VRS [239].

Les cytokines IL-20 sont associées à de nombreuses maladies inflammatoires telles que le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde, la BPCO ou les maladies infectieuses [5]. Dans notre étude, l'exposition chronique à la fumée de cigarette et l'infection par le PVM sont capables d'induire l'expression d'IL-19, IL-20 et IL-24 dans les cellules de structure et les cellules inflammatoires du poumon. De même, l'IL-24 est également induite par des virus

tels que l'IAV ou le VIH [338,339]. Dans notre étude, nous avons observé que l'exposition au CS et l'infection virale avaient un effet additif sur l'expression de ces cytokines, un processus que nous avons précédemment rapporté pour l'infection bactérienne à *S. Pneumoniae* [6]. La plupart des recherches réalisées à ce jour se sont concentrées sur l'IL-22 mais les cytokines IL-20 peuvent induire le recrutement cellulaire par la production de chimiokines et la modulation de molécules antivirales et de cytokines [5]. La supplémentation en IL-24 est responsable d'une augmentation de l'expression des éléments antiviraux dont *mx α* , *oas*, *ifn- β* dans les cellules épithéliales pulmonaires A549, tandis que son inhibition diminue la réponse interféron et la charge virale [338]. Nous rapportons ici que la déplétion de l'IL-20Rb, au cours de l'infection virale, a réduit la production de *rsad-2* et d'IFN- λ 2/3 chez les souris exposées au CS sans modifier la charge virale. En revanche, chez les souris Air, la charge virale et l'expression de *rsad-2* ont été augmentées. La différence pourrait être liée à la conjonction de différents facteurs ayant des effets opposés chez les souris exposées au CS. En effet, l'exposition au CS modifie la réponse antivirale et active la voie IL-20 conduisant à la régulation positive des cytokines IL-20 et des sous-unités des récepteurs des cytokines IL-20, à savoir IL-20Ra et IL-20Rb chez les souris infectées. Ces données suggèrent que le rôle des cytokines IL-20 sur la réponse anti-virale dépend du type de virus et probablement du degré d'activation de la voie IL-20. Cette convergence pourrait également expliquer que la déplétion en IL-20Rb a réduit l'inflammation pulmonaire et les lésions épithéliales chez les souris exposées au CS alors qu'elle n'a diminué que les lésions épithéliales chez les souris Air. Chez les souris exposées au CS, l'effet sur l'inflammation était lié à une diminution du nombre de cellules inflammatoires dans le BAL sans modification de leur répartition. Cela suggère que les cytokines IL-20 affectent un facteur majeur impliqué dans le recrutement des leucocytes plutôt qu'un composant spécifique responsable de la mobilisation du sous-type de leucocytes.

Les souris IL-20Rb KO exposée au CS présentent de meilleurs signes cliniques en réponse au PVM. Nous avons précédemment démontré que le blocage de la voie IL-20Rb favorise la clairance bactérienne [6]. Fait intéressant, cet effet est associé à un score histopathologique plus faible incluant une diminution de l'inflammation et du remodelage des voies respiratoires. Dans ce modèle, l'impact sur l'infection à PVM est probablement lié à la diminution de l'altération de l'épithélium respiratoire associée à une meilleure

préservation de l'expression de la jonction intercellulaire et de la perméabilité pulmonaire. Étant donné que ce paramètre est identifié comme un marqueur de gravité, ces données suggèrent que le blocage de la voie IL-20 peut améliorer l'issue de cette maladie. À ce stade, nous pouvons formuler deux hypothèses pour expliquer ce rôle des cytokines IL-20 : 1) ces cytokines participent aux lésions induites par le virus dans les cellules épithéliales pulmonaires. Nous avons réalisé quelques expériences *in vitro* qui n'ont pas permis de montrer un effet direct de la supplémentation en cytokines IL-20 sur la réponse *in vitro* des AEC en termes de cytotoxicité et de réponse antivirale ; 2) nos données suggèrent également que l'expression des cytokines IL-20 pourrait être associée à une perte de la fonction de barrière épithéliale. En effet, Hsu et al, ont démontré que le traitement par l'IL-20 recombinante diminuait l'expression de la E-cadhérine dans les cellules épithéliales de la prostate [289]. Cependant, des expériences supplémentaires sont nécessaires afin d'analyser la perméabilité épithéliale dans un modèle interface air-liquide après infection virale et traitement par des cytokines recombinantes ou anticorps bloquant les IL-20. De plus, il a été montré qu'un certain polymorphisme des gènes IL-19 et IL-20 pouvait aggraver l'évolution de l'hépatite B chronique [10] et du choc septique [350]. Par conséquent, le ciblage de ces cytokines et/ou de leurs récepteurs pourrait représenter une bonne approche pour traiter la BPCO et certaines maladies infectieuses. Nous devons donc mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux effets bénéfiques du traitement utilisant l'anticorps anti-IL-20Rb sur les lésions tissulaires, et vérifier si l'anticorps anti-IL-20Rb pourrait limiter les infections virales pulmonaires par le VRS mais également avec le virus de la grippe A qui est un autre virus fréquemment retrouvé chez les patients en exacerbation.

En conclusion, nous avons rapporté pour la première fois que l'infection à PVM exacerbait l'inflammation induite par le CS et que l'infection par PVM a modulé la voie des IL-20. Notre modèle, imitant l'exacerbation virale de la BPCO, a permis d'identifier la voie des cytokines IL-20 comme cible thérapeutique potentielle.

Chapitre 2 : Anticorps spécifiques de l'IL-20Rb et utilisation pour le traitement de l'exacerbation aiguë de la Bronchopneumopathie chronique obstructive

Antibodies specific for il20-rb and uses thereof for the treatment of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (**Annexe 2**)

Brevet : EP19306068.8

Domaine de l'invention : La présente invention concerne le domaine de la médecine et plus particulièrement l'immunologie

Contexte de l'invention :

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une cause majeure de morbidité et mortalité dans le monde. D'après les données de l'OMS, elle est passée en 3^{ème} position des causes de mortalité dans le monde en 2020. La BPCO est une maladie pulmonaire chronique caractérisée par une limitation progressive et irréversible du débit d'air. Le tabagisme est le principal facteur de risque pour le développement la pathologie. L'exposition chronique à la fumée de cigarette (CS) déclenche des processus inflammatoires qui finissent par altérer la barrière pulmonaire et réduisent les mécanismes de défense immunitaire, entraînant une susceptibilité accrue aux infections respiratoires. De telles infections altèrent davantage l'état clinique des patients, provoquant indirectement une morbidité et une mortalité importantes. L'exacerbation aiguë de la BPCO (EA-BPCO) est associée à un déclin inexorable de la fonction pulmonaire, un œdème accru ainsi qu'une inflammation pulmonaire et systémique. Les infections bactériennes par *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* sont la principale cause d'EA-BPCO [178,179]. L'issue de l'infection est étroitement liée à l'efficacité de la réponse antibactérienne de l'hôte. Parmi les facteurs orchestrant la réponse antibactérienne, les cytokines Th17, dont l'interleukine (IL)-17 et l'IL-22, jouent un rôle majeur dans la clairance de *S. pneumoniae* en modulant la sécrétion de peptides antimicrobiens et le recrutement de cellules effectrices [4,124,211]. Ces cytokines maintiennent également l'homéostasie pulmonaire en limitant les lésions

tissulaires, ce processus étant essentiel pour éviter l'invasion bactérienne secondaire [259,260,263]. L'IL-22 avec l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24 et l'IL-26 appartiennent à la sous-famille de cytokines IL-20. L'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24 se lient toutes au récepteur IL-20 de type I (IL-20R), un récepteur hétérodimérique composé des chaînes IL-20Ra et IL-20Rb [5]. De plus, IL-20 et IL-24 se lient également au récepteur de type II, qui est composé des sous-unités IL-22-Ra et IL-20Rb. La sous-unité IL-20Rb étant commune aux deux types de récepteurs, le blocage par anticorps bloquant cette sous-unité peut efficacement neutraliser cette voie. Les récepteurs des cytokines IL-20 sont particulièrement exprimés sur les cellules épithéliales et les phagocytes mononucléés, mais aussi sur les neutrophiles activés et certains lymphocytes [5,7].

Le rôle des cytokines IL-20 est controversé et a montré des effets « anti-inflammatoires » notamment dans le maintien de l'homéostasie du tissu cutané et dans la cicatrisation. Cependant, Myles et al. ont démontré qu'elles favorisent l'infection cutanée à *Staphylococcus aureus* chez la souris diminuant la production d'IL-17 et d'IL-22 [7]. Des données antérieures ont démontré que les cytokines IL-20 sont induites lors de l'infection pulmonaire par le *S. pneumoniae* [6]. Les données du laboratoire démontrent que l'exposition au CS entraîne également une augmentation de l'expression des ARNm d'IL-19 et de d'IL-20 dans les poumons des souris et que l'infection bactérienne par *S. pneumoniae* potentialise l'expression de ces cytokines dans ce contexte. De plus, dans un modèle expérimental murin de BPCO développé par une exposition chronique à la fumée de cigarette (CS) [342], il a été montré qu'une susceptibilité accrue aux agents pathogènes respiratoires était liée à un défaut d'expression d'IL-22 [4,124,260]. À l'inverse, ces animaux, exposés au CS, présentaient une expression accrue d'IL-19, IL-20 et IL-24 en réponse à *S. pneumoniae* ou NTHi comparativement aux souris exposées à l'air ambiant. Le traitement par anticorps bloquant la sous-unité IL-20Rb (anticorps anti-IL-20Rb) a facilité la clairance bactérienne chez les souris témoins infectées par *S. pneumoniae* [6] et a diminué l'incidence de l'infection bactérienne chez les souris, en diminuant la charge bactérienne et l'infiltrat inflammatoire (WO2016083304). Il y a donc un intérêt à générer des anticorps monoclonaux spécifiques de l'IL-20Rb ayant une activité neutralisante pour leur utilisation dans le traitement de l'AE-BPCO.

Résultats :

Le clone B7, anticorps anti-IL-20Rb humanisé, reconnaît de manière spécifique la cible d'intérêt :

Afin de développer un outil thérapeutique pour l'AE-BPCO, des clones de l'anticorps neutralisant humanisé anti-IL-20Rb ont été sélectionnés en utilisant une approche de présentation sur phage. Les clones ont été sélectionnés en fonction de leur affinité spécifique avec la sous-unité IL-20Rb et comparés avec l'anti-IL-20Rb commerciale (20RNTC). Pour cela, des analyses ELISA ont été effectuées en utilisant de l'IL-20Rb humain recombinant. Parmi les clones testés, 5 ont été testés sur la base de leur capacité d'inhibition in vitro de la fonction biologique sur les cellules épithéliales des voies respiratoires et les cellules dendritiques (qui exprimaient l'IL-20R) et ne reconnaissaient pas les sous-unités IL-20Ra et IL-22Ra1. De manière intéressante, le clone B7 était le seul qui possédait une activité neutralisante du récepteur et réactivité croisée avec les formes humaine et murine de l'IL-20Rb. Ainsi, l'analyse d'affinité montre que le clone B7 natif possède une affinité spécifique similaire à l'anti-IL-20Rb commerciale (20RNTC) (Figure 19). La mutation de B7 (mutation N297A), affectant la glycosylation, augmente grandement la reconnaissance du clone vis-à-vis de la sous-unité d'intérêt.

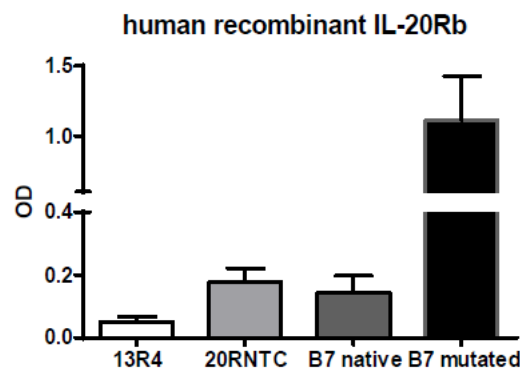


Figure 19 : Liaison de l'anticorps anti-IL-20Rb recombinant (B7 natifs et B7 mutés) produit sous forme d'IgG2a murin à l'IL-20Rb humain recombinant

La liaison de l'anticorps est comparée par rapport à l'anticorps monoclonal de rat anti-IL-20Rb (clone 20RNTC). La protéine recombinante IL-20Rb (1µg/mL) est fixée à la plaque (maxisorb Nunc) et incubée une nuit à 4°C. Après saturation en PBS 10% sérum de veau foetal (SVF) pendant 1h, les anticorps ont été ajoutés à une concentration de 1 µg/ml pendant 2h. Après les lavages, la liaison de l'anticorps a été détectée par addition d'un IgG anti-souris biotinylé puis avec de la streptavidine-HRP (Thermoscientific). La réaction est révélée par l'ajout du substrat TMB et la densité optique a été lue à 495 nm. Les résultats ont été exprimés en moyenne ± SEM de la densité optique. 13R4 : Isotype contrôle, 20RNTC : Anti-IL-20Rb commerciale, B7 natif : Anti-IL-20Rb

L'affinité spécifique du clone B7 a également été confirmée grâce à des expériences de compétition. Pour cela, des cellules dendritiques exprimant l'IL-20Rb, ont été pré-incubées avec le B7 natif ou le 20RNTC à différentes concentrations puis les cellules ont été mises en contact avec l'anticorps B7 ou le 20RNTC marqué par un fluorochrome afin de déterminer le niveau de fixation sur les cellules. Comme attendu, la pré-incubation des cellules avec l'isotype contrôle n'empêche pas la fixation du B7 ou du 20RNTC (Figure 20A et 20B). En revanche, la pré-incubation des cellules avec le 20RNTC, réduit, de manière dose dépendante, la fixation du B7 marqué (Figure 20A). De la même manière, la pré-incubation cellulaire avec le B7 réduit fortement la fixation du 20RNTC marqué (Figure 20B) et B7 marqué lui-même et ceux même à des doses plus faibles qu'avec l'anticorps commercial.

L'expérience de compétition en ELISA a démontré que l'utilisation du 20RNTC comme compétiteur, ne réduit pas la fixation du B7 ou du B7 muté. A l'inverse, lorsque le B7 ou le B7 muté sont utilisés comme agent compétitif, ils réduisent fortement la fixation de l'anti-IL-20Rb commercial (20RNTC) (Figure 21).

Ensemble, ces données montrent que les clones B7 natif et B7 muté reconnaissent de manière spécifique la cible d'intérêt (la sous-unité IL-20Rb) et sont des candidats potentiels dans l'inhibition des fonctions de cytokines IL-20.

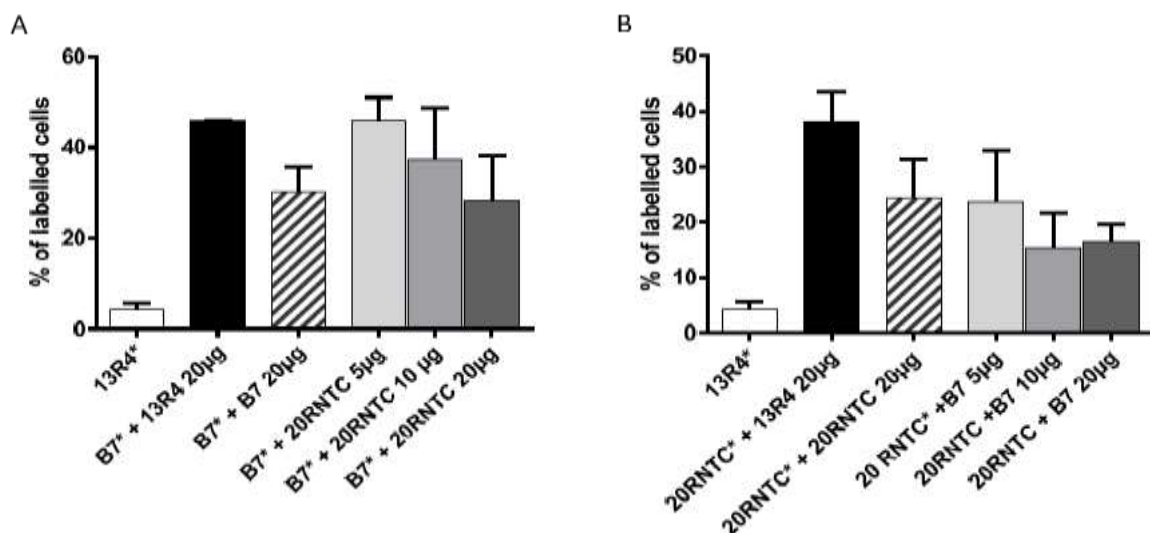


Figure 20 : Compétition entre les deux anticorps anti-IL-20Rb : Notre anticorps humain anti-IL-20Rb (B7 natif) et l'anticorps monoclonal de rat anti-IL-20Rb (clone 20RNTC)

Les deux anticorps sont marqués avec un fluorochrome (APC, B7* et 20RNTC*) ainsi que l'isotype contrôle (Clone 13R4*). La liaison du B7* (A) et du 20RNTC* (B) (5 µg/ml) a été évaluée sur des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) en présence d'anticorps non marqués (soit B7, 20RNTC et le contrôle 13R4) à différentes concentrations (5, 10 et 20 µg/ml). Les résultats sont représentés en pourcentage de cellules positives sur la base du contrôle isotypique (13R4) et sont exprimés en moyenne ± SEM (2 expériences indépendantes).

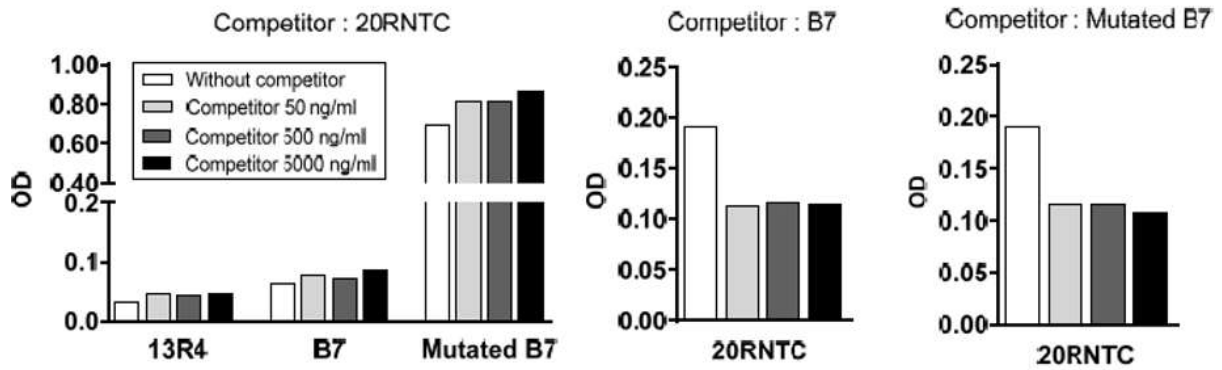


Figure 21 : Compétition entre les anticorps anti-IL-20Rb : Notre anticorps humain anti-IL-20Rb (B7), l'anticorps muté (B7 muté) et l'anticorps monoclonal de rat anti-IL-20Rb (clone 20RNTC)

Les plaques ELISA ont été recouvertes d'IL-20Rb recombinant (1 ug/ml). La liaison de chaque anticorps a été évaluée en présence ou non d'un compétiteur à différentes concentrations (50, 500 et 5000 ng/ml). La liaison des anticorps B7, B7 muté et 20RNTC a été détectée avec un anti-souris biotinylé ou un anticorps IgG anti-rat, respectivement. Cette liaison a été révélée par l'ajout de HRP conjugué streptavidine suivie de l'ajout du substrat TMB. Les résultats ont été exprimés en densité optique (DO).

Le clone B7 réduit la production de cytokines pro-inflammatoires induite par les cytokines IL-20 :

Pour évaluer l'effet biologique des clones sélectionnés, des cellules épithéliales humaines ont été traitées avec les différents anticorps à tester. Les cellules ont ensuite été stimulées par les cytokines IL-19 ou IL-20 et la production de CXCL1 a été dosée dans les surnageants de culture. Dans ce contexte, le traitement par le 20RNTC a réduit d'environ 50 % la production de CXCL1 par les cellules épithéliales comparativement aux cellules traitées par l'isotype contrôle. Le clone B7 atteint des niveaux d'inhibition plus importants pouvant atteindre 125 % (Figure 22). Sur des cellules épithéliales primaires murines, le traitement par le 20RNTC et le B7 réduisent la production de la cytokine IL-6 en réponse à l'IL-19 alors que le clone D6.2 (autre clone humain sélectionné pour reconnaître l'hIL20-Rb) n'empêche pas la production de cette cytokine (Figure 23). En revanche, le traitement par ces différents clones n'a que très peu d'effet sur la production de CXCL1 en réponse à l'IL-20 par les cellules épithéliales murines.

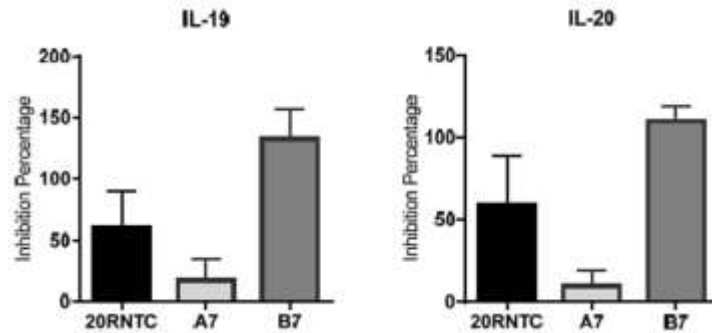


Figure 22 : Capacité des anticorps anti-IL-20Rb dont le 20RNTC, l'A7 et les clones B7 dans l'inhibition de la réponse aux cytokines IL-20 sur l'épithélium des voies respiratoires humaines (la lignée cellulaire BEAS-2B)
 Les cellules BEAS-2B ont été cultivées jusqu'à confluence complète milieu de culture de cellules épithéliales des voies aériennes (Promo-Cell) en plaque 24 puits (Thermo-Scientific). Après 1 nuit en milieu de carence, les cellules confluentes BEAS-2B ont été pré-incubées avec les différents anticorps (5 µg/ml) puis stimulées par l'IL-19 ou IL-20 (BioTechne, 20 ng/ml). La production de CXCL1 a été évaluée par ELISA dans les surnageants de culture collectés 24 h après la stimulation cytokinique (BioTechne, UK). Les résultats ont été exprimés en un pourcentage d'inhibition où 0 % correspond aux cellules pré-incubées avec l'isotype contrôle (13R4) et 100 % d'inhibition correspond au niveau de CXCL1 dans les cellules non stimulées. Les résultats ont été exprimés en moyenne ± SEM (n=3)

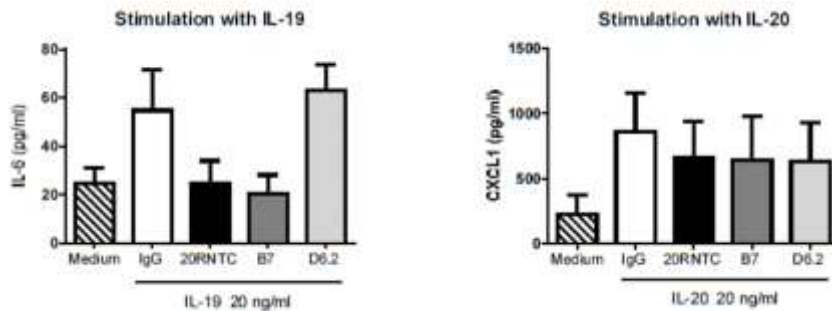


Figure 23 : Capacité des anticorps anti-IL-20Rb dont le 20RNTC, l'A7 et les clones B7 pour inhiber la réponse aux cytokines IL-20 sur des cellules épithéliales primaires issues de trachée de souris
 Après digestion enzymatique de la trachée à la pronase (1,6 mg/ml) pendant 1 heure, les cellules épithéliales trachéales ont été cultivées en plaque 24 puits (thermo-scientifique) jusqu'à confluence en milieu DMEM-F12 (Promo-Cell) supplémenté avec 2 % d'Ultrosor G (Pall Lab.) et des antibiotiques. Après une nuit de carence (milieu sans Ultrosor G), les cellules épithéliales trachéales confluentes ont été pré-incubées avec les différents anticorps (un isotype contrôle (IgG) et les anticorps anti-IL-20Rb : nos clones B7 et D6.2 et le 20RNTC (5 µg/ml)) avant stimulation par l'IL-19 ou l'IL-20 (BioTechne, 20 ng/ml). La production d'IL-6 et de CXCL1 a été évaluée par ELISA dans les surnageants cellulaires collectés après 24 h d'incubation (BioTechne, Royaume-Uni). Les résultats ont été exprimés en moyenne ± SEM (n=3).

Le traitement par l'anticorps anti-IL-20Rb réduit les infections bactériennes et l'inflammation chez des souris chroniquement exposées à la fumée de cigarette :

L'effet du traitement anti-IL-20Rb sur la réponse antibactérienne a également été évalué *in vivo* dans un modèle murin d'exposition chronique à la fumée de cigarette dont les souris ont été infectées avec du *S. pneumoniae*. Les traitements par le 20RNTC et par le clone B7 réduisent tous deux la charge bactérienne pulmonaire et systémique (Figure 24). Cette diminution de l'expansion bactérienne est associée à une réduction de l'inflammation pulmonaire liée à une diminution du recrutement cellulaire dans les lavages broncho-alvéolaires et dans les poumons (Figure 25A) chez les souris traitées avec les anticorps anti-IL-20Rb. Plus précisément, une diminution du recrutement des neutrophiles (Figure 25B), cellules particulièrement impliquées dans la pathogenèse de la BPCO, a été observée chez les souris traitées avec le 20RNTC ou le clone B7.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que le clone B7 possède des fonctions biologiques similaires à celles observées avec l'anti-IL-20RB commerciale (20RNTC).

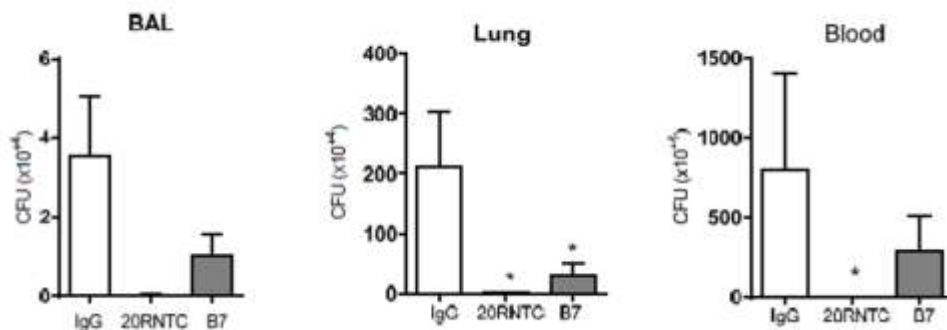


Figure 24 : Effet du traitement par les différents anticorps anti-IL-20Rb en comparaison avec un contrôle isotypique (IgG) sur l'infection par *Streptococcus pneumoniae* chez des souris exposées de façon chronique à la fumée de cigarette.

Les souris ont été exposées à la fumée de cigarette pendant 12 semaines (5 cigarettes/jour, 5 jours/semaine). A la fin du protocole d'exposition, les souris ont été traitées par administration intrapéritonéale de 100 µg/souris d'anticorps (isotype contrôle, 20RNTC, ou B7) un jour avant et un jour après l'infection par *Streptococcus pneumoniae* (sérotype 1, injection intranasale de 4×10^5 CFU). La charge bactérienne a été évaluée au pic de l'infection (jour 3) dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA), le tissu pulmonaire et le sang. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SEM des CFU par ml ($n = 8$ à 10 souris par groupe).

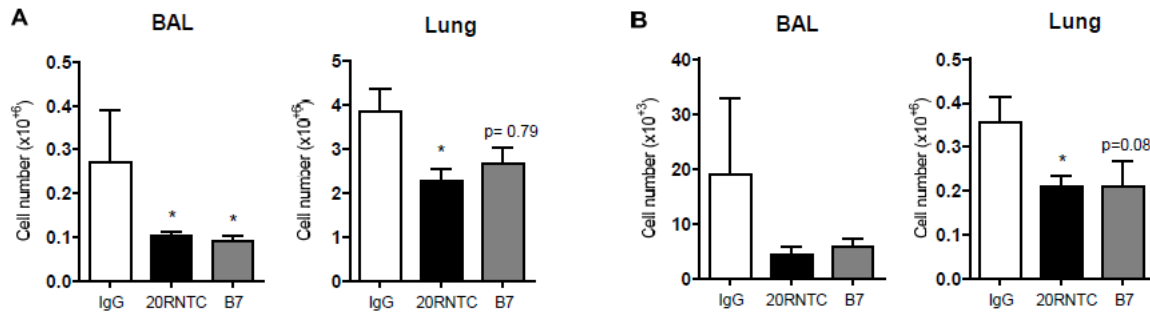


Figure 25 : Effet du traitement par les anticorps anti-IL-20Rb (20RNTC, B7 natif en comparaison avec un contrôle isotypique (IgG) sur le recrutement de cellules inflammatoires lors d'une infection par *Streptococcus pneumoniae* chez la souris exposée de façon chronique

Les souris ont été exposées à la fumée de cigarette pendant 12 semaines (5 cigarettes/jour, 5 jours/semaine). À la fin du protocole d'exposition, les souris ont été traitées par administration intrapéritonéale de 100 µg/souris d'anticorps (isotype contrôle, 20RNTC, ou B7) un jour avant et un jour après l'infection par *Streptococcus pneumoniae* (sérotypage 1, injection intranasale de 4×10^5 CFU). Le nombre total de cellules (A) et le nombre de neutrophiles (B) (identifiés comme CD45+, CD11b^{high} et Ly6G^{high}) ont été évalués au pic d'infection (jour 3) dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) et le tissu pulmonaire (obtenu après digestion enzymatique à la collagénase). Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SEM (n = 8 à 10 souris par groupe).

Conclusion :

Les tests réalisés sur la sélection des différents clones d'anti-IL-20Rb ont démontré que le clone B7 et B7 muté avait une affinité spécifique avec l'IL-20Rb comparable voire supérieure à celle observée avec l'anticorps commercial 20RNTC. La liaison du clone B7 sur l'IL-20Rb conduit à une forte inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales humaines et murines en réponse à la stimulation par l'IL-19 ou par l'IL-20. De manière similaire au 20RNTC, le blocage de la sous-unité IL-20Rb du récepteur par le B7 réduit fortement l'expansion bactérienne pulmonaire et systémique. Cette diminution de l'infection bactérienne est associée à une réduction du nombre total de cellules et du recrutement de neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires et les poumons. Ces données démontrent le potentiel thérapeutique du traitement par l'anticorps B7, produit dans le cadre de ce brevet, sur les infections bactériennes associées à la BPCO.

Chapitre 3 : Rôle des cytokines IL-20 dans les surinfections post-grippales au cours de la BPCO

Introduction :

Il est maintenant bien établi que les infections virales facilitent la colonisation et les infections bactériennes secondaires. Cela a été particulièrement documenté pour la grippe où une grande partie des décès liés à ce virus sont dus à des surinfections bactériennes notamment chez les patients BPCO [78,351]. De manière intéressante, l'infection expérimentale par un rhinovirus de patients BPCO modérés entraîne une inflammation beaucoup plus importante que chez les sujets sains [256–258]. Cette réaction conduit à une modification importante du microbiote pulmonaire entraînant l'expansion de la charge bactérienne globale et l'émergence d'une colonisation par *H. influenza* chez les patient BPCO [258]. Bien que les mécanismes conduisant à ce développement bactérien ne soient pas élucidés, ces données montrent que les infections virales altèrent les défenses antibactériennes plus spécifiquement chez les patients BPCO.

Des travaux récents montrent que l'infection virale entraîne un déficit immunitaire permettant le développement bactérien au travers d'un défaut de réponse IL-17 et IL-22 [4,124,259,260]. L'IL-22 avec l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24 et l'IL-26 appartiennent à la sous-famille des cytokines IL-20. Les récepteurs des IL-20 sont fortement exprimés sur les cellules épithéliales des voies aériennes (AEC) [6]. Le blocage de la sous-unité IL-20Rb commune aux récepteurs de l'IL-19, IL-20 et IL-24, peut neutraliser efficacement la réponse aux cytokines IL-20 (IL-19, IL-20 et IL-24) [6] et limiter les infections bactériennes cutanées et pulmonaires [6,7]. Ainsi, nous souhaitons évaluer l'impact d'un traitement par anticorps bloquant les récepteurs aux IL-20 sur la survenue des surinfections post-grippales dans un contexte de BPCO.

Matériels et méthodes :

Animaux et modèle d'induction de la BPCO :

Toutes les expérimentations ont été réalisées en appliquant les réglementations européennes sur l'expérimentation animale en vigueur. Les animaux sont hébergés dans une installation agréée dont la température (20-24 °C), l'hygrométrie (45 %-65 %) et le cycle jour/nuit (12 h) sont contrôlés. Les souris ont accès à de la nourriture et de l'eau fournies à volonté. Tous les travaux utilisant les animaux sont conformes aux directives du comité de protection et d'utilisation des animaux du Nord-Pas-de-Calais (agrément n° AF 16/20,090).

Le modèle murin de BPCO a été établi selon le modèle décrit par Pichavant et al [342]. En résumé, des souris C57BL/6 mâles ou femelles âgées de 6-8 semaines de type sauvage (WT) (Janvier Animalerie SOPF, Le Genest-St.-Isle, France) ont été utilisées.

Ces souris ont été exposées à la fumée de 5 cigarettes (1R6F, Université de Kentucky) par jour, 5 jours par semaine pendant 12 semaines (Système d'exposition InExpose, Emka, Scireq, Montreal, QC, Canada). Au bout de ces 12 semaines les souris présentent des altérations de la fonction pulmonaire associées à une inflammation.

Modèle animal de surinfection post-grippale dans un contexte de BPCO :

Au terme de l'exposition, les souris sont, dans un premier temps, exposées, par voie intranasale (i.n 50 µL) et après anesthésie, (i.p 150 µL de solution contenant de la xylazine (2 mg/ml, Bayer Santé) et de la kétamine (10 mg/ml, Merial) en PBS) à une dose sub létale de virus H1N1 (250 PFU) en PBS. Les souris contrôles ont reçu 50 µL de PBS. 7 jours après l'infection virale, les souris sont à nouveau anesthésiées afin de les infecter par voie intranasale avec 1000 CFU de la bactérie *Streptococcus pneumoniae* (Collaboration François Trottein).

Traitement par anticorps bloquant l'IL-20Rb :

Le traitement par anticorps anti-IL20Rb (Clone B7) (brevet # EP19306068.8) est administré par voie intra-péritonéale (i.p) à hauteur de 100µg/souris toutes les 48 heures.

Les souris contrôles sont administrées avec l'isotype contrôle 13R4 (100 µg/souris). Les traitements ont été réalisés 4, 6 et 8 jours après l'infection virale.

Culture des cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B

Les cellules épithéliales bronchiques humaines (Beas 2B, ATCC® CRL-9606™) sont cultivées sur une matrice de collagène G en milieu Airway Epithelial Cell basal medium enrichi (BEC+) (PromoCell) contenant 1% d'antibiotique pénicilline et streptomycine. Lorsque les cellules sont confluentes, les cellules sont mises en milieu appauvri (BEC-) avant toute expérience.

Exposition au CSE des cellules BEAS 2B

L'extrait de fumée de cigarette (CSE) est préparé en faisant buller, à l'aide d'une seringue 50 mL, l'équivalent de la fumée de deux cigarettes dans 10 mL de milieu de culture. Celui-ci est ensuite filtré (Filtre 20 µm) avant la mise en contact avec les cultures cellulaires. Les cellules sont mises en contact avec du CSE dilué au 100^{ème}.

Modèle *in vitro* de surinfection bactérienne

Les cultures cellulaires sont, dans un premier temps, mises en contact avec le virus H3N2 (MOI 0,5) pendant 1 h. Les surnageants de culture sont ensuite retirés et remplacés par du milieu BEC- sans virus. Les cellules sont ensuite incubées 24 h à 37°C et 5% CO₂ avant d'être infectées avec la bactérie NTHI (MOI 10). La croissance bactérienne est stoppée après 1 h d'incubation à 37°C et 5% CO₂, par l'ajout d'antibiotiques pénicilline et streptomycine 1%. Les cellules sont récupérées en NucléoZOL (Macherey Nagel) afin d'en extraire les ARN et réaliser les analyses d'expression de gènes.

Préparation du stock de bactérie :

La bactérie *Streptococcus pneumoniae* (S.p) est cultivée en milieu TH-YE (Todd-Hewitt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) + 2 % SVF. Les bactéries sont mises en culture à 37 °C jusqu'à leur phase exponentielle de croissance. La croissance bactérienne est suivie grâce à la lecture de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 620 nm. La prolifération est stoppée lorsque la DO a atteint 0,5 pour la bactérie S.p et 0,7 pour la bactérie *NTHI*. Les bactéries sont ensuite conservées dans leur milieu de culture respectif contenant 10 % de glycérol et congelé à -80 °C.

Collecte et traitement des échantillons :

Les souris ont été euthanasiées 1 ou 3 jours après l'infection bactérienne. Les fluides de lavage bronchoalvéolaires (LBA), les poumons, la rate et les échantillons de sang ont été collectés et conservés sur de la glace jusqu'au traitement ou congelés immédiatement dans de l'azote liquide. Les LBA ont été réalisés en instillant cinq fois 0,5 ml (volume final 2,5 ml) de PBS stérile. Après centrifugation à 400 g pendant 6 min à 4 °C, le surnageant (liquide BAL sans cellules) a été conservé à -20 °C pour l'analyse des cytokines (ELISA) et le culot cellulaire a été utilisé pour l'analyse en cytométrie en flux.

Le lobe gauche du poumon a été écrasé avec une lame stérile puis digéré avec de la collagénase (Collagénase Type VI 17104-019 Gibco par Life technologies) à 37 °C. Après 15 min de digestion, les poumons ont été homogénéisés avec une aiguille 18G et encore digérés pendant 15 min. Après centrifugation à 400 g 6 min à 4 °C, les culots ont été remis en suspension dans une solution de Percoll à 30 % (Percoll TM GE Healthcare 17-0891-01) et centrifugés à 500 g pendant 15 min. Les cellules spléniques totales ont également été isolées de la rate broyée et centrifugées à 400 g pendant 6 min à 4 °C. Les culots de poumon et de rate ont été remis en suspension dans un tampon de lyse des globules rouges (RBC) pendant 5 min à température ambiante, pour éliminer les érythrocytes. La réaction de lyse des globules rouges a été arrêtée avec du PBS à 2 % SVF (sérum de veau fœtal, Gibco). Après centrifugation à 400 g pendant 6 minutes à 4 °C, les cellules pulmonaires et spléniques ont été remises en suspension dans du PBS 2 % SVF, puis dénombrées et utilisées pour la cytométrie en flux.

Evaluation de la charge bactérienne :

La charge bactérienne dans les LBA, les poumons et le sang a été déterminée par l'étalement des échantillons sur gélose chocolat (Biomérieux). Les CFU ont été énumérées après 24h d'incubation à 37 °C, 5 % CO₂.

Cytométrie en flux :

Différents types cellulaires présents dans les LBA, les poumons et la rate ont été analysés par cytométrie en flux (LSR Fortessa, BD Biosciences) après incubation de 30 minutes en PBS 2 % SVF avec les anticorps suivants : CD5 (ref130-102-574, conjugué au FITC), Tetramer CD1d (installation NIH, conjugué au PE), NK1.1 (ref 130-103-963, conjugué au PerCp-Cy5.5), CD4 (ref 130-102-411, conjugué au PE-Cy7), CD25 (ref 130-102-550, conjugué à l'APC), CD69 (ref 561,238, conjugué à l'Alexa700), TCR $\gamma\delta$ (ref 130-104-016, conjugué à l'APC-Vio770), TCR- β (ref 130-104-815, conjugué au V450), CD8 (ref 130-109-252, conjugué au V500), CD45 (ref BLE103140, conjugué au BV605) (BD Bio-sciences , Biolegend et Myltenyi Biotech), I-Ab (réf 130-102-168, conjugué au FITC), F4/80 (réf 130-102-422, conjugué au PE), CD103 (réf 563 637, conjugué au PerCP-Cy5.5), CD11c (ref 558 079, conjugué au PE Cy7), CD86 (ref 560,581, conjugué à l'Alexa-700), Ly6G (ref 560 600, conjugué à l'APC-H7), CD11b (ref 560 455, conjugué au V450), CD45 (ref 130-402 -512, conjugué au V500), Ly6C (ref BLE128036, conjugué au BV605) (BD Biosciences, Biolegend et Myltenyi Biotech) et CCR2 (ref FAB 5538A, R&D systems, conjugué à l'APC). Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo™ v7.6.5 (Stanford, CA, USA). Les nombres absolus de cellules ont été calculés en fonction du nombre total de cellules et de la fréquence des cellules immunitaires CD45+. La stratégie de gating a déjà été décrite [4,211].

Histologie pulmonaire :

Pour l'analyse histopathologique, le lobe postérieur du poumon a été fixé avec du paraformaldehyde (PFA 4%). Les poumons ont été inclus dans de la paraffine et les sections pulmonaires ont été colorées à l'hématoxyline-éosine. Le score histologique a été calculé sur le remodelage et l'inflammation tels que définis dans l'article de Kone et al. [211]. Les lésions

de l'épithélium bronchique ont également été déterminées par l'évaluation de la desquamation cellulaire, des lésions cellulaires et de la dissociation. Le pourcentage d'épithélium altéré a été déterminé en utilisant le logiciel Image J (NIH).

Quantification protéique par ELISA :

Les niveaux protéiques d'IFN- γ et d'IFN- λ 2/3 (R&D) ont été déterminés par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) dans le LBA, les lysats pulmonaires et le sérum de chaque souris en utilisant les recommandations du fabricant.

Expression d'ARN et RT-qPCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) :

L'ARN total a été isolé du poumon de souris en utilisant le réactif NucleoZol (Macherey-nagel) selon les instructions du fabricant. La transcription inverse (RT) a été réalisée avec le kit de transcription inverse d'ADNc (Applied Biosystems) selon les recommandations du fabricant.

L'ADNc a été quantifié par PCR quantitative (QuantStudio 12 K Flex, Applied Biosystems) avec en utilisant le réactif SYBRGreen (eBiosciences) pour tous les gènes à l'exception de la détection de l'IAV (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). Les amorces (Eurofins Genomics) utilisées dans cette étude sont décrites dans le tableau 4. Les résultats sont exprimés en expression relative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculés par rapport à la condition contrôle en utilisant *hprt1* comme gène de référence.

| <i>Gene</i> | Sequences |
|---------------|--|
| <i>hprt1</i> | Sens : 5' TCC TCC TCA GAC CGC TTT T 3' |
| | Antisens : 5' CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC 3' |
| <i>il-19</i> | Sens : 5' TGT GTG CTG CAT GAC CAA CAA 3' |
| | Antisens : 5' GGC AAT GCT GCT GAT TCT CCT 3' |
| <i>il-20</i> | Sens : 5' TCT TGC CTT TGG ACT GTT CTC 3' |
| | Antisens : 5' GTT TGC AGT AAT CAC ACA GCT TC 3' |
| <i>il-24</i> | Sens : 5' AGC ACT GGC CCT TTC TTC AA 3' |
| | Antisens : 5' TGG CAA GAC CCA AAT CGG AA 3' |
| <i>Ifn-β</i> | Sens : 5' TCC ACC AGC AGA CAG TGT TTC T 3' |
| | Antisens : 5' GGT ACC TTT GCA CCC TCC AGT A 3' |
| <i>rsad-2</i> | Sens : 5' TGC TGG CTG AGA ATA GCA TTA GG 3' |
| | Antisens : 5' GCT GAG TGC TGT TCC CAT CT 3' |
| | Sens : 5' AAG ACC AAT CCT GTC ACC TCT GA 3' |
| <i>iav</i> | Antisens : 5' CAA AGC GTC TAC GCT GCA GTC C 3' |
| | Probe : 5' [FAM] TTT GTG TTC ACG CTC ACC GTC CC [TAM] 3' |

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour la qPCR

Analyses statistiques :

Les données sont exprimées en moyenne \pm sem. Les analyses statistiques des variances ont été conçues avec le logiciel prism (GraphPad version 9). La comparaison multiple des données a été réalisée en utilisant une analyse ANOVA à deux voies suivies d'un test Tukey pour déterminer l'effet significatif du virus ou de la surinfection (en comparaison avec les souris PBS) ou d'un test Sidak pour déterminer l'effet de l'exposition à la fumée de cigarette (CS) (en comparaison avec les souris Air) ou l'effet du traitement anti-IL-20Rb (en comparaison avec les souris traitées avec l'isotype contrôle 13R4). Les données sont considérées significatives lorsque la p value (p) est inférieur à 0,05 ($p < 0,05$). Un effet significatif du virus ou de la surinfection est symbolisé par * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Un effet significatif du CS ou du traitement anti-IL-20Rb sont symbolisés par # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ et #### $p < 0.0001$.

Résultats :

L'exposition à la fumée de cigarette module la réponse inflammatoire et antivirale sans impacter la charge bactérienne

Un modèle expérimental de surinfection post-grippale au cours de la BPCO a été établi chez des souris chroniquement exposées à la fumée de cigarette. Tout d'abord, une infection intranasale par la souche H1N1 a été réalisée. Au pic de l'infection virale (à 7 jours après l'infection), une instillation par la bactérie *S. pneumoniae* a été réalisée et l'effet de cette surinfection bactérienne a été analysé 1 et 3 jours après l'infection bactérienne (Figure 26a). Dans ce modèle, la charge bactérienne a été évaluée dans différents compartiments dont les poumons, les LBA et le sang (Figure 26b). Chez les souris Air, aucune colonie de *S.p* n'est détectée dans les compartiments analysés chez les souris uniquement infectées par la bactérie contrairement aux souris exposées au CS où des bactéries sont détectées dans les LBA et les poumons. Lorsque les souris sont préalablement exposées au virus H1N1, l'expansion bactérienne est plus importante à la fois chez les souris Air et chez les souris CS au niveau pulmonaire et systémique. En revanche, aucune différence significative n'est observée entre les souris Air et CS en termes de charge bactérienne.

Nous avons analysé la réponse antivirale dans ce modèle. Comme attendu, la réponse antivirale est induite par l'infection par IAV seul chez les souris Air et cette réponse n'est pas modifiée en condition CS (Figure 26c). Lors de la surinfection, l'expression de *rsad-2* et d'IFN- λ 2/3 sont augmentés alors que l'expression d'IFN- β diminue au niveau pulmonaire chez les souris Air. Chez les souris CS, les expressions de *rsad-2* et d'IFN- λ 2/3 sont réduites alors que celle d'IFN- β augmente. De manière surprenante, alors que la réponse antivirale est augmentée au cours de la surinfection bactérienne, la charge virale détectable dans les poumons est diminuée comparativement aux souris IAV seul. L'analyse du peptide antimicrobien S100A9 montre que la surinfection induit de manière plus importante son expression dans les poumons (Figure 26d) comparativement à *Sp* seul. Cependant, l'exposition au CS ne module pas significativement l'expression de ce peptide antimicrobien. L'expression pulmonaire de *cxc1-1* est induite par l'infection virale et lors de la surinfection bactérienne. De manière intéressante, l'expression de cette chimiokine est significativement augmentée chez les souris CS infectées par le virus H1N1, mais pas lors de la surinfection

bactérienne. L'analyse de l'IFN- γ , dans les lavages broncho-alvéolaires, démontre que l'infection virale et la surinfection bactérienne induisent l'expression de cette cytokine pro-inflammatoire. L'exposition à la fumée de cigarette entraîne une augmentation plus importante d'IFN- γ chez les souris surinfectées 1 jour après l'instillation de *S.p* (Figure 26d).

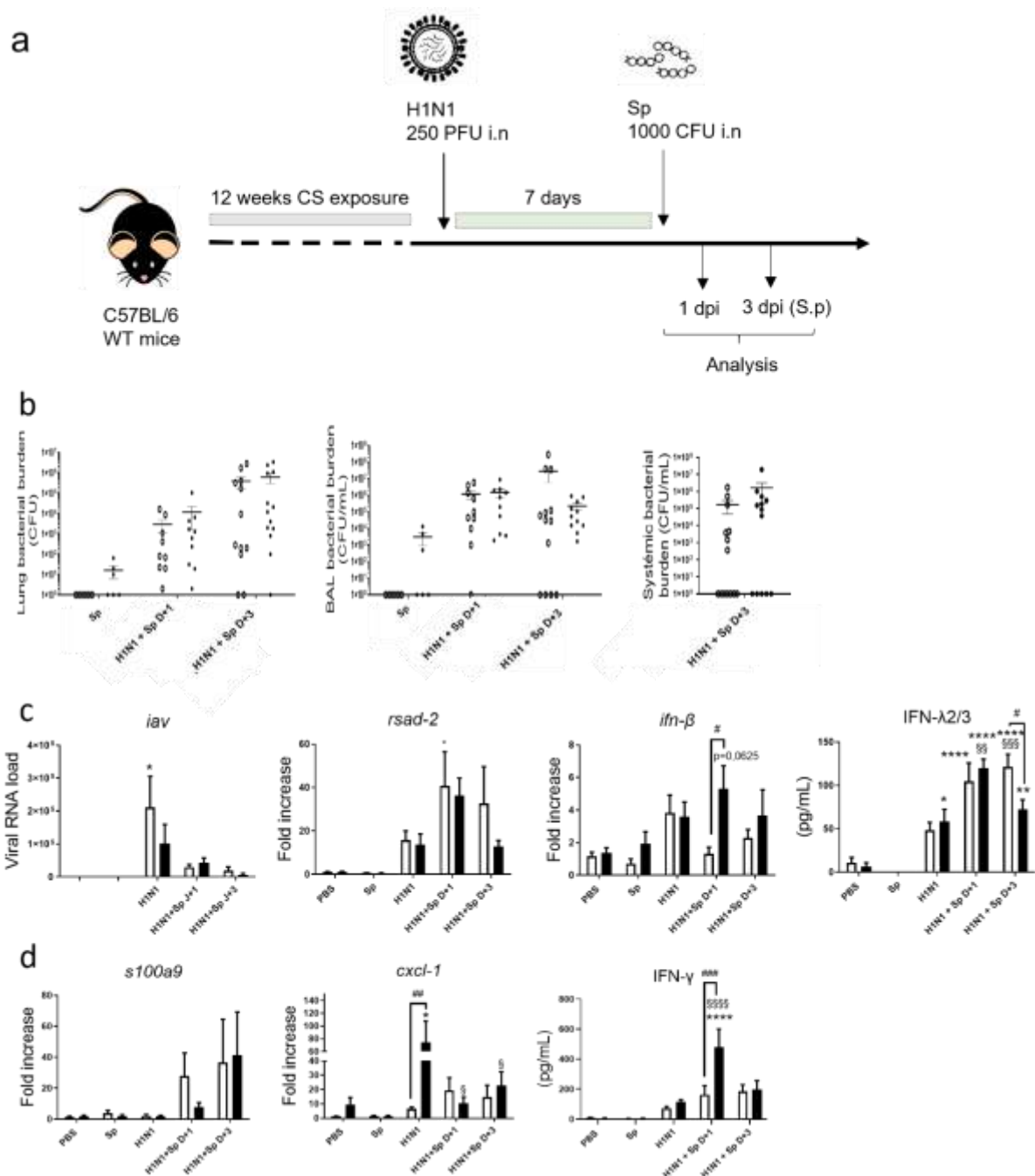


Figure 26 : L'exposition à la fumée de cigarette module la réponse antivirale, l'inflammation sans impacter la charge bactérienne

(a) Protocole expérimental de l'étude : Le jour de l'infection virale définit la fin du protocole d'exposition à la fumée de cigarette (CS), qui a consisté à exposer les souris à l'Air ambiant (Air) ou au CS (5 cigarettes/jour, 5 jours/semaine) pendant 12 semaines. La surinfection bactérienne est induite par instillation intranasale de *S. pneumoniae* 7 jours après l'infection H1N1 et les analyses ont été réalisées 1 et 3 jours après l'infection bactérienne. (b) La charge bactérienne (exprimée en CFU) a été évaluée dans les poumons, LBA et le sang 1 jour et 3 jours après l'infection bactérienne chez les souris Air (blanc) et CS

(noir). (c) La réponse antivirale incluant la détection de l'ARN viral et l'expression de *rsad-2* et *iFN- β* a été évaluée par RT-qPCR dans les tissus pulmonaires. Le niveau d'*IFN- λ 2/3* a été évalué par ELISA dans les LBA (pg/mL). (d) L'expression du peptide antimicrobien *s100a9* et de la cytokine immuno-modulatrice *cxcl-1* a été évaluées par RT-qPCR. La production d'*IFN- γ* a été analysée par ELISA (pg/mL). Les résultats de qPCR sont exprimés en expression relative en comparaison avec les souris Air non infectées. Le gène *hpvt1* a été utilisé comme gène de référence. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les souris Air sont représentées par les barres blanches et les souris CS par des barres noires. * $P < 0.05$ et **** $P < 0.0001$ correspondent à un effet significatif du virus ou de la surinfection bactérienne (H1N1 ou H1N1 + Sp vs. PBS). \$\$ $P < 0.01$, \$\$\$ $P < 0.001$ et \$\$\$\$ $P < 0.0001$ correspondent à un effet significatif du de la surinfection par rapport à l'infection virale seule (H1N1 + Sp vs. H1N1). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ et ### $P < 0.001$ correspondent à un effet significatif du CS (CS vs. Air).

L'analyse de l'inflammation cellulaire démontre que la surinfection bactérienne induit un fort recrutement de cellules dans les poumons des souris Air et CS (Figure 27). La surinfection bactérienne favorise le recrutement de lymphocytes T CD8⁺ et de NK chez les souris Air et CS (Figure 27a). En revanche, les macrophages alvéolaires ne sont pas augmentés dans ce compartiment. L'infection par la souche H1N1 du virus de la grippe induit un fort recrutement cellulaire dans le LBA en particulier chez les souris CS où le recrutement est significativement plus important que chez les souris exposées à l'air. De manière intéressante, ce recrutement cellulaire est significativement diminué au cours de la surinfection bactérienne comparativement aux souris infectées par le virus seul. Lors de la surinfection bactérienne, aucune différence n'est observée entre les souris Air et les souris CS. Le recrutement cellulaire observé au cours de l'infection virale est en partie lié à un afflux de lymphocytes T CD8⁺, de NK et de macrophages alvéolaires en particulier chez les souris exposées à la fumée de cigarette. La diminution du recrutement cellulaire observée dans les LBA est associée à un recrutement moins important de lymphocytes T CD8⁺ et de macrophages alvéolaires, à la fois chez les souris air et chez les souris CS. Les cellules NK sont recrutées lors de l'infection virale et de la surinfection. Les analyses histologiques confirment l'inflammation pulmonaire observée au cours de l'infection virale et de la surinfection (Figure 27b). Cependant, l'exposition à la fumée de cigarette ne semble pas aggraver les dommages tissulaires comme le confirme l'analyse du score histologique et des lésions épithéliales (Fig 27c).

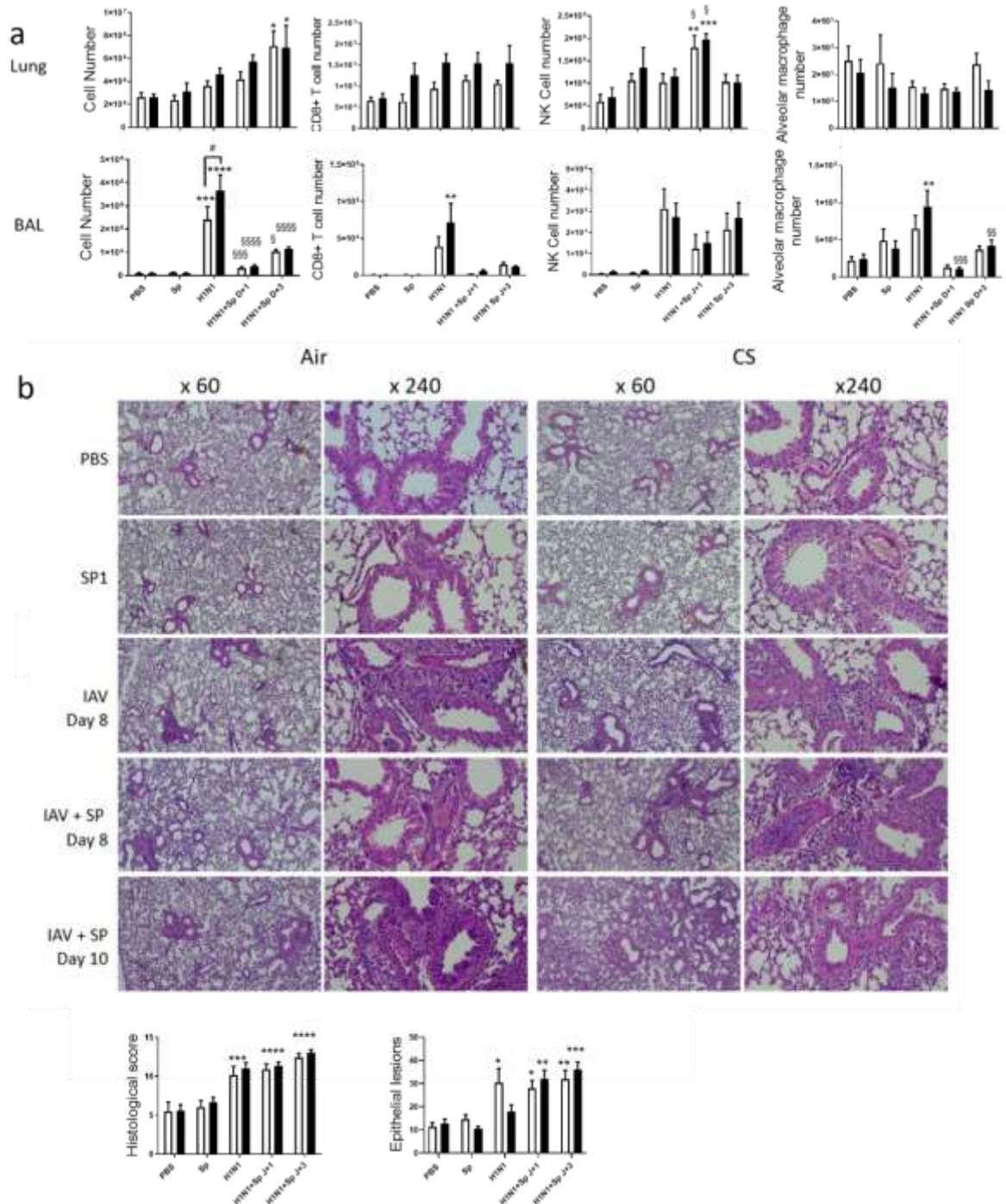


Figure 27 : L'exposition à la fumée de cigarette augmente le recrutement cellulaire dans les LBA lors de l'infection virale mais pas lors de la surinfection bactérienne

Nombre total de cellules, le nombre de lymphocytes T CD8+ CD45+/TCRβ+/ CD8+, de cellules NK CD45+/TCRβ-/NK1.1+, de macrophages alvéolaires CD45+/F4/80+/CD11c+ a été évalué dans les poumons (haut) et les LBA (bas) des souris Air (barres blanches) et des souris CS (barres noires). Les changements histologiques ont été analysés 8 et 10 jours après l'infection virale. Le score histologique incluant les dommages épithéliaux a été exprimé en moyenne ± SEM. *P<.05, **P<.01, ***P<.001 et ****P<.0001 correspondent à un effet significatif du virus ou de la surinfection (H1N1 ou H1N1 +Sp vs. PBS). § P<.05, §§ P<.01, §§§ P<.001 et §§§§ P<.0001 correspondent à un effet significatif de la surinfection par rapport à l'infection virale seule (H1N1 + Sp vs. H1N1). # p<0.05 correspond à un effet significatif du CS (CS vs. Air).

L'exposition à la fumée de cigarette favorise l'expression de cytokines IL-20 lors de la surinfection bactérienne

Nous avons évalué l'expression des cytokines IL-20 dans ce modèle de surinfection post-grippale au cours de la BPCO. Chez les souris Air et CS, les infections virales par H1N1 et bactériennes par *S. pneumoniae* n'induisent pas l'expression des cytokines IL-20 dans les poumons (Figure 28). De la même manière, lors de la surinfection, les cytokines IL-20 ne sont pas induites chez les souris contrôles. En revanche, les cytokines IL-19, -20 et -24 sont fortement induites lors de la surinfection post-grippale chez les souris exposées au CS 1 jours après l'instillation bactérienne. Cependant, l'analyse protéique des cytokines par ELISA n'a pas permis d'observer de modulation par le CS dans les LBA, les poumons ou le sérum (Données non présentées).

Afin de préciser l'effet direct de la CS sur les cellules épithéliales pulmonaires, des analyses *in vitro* ont été réalisées sur un modèle de surinfection bactérienne post-IAV de cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B). Les données démontrent que les ARNm codant pour IL-19, IL-20 et IL-24 sont surexprimés lors des infections bactériennes par NTHi (une autre bactérie impliquée dans les surinfections) et virales dans les BEAS-2B (Figure 29), ce choix ayant été guidé par leur meilleure capacité à induire une réponse sur ces cellules. Un effet additif sur l'expression de ces cytokines est observé dans le contexte de la surinfection. Ces analyses *in vitro* de l'expression des cytokines IL-20 confirment l'effet additif de l'exposition à la cigarette et des surinfections sur l'expression des cytokines. Cependant, ces cytokines ne sont pas sécrétées dans le milieu de culture dans ces conditions (non illustrées).

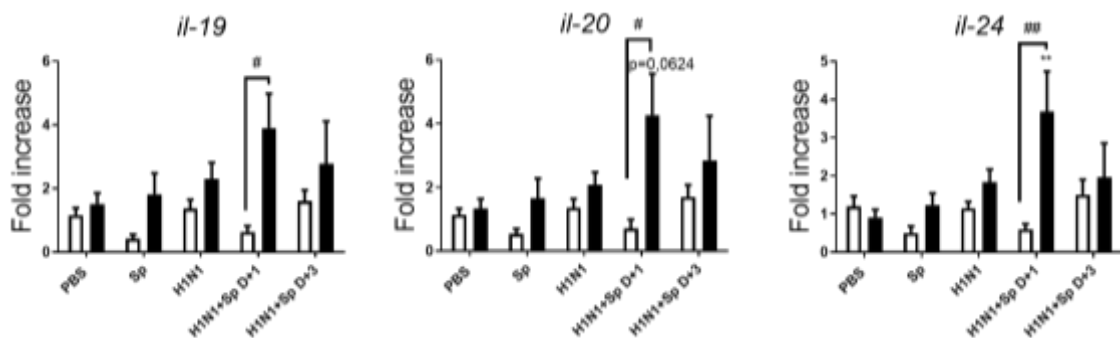


Figure 28 : L'expression des cytokines IL-20 est induite lors de la surinfection bactérienne chez les souris CS. L'expression des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 a été évaluée par RT-qPCR dans les tissus pulmonaires. Les résultats de qPCR sont exprimés en expression relative en comparaison avec les souris Air non infectées. Le gène *hprt1* a été utilisé comme gène de référence. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les souris Air sont représentées par les barres blanches et les souris CS par des barres noires. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ correspondent à un effet significatif du CS (CS vs. Air).

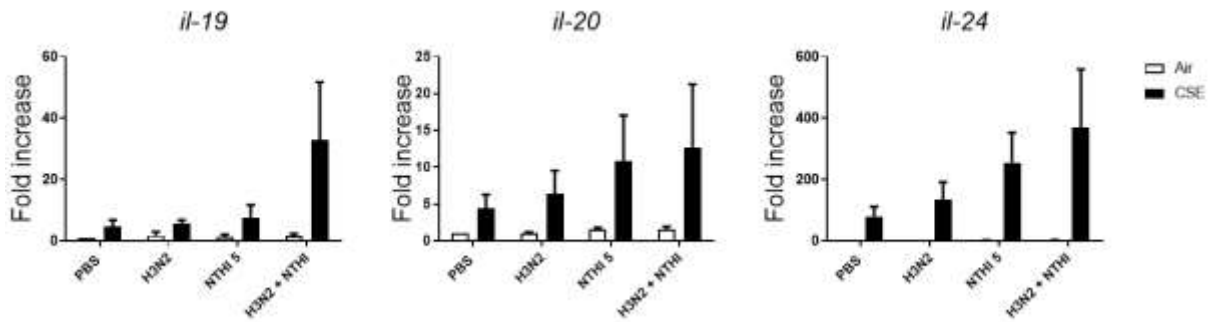


Figure 29 : L'expression des cytokines IL-20 est induite dans les cellules épithéliales humaines exposées au CSE lors de la surinfection bactérienne

L'expression des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 a été évaluée par RT-qPCR dans les cultures des cellules épithéliales BEAS-2B. Les résultats de qPCR sont exprimés en expression relative en comparaison avec les souris Air non infectées. Le gène *hprt1* a été utilisé comme gène de référence.

Le traitement par anticorps bloquant l'IL-20Rb ne module pas l'inflammation induite lors de la surinfection.

Les cytokines IL-20 n'étant induites que lors de la surinfection bactérienne chez les souris exposées à la fumée de cigarette, nous avons évalué leur impact sur la réponse à la surinfection post-grippale en utilisant un anticorps bloquant l'IL-20Rb (le clone B7). En se basant sur les données obtenues dans les modèles d'infections bactériennes, nous avons traité les souris 4, 6 et 8 jours après l'infection virale avec l'anticorps anti-IL-20Rb (Figure 30a). L'analyse de la charge bactérienne n'a pas montrée de différence entre les souris traitées par le B7 et les souris traitées par l'isotype contrôle (Figure 30b). L'administration de l'anticorps anti-IL-20Rb ne module pas significativement la réponse antivirale au cours de la surinfection (Figure 30c). De la même manière, l'expression du peptide antimicrobien *s100a9* et des cytokines *cxcl-1* et IFN- γ n'est pas significativement modulée par le traitement anti-IL-20Rb comparativement aux souris traitées par l'isotype contrôle 13R4 (Figure 30d).

L'analyse de l'inflammation cellulaire démontre que le recrutement des cellules au niveau pulmonaire n'est pas affecté par le traitement anti-IL-20Rb (Figure 31a). Dans ce modèle, les lymphocytes T CD8+, et les macrophages alvéolaires, cellules fortement recrutées lors de l'infection par H1N1 dans les LBA, ne sont pas modulés par l'administration du B7. De la même manière, le nombre de cellules NK dénombrées dans les LBA n'est pas affecté par le traitement anti-IL-20Rb. En revanche, dans les poumons, les cellules NK sont recrutées en nombre plus important chez les souris 1 jour après la surinfection bactérienne

traitées par l'anticorps B7 comparativement aux souris traitées par l'isotype contrôle. L'analyse histologique ne démontre pas de modulation significative de l'inflammation pulmonaire par le traitement anti-IL-20Rb (Figure 31b). Ces observations sont confirmées par l'établissement du score histologique. Bien que les résultats ne soient pas significatifs, les lésions épithéliales observées dans le modèle semblent diminuer lors du traitement par anti-IL-20Rb.

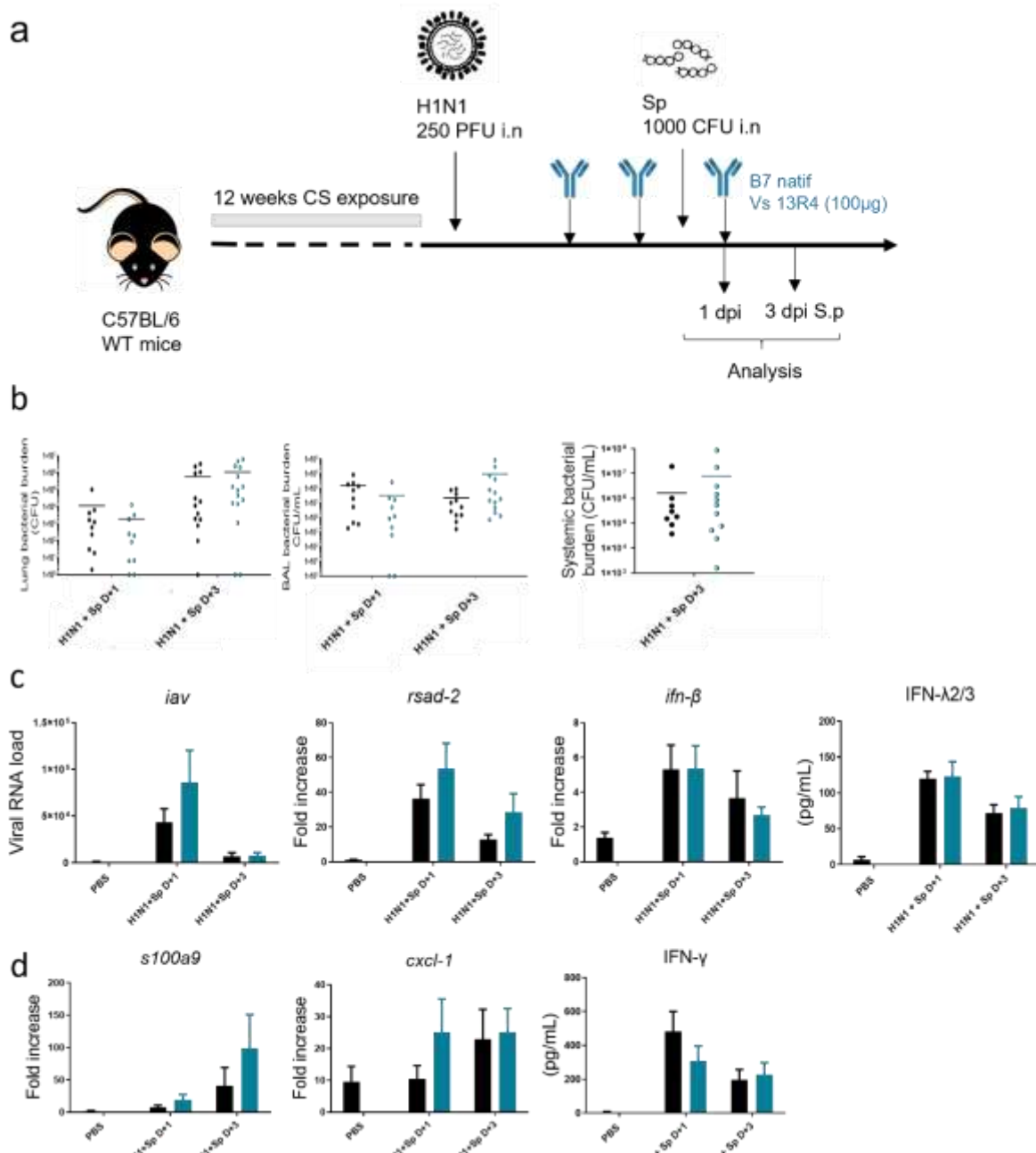


Figure 30 : Le traitement par l'anticorps anti-IL-20Rb facilite la réplication du virus H1N1 et l'expression d'*ifn-β* 10 jours post-infection

(a) Protocole expérimental de l'étude : le jour de l'infection virale définit la fin du protocole d'exposition à la fumée de cigarette (CS), qui a consisté à exposer les souris au CS (5 cigarettes/jour, 5 jours/semaine) pendant 12 semaines. La surinfection bactérienne est induite par instillation intranasale de *S. pneumoniae* 7 jours après l'infection H1N1 et les analyses ont été réalisées 1 et 3 après l'infection bactérienne. L'administration de l'anticorps anti-IL-20Rb ou de l'isotype a

été faite par voie i.p 4, 6 et 8 jours après l'infection virale. **(b)** La charge bactérienne (exprimée en CFU) a été évaluée dans les poumons, LBA et le sang 1 jour et 3 jours après l'infection bactérienne chez les souris CS traitées par l'isotype contrôle 13R4 (noir) et traitées avec le B7 (bleu). **(c)** La réponse antivirale incluant l'expression de *rsad-2* et *iFN-β* a été évaluée par RT-qPCR dans les tissus pulmonaires. Le niveau d'*iFN-λ2/3* a été évalué par ELISA dans les LBA (pg/mL) **(d)**. L'expression du peptide antimicrobien *s100a9* et de la cytokine immuno-modulatrice *cxcl-1* a été évaluée par RT-qPCR. La production d'*iFN-γ* a été analysée par ELISA (pg/mL). Les résultats de qPCR sont exprimés en expression relative en comparaison avec les souris Air non infectées. Le gène *hprt1* a été utilisé comme gène de référence. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Les souris traitées par l'isotype contrôle 13R4 sont représentées par les barres noires et les souris traitées par l'anti-IL-20Rb par des barres bleues. **P*<.05 correspond à un effet significatif du virus ou de la surinfection (H1N1 ou H1N1 + Sp vs. PBS). # *p*<.05 et ###*P*<.001 correspondent à un effet significatif du traitement anti-IL-20Rb (B7 vs 13R4).

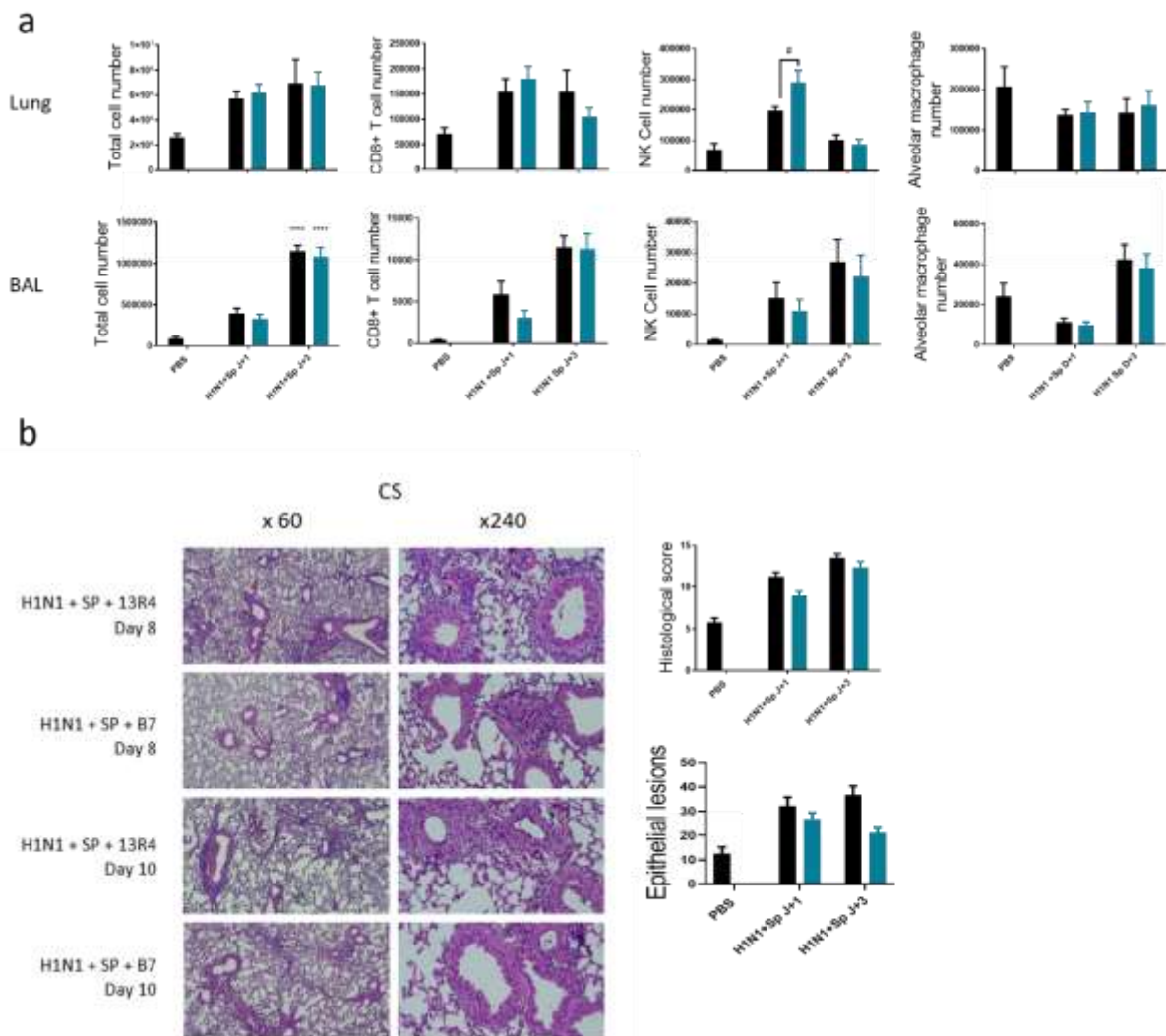


Figure 31 : Le traitement par l'anti-IL-20Rb ne module pas le recrutement cellulaire

(a) Nombre total de cellules, le nombre lymphocytes T CD45+ CD45+/TCRβ+/ CD8+, de cellules NK CD45+/TCRβ-/NK1.1+, de macrophages alvéolaires CD45+/F4/80+/CD11c+ a été évalué dans les poumons (haut) et les LBA (bas) des souris CS traitées par l'isotype contrôle 13R4 (barres noires) et des souris traitées par l'anti-IL-20Rb (barres bleues). **(b)** Les changements histologiques ont été évalués 10 jours après l'infection par l'IAV. Des photos représentatives sont représentées après une coloration HE. Le score histologique inclut l'évaluation des lésions vasculaires et des dommages épithéliaux. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. **P*<.05, ***P*<.01, ****P*<.001 et *****P*<.0001 correspondent à un effet significatif du virus ou de la surinfection (H1N1 ou H1N1 + Sp vs. PBS). # *p*<.05 correspond a un effet significative du traitement anti-IL-20Rb (B7 vs. 13R4).

Discussion :

L'apparition des infections bactériennes secondaires est un problème majeur de santé publique en particulier chez les patients BPCO et la compréhension des mécanismes conduisant à l'expansion bactérienne au cours des infections virales permettra le développement des traitements permettant de prévenir ce phénomène. Les cytokines IL-20 étant associées au développement d'infections bactériennes cutanées [7] et pulmonaires [6] mais aussi virale, nous avons souhaité explorer leur rôle au cours de la surinfection bactérienne post-grippale notamment dans notre modèle murin de BPCO.

Dans ces expériences, nous pouvons dans un premier temps définir l'impact de l'exposition à la fumée de cigarette sur l'infection grippale seule. Ainsi, nous avons pu observer que la fumée de cigarette n'a pas modulé la réponse antivirale induite par le virus contrairement à ce qui avait pu être observé avec le PVM. En revanche, l'exposition au CS augmente de manière significative l'expression de *cxcl-1* au niveau pulmonaire [352] et le recrutement cellulaire dans les LBA. La faible induction de l'inflammation au niveau pulmonaire pourrait être liée à la dose de virus utilisée, puisque dans des modèles murins d'infection par le H1N1 l'administration de virus oscille entre 10^3 et 10^6 PFU [352–354] contre 250 pfu dans nos expériences, cela afin d'éviter une mortalité très rapide lors de la surinfection. Cette faible réponse au niveau tissulaire pourrait expliquer le fait que nous ne visualisons pas d'induction de l'expression des cytokines IL-20 dans les poumons. Un résultat similaire a été obtenu *in vitro* sur les cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B.

La seconde partie de ces expériences permet d'évaluer l'impact du CS sur le développement des surinfections bactériennes. Dans notre modèle, l'exposition à la fumée de cigarette n'exacerbe pas l'expansion bactérienne pulmonaire et systémique, en revanche, elle module la réponse antivirale et inflammatoire associée. L'augmentation de l'IFN de type III et la réduction des interférons de type I (IFN- β) ont été impliquées dans la susceptibilité des souris à la surinfection [355–357]. De manière intéressante, l'exposition à la fumée de cigarette a contribué à l'augmentation d'IFN- β au cours de la surinfection alors qu'elle a réduit l'expression d'IFN- $\lambda 2/3$ et de *rsad-2*. De plus, l'infection bactérienne conduit à une augmentation de l'expression du peptide antimicrobien *s100a9* et des cytokines *cxcl-1* et IFN- γ . Alors que *cxcl-1* et *s100a9* ne sont pas significativement modulés par l'exposition au

CS, nous avons détecté des niveaux élevés d'IFN- γ dans les LBA des souris exposées au CS bien que celui-ci ne soit pas associé à une augmentation du recrutement lymphocytaire au niveau pulmonaire. De manière surprenante, nous avons observé une diminution du recrutement cellulaire dans les LBA des souris surinfectées comparativement aux souris infectées par le virus seul. Aucune donnée similaire n'a été observée dans la littérature. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'expansion bactérienne au niveau systémique contribue à la mobilisation des cellules immunitaires dans les tissus (en premier lieu dans les poumons) et au niveau sanguin ainsi que dans les compartiments impactés par la dissémination des bactéries, en particulier la moelle osseuse.

L'expression des cytokines IL-20 a été démontrée dans différentes pathologies infectieuses bactériennes [5–7]. Dans notre modèle de surinfection, nous n'observons pas d'expression des cytokines IL-20 chez les souris Air. Cependant, l'expression d'IL-19, d'IL-20 et d'IL-24 est fortement induite au cours de la surinfection chez les souris CS et dans les cellules épithéliales bronchiques humaines. Malgré cela, nous n'avons pas détecté de sécrétion de ces protéines. Des analyses par immunohistochimie permettraient de définir si ces protéines sont effectivement produites et dans quel type cellulaire. Le traitement par anticorps bloquant la sous-unité IL-20Rb n'a pas modifié la susceptibilité des souris à l'infection bactérienne secondaire et seul le recrutement des cellules NK était augmenté chez les souris traitées. L'infection bactérienne étant réalisée au pic de l'infection virale (7 jours pour l'infection grippale chez des souris WT) et dans l'hypothèse où le traitement anti-IL-20Rb pourrait décaler le pic de réplication du virus, la surinfection bactérienne pourrait ne pas avoir été réalisée au bon moment, ce qui pourrait expliquer le fait que nous n'observons pas de modifications de la charge bactérienne. De plus l'absence de sécrétion de ces cytokines dans ce contexte suggère également que cette absence d'effet de l'anticorps pourrait être liée à un défaut de mobilisation des récepteurs correspondants. Pour vérifier cela, il nous faudrait modifier ce protocole ou le type de virus / bactérie (NTHi) pour analyser l'effet de ce traitement dans un contexte associé à une production détectable de cytokines IL-20.

Au cours de la surinfection, nous observons une augmentation des IFN de type III en parallèle avec les cytokines IL-20, ces deux groupes de cytokines faisant partie de la famille de l'IL-10 [265]. L'activation des IFN de type III va majoritairement induire l'activation des

voies des signalisations STAT-2 alors que les cytokines IL-20 activent principalement la voie STAT-3. Cependant, dans certaines conditions les interférons de type III peuvent également activer les voies STAT-3 et STAT-1 [358–360]. De plus l'activation des TLR par les bactéries induit également la phosphorylation des voies STAT-3 [361,362]. Ainsi, la redondance des voies de signalisation au cours de la surinfection pourrait contourner l'effet inhibiteur du traitement anti-IL-20Rb. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser le même type d'expériences *in vivo* ou *in vitro* en bloquant la voie des interférons de type III. Malgré cette absence d'effet majeur sur l'inflammation, nous avons néanmoins observé une diminution des lésions épithéliales après traitement. Cela est à mettre en parallèle avec nos résultats obtenus avec le PVM montrant un impact de l'anti-IL-20Rb sur l'expression des jonctions intercellulaires des cellules épithéliales bronchiques. Cette étude devrait être réalisée à la fois dans nos modèles *in vivo* et *in vitro* de surinfection.

Pour conclure, la meilleure compréhension des mécanismes de sécrétion des cytokines IL-20 et de la réplication du H1N1 pourrait permettre d'optimiser le modèle de surinfection post-grippale au cours de la BPCO et d'évaluer l'effet du traitement par l'anti-IL20Rb dans des conditions optimales. Dans ce contexte, il nous semble également essentiel d'analyser ces paramètres au cours de l'exacerbation chez les patients BPCO pour confirmer l'implication de ces cytokines dans ce contexte.

Discussion et perspectives

Les travaux réalisés au sein de l'équipe ont démontré que la susceptibilité aux infections bactériennes des modèles expérimentaux de BPCO était liée à un défaut de production des cytokines IL-17 et IL-22 [124]. L'IL-22 étant négativement régulée par les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 lors d'une infection cutanée par *S. aureus* [7] le laboratoire a étudié la fonction de ces cytokines dans le contexte d'infections bactériennes pulmonaires. Ainsi, il a été montré que les cytokines de la famille des IL-20 sont fortement exprimées lors d'infections bactériennes pulmonaires et l'inhibition de leur fonction par le blocage de la sous-unité IL-20Rb conduit à la réduction des infections bactériennes cutanées [7] et pulmonaires [6]. Ces données ont conduit l'équipe à étudier le rôle de ces cytokines dans la susceptibilité aux infections respiratoires dans le cadre de la BPCO.

Au cours de cette thèse, nous avons débuté l'étude du rôle des cytokines IL-20 dans (1) la susceptibilité aux infections virales et (2) dans le contrôle des surinfections bactériennes post-grippales au cours de la BPCO. Les données présentées dans ce document montrent l'implication de ces cytokines dans ces infections et ouvrent diverses perspectives d'études concernant leur rôle.

Réponse immunitaire aux virus :

Nos données montrent un comportement différent selon le virus utilisé en réponse à l'exposition au CS. Il est difficile de comparer les deux modèles d'infection virale car ces deux pathogènes peuvent utiliser des voies d'activation différentes. En effet, le système immunitaire inné détecte les infections virales grâce à la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) par les PRR. Ces PAMP générés lors de l'infection peuvent être spécifiques de l'agent pathogène. Ainsi, il a été démontré que les virus de type IAV induisent l'activation des TLR-3 et -7 [363] alors que le PVM implique l'activation des TLR-4 et -7 [226], [359]. L'activation du TLR-7 au cours des infections virales contribue à la clairance du PVM notamment par l'action des cellules dendritiques plasmacytoïdes et la production d'IFN de type I et III. En revanche, son rôle semble plus controversé dans le cadre d'infections par l'IAV puisque son inhibition seule n'affecte pas la survie des souris probablement du fait de l'activation du TLR3 ou des hélicases à ARN [364]. En effet, les virus sont également reconnus par des senseurs viraux intracytoplasmiques tels

que RIG-I [364,365]. Ce PRR peut également induire l'activation de la voie NFκB et l'induction de la réponse inflammatoire d'une part et l'induction de gènes régulateurs d'interféron (IRF)-3 et -7 induisant la production d'IFN de type I et III d'autre part [366] comme observé dans nos modèles.

Contrairement au modèle PVM qui induit une inflammation à la fois dans les poumons et dans les LBA, l'infection par le H1N1 chez la souris induit un recrutement cellulaire principalement au niveau des LBA. Cette faible induction de l'inflammation pulmonaire pourrait être liée à la dose de virus utilisée, puisque dans des modèles murins d'infection par le H1N1 l'administration de virus oscille entre 10^3 et 10^6 PFU[352–354] contre 250 pfu dans nos expériences, cela afin d'éviter une mortalité très rapide lors de la surinfection. L'induction des cytokines IL-20 est également moindre avec la souche grippale H1N1 comparativement au PVM. *In vitro*, l'induction des cytokines a été observée uniquement avec la souche H3N2 et pas avec le H1N1 qui active très faiblement les cellules BEAS-2B suggérant que la réponse au H3N2 *in vivo* pourrait être plus importante, ce que nous avons pu observer lors d'expériences préliminaires (Figure 32). Ce sérotype n'a pas été utilisé pour les surinfections du fait de sa trop forte virulence.

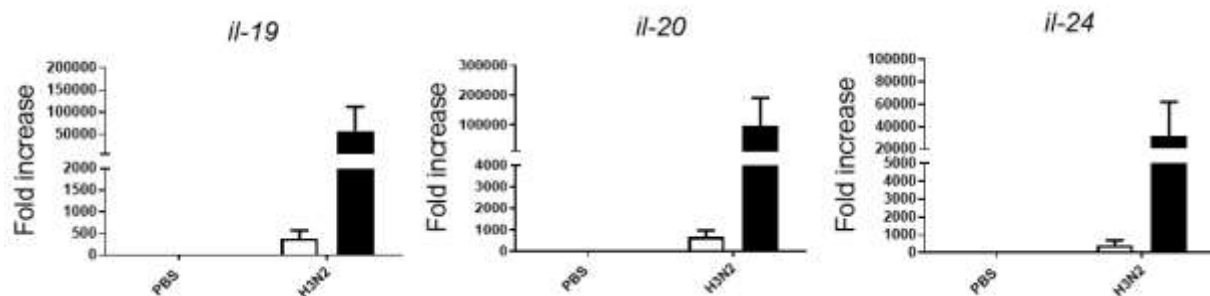


Figure 32 : L'exposition au CS exacerbe l'expression des cytokines IL-20 lors de l'infection grippale par la souche H3N2 chez la souris

L'expression des cytokines il-19, il-20 et il-24 a été évalué par RT-qPCR dans les tissus pulmonaires. Les résultats de qPCR sont exprimés en expression relative en comparaison avec les souris Air non infectées. Le gène *hprt1* a été utilisé comme gène de référence. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les souris Air sont représentées par les barres blanches et les souris traitées par l'anti-IL-20Rb par des barres noires.

Réponse antivirale et inflammatoire au cours de l'exacerbation viro-induite de la BPCO :

Dans un premier temps, nous avons développé un modèle murin d'exacerbation virale de la BPCO. Pour cela, nous avons utilisé un virus murin spécifique, le PVM, homologue du VRS humain. Dans ce modèle, nous avons démontré que l'exposition à la

fumée de cigarette facilite la réplication virale dans les poumons des souris. Cette forte multiplication du virus est accompagnée d'une augmentation de la réponse antivirale et notamment des gènes comme RIG-I (senseur d'ARN viral), du gène inducteur de la réponse interféron RSAD-2 et de l'IFN- λ 2/3. La modulation des médiateurs antiviraux au cours de l'exposition à la fumée de cigarette semble dépendre du virus impliqué. En effet, contrairement au VRS et au rhinovirus qui, comme dans notre modèle augmente la réponse antivirale par l'épithélium bronchique chez les patient BPCO [247,257], l'exposition à de l'extrait de fumée de cigarette atténue la réponse anti-virale vis-à-vis de l'IAV par les PBMC humains, en particulier, la production d'IFN- β , d'IFN- γ probablement en diminuant l'expression du détecteur d'ARN viral : RIG-I [74]. Nos données préliminaires sur la réponse antivirale de cellules épithéliales bronchiques humaines exposées à de l'extrait de fumée de cigarette (CSE) tendent à confirmer ces observations (Figure 33). La confrontation de l'ensemble de ces données démontre que la modulation de la réponse antivirale par l'exposition à la cigarette n'est pas suffisante pour expliquer la susceptibilité des patients BPCO aux différentes infections virales. D'autres mécanismes, impliquant le maintien épithélial et/ou la survie cellulaire, pourraient également être impliqués comme le suggère l'augmentation des lésions épithéliales observées avec le PVM.

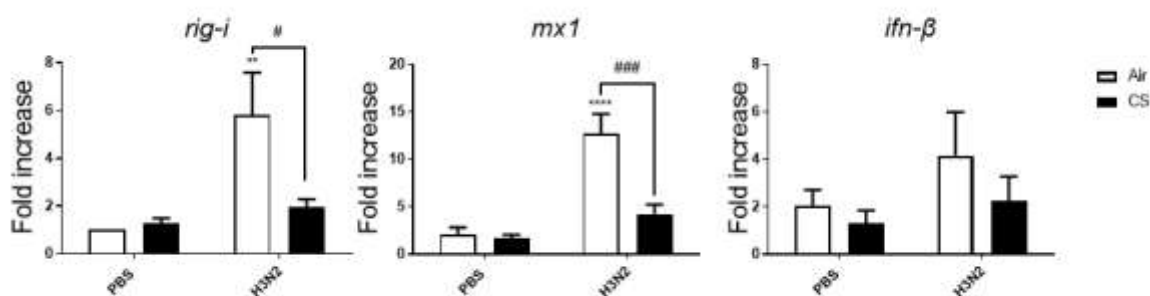


Figure 33 : L'exposition à de l'extrait de fumée de cigarette (CSE) réduit la réponse antivirale des cellules bronchiques humaines BEAS-2B stimulées par la souche grippale H3N2

La réponse antivirale incluant l'expression de *rig-i*, de *mx1* et d'*ifn- β* a été évaluée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en expression relative en comparaison avec les cellules non infectées et cultivées en milieu seul. Le gène *hprt1* a été utilisé comme gène de référence. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les cellules contrôles sont représentées par les barres blanches et les cellules exposées CSE par des barres noires. ** $P < .01$ et **** $P < .0001$ correspondent à un effet significatif du virus (H3N2 vs. PBS). # $p < 0.05$ et ### $p < .001$ correspondent à un effet significatif du CSE (CSE vs. Milieu).

La physiopathologie de la BPCO implique une inflammation chronique conduisant à l'infiltration de cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les lymphocytes NK, NKT [33,342]. [239]. Comme pour le VRS, l'infection par le PVM est associée à une augmentation de l'inflammation pulmonaire, des dommages périvasculaires et bronchiques chez les souris exposées au CS [239]. L'infiltration de cellules immunitaires au cours des infections par le PVM et la souche grippale H1N1 consiste principalement à un afflux de macrophages, de neutrophiles, de NK, de lymphocytes conventionnels et non conventionnels et de cDC2 [115,225,348,349]. Ces infections sont associées, chez les souris CS, à une production plus importante d'IFN- γ lors de l'infection par le PVM comme observé dans un modèle murin d'exacerbation par le VRS [239] et de CXCL1 dans le modèle H1N1. La majoration de la réponse inflammatoire associée à l'exacerbation contribue aux dommages tissulaires tels qu'ils sont observés chez les patients [115,367], bien que dans le modèle PVM la diminution des lésions tissulaires chez les souris IL-20Rb^{-/-} ne semble pas directement liée à l'intensité de la réaction inflammatoire.

Cytokines IL-20, infections virales et BPCO :

Les cytokines IL-20 font partie de la famille de l'IL-10 et sont fortement exprimées par les cellules épithéliales et certaines cellules immunitaires [5,368]. L'implication des cytokines IL-19, IL-20 et IL-24 a été montrée dans diverses pathologies chroniques et infectieuses. Cependant, il n'existe actuellement aucune étude les décrivant dans le cadre de la BPCO et leur rôle lors des infections virales ne reste que très brièvement étudié. Les données présentées dans ce manuscrit sont les premières à montrer l'expression des cytokines IL-20 lors des exacerbations virales de la BPCO.

Dans le modèle d'exacerbation par le PVM, les cytokines IL-20 sont induites lors de l'infection virale notamment dans les poumons des souris CS. Cette expression est associée à l'augmentation des récepteurs qui n'est pas modulée par le CS. Les analyses immunohistochimiques nous ont permis de localiser les cellules exprimant les cytokines IL-20. Ainsi, nous avons observé qu'elles sont fortement exprimées dans l'épithélium bronchique à l'état basal. L'exposition au CS semble augmenter l'expression de l'IL-19 et d'IL-24 dans

l'épithélium bronchique. Indépendamment, le VRS et l'exposition au CSE induisent l'expression d'IL-24 par les cellules épithéliales trachéales primaires (Figure 34). De manière intéressante, ces résultats préliminaires obtenus avec le VRS démontrent que le CSE augmente l'expression d'IL-24, de manière dose dépendante. De plus, l'expression d'IL-24 est majorée lorsque les cellules sont exposées à la fois au VRS et au CSE. Des analyses complémentaires devront être réalisées afin d'évaluer l'expression d'IL-19 et d'IL-20 dans ce modèle.

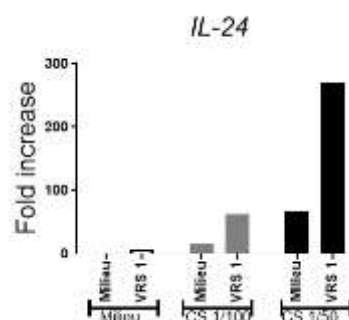


Figure 34 : Induction de l'expression de l'IL-24 par les cellules épithéliales trachéales primaires lors de l'infection à VRS et de l'exposition au CSE

L'expression d'IL-24 a été évaluée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en expression relative en comparaison avec les cellules non infectées et cultivées en milieu seul. Le gène *hprt1* a été utilisé comme gène de référence.

Les cytokines IL-20 sont également exprimées par diverses cellules immunitaires dont les monocytes, les DC et les neutrophiles activés [5,329]. Dans notre modèle l'infiltrât péribronchique et alvéolaire associé à l'inflammation viro-induite au cours de la BPCO exprime de manière importante les cytokines IL-20 notamment l'IL-20 et l'IL-24.

La délétion de la sous-unité IL-20Rb n'a pas modifié le recrutement cellulaire associé à l'infection virale et n'a pas permis non plus de réduire la charge virale. Cependant, l'inhibition de la fonction des cytokines IL-20 a fortement réduit l'expression de l'IFN- γ et de médiateurs antiviraux dont l'ISG RSAD-2 et l'IFN- λ 2/3. La réduction de ces IFN chez les souris IL-20Rb KO pourrait être responsable de la diminution des dommages épithéliaux observé dans notre modèle. En effet, il a récemment été démontré que les interférons de type I et de type III altèrent la prolifération et la différenciation épithéliale [369]. L'amélioration des conséquences liées à l'infection par le PVM chez les souris IL-20Rb KO est associée à la préservation de l'expression et de la localisation de protéines de jonction intercellulaires

comme E-cadhérine. Étant donné les conséquences de la délétion de l'IL-20Rb sur l'épithélium respiratoire lors de l'infection par le PVM, il serait intéressant d'évaluer de manière plus spécifique l'impact combiné de l'exposition à la fumée de cigarette et de l'infection virale sur la réponse épithéliale dans un modèle *ex-vivo* de culture cellulaire en interface Air-liquide (ALI). Pour cela, nous pourrions dans un premier temps réaliser ces tests grâce à l'utilisation de cellules épithéliales primaires issues de trachées de souris. L'interface Air-liquide permettra de reconstituer une barrière épithéliale et un épithélium différencié et pseudostratifié [370]. Ainsi, des cellules épithéliales de trachée de souris WT ou IL-20Rb KO de souris exposées ou non à la fumée de cigarette seraient infectées par des virus tels que le PVM ou des souches d'IAV (Figure 35A). Les cellules et les milieux de culture seraient récupérés afin d'y réaliser des analyses de la réponse antivirale et inflammatoire. Les conséquences du blocage du récepteur IL-20Rb ou du traitement par les cytokines recombinantes pourront également être évaluées sur ces mêmes paramètres (Figure 35B).

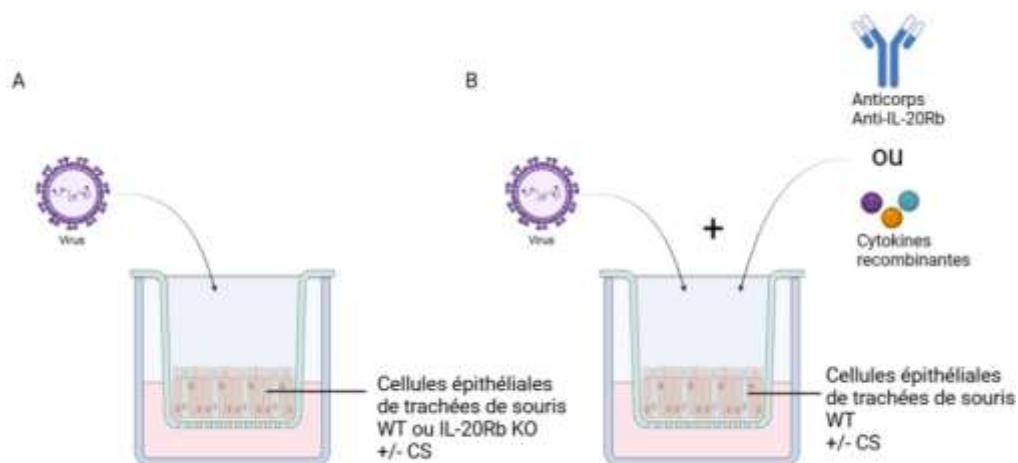


Figure 35 : Méthode d'étude du rôle des cytokines IL-20 sur des cultures de cellules épithéliales trachéales murines cultivées en interface Air-liquide
(A) Étude de la délétion de l'IL-20Rb sur la réponse à l'infection virale des cellules épithéliales de souris exposées au CS. **(B)** Étude du traitement par anticorps bloquant l'IL-20Rb ou du traitement par cytokines IL-20 recombinantes sur la réponse au virus chez des souris WT exposées au CS.

L'infection virale est également associée à une augmentation de la perméabilité pulmonaire et une désorganisation de l'expression d'E-cadhérine au niveau de l'épithélium. Ces observations ont été limitées chez les souris IL-20Rb KO. Confirmant ces données, le traitement de cellules épithéliales prostatique par la cytokine IL-20 recombinante, est associé à une diminution de l'expression d'E-cadhérine contrairement à la vimentine ou à la

protéine N-cadhérine suggérant que les cytokines IL-20 favorisent la transition épithélio-mésenchymateuse [371,372]. Dans les maladies rénales, l'expression des cytokines IL-19 et IL-20 est responsable de l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales, ce que nous n'avons pas observé sur des cellules épithéliales pulmonaires [298,373]. Les cytokines IL-20 sont toutefois parfois associées au phénomène de cicatrisation, car elles sont capables d'induire la production de VEGF, KGF et d'EGF par exemple [5]. Cela a principalement été observé dans des modèles cutanés et oculaires. Ces données démontrent que l'effet des cytokines IL-20 sur les tissus semble dépendre de l'organe et des conditions physiopathologiques étudiées. Ainsi, il sera intéressant de réaliser des analyses de résistance transépithéliale et des marquages immunofluorescents afin d'évaluer l'impact des différents traitements sur l'expression des jonctions intercellulaires, la sécrétion de mucus et la régénération tissulaire à partir de cellules épithéliales trachéales murines. Des analyses transcriptomiques pourraient également être envisagées sur ces modèles et permettraient l'identification de signatures spécifiques associées à l'infection virale au cours de la BPCO. L'activation des IL-20R est connue pour activer les voies de signalisation STAT3 et MAPK (ERK and P38) [269]. La contribution de ces voies de signalisation pourrait être évaluée par les approches transcriptomiques et par l'évaluation de la phosphorylation des kinases JAK, p38 et ERK.

L'ensemble des approches citées précédemment pourrait être adapté à un modèle *ex-vivo* de culture en ALI de cellules pulmonaires humaines. Ainsi, nous pourrions comparer la réponse aux virus des cellules épithéliales issues de donneurs non fumeurs, fumeurs ou BPCO (Figure 36).

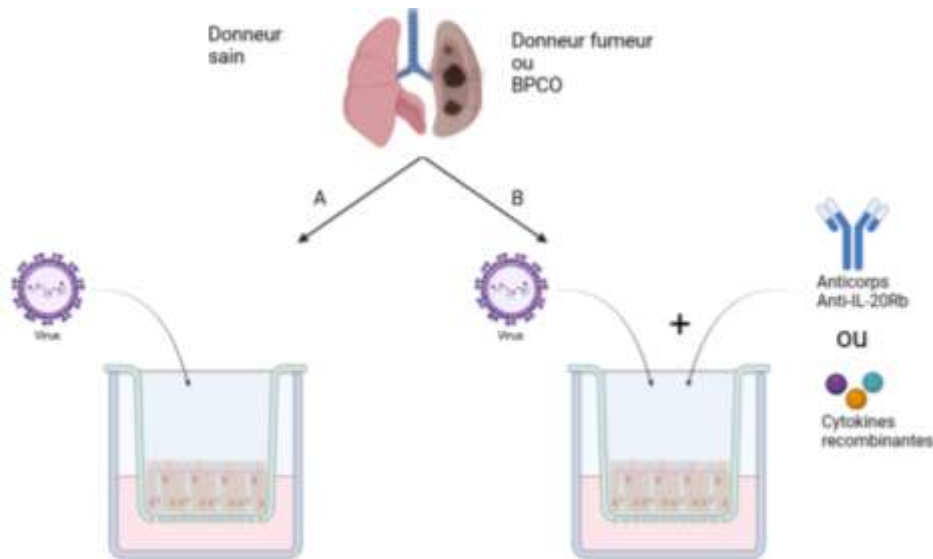


Figure 36 : Méthode d'étude ex-vivo du rôle des cytokines IL-20 sur des cultures de cellules épithéliales pulmonaires humaines cultivées en interface Air-liquide
(A) Étude de la délétion de l'IL-20Rb sur la réponse à l'infection virale des cellules épithéliales de donneurs sains, fumeurs ou BPCO. **(B)** Etude du traitement par anticorps bloquant l'IL-20Rb ou du traitement par cytokines IL-20 recombinantes sur la réponse au virus des cellules épithéliales humaines de donneurs sains, fumeurs ou BPCO.

Les cellules épithéliales pulmonaires forment la première barrière physique et immunitaire face aux agressions extérieures. Elles représentent aussi les premières cibles des virus respiratoires. À l'homéostasie, on retrouve également des cellules sentinelles comme les macrophages alvéolaires qui vont pouvoir interagir avec l'épithélium de manière directe (contact/contact) ou indirecte (sécrétion de molécules) afin d'éliminer efficacement le pathogène. Ainsi, la coopération des macrophages avec l'épithélium favorise la production de molécules pro-inflammatoires et la réparation tissulaire [374,375]. Cependant, l'exposition à la fumée de cigarette est associée à un déclin des fonctions macrophagiques qui entraîne une diminution de l'activité phagocytaire et de certains marqueurs de reconnaissance [97,99,100] essentiels à l'élimination des virus [376]. De plus, les macrophages exposés à certaines protéines virales contribuent à la perte d'intégrité épithéliale observée au cours d'infection par le VIH [377]. Dans notre modèle murin d'exacerbation virale, l'infection par le PVM induit un afflux de cellules immunitaires au niveau pulmonaire qui expriment les cytokines IL-19, IL-20 et IL-24. Les cellules épithéliales et les cellules phagocytaires étant à la fois productrices des cytokines IL-20 et cellules cibles de ces cytokines [5,269], il serait intéressant d'étudier l'impact des cytokines IL-20 sur les interactions épithélium/cellules présentatrices d'antigène. L'utilisation du système ALI permettrait d'étudier l'impact de l'exposition à la fumée de cigarette et du traitement par

des cytokines IL-20 recombinantes ou l'anticorps anti-IL-20Rb sur les interactions cellulaires après stimulation par des virus (Figure 37). L'impact sur la réponse immune sera ensuite évalué en mesurant la fonction des cellules présentatrices d'antigène.

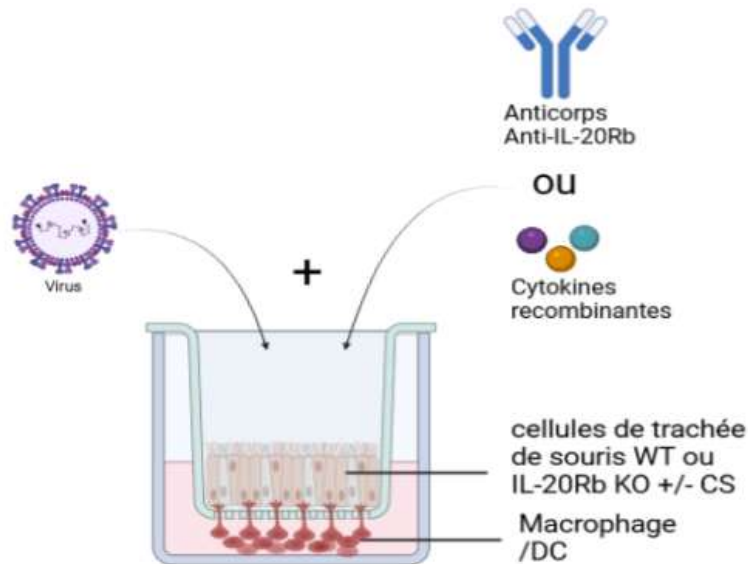


Figure 37 : Méthode d'étude du rôle des cytokines IL-20 sur les interactions épithélium/cellules immunitaires

Les connaissances sur le rôle des cytokines IL-20 dans le contexte d'infection virale et de la BPCO nécessitent d'être approfondies afin de comprendre leur impact sur la réponse à la stimulation virale notamment sur les dommages épithéliaux et sur la réponse immune.

Les cytokines IL-20 dans les surinfections bactériennes :

Les infections virales sont souvent associées à l'apparition de colonisation d'infections bactériennes secondaires. Cela a été particulièrement documenté pour la grippe où une grande partie des décès liés à ce virus sont dus à des surinfections bactériennes notamment chez les patients BPCO [78,351]. Dans notre modèle murin de surinfection post-grippale, l'exposition à la fumée de cigarette n'a pas permis d'exacerber la prolifération bactérienne post-H1N1. Cependant, l'exposition au CS contribue à la détection de niveau élevé d'IFN- γ dans les LBA. De manière surprenante, le recrutement de cellules observé dans les LBA était fortement diminué au cours de la surinfection comparativement aux souris infectées par le

H1N1 seul. Aucune donnée similaire n'a été observée dans la littérature. De manière intéressante, l'exposition à la fumée de cigarette a contribué à l'induction de l'expression de cytokines IL-20 lors de la surinfection bactérienne alors que leur expression n'est pas induite chez les souris Air. Néanmoins, la sécrétion de ces cytokines n'a pas été détectée dans ce contexte. Dans ce modèle de surinfection, le traitement des souris par l'anticorps anti-IL-20Rb n'a pas permis de réduire la charge bactérienne ni l'inflammation pulmonaire contrairement à ce qui a pu être observé dans le contexte d'infections bactériennes seules [6,7].

Nous avons également tenté de mettre au point un modèle de surinfection post-PVM. Les données préliminaires, qui restent encore à confirmer, semblent démontrer que l'exposition à la fumée de cigarette facilite l'expansion bactérienne dans les poumons et dans le sang des souris sans moduler la charge bactérienne dans les LBA. Le traitement par l'anticorps anti-IL-20Rb dans ce modèle ne semble pas affecter la charge bactérienne au niveau pulmonaire. Cependant, il semblerait que la bactériémie associée à la surinfection soit réduite chez les souris traitées par l'anti-IL-20Rb suggérant que les cytokines IL-20 pourraient contribuer à la sévérité des surinfections post-PVM en facilitant la dissémination bactérienne au niveau systémique (Figure 37). Cette donnée pourrait s'expliquer par le rôle délétère des cytokines IL-20 sur les lésions épithéliales et les jonctions intercellulaires observé dans le modèle PVM seul.

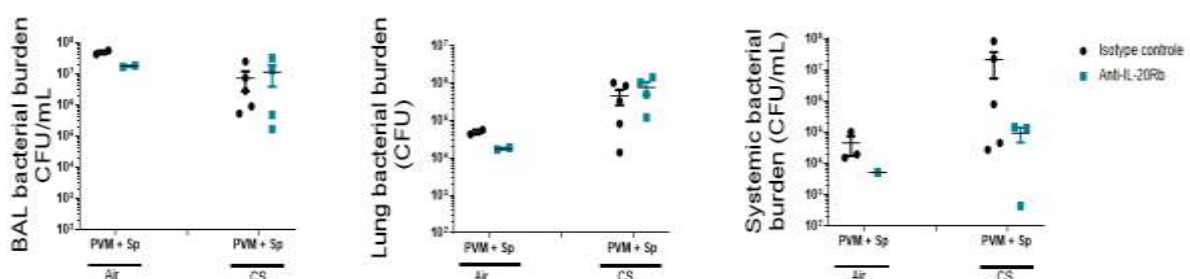


Figure 38 : Charge bactérienne lors de la surinfection post-PVM

La charge bactérienne (exprimée en CFU) a été évaluée dans les poumons, LBA et le sang 3 jours après l'infection bactérienne chez les souris Air et CS traitées par l'isotype contrôle 13R4 (noir) et traitées avec le B7 (bleu).

Les modèles murins de surinfection bactérienne au cours de la BPCO sont des modèles complexes impliquants de nombreuses contraintes. Ainsi, il est indispensable d'établir des

modèles adaptés à la cinétique de chaque virus. De plus, une meilleure connaissance de la cinétique d'expression des cytokines IL-20 dans ces modèles permettra d'adapter le délai d'administration du traitement par l'anticorps anti-IL-20Rb. Nos données *in vitro* démontrent que les cellules épithéliales exposées au CSE expriment de manière dose dépendante les cytokines IL-20. Ainsi, le développement d'un modèle murin de BPCO plus sévère, pourrait contribuer à une induction plus importante de l'expression de ces cytokines et faciliter la visualisation des effets du traitement anti-IL-20Rb dans nos modèles *in vivo*. Ces données devront ensuite être validées par une étude clinique visant à confirmer l'implication de ces cytokines au cours des exacerbations virales de la BPCO.

Applications thérapeutiques :

Les cytokines IL-20 sont associées au développement de diverses pathologies inflammatoires chroniques telles que les maladies rénales, la polyarthrite rhumatoïde ou le psoriasis [5]. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, différentes études cliniques ont été mises en place afin d'évaluer l'impact d'un traitement bloquant la cytokine IL-20 dans le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde. Ces études cliniques ont permis de démontrer la bonne innocuité et tolérabilité du traitement ciblant la cytokine IL-20 [378]. A l'heure actuelle, la majorité des brevets concerne des anticorps bloquant la cytokine IL-20. Cependant, la cytokine IL-20, n'est pas la seule cytokine de cette sous-famille, à être corrélée à l'inflammation au cours des pathologies citées précédemment [5]. Ainsi, l'inhibition de l'IL-20 seule pourrait ne pas être suffisante pour traiter les maladies associées aux cytokines IL-20 [378]. L'utilisation d'un antagoniste des cytokines IL-20 tel qu'un anticorps bloquant leur récepteur pourrait faciliter le traitement de ces pathologies. Notre brevet propose un anticorps humain recombinant ciblant la sous-unité IL-20Rb, le clone B7, qui est commune aux deux récepteurs par lesquels les cytokines IL-20 peuvent signaler. Cet anticorps reconnaissant également les récepteurs murins a montré son efficacité dans nos modèles d'infections bactériennes. De cette manière, nous espérons pouvoir traiter de façon efficace les pathologies associées aux cytokines IL-20 et en particulier la BPCO et ses exacerbations.

Conclusion

La broncho-pneumopathie chronique obstructive est un véritable problème de santé publique car elle représente la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde. Les données actuelles ont permis de mettre en évidence différents aspects cellulaires et moléculaires liés au développement de la pathologie. Cependant, il n'existe, aujourd'hui, aucun traitement préventif ou curatif permettant de traiter de manière efficace cette maladie. L'aspect multifactoriel rend l'étude et la découverte des nouveaux traitements d'autant plus complexe.

La survenue d'épisodes d'exacerbations représente l'un des aspects les plus problématiques dans l'évolution de la pathologie. Il est donc essentiel de développer des moyens de prévention permettant de prévenir ou de traiter rapidement les infections respiratoires responsables de l'aggravation de la pathologie. C'est pourquoi, le laboratoire s'intéresse de manière approfondie à l'étude de ces phénomènes d'exacerbations. Pour cela, il a été mis en place un modèle murin de BPCO sur lequel nous réalisons diverses infections fongiques, bactériennes et virales afin de mimer les exacerbations. Mon projet de thèse s'est concentré sur les exacerbations d'origines virales et les surinfections bactériennes subséquentes. Dans ce travail de thèse, nous avons pu observer une susceptibilité des souris exposées à la fumée de cigarette à l'infection par le virus PVM (homologue murin du VRS) accompagnée de dommages cellulaires importants et d'une augmentation de l'expression des cytokines IL-20.

Les cytokines IL-20 sont décrites comme ayant un rôle délétère dans les infections bactériennes alors que leur fonction dans les infections virales est méconnue. Ainsi, mon projet consistait en l'étude du rôle de ces cytokines lors des infections virales dans le contexte de la BPCO. Nos données ont démontré que les cytokines IL-20 pouvaient participer aux lésions épithéliales associées aux exacerbations de la BPCO.

Les infections virales étant couramment suivies de surinfection bactérienne, nous avons développé un modèle de surinfection dans le contexte de la BPCO. Nos données préliminaires démontrent que les cytokines IL-20 sont induites par l'exposition à la fumée de cigarette au cours de la surinfection post-grippale. Cependant, l'exposition au CS n'a pas permis d'augmenter la susceptibilité des souris à l'infection bactérienne dans ce modèle, contrairement à la surinfection induite par le PVM. Dans ce dernier modèle, le traitement par anticorps anti-IL-20Rb semble diminuer la diffusion systémique de la bactérie alors qu'il n'a pas d'effet visible sur la surinfection postgrippale. Ainsi, l'effet des cytokines IL-20 lors

des infections virales pourrait dépendre du virus impliqué. Ces résultats préliminaires nécessitent d'être confortés et démontrent que les modèles murins de surinfections bactériennes sont des modèles complexes dépendants en premier lieu du type de virus en cause, notamment au cours de la BPCO. L'exploitation de ces modèles nécessite une parfaite compréhension des cinétiques d'infections afin d'obtenir des modèles fiables et reproductibles.

Ce projet qui s'intègre dans une étude plus large concernant la BPCO et ses exacerbations, vise à long terme, au développement de traitements permettant de prévenir la survenue des infections microbiennes. Les données obtenues grâce à l'utilisation de souris déficiente en IL-20Rb démontrent le potentiel thérapeutique ciblant les IL-20 sur la prévention des lésions épithéliales au cours des infections virales par le VRS et de la BPCO.

Bibliographie

1. Guo-Parke, H.; Linden, D.; Weldon, S.; Kidney, J.C.; Taggart, C.C. Mechanisms of Virus-Induced Airway Immunity Dysfunction in the Pathogenesis of COPD Disease, Progression, and Exacerbation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.01205.
2. Kumar, P.; Thakar, M.S.; Ouyang, W.; Malarkannan, S. IL-22 from Conventional NK Cells Is Epithelial Regenerative and Inflammation Protective during Influenza Infection. *Mucosal Immunol.* **2013**, *6*, 69–82, doi:10.1038/mi.2012.49.
3. Mühl, H.; Scheiermann, P.; Bachmann, M.; Härdle, L.; Heinrichs, A.; Pfeilschifter, J. IL-22 in Tissue-Protective Therapy. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 761–771, doi:10.1111/bph.12196.
4. Sharan, R.; Perez-Cruz, M.; Kervoaze, G.; Gosset, P.; Weynants, V.; Godfroid, F.; Hermand, P.; Trottein, F.; Pichavant, M.; Gosset, P. Interleukin-22 Protects against Non-Typeable Haemophilus Influenzae Infection: Alteration during Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Mucosal Immunol.* **2017**, *10*, 139–149, doi:10.1038/mi.2016.40.
5. Rutz, S.; Wang, X.; Ouyang, W. The IL-20 Subfamily of Cytokines--from Host Defence to Tissue Homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 783–795, doi:10.1038/nri3766.
6. Madouri, F.; Barada, O.; Kervoaze, G.; Trottein, F.; Pichavant, M.; Gosset, P. Production of Interleukin-20 Cytokines Limits Bacterial Clearance and Lung Inflammation during Infection by Streptococcus Pneumoniae. *EBioMedicine* **2018**, *37*, 417–427, doi:10.1016/j.ebiom.2018.10.031.
7. Myles, I.A.; Fontecilla, N.M.; Valdez, P.A.; Vithayathil, P.J.; Naik, S.; Belkaid, Y.; Ouyang, W.; Datta, S.K. Signaling via the IL-20 Receptor Inhibits Cutaneous Production of IL-1 β and IL-17A to Promote Infection with Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 804–811, doi:10.1038/ni.2637.
8. Rong, B.; Liu, Y.; Li, M.; Fu, T.; Gao, W.; Liu, H. Correlation of Serum Levels of HIF-1 α and IL-19 with the Disease Progression of COPD: A Retrospective Study. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2018**, *13*, 3791–3803, doi:10.2147/COPD.S177034.
9. Ermers, M.J.J.; Janssen, R.; Onland-Moret, N.C.; Hodemaekers, H.M.; Rovers, M.M.; Houben, M.L.; Kimpen, J.L.L.; Bont, L.J. IL10 Family Member Genes IL19 and IL20 Are Associated with Recurrent Wheeze after Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Pediatr. Res.* **2011**, *70*, 518–523, doi:10.1203/PDR.0b013e31822f5863.
10. Truelove, A.L.; Oleksyk, T.K.; Shrestha, S.; Thio, C.L.; Goedert, J.J.; Donfield, S.M.; Kirk, G.D.; Thomas, D.L.; O'Brien, S.J.; Smith, M.W. Evaluation of IL10, IL19 and IL20 Gene Polymorphisms and Chronic Hepatitis B Infection Outcome. *Int. J. Immunogenet.* **2008**, *35*, 255–264, doi:10.1111/j.1744-313X.2008.00770.x.
11. Les 10 principales causes de mortalité Available online: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed on 21 May 2021).

12. Quaderi, S.A.; Hurst, J.R. The Unmet Global Burden of COPD. *Glob. Health Epidemiol. Genomics* **2018**, *3*, e4, doi:10.1017/ghg.2018.1.
13. Maladies du poumon. *Fond. Souffle*.
14. BPCO et insuffisance respiratoire chronique Available online: /maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/bpco-et-insuffisance-respiratoire-chronique (accessed on 21 May 2021).
15. Quach, A.; Giovannelli, J.; Chérot-Kornobis, N.; Ciuchete, A.; Clément, G.; Matran, R.; Amouyel, P.; Edmé, J.-L.; Dauchet, L. Prevalence and Underdiagnosis of Airway Obstruction among Middle-Aged Adults in Northern France: The ELISABET Study 2011-2013. *Respir. Med.* **2015**, *109*, 1553–1561, doi:10.1016/j.rmed.2015.10.012.
16. Tobacco Additives: Cigarette Engineering and Nicotine Addiction. *Action Smok. Health* 1999.
17. Thielen, A.; Klus, H.; Müller, L. Tobacco Smoke: Unraveling a Controversial Subject. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2008**, *60*, 141–156, doi:10.1016/j.etp.2008.01.014.
18. Paumgarten, F.J.R.; Gomes-Carneiro, M.R.; Oliveira, A.C.A.X. de The Impact of Tobacco Additives on Cigarette Smoke Toxicity: A Critical Appraisal of Tobacco Industry Studies. *Cad. Saúde Pública* **2017**, *33*, doi:10.1590/0102-311X00132415.
19. Cheemarla, N.R.; Uche, I.K.; McBride, K.; Naidu, S.; Guerrero-Plata, A. In Utero Tobacco Smoke Exposure Alters Lung Inflammation, Viral Clearance, and CD8+ T-Cell Responses in Neonatal Mice Infected with Respiratory Syncytial Virus. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2019**, *317*, L212–L221, doi:10.1152/ajplung.00338.2018.
20. La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive Professionnelle : Une Maladie Méconnue. Available online: <http://www.camip.info/La-bronchopneumopathie-chronique.html> (accessed on 25 May 2021).
21. Doiron, D.; Hoogh, K. de; Probst-Hensch, N.; Fortier, I.; Cai, Y.; Matteis, S.D.; Hansell, A.L. Air Pollution, Lung Function and COPD: Results from the Population-Based UK Biobank Study. *Eur. Respir. J.* **2019**, *54*, doi:10.1183/13993003.02140-2018.
22. Hendryx, M.; Luo, J.; Chojenta, C.; Byles, J.E. Air Pollution Exposures from Multiple Point Sources and Risk of Incident Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and Asthma. *Environ. Res.* **2019**, *179*, 108783, doi:10.1016/j.envres.2019.108783.
23. Pathak, U.; Gupta, N.C.; Suri, J.C. Risk of COPD Due to Indoor Air Pollution from Biomass Cooking Fuel: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Environ. Health Res.* **2020**, *30*, 75–88, doi:10.1080/09603123.2019.1575951.
24. Savran, O.; Ulrik, C.S. Early Life Insults as Determinants of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Adult Life. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2018**, *13*, 683–693, doi:10.2147/COPD.S153555.

25. Barnes, P.J.; Shapiro, S.D.; Pauwels, R.A. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Molecular and Cellular Mechanisms. *Eur. Respir. J.* **2003**, *22*, 672–688, doi:10.1183/09031936.03.00040703.
26. Routhier, J.; Pons, S.; Freidja, M.L.; Dalstein, V.; Cutrona, J.; Jonquet, A.; Lalun, N.; Mérol, J.-C.; Lathrop, M.; Stitzel, J.A.; et al. An Innate Contribution of Human Nicotinic Receptor Polymorphisms to COPD-like Lesions. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6384, doi:10.1038/s41467-021-26637-6.
27. Wain, L.V.; Shrine, N.; Artigas, M.S.; Erzurumluoglu, A.M.; Noyvert, B.; Bossini-Castillo, L.; Obeidat, M.; Henry, A.P.; Portelli, M.A.; Hall, R.J.; et al. Genome-Wide Association Analyses for Lung Function and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Identify New Loci and Potential Druggable Targets. *Nat. Genet.* **2017**, *49*, 416–425, doi:10.1038/ng.3787.
28. Liu, F.; Killian, J.K.; Yang, M.; Walker, R.L.; Hong, J.A.; Zhang, M.; Davis, S.; Zhang, Y.; Hussain, M.; Xi, S.; et al. Epigenomic Alterations and Gene Expression Profiles in Respiratory Epithelia Exposed to Cigarette Smoke Condensate. *Oncogene* **2010**, *29*, 3650–3664, doi:10.1038/onc.2010.129.
29. Ito, K.; Ito, M.; Elliott, W.M.; Cosio, B.; Caramori, G.; Kon, O.M.; Barczyk, A.; Hayashi, S.; Adcock, I.M.; Hogg, J.C.; et al. Decreased Histone Deacetylase Activity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1967–1976, doi:10.1056/NEJMoa041892.
30. Gan, W.Q.; Man, S.F.P.; Postma, D.S.; Camp, P.; Sin, D.D. Female Smokers beyond the Perimenopausal Period Are at Increased Risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Respir. Res.* **2006**, *7*, 52, doi:10.1186/1465-9921-7-52.
31. Traitement de la BPCO Available online: <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/bpco-bronchite-chronique/traitement> (accessed on 15 July 2021).
32. Le Rouzic, O.; Pichavant, M.; Frealle, E.; Guillon, A.; Si-Tahar, M.; Gosset, P. Th17 Cytokines: Novel Potential Therapeutic Targets for COPD Pathogenesis and Exacerbations. *Eur. Respir. J.* **2017**, *50*, 1602434, doi:10.1183/13993003.02434-2016.
33. Hikichi, M.; Mizumura, K.; Maruoka, S.; Gon, Y. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Induced by Cigarette Smoke. *J. Thorac. Dis.* **2019**, *1*, doi:10.21037/jtd.2019.10.43.
34. Willemse, B.W.; ten Hacken, N.H.; Rutgers, B.; Postma, D.S.; Timens, W. Association of Current Smoking with Airway Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asymptomatic Smokers. *Respir. Res.* **2005**, *6*, 38, doi:10.1186/1465-9921-6-38.
35. Kim, S.; Nadel, J.A. Role of Neutrophils in Mucus Hypersecretion in COPD and Implications for Therapy. *Treat. Respir. Med.* **2004**, *3*, 147–159, doi:10.2165/00151829-200403030-00003.

36. Emphysema in COPD: Consequences and Causes Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117054/> (accessed on 9 July 2021).
37. Pouwels, S.D.; Heijink, I.H.; ten Hacken, N.H.; Vandenabeele, P.; Krysko, D.V.; Nawijn, M.C.; van Oosterhout, A.J. DAMPs Activating Innate and Adaptive Immune Responses in COPD. *Mucosal Immunol.* **2014**, *7*, 215–226, doi:10.1038/mi.2013.77.
38. Kinose, D.; Ogawa, E.; Kudo, M.; Marumo, S.; Kiyokawa, H.; Hoshino, Y.; Hirai, T.; Chin, K.; Muro, S.; Mishima, M. Association of COPD Exacerbation Frequency with Gene Expression of Pattern Recognition Receptors in Inflammatory Cells in Induced Sputum. *Clin. Respir. J.* **2016**, *10*, 11–21, doi:10.1111/crj.12171.
39. Pace, E.; Ferraro, M.; Siena, L.; Melis, M.; Montalbano, A.M.; Johnson, M.; Bonsignore, M.R.; Bonsignore, G.; Gjomarkaj, M. Cigarette Smoke Increases Toll-like Receptor 4 and Modifies Lipopolysaccharide-Mediated Responses in Airway Epithelial Cells. *Immunology* **2008**, *124*, 401–411, doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02788.x.
40. Haw, T.J.; Starkey, M.R.; Pavlidis, S.; Fricker, M.; Arthurs, A.L.; Nair, P.M.; Liu, G.; Hanish, I.; Kim, R.Y.; Foster, P.S.; et al. Toll-like Receptor 2 and 4 Have Opposing Roles in the Pathogenesis of Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2018**, *314*, L298–L317, doi:10.1152/ajplung.00154.2017.
41. Kawai, T.; Akira, S. TLR Signaling. *Semin. Immunol.* **2007**, *19*, 24–32, doi:10.1016/j.smim.2006.12.004.
42. Hautamaki, R.D.; Kobayashi, D.K.; Senior, R.M.; Shapiro, S.D. Requirement for Macrophage Elastase for Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *Science* **1997**, *277*, 2002–2004, doi:10.1126/science.277.5334.2002.
43. Zhou, L.; Le, Y.; Tian, J.; Yang, X.; Jin, R.; Gai, X.; Sun, Y. Cigarette Smoke-Induced RANKL Expression Enhances MMP-9 Production by Alveolar Macrophages. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2019**, *14*, 81–91, doi:10.2147/COPD.S190023.
44. Bezerra, F.S.; Valença, S.S.; Pires, K.M.P.; Lanzetti, M.; Pimenta, W.A.; Schmidt, A.C.; Porto, L.C.; Zin, W.A. Long-Term Exposure to Cigarette Smoke Impairs Lung Function and Increases HMGB-1 Expression in Mice. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2011**, *177*, 120–126, doi:10.1016/j.resp.2011.03.023.
45. Wang, Y.; Jia, M.; Yan, X.; Cao, L.; Barnes, P.J.; Adcock, I.M.; Huang, M.; Yao, X. Increased Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) Promotes Airway Remodelling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **2017**, *131*, 1147–1159, doi:10.1042/CS20170096.
46. Bardoel, B.W.; Kenny, E.F.; Sollberger, G.; Zychlinsky, A. The Balancing Act of Neutrophils. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 526–536, doi:10.1016/j.chom.2014.04.011.
47. Kobayashi, T.; Kim, H.; Liu, X.; Sugiura, H.; Kohyama, T.; Fang, Q.; Wen, F.-Q.; Abe, S.; Wang, X.; Atkinson, J.J.; et al. Matrix Metalloproteinase-9 Activates TGF- β and

- Stimulates Fibroblast Contraction of Collagen Gels. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2014**, *306*, L1006-1015, doi:10.1152/ajplung.00015.2014.
48. Yu, Q.; Stamenkovic, I. Cell Surface-Localized Matrix Metalloproteinase-9 Proteolytically Activates TGF- β and Promotes Tumor Invasion and Angiogenesis. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 163–176, doi:10.1101/gad.14.2.163.
 49. Freeman, C.M.; Martinez, F.J.; Han, M.K.; Ames, T.M.; Chensue, S.W.; Todt, J.C.; Arenberg, D.A.; Meldrum, C.A.; Getty, C.; McCloskey, L.; et al. Lung Dendritic Cell Expression of Maturation Molecules Increases with Worsening Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2009**, *180*, 1179–1188, doi:10.1164/rccm.200904-0552OC.
 50. Segura, É.; Amigorena, S. Les cellules dendritiques inflammatoires. *médecine/sciences* **2014**, *30*, 64–68, doi:10.1051/medsci/20143001015.
 51. Adam, D.; Perotin, J.-M.; Lebargy, F.; Birembaut, P.; Deslée, G.; Coraux, C. Régénération de l'épithélium des voies aériennes. *Rev. Mal. Respir.* **2014**, *31*, 300–311, doi:10.1016/j.rmr.2013.11.001.
 52. Milara, J.; Peiró, T.; Serrano, A.; Cortijo, J. Epithelial to Mesenchymal Transition Is Increased in Patients with COPD and Induced by Cigarette Smoke. *Thorax* **2013**, *68*, 410–420, doi:10.1136/thoraxjnl-2012-201761.
 53. Shaykhiev, R.; Otaki, F.; Bonsu, P.; Dang, D.T.; Teater, M.; Strulovici-Barel, Y.; Salit, J.; Harvey, B.-G.; Crystal, R.G. Cigarette Smoking Reprograms Apical Junctional Complex Molecular Architecture in the Human Airway Epithelium in Vivo. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2011**, *68*, 877–892, doi:10.1007/s00018-010-0500-x.
 54. Baker, J.R.; Vuppusetty, C.; Colley, T.; Hassibi, S.; Fenwick, P.S.; Donnelly, L.E.; Ito, K.; Barnes, P.J. MicroRNA-570 Is a Novel Regulator of Cellular Senescence and Inflammaging. *FASEB J.* **2019**, *33*, 1605–1616, doi:10.1096/fj.201800965R.
 55. Belgacemi, R.; Luczka, E.; Ancel, J.; Diabasana, Z.; Perotin, J.-M.; Germain, A.; Lalun, N.; Birembaut, P.; Dubernard, X.; Mérol, J.-C.; et al. Airway Epithelial Cell Differentiation Relies on Deficient Hedgehog Signalling in COPD. *EBioMedicine* **2019**, *51*, 102572, doi:10.1016/j.ebiom.2019.11.033.
 56. Perotin, J.-M.; Coraux, C.; Lagonotte, E.; Birembaut, P.; Delepine, G.; Polette, M.; Deslée, G.; Dormoy, V. Alteration of Primary Cilia in COPD. *Eur. Respir. J.* **2018**, *52*, doi:10.1183/13993003.00122-2018.
 57. Ancel, J.; Belgacemi, R.; Diabasana, Z.; Perotin, J.-M.; Bonnomet, A.; Dewolf, M.; Launois, C.; Mulette, P.; Deslée, G.; Polette, M.; et al. Impaired Ciliary Beat Frequency and Ciliogenesis Alteration during Airway Epithelial Cell Differentiation in COPD. *Diagnostics* **2021**, *11*, 1579, doi:10.3390/diagnostics11091579.

58. Ganesan, S.; Sajjan, U.S. Repair and Remodeling of Airway Epithelium after Injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Curr. Respir. Care Rep.* **2013**, *2*, 10.1007/s13665-013-0052-2, doi:10.1007/s13665-013-0052-2.
59. Radicioni, G.; Ceppe, A.; Ford, A.A.; Alexis, N.E.; Barr, R.G.; Bleecker, E.R.; Christenson, S.A.; Cooper, C.B.; Han, M.K.; Hansel, N.N.; et al. Airway Mucin MUC5AC and MUC5B Concentrations and the Initiation and Progression of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: An Analysis of the SPIROMICS Cohort. *Lancet Respir. Med.* **2021**, doi:10.1016/S2213-2600(21)00079-5.
60. Amatngalim, G.D.; Schrumpf, 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 Aberrant Epithelial Differentiation by Cigarette Smoke Dysregulates Respiratory Host Defence. *Eur. Respir. J.* **2018**, *51*, doi:10.1183/13993003.01009-2017.
61. Chinnapaiyan, S.; Dutta, R.; Bala, J.; Parira, T.; Agudelo, M.; Nair, M.; Unwalla, H.J. Cigarette Smoke Promotes HIV Infection of Primary Bronchial Epithelium and Additively Suppresses CFTR Function. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7984, doi:10.1038/s41598-018-26095-z.
62. Heijink, I.H.; Brandenburg, S.M.; Postma, D.S.; Oosterhout, A.J.M. van Cigarette Smoke Impairs Airway Epithelial Barrier Function and Cell–Cell Contact Recovery. *Eur. Respir. J.* **2012**, *39*, 419–428, doi:10.1183/09031936.00193810.
63. Vignola, A.M.; Chanez, P.; Chiappara, G.; Merendino, A.; Pace, E.; Rizzo, A.; la Rocca, A.M.; Bellia, V.; Bonsignore, G.; Bousquet, J. Transforming Growth Factor-Beta Expression in Mucosal Biopsies in Asthma and Chronic Bronchitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1997**, *156*, 591–599, doi:10.1164/ajrccm.156.2.9609066.
64. Mortaz, E.; Henricks, P.A.J.; Kraneveld, A.D.; Givi, M.E.; Garssen, J.; Folkerts, G. Cigarette Smoke Induces the Release of CXCL-8 from Human Bronchial Epithelial Cells via TLRs and Induction of the Inflammasome. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **2011**, *1812*, 1104–1110, doi:10.1016/j.bbadis.2011.06.002.
65. Masubuchi, T.; Koyama, S.; Sato, E.; Takamizawa, A.; Kubo, K.; Sekiguchi, M.; Nagai, S.; Izumi, T. Smoke Extract Stimulates Lung Epithelial Cells to Release Neutrophil and Monocyte Chemotactic Activity. *Am. J. Pathol.* **1998**, *153*, 1903–1912, doi:10.1016/S0002-9440(10)65704-5.
66. Crane-Godreau, M.A.; Maccani, M.A.; Eszterhas, S.K.; Warner, S.L.; Jukosky, J.A.; Fiering, S. Exposure to Cigarette Smoke Disrupts CCL20-Mediated Antimicrobial Activity in Respiratory Epithelial Cells. *Open Immunol. J.* **2009**, *2*, 86–93, doi:10.2174/1874226200902010086.
67. Amatngalim, G.D.; Schrumpf, J.A.; Henic, A.; Dronkers, E.; Verhoosel, R.M.; Ordonez, S.R.; Haagsman, H.P.; Fuentes, M.E.; Sridhar, S.; Aarbiou, J.; et al. Antibacterial Defense of Human Airway Epithelial Cells from Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients Induced by Acute Exposure to Nontypeable Haemophilus Influenzae:

- Modulation by Cigarette Smoke. *J. Innate Immun.* **2017**, *9*, 359–374, doi:10.1159/000455193.
68. Qian, Y.-J.; Wang, X.; Gao, Y.-F.; Duan, N.; Huang, X.-F.; Sun, F.-F.; Han, X.-D.; Wang, W.-M. Cigarette Smoke Modulates NOD1 Signal Pathway and Human β Defensins Expression in Human Oral Mucosa. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2015**, *36*, 457–473, doi:10.1159/000430112.
 69. Lin, C.-R.; Bahmed, K.; Criner, G.J.; Marchetti, N.; Tuder, R.M.; Kelsen, S.; Bolla, S.; Mandapati, C.; Kosmider, B. S100A8 Protects Human Primary Alveolar Type II Cells against Injury and Emphysema. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2019**, *60*, 299–307, doi:10.1165/rcmb.2018-0144OC.
 70. Herr, C.; Tsitouras, K.; Niederstraßer, J.; Backes, C.; Beisswenger, C.; Dong, L.; Guillot, L.; Keller, A.; Bals, R. Cigarette Smoke and Electronic Cigarettes Differentially Activate Bronchial Epithelial Cells. *Respir. Res.* **2020**, *21*, 67, doi:10.1186/s12931-020-1317-2.
 71. Railwah, C.; Lora, A.; Zahid, K.; Goldenberg, H.; Campos, M.; Wyman, A.; Jundi, B.; Ploszaj, M.; Rivas, M.; Dabo, A.; et al. Cigarette Smoke Induction of S100A9 Contributes to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2020**, *319*, L1021–L1035, doi:10.1152/ajplung.00207.2020.
 72. Duffney, P.F.; McCarthy, C.E.; Nogales, A.; Thatcher, T.H.; Martinez-Sobrido, L.; Phipps, R.P.; Sime, P.J. Cigarette Smoke Dampens Antiviral Signaling in Small Airway Epithelial Cells by Disrupting TLR3 Cleavage. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2018**, *314*, L505–L513, doi:10.1152/ajplung.00406.2017.
 73. Wu, W.; Zhang, W.; Booth, J.L.; Hutchings, D.C.; Wang, X.; White, V.L.; Youness, H.; Cross, C.D.; Zou, M.-H.; Burian, D.; et al. Human Primary Airway Epithelial Cells Isolated from Active Smokers Have Epigenetically Impaired Antiviral Responses. *Respir. Res.* **2016**, *17*, 111, doi:10.1186/s12931-016-0428-2.
 74. Wu, W.; Patel, K.B.; Booth, J.L.; Zhang, W.; Metcalf, J.P. Cigarette Smoke Extract Suppresses the RIG-I-Initiated Innate Immune Response to Influenza Virus in the Human Lung. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **2011**, *300*, L821–L830, doi:10.1152/ajplung.00267.2010.
 75. Danov, O.; Wolff, M.; Bartel, S.; Böhlen, S.; Obernolte, H.; Wronski, S.; Jonigk, D.; Hammer, B.; Kovacevic, D.; Reuter, S.; et al. Cigarette Smoke Affects Dendritic Cell Populations, Epithelial Barrier Function, and the Immune Response to Viral Infection With H1N1. *Front. Med.* **2020**, *7*, 571003, doi:10.3389/fmed.2020.571003.
 76. Modestou, M.A.; Manzel, L.J.; El-Mahdy, S.; Look, D.C. Inhibition of IFN- γ -Dependent Antiviral Airway Epithelial Defense by Cigarette Smoke. *Respir. Res.* **2010**, *11*, 1–18, doi:10.1186/1465-9921-11-64.
 77. Bauer, C.M.T.; Dewitte-Orr, S.J.; Hornby, K.R.; Zavitz, C.C.J.; Lichty, B.D.; Stämpfli, M.R.; Mossman, K.L. Cigarette Smoke Suppresses Type I Interferon-Mediated Antiviral

- Immunity in Lung Fibroblast and Epithelial Cells. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **2008**, *28*, 167–179, doi:10.1089/jir.2007.0054.
78. Singanayagam, A.; Loo, S.-L.; Calderazzo, M.; Finney, L.J.; Trujillo Torralbo, M.-B.; Bakhsoliani, E.; Girkin, J.; Veerati, P.; Pathinayake, P.S.; Nichol, K.S.; et al. Antiviral Immunity Is Impaired in COPD Patients with Frequent Exacerbations. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **2019**, *317*, L893–L903, doi:10.1152/ajplung.00253.2019.
 79. Eddleston, J.; Lee, R.U.; Doerner, A.M.; Herschbach, J.; Zuraw, B.L. Cigarette Smoke Decreases Innate Responses of Epithelial Cells to Rhinovirus Infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2011**, *44*, 118–126, doi:10.1165/rcmb.2009-0266OC.
 80. Jacobs, M.; Van Eeckhoutte, H.P.; Wijnant, S.R.A.; Janssens, W.; Joos, G.F.; Brusselle, G.G.; Bracke, K.R. Increased Expression of ACE2, the SARS-CoV-2 Entry Receptor, in Alveolar and Bronchial Epithelium of Smokers and COPD Subjects. *Eur. Respir. J.* **2020**, *56*, 2002378, doi:10.1183/13993003.02378-2020.
 81. Donaldson, G.C.; Seemungal, T.A.R.; Patel, I.S.; Bhowmik, A.; Wilkinson, T.M.A.; Hurst, J.R.; Maccallum, P.K.; Wedzicha, J.A. Airway and Systemic Inflammation and Decline in Lung Function in Patients with COPD. *Chest* **2005**, *128*, 1995–2004, doi:10.1378/chest.128.4.1995.
 82. Kim, M.; Gu, B.; Madison, M.C.; Song, H.W.; Norwood, K.; Hill, A.A.; Wu, W.-J.; Corry, D.; Kheradmand, F.; Diehl, G.E. Cigarette Smoke Induces Intestinal Inflammation via a Th17 Cell-Neutrophil Axis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 75, doi:10.3389/fimmu.2019.00075.
 83. O'Donnell, R.A.; Peebles, C.; Ward, J.A.; Daraker, A.; Angco, G.; Broberg, P.; Pierrou, S.; Lund, J.; Holgate, S.T.; Davies, D.E.; et al. Relationship between Peripheral Airway Dysfunction, Airway Obstruction, and Neutrophilic Inflammation in COPD. *Thorax* **2004**, *59*, 837–842, doi:10.1136/thx.2003.019349.
 84. Mortaz, E.; Adcock, I.M.; Ito, K.; Kraneveld, A.D.; Nijkamp, F.P.; Folkerts, G. Cigarette Smoke Induces CXCL8 Production by Human Neutrophils via Activation of TLR9 Receptor. *Eur. Respir. J.* **2010**, *36*, 1143–1154, doi:10.1183/09031936.00062209.
 85. Victoni, T.; Gicquel, T.; Bodin, A.; Daude, M.; Tenor, H.; Valença, S.; Devillier, P.; Porto, L.C.; Lagente, V.; Boichot, E. Roflumilast N-Oxide Associated with PGE2 Prevents the Neutrophil Elastase-Induced Production of Chemokines by Epithelial Cells. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *30*, 1–8, doi:10.1016/j.intimp.2015.11.019.
 86. Trivedi, A.; Khan, M.A.; Bade, G.; Talwar, A. Orchestration of Neutrophil Extracellular Traps (Nets), a Unique Innate Immune Function during Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Development. *Biomedicines* **2021**, *9*, 53, doi:10.3390/biomedicines9010053.
 87. Papayannopoulos, V.; Metzler, K.D.; Hakkim, A.; Zychlinsky, A. Neutrophil Elastase and Myeloperoxidase Regulate the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *J. Cell Biol.* **2010**, *191*, 677–691, doi:10.1083/jcb.201006052.

88. Grabcanovic-Musija, F.; Obermayer, A.; Stoiber, W.; Krautgartner, W.-D.; Steinbacher, P.; Winterberg, N.; Bathke, A.C.; Klappacher, M.; Studnicka, M. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation Characterises Stable and Exacerbated COPD and Correlates with Airflow Limitation. *Respir. Res.* **2015**, *16*, 59, doi:10.1186/s12931-015-0221-7.
89. Dicker, A.J.; Crichton, M.L.; Pumphrey, E.G.; Cassidy, A.J.; Suarez-Cuartin, G.; Sibila, O.; Furrie, E.; Fong, C.J.; Ibrahim, W.; Brady, G.; et al. Neutrophil Extracellular Traps Are Associated with Disease Severity and Microbiota Diversity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141*, 117–127, doi:10.1016/j.jaci.2017.04.022.
90. Lonergan, M.; Dicker, A.J.; Crichton, M.L.; Keir, H.R.; Van Dyke, M.K.; Mullerova, H.; Miller, B.E.; Tal-Singer, R.; Chalmers, J.D. Blood Neutrophil Counts Are Associated with Exacerbation Frequency and Mortality in COPD. *Respir. Res.* **2020**, *21*, 166, doi:10.1186/s12931-020-01436-7.
91. Parr, D.G.; White, A.J.; Bayley, D.L.; Guest, P.J.; Stockley, R.A. Inflammation in Sputum Relates to Progression of Disease in Subjects with COPD: A Prospective Descriptive Study. *Respir. Res.* **2006**, *7*, 136, doi:10.1186/1465-9921-7-136.
92. Kim, M.; Gu, B.; Madison, M.C.; Song, H.W.; Norwood, K.; Hill, A.A.; Wu, W.-J.; Corry, D.; Kheradmand, F.; Diehl, G.E. Cigarette Smoke Induces Intestinal Inflammation via a Th17 Cell-Neutrophil Axis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 75, doi:10.3389/fimmu.2019.00075.
93. Sapey, E.; Stockley, J.A.; Greenwood, H.; Ahmad, A.; Bayley, D.; Lord, J.M.; Insall, R.H.; Stockley, R.A. Behavioral and Structural Differences in Migrating Peripheral Neutrophils from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *183*, 1176–1186, doi:10.1164/rccm.201008-1285OC.
94. Shanmugam, L.; Ravinder, S.S.; Johnson, P.; Padmavathi, R.; Rajagopalan, B.; Kindo, A.J. Assessment of Phagocytic Activity of Neutrophils in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Lung India Off. Organ Indian Chest Soc.* **2015**, *32*, 437–440, doi:10.4103/0970-2113.164159.
95. Jaroenpool, J.; Pattanapanyasat, K.; Noonin, N.; Prachongsai, I. Aberrant Neutrophil Function among Heavy Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **2016**, *34*, 278–283, doi:10.12932/AP0724.
96. Zhang, Y.; Geng, S.; Prasad, G.L.; Li, L. Suppression of Neutrophil Antimicrobial Functions by Total Particulate Matter From Cigarette Smoke. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2274, doi:10.3389/fimmu.2018.02274.
97. Lugg, S.T.; Scott, A.; Parekh, D.; Naidu, B.; Thickett, D.R. Cigarette Smoke Exposure and Alveolar Macrophages: Mechanisms for Lung Disease. *Thorax* **2021**, doi:10.1136/thoraxjnl-2020-216296.

98. Eapen, M.S.; Hansbro, P.M.; McAlinden, K.; Kim, R.Y.; Ward, C.; Hackett, T.-L.; Walters, E.H.; Sohal, S.S. Abnormal M1/M2 Macrophage Phenotype Profiles in the Small Airway Wall and Lumen in Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13392, doi:10.1038/s41598-017-13888-x.
99. Hodge, S.; Hodge, G.; Ahern, J.; Jersmann, H.; Holmes, M.; Reynolds, P.N. Smoking Alters Alveolar Macrophage Recognition and Phagocytic Ability: Implications in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2007**, *37*, 748–755, doi:10.1165/rcmb.2007-0025OC.
100. Singh, R.; Belchamber, K.B.R.; Fenwick, P.S.; Chana, K.; Donaldson, G.; Wedzicha, J.A.; Barnes, P.J.; Donnelly, L.E. Defective Monocyte-Derived Macrophage Phagocytosis Is Associated with Exacerbation Frequency in COPD. *Respir. Res.* **2021**, *22*, 1–11, doi:10.1186/s12931-021-01718-8.
101. Todt, J.C.; Freeman, C.M.; Brown, J.P.; Sonstein, J.; Ames, T.M.; McCubbrey, A.L.; Martinez, F.J.; Chensue, S.W.; Beck, J.M.; Curtis, J.L. Smoking Decreases the Response of Human Lung Macrophages to Double-Stranded RNA by Reducing TLR3 Expression. *Respir. Res.* **2013**, *14*, 33, doi:10.1186/1465-9921-14-33.
102. Gaschler, G.J.; Zavitz, C.C.J.; Bauer, C.M.T.; Skrtic, M.; Lindahl, M.; Robbins, C.S.; Chen, B.; Stämpfli, M.R. Cigarette Smoke Exposure Attenuates Cytokine Production by Mouse Alveolar Macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2008**, *38*, 218–226, doi:10.1165/rcmb.2007-0053OC.
103. Barchet, W.; Cella, M.; Colonna, M. Plasmacytoid Dendritic Cells--Virus Experts of Innate Immunity. *Semin. Immunol.* **2005**, *17*, 253–261, doi:10.1016/j.smim.2005.05.008.
104. Mildner, A.; Jung, S. Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity* **2014**, *40*, 642–656, doi:10.1016/j.immuni.2014.04.016.
105. Segura, E.; Amigorena, S. Chapter One - Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. In *Advances in Immunology*; Alt, F.W., Ed.; Academic Press, 2015; Vol. 127, pp. 1–31.
106. León, B.; López-Bravo, M.; Ardavín, C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. *Immunity* **2007**, *26*, 519–531, doi:10.1016/j.immuni.2007.01.017.
107. Greter, M.; Helft, J.; Chow, A.; Hashimoto, D.; Mortha, A.; Agudo-Cantero, J.; Bogunovic, M.; Gautier, E.L.; Miller, J.; Leboeuf, M.; et al. GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* **2012**, *36*, 1031–1046, doi:10.1016/j.immuni.2012.03.027.
108. Ballesteros-Tato, A.; León, B.; Lund, F.E.; Randall, T.D. Temporal Changes in Dendritic Cell Subsets, Cross-Priming and Costimulation via CD70 Control CD8(+) T Cell Responses to Influenza. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 216–224, doi:10.1038/ni.1838.

109. Hammad, H.; Plantinga, M.; Deswarte, K.; Pouliot, P.; Willart, M.A.M.; Kool, M.; Muskens, F.; Lambrecht, B.N. Inflammatory Dendritic Cells—Not Basophils—Are Necessary and Sufficient for Induction of Th2 Immunity to Inhaled House Dust Mite Allergen. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 2097–2111, doi:10.1084/jem.20101563.
110. Kuang, L.-J.; Deng, T.-T.; Wang, Q.; Qiu, S.-L.; Liang, Y.; He, Z.-Y.; Zhang, J.-Q.; Bai, J.; Li, M.-H.; Deng, J.-M.; et al. Dendritic Cells Induce Tc1 Cell Differentiation via the CD40/CD40L Pathway in Mice after Exposure to Cigarette Smoke. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **2016**, *311*, L581–L589, doi:10.1152/ajplung.00002.2016.
111. Botelho, F.M.; Nikota, J.K.; Bauer, C.M.T.; Morissette, M.C.; Iwakura, Y.; Kolbeck, R.; Finch, D.; Humbles, A.A.; Stämpfli, M.R. Cigarette Smoke-Induced Accumulation of Lung Dendritic Cells Is Interleukin-1 α -Dependent in Mice. *Respir. Res.* **2012**, *13*, 81, doi:10.1186/1465-9921-13-81.
112. Givi, M.E.; Akbari, P.; Boon, L.; Puzovic, V.S.; Bezemer, G.F.G.; Ricciardolo, F.L.M.; Folkerts, G.; Redegeld, F.A.; Mortaz, E. Dendritic Cells Inversely Regulate Airway Inflammation in Cigarette Smoke-Exposed Mice. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **2016**, *310*, L95–L102, doi:10.1152/ajplung.00251.2014.
113. Mulligan, J.K.; O’Connell, B.P.; Pasquini, W.; Mulligan, R.M.; Smith, S.; Soler, Z.M.; Atkinson, C.; Schlosser, R.J. Impact of Tobacco Smoke on Upper Airway Dendritic Cell Accumulation and Regulation by Sinonasal Epithelial Cells. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2017**, *7*, 777–785, doi:10.1002/alr.21955.
114. Demedts, I.K.; Bracke, K.R.; Van Pottelberge, G.; Testelmans, D.; Verleden, G.M.; Vermassen, F.E.; Joos, G.F.; Brusselle, G.G. Accumulation of Dendritic Cells and Increased CCL20 Levels in the Airways of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2007**, *175*, 998–1005, doi:10.1164/rccm.200608-1113OC.
115. Danov, O.; Wolff, M.; Bartel, S.; Böhlen, S.; Obernolte, H.; Wronski, S.; Jonigk, D.; Hammer, B.; Kovacevic, D.; Reuter, S.; et al. Cigarette Smoke Affects Dendritic Cell Populations, Epithelial Barrier Function, and the Immune Response to Viral Infection With H1N1. *Front. Med.* **2020**, *7*, 571003, doi:10.3389/fmed.2020.571003.
116. Robbins, C.S.; Dawe, D.E.; Goncharova, S.I.; Pouladi, M.A.; Drannik, A.G.; Swirski, F.K.; Cox, G.; Stämpfli, M.R. Cigarette Smoke Decreases Pulmonary Dendritic Cells and Impacts Antiviral Immune Responsiveness. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2004**, *30*, 202–211, doi:10.1165/rcmb.2003-0259OC.
117. Robbins, C.S.; Franco, F.; Mouded, M.; Cernadas, M.; Shapiro, S.D. Cigarette Smoke Exposure Impairs Dendritic Cell Maturation and T Cell Proliferation in Thoracic Lymph Nodes of Mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2008**, *180*, 6623–6628, doi:10.4049/jimmunol.180.10.6623.
118. Rogers, A.V.; Ädelroth, E.; Hattotuwa, K.; Dewar, A.; Jeffery, P.K. Bronchial Mucosal Dendritic Cells in Smokers and Ex-Smokers with COPD: An Electron Microscopic Study. *Thorax* **2008**, *63*, 108–114, doi:10.1136/thx.2007.078253.

119. Tsoumakidou, M.; Koutsopoulos, A.V.; Tzanakis, N.; Dambaki, K.; Tzortzaki, E.; Zakyntinos, S.; Jeffery, P.K.; Siafakas, N.M. Decreased Small Airway and Alveolar CD83+ Dendritic Cells in COPD. *Chest* **2009**, *136*, 726–733, doi:10.1378/chest.08-2824.
120. Liao, S.-X.; Ding, T.; Rao, X.-M.; Sun, D.-S.; Sun, P.-P.; Wang, Y.-J.; Fu, D.-D.; Liu, X.-L.; Ou-Yang, Y. Cigarette Smoke Affects Dendritic Cell Maturation in the Small Airways of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11*, 219–225, doi:10.3892/mmr.2014.2759.
121. Roghanian, A.; Drost, E.M.; MacNee, W.; Howie, S.E.M.; Sallenave, J.-M. Inflammatory Lung Secretions Inhibit Dendritic Cell Maturation and Function via Neutrophil Elastase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, *174*, 1189–1198, doi:10.1164/rccm.200605-632OC.
122. Vassallo, R.; Kroening, P.R.; Parambil, J.; Kita, H. Nicotine and Oxidative Cigarette Smoke Constituents Induce Immune-Modulatory and pro-Inflammatory Dendritic Cell Responses. *Mol. Immunol.* **2008**, *45*, 3321–3329, doi:10.1016/j.molimm.2008.04.014.
123. Nouri-Shirazi, M.; Tinajero, R.; Guinet, E. Nicotine Alters the Biological Activities of Developing Mouse Bone Marrow-Derived Dendritic Cells (DCs). *Immunol. Lett.* **2007**, *109*, 155–164, doi:10.1016/j.imlet.2007.02.005.
124. Pichavant, M.; Sharan, R.; Le Rouzic, O.; Olivier, C.; Hennegrave, F.; Rémy, G.; Pérez-Cruz, M.; Koné, B.; Gosset, P.; Just, N.; et al. IL-22 Defect During Streptococcus Pneumoniae Infection Triggers Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *EBioMedicine* **2015**, *2*, 1686–1696, doi:10.1016/j.ebiom.2015.09.040.
125. Givi, M.E.; Folkerts, G.; Wagenaar, G.T.M.; Redegeld, F.A.; Mortaz, E. Cigarette Smoke Differentially Modulates Dendritic Cell Maturation and Function in Time. *Respir. Res.* **2015**, *16*, 131, doi:10.1186/s12931-015-0291-6.
126. Le Rouzic, O.; Koné, B.; Kluza, J.; Marchetti, P.; Hennegrave, F.; Olivier, C.; Kervoaze, G.; Vilain, E.; Mordacq, C.; Just, N.; et al. Cigarette Smoke Alters the Ability of Human Dendritic Cells to Promote Anti-Streptococcus Pneumoniae Th17 Response. *Respir. Res.* **2016**, *17*, 94, doi:10.1186/s12931-016-0408-6.
127. Nakano, H.; Burgents, J.; Nakano, K.; Whitehead, G.; Cheong, C.; Bortner, C.; Cook, D. Migratory Properties of Pulmonary Dendritic Cells Are Determined by Their Developmental Lineage. *Mucosal Immunol.* **2013**, *6*, 678–691, doi:10.1038/mi.2012.106.
128. Muñoz-Wolf, N.; Lavelle, E.C. A Guide to IL-1 Family Cytokines in Adjuvanticity. *FEBS J.* **2018**, *285*, 2377–2401, doi:10.1111/febs.14467.
129. Brozyna, S.; Ahern, J.; Hodge, G.; Nairn, J.; Holmes, M.; Reynolds, P.N.; Hodge, S. Chemotactic Mediators of Th1 T-Cell Trafficking in Smokers and COPD Patients. *COPD* **2009**, *6*, 4–16, doi:10.1080/15412550902724164.

130. Christenson, S.A.; van den Berge, M.; Faiz, A.; Inkamp, K.; Bhakta, N.; Bonser, L.R.; Zlock, L.T.; Barjaktarevic, I.Z.; Barr, R.G.; Bleeker, E.R.; et al. An Airway Epithelial IL-17A Response Signature Identifies a Steroid-Unresponsive COPD Patient Subgroup. *J. Clin. Invest.* **2019**, *129*, 169–181, doi:10.1172/JCI121087.
131. Zhang, L.; Cheng, Z.; Liu, W.; Wu, K. Expression of Interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in Serum and Sputum of Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *COPD* **2013**, *10*, 459–465, doi:10.3109/15412555.2013.770456.
132. D’hulst, A.I.; Maes, T.; Bracke, K.R.; Demedts, I.K.; Tournoy, K.G.; Joos, G.F.; Brusselle, G.G. Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Emphysema in Scid-Mice. Is the Acquired Immune System Required? *Respir. Res.* **2005**, *6*, 147, doi:10.1186/1465-9921-6-147.
133. Lugade, A.A.; Bogner, P.N.; Thatcher, T.H.; Sime, P.J.; Phipps, R.P.; Thanavala, Y. Cigarette Smoke Exposure Exacerbates Lung Inflammation and Compromises Immunity to Bacterial Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2014**, *192*, 5226–5235, doi:10.4049/jimmunol.1302584.
134. Geerdink, J.X.; Simons, S.O.; Pike, R.; Stauss, H.J.; Heijdra, Y.F.; Hurst, J.R. Differences in Systemic Adaptive Immunity Contribute to the ‘Frequent Exacerbator’ COPD Phenotype. *Respir. Res.* **2016**, *17*, 140, doi:10.1186/s12931-016-0456-y.
135. Xu, W.-H.; Hu, X.-L.; Liu, X.-F.; Bai, P.; Sun, Y.-C. Peripheral Tc17 and Tc17/Interferon- γ Cells Are Increased and Associated with Lung Function in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin. Med. J. (Engl.)* **2016**, *129*, 909–916, doi:10.4103/0366-6999.179798.
136. Paats, M.S.; Bergen, I.M.; Hoogsteden, H.C.; Eerden, M.M. van der; Hendriks, R.W. Systemic CD4+ and CD8+ T-Cell Cytokine Profiles Correlate with GOLD Stage in Stable COPD. *Eur. Respir. J.* **2012**, *40*, 330–337, doi:10.1183/09031936.00079611.
137. Zhu, X.; Gadgil, A.S.; Givelber, R.; George, M.P.; Stoner, M.W.; Sciruba, F.C.; Duncan, S.R. Peripheral T Cell Functions Correlate with the Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 3270–3277, doi:10.4049/jimmunol.0802622.
138. Lugade, A.A.; Bogner, P.N.; Thatcher, T.H.; Sime, P.J.; Phipps, R.P.; Thanavala, Y. Cigarette Smoke Exposure Exacerbates Lung Inflammation and Compromises Immunity to Bacterial Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2014**, *192*, 5226–5235, doi:10.4049/jimmunol.1302584.
139. Freeman, C.M.; Martinez, F.J.; Han, M.K.; Washko, G.R.; McCubbrey, A.L.; Chensue, S.W.; Arenberg, D.A.; Meldrum, C.A.; McCloskey, L.; Curtis, J.L. Lung CD8+ T Cells in COPD Have Increased Expression of Bacterial TLRs. *Respir. Res.* **2013**, *14*, 13, doi:10.1186/1465-9921-14-13.
140. Ito, J.T.; Cervilha, D.A. de B.; Lourenço, J.D.; Gonçalves, N.G.; Volpini, R.A.; Caldini, E.G.; Landman, G.; Lin, C.J.; Velosa, A.P.P.; Teodoro, W.P.R.; et al. Th17/Treg

- Imbalance in COPD Progression: A Temporal Analysis Using a CS-Induced Model. *PLoS One* **2019**, *14*, e0209351, doi:10.1371/journal.pone.0209351.
141. Wang, H.; Peng, W.; Weng, Y.; Ying, H.; Li, H.; Xia, D.; Yu, W. Imbalance of Th17/Treg Cells in Mice with Chronic Cigarette Smoke Exposure. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *14*, 504–512, doi:10.1016/j.intimp.2012.09.011.
 142. Chen, L.; Chen, G.; Zhang, M.-Q.; Xiong, X.-Z.; Liu, H.-J.; Xin, J.-B.; Zhang, J.-C.; Wu, J.-H.; Meng, Z.-J.; Sun, S.-W. Imbalance between Subsets of CD8+ Peripheral Blood T Cells in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PeerJ* **2016**, *4*, e2301, doi:10.7717/peerj.2301.
 143. Siena, L.; Gjomarkaj, M.; Elliot, J.; Pace, E.; Bruno, A.; Baraldo, S.; Saetta, M.; Bonsignore, M.R.; James, A. Reduced Apoptosis of CD8+ T-Lymphocytes in the Airways of Smokers with Mild/Moderate COPD. *Respir. Med.* **2011**, *105*, 1491–1500, doi:10.1016/j.rmed.2011.04.014.
 144. Xu, X.; Araki, K.; Li, S.; Han, J.-H.; Ye, L.; Tan, W.G.; Konieczny, B.T.; Bruinsma, M.W.; Martinez, J.; Pearce, E.L.; et al. Autophagy Is Essential for Effector CD8+ T Cell Survival and Memory Formation. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 1152–1161, doi:10.1038/ni.3025.
 145. Zhuang, H.; Li, N.; Chen, S.; Shen, Y.; Zhan, W.; Xu, X.; Zhuo, S. Correlation between Level of Autophagy and Frequency of CD8+ T Cells in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Int. Med. Res.* **2020**, *48*, 0300060520952638, doi:10.1177/0300060520952638.
 146. Borchers, M.T.; Wesselkamper, S.C.; Harris, N.L.; Deshmukh, H.; Beckman, E.; Vitucci, M.; Tichelaar, J.W.; Leikauf, G.D. CD8+ T Cells Contribute to Macrophage Accumulation and Airspace Enlargement Following Repeated Irritant Exposure. *Exp. Mol. Pathol.* **2007**, *83*, 301–310, doi:10.1016/j.yexmp.2007.08.020.
 147. Lieberman, J. The ABCs of Granule-Mediated Cytotoxicity: New Weapons in the Arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 361–370, doi:10.1038/nri1083.
 148. Kim, W.-D.; Chi, H.-S.; Choe, K.-H.; Oh, Y.-M.; Lee, S.-D.; Kim, K.-R.; Yoo, K.-H.; Ngan, D.A.; Elliott, W.M.; Granville, D.J.; et al. A Possible Role for CD8+ and Non-CD8+ Cell Granzyme B in Early Small Airway Wall Remodelling in Centrilobular Emphysema. *Respirology* **2013**, *18*, 688–696, doi:10.1111/resp.12069.
 149. Burchiel, S.W.; Lauer, F.T.; Factor-Litvak, P.; Liu, X.; Santella, R.M.; Islam, T.; Eunos, M.; Alam, N.; Islam, T.; Rahman, M.; et al. An Increase in Circulating B Cells and B Cell Activation Markers in Peripheral Blood Is Associated with Cigarette Smoking in a Male Cohort in Bangladesh. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2019**, *384*, 114783, doi:10.1016/j.taap.2019.114783.
 150. Hogg, J.C.; Chu, F.; Utokaparch, S.; Woods, R.; Elliott, W.M.; Buzatu, L.; Cherniack, R.M.; Rogers, R.M.; Sciruba, F.C.; Coxson, H.O.; et al. The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2645–2653, doi:10.1056/NEJMoa032158.

151. Brandsma, C.-A.; Hylkema, M.N.; van der Strate, B.W.A.; Slebos, D.-J.; Luinge, M.A.; Geerlings, M.; Timens, W.; Postma, D.S.; Kerstjens, H.A.M. Heme Oxygenase-1 Prevents Smoke Induced B-Cell Infiltrates: A Role for Regulatory T Cells? *Respir. Res.* **2008**, *9*, 17, doi:10.1186/1465-9921-9-17.
152. Cui, W.; Zhang, Z.; Zhang, P.; Qu, J.; Zheng, C.; Mo, X.; Zhou, W.; Xu, L.; Yao, H.; Gao, J. Nrf2 Attenuates Inflammatory Response in COPD/Emphysema: Crosstalk with Wnt3a/ β -Catenin and AMPK Pathways. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, *22*, 3514–3525, doi:10.1111/jcmm.13628.
153. Nascimento, M.; Huot-Marchand, S.; Gombault, A.; Panek, C.; Bourinet, M.; Fanny, M.; Savigny, F.; Schneider, P.; Le Bert, M.; Ryffel, B.; et al. B-Cell Activating Factor Secreted by Neutrophils Is a Critical Player in Lung Inflammation to Cigarette Smoke Exposure. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1622, doi:10.3389/fimmu.2020.01622.
154. Seys, L.J.M.; Verhamme, F.M.; Schinwald, A.; Hammad, H.; Cunoosamy, D.M.; Bantsimba-Malanda, C.; Sabirsh, A.; McCall, E.; Flavell, L.; Herbst, R.; et al. Role of B Cell-Activating Factor in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, doi:10.1164/rccm.201501-0103OC.
155. Ladjemi, M.Z.; Martin, C.; Lecocq, M.; Detry, B.; Nana, F.A.; Moulin, C.; Weynand, B.; Fregimilicka, C.; Bouzin, C.; Thurion, P.; et al. Increased IgA Expression in Lung Lymphoid Follicles in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2019**, *199*, 592–602, doi:10.1164/rccm.201802-0352OC.
156. Li, G.; Wulan, H.; Song, Z.; Paik, P.A.; Tsao, M.L.; Goodman, G.M.; MacEachern, P.T.; Downey, R.S.; Jankowska, A.J.; Rabinowitz, Y.M.; et al. Regulatory B Cell Function Is Suppressed by Smoking and Obesity in H. Pylori-Infected Subjects and Is Correlated with Elevated Risk of Gastric Cancer. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0134591, doi:10.1371/journal.pone.0134591.
157. Das, A.; Ellis, G.; Pallant, C.; Lopes, A.R.; Khanna, P.; Peppas, D.; Chen, A.; Blair, P.; Dusheiko, G.; Gill, U.; et al. IL-10-Producing Regulatory B Cells in the Pathogenesis of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2012**, *189*, 3925–3935, doi:10.4049/jimmunol.1103139.
158. Murphy, T.F.; Sethi, S. Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1992**, *146*, 1067–1083, doi:10.1164/ajrccm/146.4.1067.
159. Adams, W.; Bhowmick, R.; Bou Ghanem, E.N.; Wade, K.; Shchepetov, M.; Weiser, J.N.; McCormick, B.A.; Tweten, R.K.; Leong, J.M. Pneumolysin Induces 12-Lipoxygenase-Dependent Neutrophil Migration during Streptococcus Pneumoniae Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2020**, *204*, 101–111, doi:10.4049/jimmunol.1800748.
160. Papi, A.; Bellettato, C.M.; Braccioni, F.; Romagnoli, M.; Casolari, P.; Caramori, G.; Fabbri, L.M.; Johnston, S.L. Infections and Airway Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severe Exacerbations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, *173*, 1114–1121, doi:10.1164/rccm.200506-859OC.

161. Soler-Cataluña, J.J.; Martínez-García, M.Á.; Sánchez, P.R.; Salcedo, E.; Navarro, M.; Ochando, R. Yy. *Thorax* **2005**, *60*, 925–931, doi:10.1136/thx.2005.040527.
162. Halpin, D.M.G.; Decramer, M.; Celli, B.R.; Mueller, A.; Metzdorf, N.; Tashkin, D.P. Effect of a Single Exacerbation on Decline in Lung Function in COPD. *Respir. Med.* **2017**, *128*, 85–91, doi:10.1016/j.rmed.2017.04.013.
163. Hogeia, S.-P.; Tudorache, E.; Fildan, A.P.; Fira-Mladinescu, O.; Marc, M.; Oancea, C. Risk Factors of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations. *Clin. Respir. J.* **2020**, *14*, 183–197, doi:10.1111/crj.13129.
164. Decramer, M.; Janssens, W.; Miravittles, M. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Lancet* **2012**, *379*, 1341–1351, doi:10.1016/S0140-6736(11)60968-9.
165. Simoni-Wastila, L.; Wei, Y.-J.; Qian, J.; Zuckerman, I.H.; Stuart, B.; Shaffer, T.; Dalal, A.A.; Bryant-Comstock, L. Association of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Maintenance Medication Adherence with All-Cause Hospitalization and Spending in a Medicare Population. *Am. J. Geriatr. Pharmacother.* **2012**, *10*, 201–210, doi:10.1016/j.amjopharm.2012.04.002.
166. Bender, B.G. Nonadherence to COPD Treatment: What Have We Learned and What Do We Do Next? *COPD* **2012**, *9*, 209–210, doi:10.3109/15412555.2012.679880.
167. Scanlon, P.D.; Connett, J.E.; Waller, L.A.; Altose, M.D.; Bailey, W.C.; Sonia Buist, A.; e Lung Health Study Research Group, D.P.T. for th Smoking Cessation and Lung Function in Mild-to-Moderate Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *161*, 381–390, doi:10.1164/ajrccm.161.2.9901044.
168. Etude PolluBPCO : une corrélation entre les pics d’hospitalisation et de la qualité de l’air. *Atmo Fr.* 2019.
169. Ko, F.W.S.; Hui, D.S.C. Air Pollution and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respirol. Carlton Vic* **2012**, *17*, 395–401, doi:10.1111/j.1440-1843.2011.02112.x.
170. Tiew, P.Y.; Ko, F.W.S.; Pang, S.L.; Matta, S.A.; Sio, Y.Y.; Poh, M.E.; Lau, K.J.X.; Mac Aogáin, M.; Jaggi, T.K.; Ivan, F.X.; et al. Environmental Fungal Sensitisation Associates with Poorer Clinical Outcomes in COPD. *Eur. Respir. J.* **2020**, *56*, 2000418, doi:10.1183/13993003.00418-2020.
171. Huerta, A.; Soler, N.; Esperatti, M.; Guerrero, M.; Menendez, R.; Gimeno, A.; Zalacaín, R.; Mir, N.; Aguado, J.M.; Torres, A. Importance of Aspergillus Spp. Isolation in Acute Exacerbations of Severe COPD: Prevalence, Factors and Follow-up: The FUNGI-COPD Study. *Respir. Res.* **2014**, *15*, 1–9, doi:10.1186/1465-9921-15-17.
172. Su, J.; Liu, H.; Tan, X.; Ji, Y.; Jiang, Y.; Prabhakar, M.; Rong, Z.; Zhou, H.; Zhang, G. Sputum Bacterial and Fungal Dynamics during Exacerbations of Severe COPD. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130736, doi:10.1371/journal.pone.0130736.

173. Fahmy, E.A.; Abdelwahab, H.W.; Eldegla, H.E.; Elbadrawy, M.K.F. The Role of Infectious Pathogens in Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Dakahlia Governorate. *Egypt. J. Bronchol.* **2020**, *14*, 1–9, doi:10.1186/s43168-020-00039-6.
174. Tiew, P.Y.; Dicker, A.J.; Keir, H.R.; Poh, M.E.; Pang, S.L.; Mac Aogáin, M.; Chua, B.Q.Y.; Tan, J.L.; Xu, H.; Koh, M.S.; et al. A High-Risk Airway Mycobiome Is Associated with Frequent Exacerbation and Mortality in COPD. *Eur. Respir. J.* **2021**, *57*, 2002050, doi:10.1183/13993003.02050-2020.
175. Wrench, C.; Belchamber, K.B.R.; Bercusson, A.; Shah, A.; Barnes, P.J.; Armstrong-James, D.; Donnelly, L.E. Reduced Clearance of Fungal Spores by Chronic Obstructive Pulmonary Disease GM-CSF– and M-CSF–Derived Macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2018**, doi:10.1165/rcmb.2017-0351LE.
176. Wu, Y.; Xu, H.; Li, L.; Yuan, W.; Zhang, D.; Huang, W. Susceptibility to Aspergillus Infections in Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease via Deficiency Function of Alveolar Macrophages and Impaired Activation of TLR2. *Inflammation* **2016**, *39*, 1310–1318, doi:10.1007/s10753-016-0363-x.
177. Sethi, S.; Evans, N.; Grant, B.J.B.; Murphy, T.F. New Strains of Bacteria and Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 465–471, doi:10.1056/NEJMoa012561.
178. Bafadhel, M.; McKenna, S.; Terry, S.; Mistry, V.; Reid, C.; Haldar, P.; McCormick, M.; Haldar, K.; Kebabdz, T.; Duvoix, A.; et al. Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *184*, 662–671, doi:10.1164/rccm.201104-0597OC.
179. Sethi, S.; Murphy, T.F. Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2355–2365, doi:10.1056/NEJMra0800353.
180. Duell, B.L.; Su, Y.-C.; Riesbeck, K. Host–Pathogen Interactions of Nontypeable Haemophilus Influenzae: From Commensal to Pathogen. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 3840–3853, doi:10.1002/1873-3468.12351.
181. Langereis, J.D.; de Jonge, M.I.; Weiser, J.N. Binding of Human Factor H to Outer Membrane Protein P5 of Non-Typeable Haemophilus Influenzae Contributes to Complement Resistance. *Mol. Microbiol.* **2014**, *94*, 89–106, doi:10.1111/mmi.12741.
182. Langereis, J.D.; Stol, K.; Schweda, E.K.; Twelkmeyer, B.; Bootsma, H.J.; de Vries, S.P.W.; Burghout, P.; Diavatopoulos, D.A.; Hermans, P.W.M. Modified Lipooligosaccharide Structure Protects Nontypeable Haemophilus Influenzae from IgM-Mediated Complement Killing in Experimental Otitis Media. *mBio* **2012**, *3*, e00079-00012, doi:10.1128/mBio.00079-12.
183. Su, Y.-C.; Mukherjee, O.; Singh, B.; Hallgren, O.; Westergren-Thorsson, G.; Hood, D.; Riesbeck, K. Haemophilus Influenzae P4 Interacts With Extracellular Matrix Proteins

- Promoting Adhesion and Serum Resistance. *J. Infect. Dis.* **2016**, *213*, 314–323, doi:10.1093/infdis/jiv374.
184. Hong, W.; Mason, K.; Jurcisek, J.; Novotny, L.; Bakaletz, L.O.; Swords, W.E. Phosphorylcholine Decreases Early Inflammation and Promotes the Establishment of Stable Biofilm Communities of Nontypeable Haemophilus Influenzae Strain 86-028NP in a Chinchilla Model of Otitis Media. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 958–965, doi:10.1128/IAI.01691-06.
185. Pang, B.; Hong, W.; Kock, N.D.; Swords, W.E. Dps Promotes Survival of Nontypeable Haemophilus Influenzae in Biofilm Communities in Vitro and Resistance to Clearance in Vivo. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 58, doi:10.3389/fcimb.2012.00058.
186. Clarke, C.; Bakaletz, L.O.; Ruiz-Guiñazú, J.; Borys, D.; Mrkvan, T. Impact of Protein D-Containing Pneumococcal Conjugate Vaccines on Non-Typeable Haemophilus Influenzae Acute Otitis Media and Carriage. *Expert Rev. Vaccines* **2017**, *16*, 1–14, doi:10.1080/14760584.2017.1333905.
187. Taking a Multidisciplinary Approach to Allergy and Immunology.
188. Van Damme, P.; Leroux-Roels, G.; Vandermeulen, C.; De Ryck, I.; Tasciotti, A.; Dozot, M.; Moraschini, L.; Testa, M.; Arora, A.K. Safety and Immunogenicity of Non-Typeable Haemophilus Influenzae-Moraxella Catarrhalis Vaccine. *Vaccine* **2019**, *37*, 3113–3122, doi:10.1016/j.vaccine.2019.04.041.
189. Kadioglu, A.; Weiser, J.N.; Paton, J.C.; Andrew, P.W. The Role of Streptococcus Pneumoniae Virulence Factors in Host Respiratory Colonization and Disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 288–301, doi:10.1038/nrmicro1871.
190. Tu, A.H.; Fulgham, R.L.; McCrory, M.A.; Briles, D.E.; Szalai, A.J. Pneumococcal Surface Protein A Inhibits Complement Activation by Streptococcus Pneumoniae. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 4720–4724, doi:10.1128/IAI.67.9.4720-4724.1999.
191. Berry, A.M.; Paton, J.C. Additive Attenuation of Virulence of Streptococcus Pneumoniae by Mutation of the Genes Encoding Pneumolysin and Other Putative Pneumococcal Virulence Proteins. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 133–140, doi:10.1128/IAI.68.1.133-140.2000.
192. Dowson, C.G.; Hutchison, A.; Woodford, N.; Johnson, A.P.; George, R.C.; Spratt, B.G. Penicillin-Resistant Viridans Streptococci Have Obtained Altered Penicillin-Binding Protein Genes from Penicillin-Resistant Strains of Streptococcus Pneumoniae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 5858–5862, doi:10.1073/pnas.87.15.5858.
193. Hui, D.S.; Ip, M.; Ling, T.; Chang, S.-C.; Liao, C.-H.; Yoo, C.-G.; Kim, D.-K.; Yoon, H.-I.; Udompanich, V.; Mogmeud, S.; et al. A Multicentre Surveillance Study on the Characteristics, Bacterial Aetiologies and in Vitro Antibiotic Susceptibilities in Patients with Acute Exacerbations of Chronic Bronchitis. *Respirology* **2011**, *16*, 532–539, doi:10.1111/j.1440-1843.2011.01943.x.

194. Froes, F.; Roche, N.; Blasi, F. Pneumococcal Vaccination and Chronic Respiratory Diseases. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2017**, *12*, 3457–3468, doi:10.2147/COPD.S140378.
195. Walters, J.A.; Tang, J.N.Q.; Poole, P.; Wood-Baker, R. Pneumococcal Vaccines for Preventing Pneumonia in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, *1*, CD001390, doi:10.1002/14651858.CD001390.pub4.
196. Su, Y.-C.; Jalalvand, F.; Thegerström, J.; Riesbeck, K. The Interplay Between Immune Response and Bacterial Infection in COPD: Focus Upon Non-Typeable Haemophilus Influenzae. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2530, doi:10.3389/fimmu.2018.02530.
197. Koppe, U.; Suttorp, N.; Opitz, B. Recognition of Streptococcus Pneumoniae by the Innate Immune System. *Cell. Microbiol.* **2012**, *14*, 460–466, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x.
198. King, P.T.; Sharma, R. The Lung Immune Response to Nontypeable Haemophilus Influenzae (Lung Immunity to NTHi). *J. Immunol. Res.* **2015**, *2015*, e706376, doi:10.1155/2015/706376.
199. Wieland, C.W.; Florquin, S.; Maris, N.A.; Hoebe, K.; Beutler, B.; Takeda, K.; Akira, S.; Poll, T. van der The MyD88-Dependent, but Not the MyD88-Independent, Pathway of TLR4 Signaling Is Important in Clearing Nontypeable Haemophilus Influenzae from the Mouse Lung. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 6042–6049, doi:10.4049/jimmunol.175.9.6042.
200. Wang, X.; Moser, C.; Louboutin, J.-P.; Lysenko, E.S.; Weiner, D.J.; Weiser, J.N.; Wilson, J.M. Toll-Like Receptor 4 Mediates Innate Immune Responses to Haemophilus Influenzae Infection in Mouse Lung. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 810–815, doi:10.4049/jimmunol.168.2.810.
201. Vella, G.; Ritzmann, F.; Wolf, L.; Kamyschnikov, A.; Stodden, H.; Herr, C.; Slevogt, H.; Bals, R.; Beisswenger, C. IL-17C Contributes to NTHi-Induced Inflammation and Lung Damage in Experimental COPD and Is Present in Sputum during Acute Exacerbations. *PloS One* **2021**, *16*, e0243484, doi:10.1371/journal.pone.0243484.
202. Shimamura, M.; Yamamura, M.; Nabeshima, T.; Kitano, N.; van den Elzen, P.; Yesilkaya, H.; Andrew, P.; Illarionov, P. Activation of Invariant Natural Killer T Cells Stimulated with Microbial α -Mannosyl Glycolipids. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9703, doi:10.1038/s41598-017-10309-x.
203. Hassane, M.; Demon, D.; Soulard, D.; Fontaine, J.; Keller, L.E.; Patin, E.C.; Porte, R.; Prinz, I.; Ryffel, B.; Kadioglu, A.; et al. Neutrophilic NLRP3 Inflammasome-Dependent IL-1 β Secretion Regulates the $\gamma\delta$ T17 Cell Response in Respiratory Bacterial Infections. *Mucosal Immunol.* **2017**, *10*, 1056–1068, doi:10.1038/mi.2016.113.
204. Wallington, J.C.; Williams, A.P.; Staples, K.J.; Wilkinson, T.M.A. IL-12 and IL-7 Synergize to Control Mucosal-Associated Invariant T-Cell Cytotoxic Responses to Bacterial Infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141*, 2182-2195.e6, doi:10.1016/j.jaci.2017.08.009.

205. Noda, K.; Kodama, S.; Umemoto, S.; Nomi, N.; Hirano, T.; Suzuki, M. Th17 Cells Contribute to Nontypeable Haemophilus Influenzae-Specific Protective Immunity Induced by Nasal Vaccination with P6 Outer Membrane Protein and α -Galactosylceramide. *Microbiol. Immunol.* **2011**, *55*, 574–581, doi:10.1111/j.1348-0421.2011.00352.x.
206. Li, W.; Zhang, X.; Yang, Y.; Yin, Q.; Wang, Y.; Li, Y.; Wang, C.; Wong, S.M.; Wang, Y.; Goldfine, H.; et al. Recognition of Conserved Antigens by Th17 Cells Provides Broad Protection against Pulmonary Haemophilus Influenzae Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, E7149–E7157, doi:10.1073/pnas.1802261115.
207. Olliver, M.; Hiew, J.; Mellroth, P.; Henriques-Normark, B.; Bergman, P. Human Monocytes Promote Th1 and Th17 Responses to Streptococcus Pneumoniae ∇ . *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 4210–4217, doi:10.1128/IAI.05286-11.
208. Lugade, A.A.; Vethanayagam, R.R.; Nasirikenari, M.; Bogner, P.N.; Segal, B.H.; Thanavala, Y. Nrf2 Regulates Chronic Lung Inflammation and B-Cell Responses to Nontypeable Haemophilus Influenzae. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2012**, doi:10.1165/rcmb.2010-0321OC.
209. Knobloch, J.; Panek, S.; Yanik, S.D.; Jamal Jameel, K.; Bendella, Z.; Jungck, D.; Bürger, P.; Bühlhoff, E.; Struck, B.; Giannakis, N.; et al. The Monocyte-Dependent Immune Response to Bacteria Is Suppressed in Smoking-Induced COPD. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **2019**, *97*, 817–828, doi:10.1007/s00109-019-01778-w.
210. Wang, R.; Ahmed, J.; Wang, G.; Hassan, I.; Strulovici-Barel, Y.; Salit, J.; Mezey, J.G.; Crystal, R.G. Airway Epithelial Expression of TLR5 Is Downregulated in Healthy Smokers and Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2012**, *189*, 2217–2225, doi:10.4049/jimmunol.1101895.
211. Koné, B.; Pérez-Cruz, M.; Porte, R.; Hennegrave, F.; Carnoy, C.; Gosset, P.; Trottein, F.; Sirard, J.-C.; Pichavant, M.; Gosset, P. Boosting the IL-22 Response Using Flagellin Prevents Bacterial Infection in Cigarette Smoke-Exposed Mice. *Clin. Exp. Immunol.* **2020**, *201*, 171–186, doi:10.1111/cei.13445.
212. Buscho, R.O.; Saxtan, D.; Shultz, P.S.; Finch, E.; Mufson, M.A. Infections with Viruses and Mycoplasma Pneumoniae during Exacerbations of Chronic Bronchitis. *J. Infect. Dis.* **1978**, *137*, 377–383, doi:10.1093/infdis/137.4.377.
213. Rohde, G.; Wiethage, A.; Borg, I.; Kauth, M.; Bauer, T.T.; Gillissen, A.; Bufe, A.; Schultze-Werninghaus, G. Respiratory Viruses in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Requiring Hospitalisation: A Case-Control Study. *Thorax* **2003**, *58*, 37–42, doi:10.1136/thorax.58.1.37.
214. Cameron, R.J.; de Wit, D.; Welsh, T.N.; Ferguson, J.; Grissell, T.V.; Rye, P.J. Virus Infection in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Requiring Ventilation. *Intensive Care Med.* **2006**, *32*, 1022–1029, doi:10.1007/s00134-006-0202-x.

215. MOHAN, A.; CHANDRA, S.; AGARWAL, D.; GULERIA, R.; BROOR, S.; GAUR, B.; PANDEY, R.M. Prevalence of Viral Infection Detected by PCR and RT-PCR in Patients with Acute Exacerbation of COPD: A Systematic Review. *Respirol. Carlton Vic* **2010**, *15*, 536–542, doi:10.1111/j.1440-1843.2010.01722.x.
216. Chanock, R.; Roizman, B.; Myers, R. Recovery from Infants with Respiratory Illness of a Virus Related to Chimpanzee Coryza Agent (CCA). I. Isolation, Properties and Characterization. *Am. J. Hyg.* **1957**, *66*, 281–290, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a119901.
217. Zwaans, W.A.R.; Mallia, P.; van Winden, M.E.C.; Rohde, G.G.U. The Relevance of Respiratory Viral Infections in the Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease—A Systematic Review. *J. Clin. Virol.* **2014**, *61*, 181–188, doi:10.1016/j.jcv.2014.06.025.
218. Mehta, J.; Walsh, E.E.; Mahadevia, P.J.; Falsey, A.R. Risk Factors for Respiratory Syncytial Virus Illness Among Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* **2013**, *10*, 293–299, doi:10.3109/15412555.2012.744741.
219. Anderson, N.W.; Binnicker, M.J.; Harris, D.M.; Chirila, R.M.; Brumble, L.; Mandrekar, J.; Hata, D.J. Morbidity and Mortality among Patients with Respiratory Syncytial Virus Infection: A 2-Year Retrospective Review. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *85*, 367–371, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.025.
220. Graham, B.S.; Perkins, M.D.; Wright, P.F.; Karzon, D.T. Primary Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. *J. Med. Virol.* **1988**, *26*, 153–162, doi:10.1002/jmv.1890260207.
221. Rameix-Welti, M.-A.; Le Goffic, R.; Hervé, P.-L.; Sourimant, J.; Rémot, A.; Riffault, S.; Yu, Q.; Galloux, M.; Gault, E.; Eléouët, J.-F. Visualizing the Replication of Respiratory Syncytial Virus in Cells and in Living Mice. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5104, doi:10.1038/ncomms6104.
222. Jafri, H.S.; Chávez-Bueno, S.; Mejías, A.; Gómez, A.M.; Ríos, A.M.; Nassi, S.S.; Yusuf, M.; Kapur, P.; Hardy, R.D.; Hatfield, J.; et al. Respiratory Syncytial Virus Induces Pneumonia, Cytokine Response, Airway Obstruction, and Chronic Inflammatory Infiltrates Associated with Long-Term Airway Hyperresponsiveness in Mice. *J. Infect. Dis.* **2004**, *189*, 1856–1865, doi:10.1086/386372.
223. Mosquera, R.A.; Jesus-Rojas, W.D.; Stark, J.M.; Yadav, A.; Jon, C.K.; Atkins, C.L.; Samuels, C.L.; Gonzales, T.R.; McBeth, K.E.; Hashmi, S.S.; et al. Role of Prophylactic Azithromycin to Reduce Airway Inflammation and Mortality in a RSV Mouse Infection Model. *Pediatr. Pulmonol.* **2018**, *53*, 567–574, doi:10.1002/ppul.23956.
224. Horsfall, F.L.; Hahn, R.G. A LATENT VIRUS IN NORMAL MICE CAPABLE OF PRODUCING PNEUMONIA IN ITS NATURAL HOST. *J. Exp. Med.* **1940**, *71*, 391–408, doi:10.1084/jem.71.3.391.

225. Watkiss, E.R.T.; Shrivastava, P.; Arsic, N.; Gomis, S.; Van Drunen Littel-van den Hurk, S. Innate and Adaptive Immune Response to Pneumonia Virus of Mice in a Resistant and a Susceptible Mouse Strain. *Viruses* **2013**, *5*, 295–320, doi:10.3390/v5010295.
226. Rosenberg, H.F.; Bonville, C.A.; Easton, A.J.; Domachowske, J.B. The Pneumonia Virus of Mice Infection Model for Severe Respiratory Syncytial Virus Infection: Identifying Novel Targets for Therapeutic Intervention. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *105*, 1–6, doi:10.1016/j.pharmthera.2004.09.001.
227. Bonville, C.A.; Bennett, N.J.; Koehnlein, M.; Haines, D.M.; Ellis, J.A.; DelVecchio, A.M.; Rosenberg, H.F.; Domachowske, J.B. Respiratory Dysfunction and Proinflammatory Chemokines in the Pneumonia Virus of Mice (PVM) Model of Viral Bronchiolitis. *Virology* **2006**, *349*, 87–95, doi:10.1016/j.virol.2006.02.017.
228. Rosenberg, H.F.; Domachowske, J.B. Pneumonia Virus of Mice: Severe Respiratory Infection in a Natural Host. *Immunol. Lett.* **2008**, *118*, 6–12, doi:10.1016/j.imlet.2008.03.013.
229. Hong, S.; Park, S.; Yu, J.-W. Pyrin Domain (PYD)-Containing Inflammasome in Innate Immunity. *J. Bacteriol. Virol.* **2011**, *41*, 133–146, doi:10.4167/jbv.2011.41.3.133.
230. Majzoub, K.; Wrensch, F.; Baumert, T.F. The Innate Antiviral Response in Animals: An Evolutionary Perspective from Flagellates to Humans. *Viruses* **2019**, *11*, 758, doi:10.3390/v11080758.
231. Wu, W.; Zhang, W.; Tian, L.; Brown, B.R.; Walters, M.S.; Metcalf, J.P. IRF7 Is Required for the Second Phase Interferon Induction during Influenza Virus Infection in Human Lung Epithelia. *Viruses* **2020**, *12*, E377, doi:10.3390/v12040377.
232. Grandvaux, N.; Guan, X.; Yoboua, F.; Zucchini, N.; Fink, K.; Doyon, P.; Martin, L.; Servant, M.J.; Chartier, S. Sustained Activation of Interferon Regulatory Factor 3 during Infection by Paramyxoviruses Requires MDA5. *J. Innate Immun.* **2014**, *6*, 650–662, doi:10.1159/000360764.
233. Mebratu, Y.A.; Tesfaigzi, Y. IL-17 Plays a Role in Respiratory Syncytial Virus–Induced Lung Inflammation and Emphysema in Elastase and LPS-Injured Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2018**, *58*, 717–726, doi:10.1165/rcmb.2017-0265OC.
234. Paulsen, M.; Varese, A.; Pinpathomrat, N.; Kirsebom, F.C.M.; Paulsen, M.; Johansson, C. MAVS Deficiency Is Associated With a Reduced T Cell Response Upon Secondary RSV Infection in Mice. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 572747, doi:10.3389/fimmu.2020.572747.
235. Manley, G.C.A.; Stokes, C.A.; Marsh, E.K.; Sabroe, I.; Parker, L.C. DUSP10 Negatively Regulates the Inflammatory Response to Rhinovirus Through IL-1 β Signalling. *J. Virol.* **2018**, doi:10.1128/JVI.01659-18.

236. Hemann, E.A.; Green, R.; Turnbull, J.B.; Langlois, R.A.; Savan, R.; Gale, M. Interferon- λ Modulates Dendritic Cells to Facilitate T Cell Immunity during Infection with Influenza A Virus. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 1035–1045, doi:10.1038/s41590-019-0408-z.
237. González-Navajas, J.M.; Lee, J.; David, M.; Raz, E. Immunomodulatory Functions of Type I Interferons. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 125–135, doi:10.1038/nri3133.
238. Egli, A.; Santer, D.M.; O’Shea, D.; Tyrrell, D.L.; Houghton, M. The Impact of the Interferon-Lambda Family on the Innate and Adaptive Immune Response to Viral Infections. *Emerg. Microbes Infect.* **2014**, *3*, 1–12, doi:10.1038/emi.2014.51.
239. Foronjy, R.F.; Dabo, A.J.; Taggart, C.C.; Weldon, S.; Geraghty, P. Respiratory Syncytial Virus Infections Enhance Cigarette Smoke Induced COPD in Mice. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e90567, doi:10.1371/journal.pone.0090567.
240. Gimenes, J.A.; Srivastava, V.; ReddyVari, H.; Kotnala, S.; Mishra, R.; Farazuddin, M.; Li, W.; Sajjan, U.S. Rhinovirus-Induces Progression of Lung Disease in a Mouse Model of COPD via IL-33/ST2 Signaling Axis. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **2019**, *133*, 983–996, doi:10.1042/CS20181088.
241. Robbins, C.S.; Bauer, C.M.T.; Vujicic, N.; Gaschler, G.J.; Lichty, B.D.; Brown, E.G.; Stämpfli, M.R. Cigarette Smoke Impacts Immune Inflammatory Responses to Influenza in Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, *174*, 1342–1351, doi:10.1164/rccm.200604-561OC.
242. He, Y.; Xie, M.; Zhao, J.; Liu, X. Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with Severe COVID-19 and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Med. Sci. Monit.* **2020**, *26*, doi:10.12659/MSM.927212.
243. Mebratu, Y.A.; Smith, K.R.; Agga, G.E.; Tesfaigzi, Y. Inflammation and Emphysema in Cigarette Smoke-Exposed Mice When Instilled with Poly (I:C) or Infected with Influenza A or Respiratory Syncytial Viruses. *Respir. Res.* **2016**, *17*, 1–12, doi:10.1186/s12931-016-0392-x.
244. Seemungal, T.; Harper-Owen, R.; Bhowmik, A.; Moric, I.; Sanderson, G.; Message, S.; MacCALLUM, P.; Meade, T.W.; Jeffries, D.J.; Johnston, S.L.; et al. Respiratory Viruses, Symptoms, and Inflammatory Markers in Acute Exacerbations and Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, *164*, 1618–1623, doi:10.1164/ajrccm.164.9.2105011.
245. Castro, S.M.; Chakraborty, K.; Guerrero-Plata, A. Cigarette Smoke Suppresses TLR-7 Stimulation in Response to Virus Infection in Plasmacytoid Dendritic Cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **2011**, *25*, 1106–1113, doi:10.1016/j.tiv.2011.03.011.
246. Hsu, A.C.-Y.; Dua, K.; Starkey, M.R.; Haw, T.-J.; Nair, P.M.; Nichol, K.; Zammit, N.; Grey, S.T.; Baines, K.J.; Foster, P.S.; et al. MicroRNA-125a and -b Inhibit A20 and MAVS to Promote Inflammation and Impair Antiviral Response in COPD. *JCI Insight* **2017**, *2*, doi:10.1172/jci.insight.90443.

247. Collinson, N.; Snape, N.; Beagley, K.; Fantino, E.; Spann, K. COPD Is Associated with Elevated IFN- β Production by Bronchial Epithelial Cells Infected with RSV or HMPV. *Viruses* **2021**, *13*, 911, doi:10.3390/v13050911.
248. Groskreutz, D.J.; Monick, M.M.; Babor, E.C.; Nyunoya, T.; Varga, S.M.; Look, D.C.; Hunninghake, G.W. Cigarette Smoke Alters Respiratory Syncytial Virus-Induced Apoptosis and Replication. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2009**, *41*, 189–198, doi:10.1165/rcmb.2008-0131OC.
249. Morgene, M.F.; Botelho-Nevers, E.; Grattard, F.; Pillet, S.; Berthelot, P.; Pozzetto, B.; Verhoeven, P.O. Staphylococcus Aureus Colonization and Non-Influenza Respiratory Viruses: Interactions and Synergism Mechanisms. *Virulence* **2018**, *9*, 1354–1363, doi:10.1080/21505594.2018.1504561.
250. Shibata, T.; Makino, A.; Ogata, R.; Nakamura, S.; Ito, T.; Nagata, K.; Terauchi, Y.; Oishi, T.; Fujieda, M.; Takahashi, Y.; et al. Respiratory Syncytial Virus Infection Exacerbates Pneumococcal Pneumonia via Gas6/Axl-Mediated Macrophage Polarization. *J. Clin. Invest.* **130**, 3021–3037, doi:10.1172/JCI125505.
251. Musuuza, J.S.; Watson, L.; Parmasad, V.; Putman-Buehler, N.; Christensen, L.; Safdar, N. Prevalence and Outcomes of Co-Infection and Superinfection with SARS-CoV-2 and Other Pathogens: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0251170, doi:10.1371/journal.pone.0251170.
252. 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.; et al. Outgrowth of the Bacterial Airway Microbiome after Rhinovirus Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *188*, 1224–1231, doi:10.1164/rccm.201302-0341OC.
253. Wilkinson, T.M.A.; Hurst, J.R.; Perera, W.R.; Wilks, M.; Donaldson, G.C.; Wedzicha, J.A. Effect of Interactions between Lower Airway Bacterial and Rhinoviral Infection in Exacerbations of COPD. *Chest* **2006**, *129*, 317–324, doi:10.1378/chest.129.2.317.
254. Kudva, A.; Scheller, E.V.; Robinson, K.M.; Crowe, C.R.; Choi, S.M.; Slight, S.R.; Khader, S.A.; Dubin, P.J.; Enelow, R.I.; Kolls, J.K.; et al. Influenza A Inhibits Th17-Mediated Host Defense against Bacterial Pneumonia in Mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2011**, *186*, 1666–1674, doi:10.4049/jimmunol.1002194.
255. Small, C.-L.; Shaler, C.R.; McCormick, S.; Jeyanathan, M.; Damjanovic, D.; Brown, E.G.; Arck, P.; Jordana, M.; Kaushic, C.; Ashkar, A.A.; et al. Influenza Infection Leads to Increased Susceptibility to Subsequent Bacterial Superinfection by Impairing NK Cell Responses in the Lung. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 2048–2056, doi:10.4049/jimmunol.0902772.
256. Mallia, P.; Message, S.D.; Keadze, T.; Parker, H.L.; Kon, O.M.; Johnston, S.L. An Experimental Model of Rhinovirus Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations: A Pilot Study. *Respir. Res.* **2006**, *7*, 116, doi:10.1186/1465-9921-7-116.

257. Baines, K.J.; Hsu, A.C.-Y.; Tooze, M.; Gunawardhana, L.P.; Gibson, P.G.; Wark, P.A. Novel Immune Genes Associated with Excessive Inflammatory and Antiviral Responses to Rhinovirus in COPD. *Respir. Res.* **2013**, *14*, 15, doi:10.1186/1465-9921-14-15.
258. 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.; et al. Outgrowth of the Bacterial Airway Microbiome after Rhinovirus Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *188*, 1224–1231, doi:10.1164/rccm.201302-0341OC.
259. Ivanov, S.; Renneson, J.; Fontaine, J.; Barthelemy, A.; Paget, C.; Fernandez, E.M.; Blanc, F.; De Trez, C.; Van Maele, L.; Dumoutier, L.; et al. Interleukin-22 Reduces Lung Inflammation during Influenza A Virus Infection and Protects against Secondary Bacterial Infection. *J. Virol.* **2013**, *87*, 6911–6924, doi:10.1128/JVI.02943-12.
260. Barthelemy, A.; Sencio, V.; Soulard, D.; Deruyter, L.; Faveeuw, C.; Le Goffic, R.; Trottein, F. Interleukin-22 Immunotherapy during Severe Influenza Enhances Lung Tissue Integrity and Reduces Secondary Bacterial Systemic Invasion. *Infect. Immun.* **2018**, *86*, doi:10.1128/IAI.00706-17.
261. Myles, I.A.; Fontecilla, N.M.; Valdez, P.A.; Vithayathil, P.J.; Naik, S.; Belkaid, Y.; Ouyang, W.; Datta, S.K. IL-20 Receptor Signaling Inhibits Cutaneous IL-1 β and IL-17A Production to Promote Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infection. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 804–811, doi:10.1038/ni.2637.
262. Ramani, T.; Auletta, C.S.; Weinstock, D.; Mounho-Zamora, B.; Ryan, P.C.; Salcedo, T.W.; Bannish, G. Cytokines: The Good, the Bad, and the Deadly. *Int. J. Toxicol.* **2015**, *34*, 355–365, doi:10.1177/1091581815584918.
263. Pociask, D.A.; Scheller, E.V.; Mandalapu, S.; McHugh, K.J.; Enelow, R.I.; Fattman, C.L.; Kolls, J.K.; Alcorn, J.F. IL-22 Is Essential for Lung Epithelial Repair Following Influenza Infection. *Am. J. Pathol.* **2013**, *182*, 1286–1296, doi:10.1016/j.ajpath.2012.12.007.
264. Dumoutier, L.; Lejeune, D.; Colau, D.; Renaud, J.-C. Cloning and Characterization of IL-22 Binding Protein, a Natural Antagonist of IL-10-Related T Cell-Derived Inducible Factor/IL-22. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 7090–7095, doi:10.4049/jimmunol.166.12.7090.
265. Ouyang, W.; O'Garra, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: From Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* **2019**, *50*, 871–891, doi:10.1016/j.immuni.2019.03.020.
266. Xin, P.; Xu, X.; Deng, C.; Liu, S.; Wang, Y.; Zhou, X.; Ma, H.; Wei, D.; Sun, S. The Role of JAK/STAT Signaling Pathway and Its Inhibitors in Diseases. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *80*, 106210, doi:10.1016/j.intimp.2020.106210.
267. Dumoutier, L.; Leemans, C.; Lejeune, D.; Kotenko, S.V.; Renaud, J.-C. Cutting Edge: STAT Activation By IL-19, IL-20 and Mda-7 Through IL-20 Receptor Complexes of Two Types. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 3545–3549, doi:10.4049/jimmunol.167.7.3545.

268. Kunz, S.; Wolk, K.; Witte, E.; Witte, K.; Doecke, W.-D.; Volk, H.-D.; Sterry, W.; Asadullah, K.; Sabat, R. 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, doi:10.1111/j.1600-0625.2006.00516.x.
269. Caparros, E.; Phd, R. The Interleukin-20 Cytokine Family in Liver Disease. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fimmu.2018.01155.
270. 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. Interleukin-20 Promotes Migration of Bladder Cancer Cells through Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)-Mediated MMP-9 Protein Expression Leading to Nuclear Factor (NF-KB) Activation by Inducing the Up-Regulation of P21WAF1 Protein Expression * [S]. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 5539–5552, doi:10.1074/jbc.M112.410233.
271. Tritsarlis, K.; Myren, M.; Ditlev, S.B.; Hübschmann, M.V.; van der Blom, I.; Hansen, A.J.; Olsen, U.B.; Cao, R.; Zhang, J.; Jia, T.; et al. IL-20 Is an Arteriogenic Cytokine That Remodels Collateral Networks and Improves Functions of Ischemic Hind Limbs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 15364–15369, doi:10.1073/pnas.0707302104.
272. Lejeune, D.; Dumoutier, L.; Constantinescu, S.; Kruijer, W.; Schuringa, J.J.; Renault, J.-C. Interleukin-22 (IL-22) Activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and P38 MAP Kinase Pathways in a Rat Hepatoma Cell Line: PATHWAYS THAT ARE SHARED WITH AND DISTINCT FROM IL-10*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33676–33682, doi:10.1074/jbc.M204204200.
273. Sun, D.-P.; Yeh, C.-H.; So, E.; Wang, L.-Y.; Wei, T.-S.; Chang, M.-S.; Hsing, C.-H. Interleukin (IL)-19 Promoted Skin Wound Healing by Increasing Fibroblast Keratinocyte Growth Factor Expression. *Cytokine* **2013**, *62*, 360–368, doi:10.1016/j.cyto.2013.03.017.
274. 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. IL-22 Promotes Fibroblast-Mediated Wound Repair in the Skin. *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133*, 1321–1329, doi:10.1038/jid.2012.463.
275. Poindexter, N.J.; Williams, R.R.; Powis, G.; Jen, E.; Caudle, A.S.; Chada, S.; Grimm, E.A. IL-24 Is Expressed during Wound Repair and Inhibits TGFalpha-Induced Migration and Proliferation of Keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2010**, *19*, 714–722, doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01077.x.
276. Zhang, W.; Magadi, S.; Li, Z.; Smith, C.W.; Burns, A.R. IL-20 Promotes Epithelial Healing of the Injured Mouse Cornea. *Exp. Eye Res.* **2017**, *154*, 22–29, doi:10.1016/j.exer.2016.11.006.
277. Sa, S.M.; Valdez, P.A.; Wu, J.; Jung, K.; Zhong, F.; Hall, L.; Kasman, I.; Winer, J.; Modrusan, Z.; Danilenko, D.M.; et al. 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. Baltim. Md 1950* **2007**, *178*, 2229–2240, doi:10.4049/jimmunol.178.4.2229.
278. Bosanquet, D.C.; Harding, K.G.; Ruge, F.; Sanders, A.J.; Jiang, W.G. Expression of IL-24 and IL-24 Receptors in Human Wound Tissues and the Biological Implications of IL-24 on Keratinocytes. *Wound Repair Regen.* **2012**, *20*, 896–903, doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00840.x.
279. Tan, Y.; Sanders, A.J.; Zhang, Y.; Martin, T.A.; Owen, S.; Ruge, F.; Jiang, W.G. Interleukin-24 (IL-24) Expression and Biological Impact on HECV Endothelial Cells. *Cancer Genomics - Proteomics* **2015**, *12*, 243–250.
280. Blumberg, H.; Conklin, D.; Xu, W.F.; Grossmann, A.; Brender, T.; Carollo, S.; Eagan, M.; Foster, D.; Haldeman, B.A.; Hammond, A.; et al. Interleukin 20: Discovery, Receptor Identification, and Role in Epidermal Function. *Cell* **2001**, *104*, 9–19, doi:10.1016/s0092-8674(01)00187-8.
281. Chan, J.R.; Blumenschein, W.; Murphy, E.; Diveu, C.; Wiekowski, M.; Abbondanzo, S.; Lucian, L.; Geissler, R.; Brodie, S.; Kimball, A.B.; et al. IL-23 Stimulates Epidermal Hyperplasia via TNF and IL-20R2-Dependent Mechanisms with Implications for Psoriasis Pathogenesis. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 2577–2587, doi:10.1084/jem.20060244.
282. Gabunia, K.; Autieri, M.V. Interleukin-19 Can Enhance Angiogenesis by Macrophage Polarization. *Macrophage* **2015**, *2*, e562, doi:10.14800/macrophage.562.
283. Kolumam, G.; Wu, X.; Lee, W.P.; Hackney, J.A.; Zavala-Solorio, J.; Gandham, V.; Danilenko, D.M.; Arora, P.; Wang, X.; Ouyang, W. IL-22R Ligands IL-20, IL-22, and IL-24 Promote Wound Healing in Diabetic Db/Db Mice. *PloS One* **2017**, *12*, e0170639, doi:10.1371/journal.pone.0170639.
284. Jiang, H.; Lin, J.J.; Su, Z.Z.; Goldstein, N.I.; Fisher, P.B. Subtraction Hybridization Identifies a Novel Melanoma Differentiation Associated Gene, Mda-7, Modulated during Human Melanoma Differentiation, Growth and Progression. *Oncogene* **1995**, *11*, 2477–2486.
285. Emdad, L.; Lebedeva, I.V.; Su, Z.; Gupta, P.; Sauane, M.; Dash, R.; Grant, S.; Dent, P.; Curiel, D.T.; Sarkar, D.; et al. 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.* **2009**, *8*, 402–411, doi:10.4161/cbt.8.5.7581.
286. Whitaker, E.L.; Filippov, V.A.; Duerksen-Hughes, P.J. Interleukin 24: Mechanisms and Therapeutic Potential of an Anti-Cancer Gene. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2012**, *23*, 323–331, doi:10.1016/j.cytogfr.2012.08.004.
287. Hsu, Y.-H.; Wei, C.-C.; Shieh, D.-B.; Chan, C.-H.; Chang, M.-S. Anti-IL-20 Monoclonal Antibody Alleviates Inflammation in Oral Cancer and Suppresses Tumor Growth. *Mol. Cancer Res. MCR* **2012**, *10*, 1430–1439, doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0276.

288. Lu, S.-W.; Pan, H.-C.; Hsu, Y.-H.; Chang, K.-C.; Wu, L.-W.; Chen, W.-Y.; Chang, M.-S. IL-20 Antagonist Suppresses PD-L1 Expression and Prolongs Survival in Pancreatic Cancer Models. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4611, doi:10.1038/s41467-020-18244-8.
289. Hsu, Y.-H.; Wu, C.-Y.; Hsing, C.-H.; Lai, W.-T.; Wu, L.-W.; Chang, M.-S. Anti-IL-20 Monoclonal Antibody Suppresses Prostate Cancer Growth and Bone Osteolysis in Murine Models. *PLoS One* **2015**, *10*, e0139871, doi:10.1371/journal.pone.0139871.
290. Hsu, Y.-H.; Hsing, C.-H.; Li, C.-F.; Chan, C.-H.; Chang, M.-C.; Yan, J.-J.; Chang, M.-S. Anti-IL-20 Monoclonal Antibody Suppresses Breast Cancer Progression and Bone Osteolysis in Murine Models. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2012**, *188*, 1981–1991, doi:10.4049/jimmunol.1102843.
291. Ding, W.-Z.; Han, G.-Y.; Jin, H.-H.; Zhan, C.-F.; Ji, Y.; Huang, X.-L. Anti-IL-20 Monoclonal Antibody Suppresses Hepatocellular Carcinoma Progression. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 6156–6162, doi:10.3892/ol.2018.9402.
292. Hsing, C.-H.; Cheng, H.-C.; Hsu, Y.-H.; Chan, C.-H.; Yeh, C.-H.; Li, C.-F.; Chang, M.-S. Upregulated IL-19 in Breast Cancer Promotes Tumor Progression and Affects Clinical Outcome. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2012**, *18*, 713–725, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1532.
293. Moniruzzaman, M.; Wang, R.; Jeet, V.; McGuckin, M.A.; Hasnain, S.Z. Interleukin (IL)-22 from IL-20 Subfamily of Cytokines Induces Colonic Epithelial Cell Proliferation Predominantly through ERK1/2 Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, E3468, doi:10.3390/ijms20143468.
294. You, W.; Tang, Q.; Zhang, C.; Wu, J.; Gu, C.; Wu, Z.; Li, X. IL-26 Promotes the Proliferation and Survival of Human Gastric Cancer Cells by Regulating the Balance of STAT1 and STAT3 Activation. *PLoS One* **2013**, *8*, e63588, doi:10.1371/journal.pone.0063588.
295. Yu, D.; Yang, X.; Lin, J.; Cao, Z.; Lu, C.; Yang, Z.; Zheng, M.; Pan, R.; Cai, W. Super-Enhancer Induced IL-20RA Promotes Proliferation/Metastasis and Immune Evasion in Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 724655, doi:10.3389/fonc.2021.724655.
296. Zou, S.; Tong, Q.; Liu, B.; Huang, W.; Tian, Y.; Fu, X. Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer* **2020**, *19*, 145, doi:10.1186/s12943-020-01258-7.
297. Wei, C.-C.; Li, H.-H.; Hsu, Y.-H.; Hsing, C.-H.; Sung, J.-M.; Chang, M.-S. Interleukin-20 Targets Renal Cells and Is Associated with Chronic Kidney Disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *374*, 448–453, doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.039.
298. Li, H.-H.; Hsu, Y.-H.; Wei, C.-C.; Lee, P.-T.; Chen, W.-C.; Chang, M.-S. Interleukin-20 Induced Cell Death in Renal Epithelial Cells and Was Associated with Acute Renal Failure. *Genes Immun.* **2008**, *9*, 395–404, doi:10.1038/gene.2008.28.

299. Li, H.-H.; Cheng, H.-H.; Sun, K.-H.; Wei, C.-C.; Li, C.-F.; Chen, W.-C.; Wu, W.-M.; Chang, M.-S. Interleukin-20 Targets Renal Mesangial Cells and Is Associated with Lupus Nephritis. *Clin. Immunol.* **2008**, *129*, 277–285, doi:10.1016/j.clim.2008.07.006.
300. Tabata, T.; Sugiyama, N.; Otsuki, Y.; Kondo, Y. Interleukin-24 Is a Novel Diagnostic Biomarker for the Severity of Acute Kidney Injury. *Med. Mol. Morphol.* **2020**, *53*, 115–123, doi:10.1007/s00795-019-00239-0.
301. Pap, D.; Veres-Székely, A.; Szebeni, B.; Rokonay, R.; Ónody, A.; Lippai, R.; Takács, I.M.; Tislér, A.; Kardos, M.; Oswald, F.; et al. Characterization of IL-19, -20, and -24 in Acute and Chronic Kidney Diseases Reveals a pro-Fibrotic Role of IL-24. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 172, doi:10.1186/s12967-020-02338-4.
302. Wolk, K.; Witte, E.; Wallace, E.; Döcke, W.-D.; Kunz, S.; Asadullah, K.; Volk, H.-D.; Sterry, W.; Sabat, R. 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.* **2006**, *36*, 1309–1323, doi:10.1002/eji.200535503.
303. Otkjaer, K.; Kragballe, K.; Funding, A.T.; Clausen, J.T.; Noerby, P.L.; Steiniche, T.; Iversen, L. The Dynamics of Gene Expression of Interleukin-19 and Interleukin-20 and Their Receptors in Psoriasis. *Br. J. Dermatol.* **2005**, *153*, 911–918, doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06800.x.
304. He, M.; Liang, P. IL-24 Transgenic Mice: In Vivo Evidence of Overlapping Functions for IL-20, IL-22, and IL-24 in the Epidermis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2010**, *184*, 1793–1798, doi:10.4049/jimmunol.0901829.
305. Feldmann, M.; Brennan, F.M.; Maini, R.N. Role of Cytokines in Rheumatoid Arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **1996**, *14*, 397–440, doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.397.
306. Sakurai, N.; Kuroiwa, T.; Ikeuchi, H.; Hiramatsu, N.; Maeshima, A.; Kaneko, Y.; Hiromura, K.; Nojima, Y. Expression of IL-19 and Its Receptors in RA: Potential Role for Synovial Hyperplasia Formation. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **2008**, *47*, 815–820, doi:10.1093/rheumatology/ken061.
307. Corvaisier, M.; Delneste, Y.; Jeanvoine, H.; Preisser, L.; Blanchard, S.; Garo, E.; Hoppe, E.; Barré, B.; Audran, M.; Bouvard, B.; et al. IL-26 Is Overexpressed in Rheumatoid Arthritis and Induces Proinflammatory Cytokine Production and Th17 Cell Generation. *PLOS Biol.* **2012**, *10*, e1001395, doi:10.1371/journal.pbio.1001395.
308. Lee, K.-A.; Kim, K.-W.; Kim, B.-M.; Won, J.-Y.; Min, H.K.; Lee, D.W.; Kim, H.-R.; Lee, S.-H. Promotion of Osteoclastogenesis by IL-26 in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2019**, *21*, 283, doi:10.1186/s13075-019-2070-0.
309. Kragstrup, T.W.; Otkjaer, K.; Holm, C.; Jørgensen, A.; Hokland, M.; Iversen, L.; Deleuran, B. The Expression of IL-20 and IL-24 and Their Shared Receptors Are Increased in Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis. *Cytokine* **2008**, *41*, 16–23, doi:10.1016/j.cyto.2007.10.004.

310. Imaoka, A.; Zhang, L.; Kuboyama, N.; Abiko, Y. Reduction of IL-20 Expression in Rheumatoid Arthritis by Linear Polarized Infrared Light Irradiation. *Laser Ther.* **2014**, *23*, 109–114, doi:10.5978/islsm.14-OR-08.
311. Cantó, E.; Garcia Planella, E.; Zamora-Atenza, C.; Nieto, J.C.; Gordillo, J.; Ortiz, M.A.; Metón, I.; Serrano, E.; Vegas, E.; García-Bosch, O.; et al. Interleukin-19 Impairment in Active Crohn's Disease Patients. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93910, doi:10.1371/journal.pone.0093910.
312. Matsuo, Y.; Azuma, Y.-T.; Kuwamura, M.; Kuramoto, N.; Nishiyama, K.; Yoshida, N.; Ikeda, Y.; Fujimoto, Y.; Nakajima, H.; Takeuchi, T. Interleukin 19 Reduces Inflammation in Chemically Induced Experimental Colitis. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *29*, 468–475, doi:10.1016/j.intimp.2015.10.011.
313. Fonseca-Camarillo, G.; Furuzawa-Carballeda, J.; Granados, J.; Yamamoto-Furusho, J.K. Expression of Interleukin (IL)-19 and IL-24 in Inflammatory Bowel Disease Patients: A Cross-Sectional Study. *Clin. Exp. Immunol.* **2014**, *177*, 64–75, doi:10.1111/cei.12285.
314. Dambacher, J.; Beigel, F.; Zitzmann, K.; De Toni, E.N.; Göke, B.; Diepolder, H.M.; Auernhammer, C.J.; Brand, S. The Role of the Novel Th17 Cytokine IL-26 in Intestinal Inflammation. *Gut* **2009**, *58*, 1207–1217, doi:10.1136/gut.2007.130112.
315. Fujii, M.; Nishida, A.; Imaeda, H.; Ohno, M.; Nishino, K.; Sakai, S.; Inatomi, O.; Bamba, S.; Kawahara, M.; Shimizu, T.; et al. Expression of Interleukin-26 Is Upregulated in Inflammatory Bowel Disease. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 5519–5529, doi:10.3748/wjg.v23.i30.5519.
316. Andoh, A.; Shioya, M.; Nishida, A.; Bamba, S.; Tsujikawa, T.; Kim-Mitsuyama, S.; Fujiyama, Y. Expression of IL-24, an Activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 Cascade, Is Enhanced in Inflammatory Bowel Disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2009**, *183*, 687–695, doi:10.4049/jimmunol.0804169.
317. Ungaro, F.; Garlatti, V.; Massimino, L.; Spinelli, A.; Carvello, M.; Sacchi, M.; Spanò, S.; Colasante, G.; Valassina, N.; Vetrano, S.; et al. MTOR-Dependent Stimulation of IL20RA Orchestrates Immune Cell Trafficking through Lymphatic Endothelium in Patients with Crohn's Disease. *Cells* **2019**, *8*, 924, doi:10.3390/cells8080924.
318. Boonpiyathad, T.; Sözen, Z.C.; Satitsuksanoa, P.; Akdis, C.A. Immunologic Mechanisms in Asthma. *Semin. Immunol.* **2019**, *46*, 101333, doi:10.1016/j.smim.2019.101333.
319. Li, X.; Huang, J.; Chen, X.; Lai, X.; Huang, Z.; Li, Y.; Li, S.; Chang, L.; Zhang, G. IL-19 Induced by IL-13/IL-17A in the Nasal Epithelium of Patients with Chronic Rhinosinusitis Upregulates MMP-9 Expression via ERK/NF- κ B Signaling Pathway. *Clin. Transl. Allergy* **2021**, *11*, e12003, doi:10.1002/ct2.12003.
320. Huang, F.; Wachi, S.; Thai, P.; Loukoianov, A.; Tan, K.H.; Forteza, R.M.; Wu, R. Potentiation of IL-19 Expression in Airway Epithelia by IL-17A and IL-4/IL-13: Important

- Implications in Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *121*, 1415–1421, 1421.e1-3, doi:10.1016/j.jaci.2008.04.016.
321. Chong, W.P.; Mattapallil, M.J.; Raychaudhuri, K.; Bing, S.J.; Wu, S.; Zhong, Y.; Wang, W.; Chen, Z.; Silver, P.B.; Jittayasothorn, Y.; et al. The Cytokine IL-17A Limits Th17 Pathogenicity via a Negative Feedback Loop Driven by Autocrine Induction of IL-24. *Immunity* **2020**, *53*, 384-397.e5, doi:10.1016/j.immuni.2020.06.022.
322. Mitamura, Y.; Nunomura, S.; Nanri, Y.; Ogawa, M.; Yoshihara, T.; Masuoka, M.; Tsuji, G.; Nakahara, T.; Hashimoto-Hachiya, A.; Conway, S.J.; et al. The IL-13/Periostin/IL-24 Pathway Causes Epidermal Barrier Dysfunction in Allergic Skin Inflammation. *Allergy* **2018**, doi:10.1111/all.13437.
323. Van Belle, A.B.; Cochez, P.M.; de Heusch, M.; Pointner, L.; Opsomer, R.; Raynaud, P.; Achouri, Y.; Hendrickx, E.; Cheou, P.; Warnier, G.; et al. IL-24 Contributes to Skin Inflammation in Para-Phenylenediamine-Induced Contact Hypersensitivity. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1852, doi:10.1038/s41598-018-38156-4.
324. Weng, Y.-H.; Chen, W.-Y.; Lin, Y.-L.; Wang, J.-Y.; Chang, M.-S. Blocking IL-19 Signaling Ameliorates Allergen-Induced Airway Inflammation. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 968, doi:10.3389/fimmu.2019.00968.
325. Wang, X.; Hu, G.; Kang, H.; Ke, X.; Hong, S. [Increased IL-19 level in peripheral blood of patients with allergic rhinitis is related with clinical severity]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* **2015**, *31*, 1537–1540, 1543.
326. Savchenko, L.; Mykytiuk, M.; Cinato, M.; Tronchere, H.; Kunduzova, O.; Kaidashev, I. IL-26 in the Induced Sputum Is Associated with the Level of Systemic Inflammation, Lung Functions and Body Weight in COPD Patients. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2018**, *13*, 2569–2575, doi:10.2147/COPD.S164833.
327. Che, K.F.; Tufvesson, E.; Tengvall, S.; Lappi-Blanco, E.; Kaarteenaho, R.; Levänen, B.; Ekberg, M.; Brauner, A.; Wheelock, Å.M.; Bjermer, L.; et al. The Neutrophil-Mobilizing Cytokine Interleukin-26 in the Airways of Long-Term Tobacco Smokers. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **2018**, *132*, 959–983, doi:10.1042/CS20180057.
328. Paget, C.; Ivanov, S.; Fontaine, J.; Renneson, J.; Blanc, F.; Pichavant, M.; Dumoutier, L.; Ryffel, B.; Renaud, J.C.; Gosset, P.; et al. Interleukin-22 Is Produced by Invariant Natural Killer T Lymphocytes during Influenza A Virus Infection: Potential Role in Protection against Lung Epithelial Damages. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 8816–8829, doi:10.1074/jbc.M111.304758.
329. Gough, P.; Ganesan, S.; Datta, S.K. IL-20 Signaling in Activated Human Neutrophils Inhibits Neutrophil Migration and Function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2017**, *198*, 4373–4382, doi:10.4049/jimmunol.1700253.
330. He, Y.; Feng, D.; Hwang, S.; Mackowiak, B.; Wang, X.; Xiang, X.; Rodrigues, R.M.; Fu, Y.; Ma, J.; Ren, T.; et al. Interleukin-20 Exacerbates Acute Hepatitis and Bacterial Infection

- by Downregulating IκBζ Target Genes in Hepatocytes. *J. Hepatol.* **2021**, *75*, 163–176, doi:10.1016/j.jhep.2021.02.004.
331. Ross, B.X.; Gao, N.; Cui, X.; Standiford, T.J.; Xu, J.; Yu, F.-S.X. IL-24 Promotes Pseudomonas Aeruginosa Keratitis in C57BL/6 Mouse Corneas. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2017**, *198*, 3536–3547, doi:10.4049/jimmunol.1602087.
332. Burmeister, A.R.; Johnson, M.B.; Yaemmongkol, J.J.; Marriott, I. Murine Astrocytes Produce IL-24 and Are Susceptible to the Immunosuppressive Effects of This Cytokine. *J. Neuroinflammation* **2019**, *16*, 55, doi:10.1186/s12974-019-1444-1.
333. Ma, Y.; Chen, H.; Wang, Q.; Luo, F.; Yan, J.; Zhang, X.-L. IL-24 Protects against Salmonella Typhimurium Infection by Stimulating Early Neutrophil Th1 Cytokine Production, Which in Turn Activates CD8+ T Cells. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39*, 3357–3368, doi:10.1002/eji.200939678.
334. Che, K.F.; Tengvall, S.; Levänen, B.; Silverpil, E.; Smith, M.E.; Awad, M.; Vikström, M.; Palmberg, L.; Qvarfordt, I.; Sköld, M.; et al. Interleukin-26 in Antibacterial Host Defense of Human Lungs. Effects on Neutrophil Mobilization. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2014**, *190*, 1022–1031, doi:10.1164/rccm.201404-0689OC.
335. Kumar, N.P.; Moideen, K.; Banurekha, V.V.; Nair, D.; Babu, S. Modulation of Th1/Tc1 and Th17/Tc17 Responses in Pulmonary Tuberculosis by IL-20 Subfamily of Cytokines. *Cytokine* **2018**, *108*, 190–196, doi:10.1016/j.cyto.2018.04.005.
336. Wu, B.; Huang, C.; Kato-Maeda, M.; Hopewell, P.C.; Daley, C.L.; Krensky, A.M.; Clayberger, C. IL-24 Modulates IFN-γ Expression in Patients with Tuberculosis. *Immunol. Lett.* **2008**, *117*, 57–62, doi:10.1016/j.imlet.2007.11.018.
337. Che, K.F.; Kaarteenaho, R.; Lappi-Blanco, E.; Levänen, B.; Sun, J.; Wheelock, Å.; Palmberg, L.; Sköld, C.M.; Lindén, A. Interleukin-26 Production in Human Primary Bronchial Epithelial Cells in Response to Viral Stimulation: Modulation by Th17 Cytokines. *Mol. Med.* **2017**, *23*, 247–257, doi:10.2119/molmed.2016.00064.
338. Seong, R.-K.; Choi, Y.-K.; Shin, O.S. MDA7/IL-24 Is an Anti-Viral Factor That Inhibits Influenza Virus Replication. *J. Microbiol. Seoul Korea* **2016**, *54*, 695–700, doi:10.1007/s12275-016-6383-2.
339. Strumillo, S.T.; Curcio, M.F.; Carvalho, F.F. de; Sucupira, M.A.; Diaz, R.S.; Monteiro, H.P.; Janini, L.M.R. HIV-1 Infection Modulates IL-24 Expression Which Contributes to Cell Apoptosis in Vitro. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43*, 574–579, doi:10.1002/cbin.11111.
340. Mear, J.B.; Gosset, P.; Kipnis, E.; Faure, E.; Dessein, R.; Jawhara, S.; Fradin, C.; Faure, K.; Poulain, D.; Sendid, B.; et al. Candida Albicans Airway Exposure Primes the Lung Innate Immune Response against Pseudomonas Aeruginosa Infection through Innate Lymphoid Cell Recruitment and Interleukin-22-Associated Mucosal Response. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 306–315, doi:10.1128/IAI.01085-13.

341. Okabayashi, T.; Kojima, T.; Masaki, T.; Yokota, S.; Imaizumi, T.; Tsutsumi, H.; Himi, T.; Fujii, N.; Sawada, N. Type-III Interferon, Not Type-I, Is the Predominant Interferon Induced by Respiratory Viruses in Nasal Epithelial Cells. *Virus Res.* **2011**, *160*, 360–366, doi:10.1016/j.virusres.2011.07.011.
342. Pichavant, M.; Rémy, G.; Bekaert, S.; Le Rouzic, O.; Kervoaze, G.; Vilain, E.; Just, N.; Tillie-Leblond, I.; Trottein, F.; Cataldo, D.; et al. Oxidative Stress-Mediated INKT-Cell Activation Is Involved in COPD Pathogenesis. *Mucosal Immunol.* **2014**, *7*, 568–578, doi:10.1038/mi.2013.75.
343. Wahl, C.; Müller, W.; Leithäuser, F.; Adler, G.; Oswald, F.; Reimann, J.; Schirmbeck, R.; Seier, A.; Weiss, J.M.; Prochnow, B.; et al. IL-20 Receptor 2 Signaling down-Regulates Antigen-Specific T Cell Responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2009**, *182*, 802–810, doi:10.4049/jimmunol.182.2.802.
344. Randall, R.E.; Goodbourn, S. Interferons and Viruses: An Interplay between Induction, Signalling, Antiviral Responses and Virus Countermeasures. *J. Gen. Virol.* **2008**, *89*, 1–47, doi:10.1099/vir.0.83391-0.
345. Hsu, A.C.-Y.; Parsons, K.; Moheimani, F.; Knight, D.A.; Hansbro, P.M.; Fujita, T.; Wark, P.A. Impaired Antiviral Stress Granule and IFN- β Enhanceosome Formation Enhances Susceptibility to Influenza Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2016**, *55*, 117–127, doi:10.1165/rcmb.2015-0306OC.
346. García-Valero, J.; Olloquequi, J.; Montes, J.F.; Rodríguez, E.; Martín-Satué, M.; Texidó, L.; Ferrer Sancho, J. Deficient Pulmonary IFN- β Expression in COPD Patients. *PLoS One* **2019**, *14*, e0217803, doi:10.1371/journal.pone.0217803.
347. Hilzendeger, C.; da Silva, J.; Henket, M.; Schleich, F.; Corhay, J.L.; Kebabzde, T.; Edwards, M.R.; Mallia, P.; Johnston, S.L.; Louis, R. Reduced Sputum Expression of Interferon-Stimulated Genes in Severe COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2016**, *11*, 1485–1494, doi:10.2147/COPD.S105948.
348. van Helden, M.J.G.; van Kooten, P.J.S.; Bekker, C.P.J.; Gröne, A.; Topham, D.J.; Easton, A.J.; Boog, C.J.P.; Busch, D.H.; Zaiss, D.M.W.; Sijts, A.J.A.M. Pre-Existing Virus-Specific CD8+ T-Cells Provide Protection against Pneumovirus-Induced Disease in Mice. *Vaccine* **2012**, *30*, 6382–6388, doi:10.1016/j.vaccine.2012.08.027.
349. Van Leuven, J.T.; Gonzalez, A.J.; Ijezie, E.C.; Wixom, A.Q.; Clary, J.L.; Naranjo, M.N.; Ridenhour, B.J.; Miller, C.R.; Miura, T.A. Rhinovirus Reduces the Severity of Subsequent Respiratory Viral Infections by Interferon-Dependent and -Independent Mechanisms. *mSphere* **2021**, *6*, e0047921, doi:10.1128/mSphere.00479-21.
350. Nakada, T.-A.; Wacharasint, P.; Russell, J.A.; Boyd, J.H.; Nakada, E.; Thair, S.A.; Shimada, T.; Walley, K.R. The IL20 Genetic Polymorphism Is Associated with Altered Clinical Outcome in Septic Shock. *J. Innate Immun.* **2018**, *10*, 181–188, doi:10.1159/000486104.

351. Papi, A.; Bellettato, C.M.; Braccioni, F.; Romagnoli, M.; Casolari, P.; Caramori, G.; Fabbri, L.M.; Johnston, S.L. Infections and Airway Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severe Exacerbations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, *173*, 1114–1121, doi:10.1164/rccm.200506-859OC.
352. Ferrero, M.R.; Garcia, C.C.; Dutra de Almeida, M.; Torres Braz da Silva, J.; Bianchi Reis Insuela, D.; Teixeira Ferreira, T.P.; de Sá Coutinho, D.; Trindade de Azevedo, C.; Machado Rodrigues e Silva, P.; Martins, M.A. CCR5 Antagonist Maraviroc Inhibits Acute Exacerbation of Lung Inflammation Triggered by Influenza Virus in Cigarette Smoke-Exposed Mice. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 620, doi:10.3390/ph14070620.
353. Yang, M.-L.; Wang, C.-T.; Yang, S.-J.; Leu, C.-H.; Chen, S.-H.; Wu, C.-L.; Shiau, A.-L. IL-6 Ameliorates Acute Lung Injury in Influenza Virus Infection. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43829, doi:10.1038/srep43829.
354. Liu, B.; Bao, L.; Wang, L.; Li, F.; Wen, M.; Li, H.; Deng, W.; Zhang, X.; Cao, B. Anti-IFN- γ Therapy Alleviates Acute Lung Injury Induced by Severe Influenza A (H1N1) Pdm09 Infection in Mice. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2021**, *54*, 396–403, doi:10.1016/j.jmii.2019.07.009.
355. Shepardson, K.M.; Larson, K.; Morton, R.V.; Prigge, J.R.; Schmidt, E.E.; Huber, V.C.; Rynda-Apple, A. Differential Type I Interferon Signaling Is a Master Regulator of Susceptibility to Postinfluenza Bacterial Superinfection. *mBio* **2016**, *7*, e00506-16, doi:10.1128/mBio.00506-16.
356. Rich, H.E.; McCourt, C.C.; Zheng, W.Q.; McHugh, K.J.; Robinson, K.M.; Wang, J.; Alcorn, J.F. Interferon Lambda Inhibits Bacterial Uptake during Influenza Superinfection. *Infect. Immun.* **2019**, *87*, e00114-19, doi:10.1128/IAI.00114-19.
357. Broggi, A.; Ghosh, S.; Sposito, B.; Spreafico, R.; Balzarini, F.; Lo Cascio, A.; Clementi, N.; De Santis, M.; Mancini, N.; Granucci, F.; et al. Type III Interferons Disrupt the Lung Epithelial Barrier upon Viral Recognition. *Science* **2020**, *369*, 706–712, doi:10.1126/science.abc3545.
358. Dumoutier, L.; Tounsi, A.; Michiels, T.; Sommereyns, C.; Kottenko, S.V.; Renaud, J.-C. Role of the Interleukin (IL)-28 Receptor Tyrosine Residues for Antiviral and Antiproliferative Activity of IL-29/Interferon- λ 1: SIMILARITIES WITH TYPE I INTERFERON SIGNALING *. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 32269–32274, doi:10.1074/jbc.M404789200.
359. Mucha, J.; Majchrzak, K.; Taciak, B.; Hellmén, E.; Król, M. MDSCs Mediate Angiogenesis and Predispose Canine Mammary Tumor Cells for Metastasis via IL-28/IL-28RA (IFN- λ) Signaling. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103249, doi:10.1371/journal.pone.0103249.
360. Kottenko, S.V.; Gallagher, G.; Baurin, V.V.; Lewis-Antes, A.; Shen, M.; Shah, N.K.; Langer, J.A.; Sheikh, F.; Dickensheets, H.; Donnelly, R.P. IFN- λ s Mediate Antiviral Protection through a Distinct Class II Cytokine Receptor Complex. *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 69–77, doi:10.1038/ni875.

361. Ching, C.B.; Gupta, S.; Li, B.; Cortado, H.; Mayne, N.; Jackson, A.R.; McHugh, K.M.; Becknell, B. Interleukin-6/Stat3 Signaling Has an Essential Role in the Host Antimicrobial Response to Urinary Tract Infection. *Kidney Int.* **2018**, *93*, 1320–1329, doi:10.1016/j.kint.2017.12.006.
362. Sharma, P.; Sharma, N.; Mishra, P.; Joseph, J.; Mishra, D.K.; Garg, P.; Roy, S. Differential Expression of Antimicrobial Peptides in Streptococcus Pneumoniae Keratitis and STAT3-Dependent Expression of LL-37 by Streptococcus Pneumoniae in Human Corneal Epithelial Cells. *Pathogens* **2019**, *8*, 31, doi:10.3390/pathogens8010031.
363. Iwasaki, A.; Pillai, P.S. Innate Immunity to Influenza Virus Infection. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 315–328, doi:10.1038/nri3665.
364. Pillai, P.S.; Molony, R.D.; Martinod, K.; Dong, H.; Pang, I.K.; Tal, M.C.; Solis, A.G.; Bielecki, P.; Mohanty, S.; Trentalange, M.; et al. Mx1 Reveals Innate Pathways to Antiviral Resistance and Lethal Influenza Disease. *Science* **2016**, *352*, 463–466, doi:10.1126/science.aaf3926.
365. Simpson, J.; Lynch, J.P.; Loh, Z.; Zhang, V.; Werder, R.B.; Spann, K.; Phipps, S. The Absence of Interferon- β Promotor Stimulator-1 (IPS-1) Predisposes to Bronchiolitis and Asthma-like Pathology in Response to Pneumoviral Infection in Mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2353, doi:10.1038/s41598-017-02564-9.
366. Yoo, J.-K.; Kim, T.S.; Hufford, M.M.; Braciale, T.J. Viral Infection of the Lung: Host Response and Sequelae. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *132*, 1263–1276, doi:10.1016/j.jaci.2013.06.006.
367. Hadzic, S.; Wu, C.-Y.; Avdeev, S.; Weissmann, N.; Schermuly, R.T.; Kosanovic, D. Lung Epithelium Damage in COPD – An Unstoppable Pathological Event? *Cell. Signal.* **2020**, *68*, 109540, doi:10.1016/j.celmsg.2020.109540.
368. Wegenka, U.M. IL-20: Biological Functions Mediated through Two Types of Receptor Complexes. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2010**, *21*, 353–363, doi:10.1016/j.cytogfr.2010.08.001.
369. Major, J.; Crotta, S.; Llorian, M.; McCabe, T.M.; Gad, H.H.; Priestnall, S.L.; Hartmann, R.; Wack, A. Type I and III Interferons Disrupt Lung Epithelial Repair during Recovery from Viral Infection. *Science* **2020**, *369*, 712–717, doi:10.1126/science.abc2061.
370. Leung, C.; Wadsworth, S.J.; Yang, S.J.; Dorscheid, D.R. Structural and Functional Variations in Human Bronchial Epithelial Cells Cultured in Air-Liquid Interface Using Different Growth Media. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **2020**, *318*, L1063–L1073, doi:10.1152/ajplung.00190.2019.
371. Hsu, Y.-H.; Wu, C.-Y.; Hsing, C.-H.; Lai, W.-T.; Wu, L.-W.; Chang, M.-S. Anti-IL-20 Monoclonal Antibody Suppresses Prostate Cancer Growth and Bone Osteolysis in Murine Models. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139871, doi:10.1371/journal.pone.0139871.

372. Cui, X.-F.; Cui, X.-G.; Leng, N. Overexpression of Interleukin-20 Receptor Subunit Beta (IL20RB) Correlates with Cell Proliferation, Invasion and Migration Enhancement and Poor Prognosis in Papillary Renal Cell Carcinoma. *J. Toxicol. Pathol.* **2019**, *32*, 245–251, doi:10.1293/tox.2019-0017.
373. Hsu, Y.-H.; Li, H.-H.; Sung, J.-M.; Chen, W.-T.; Hou, Y.-C.; Chang, M.-S. Interleukin-19 Mediates Tissue Damage in Murine Ischemic Acute Kidney Injury. *PLoS One* **2013**, *8*, e56028, doi:10.1371/journal.pone.0056028.
374. van Riet, S.; van Schadewijk, A.; de Vos, S.; Vandeghinste, N.; Rottier, R.J.; Stolk, J.; Hiemstra, P.S.; Khedoe, P. Modulation of Airway Epithelial Innate Immunity and Wound Repair by M(GM-CSF) and M(M-CSF) Macrophages. *J. Innate Immun.* **2020**, *12*, 410–421, doi:10.1159/000506833.
375. Bissonnette, E.Y.; Lauzon-Joset, J.-F.; Debley, J.S.; Ziegler, S.F. Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells Is Essential to Maintain Lung Homeostasis. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 2734, doi:10.3389/fimmu.2020.583042.
376. Walker, K.H.; Krishnamoorthy, N.; Brüggemann, T.R.; Shay, A.E.; Serhan, C.N.; Levy, B.D. Protectins PCTR1 and PD1 Reduce Viral Load and Lung Inflammation During Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 704427, doi:10.3389/fimmu.2021.704427.
377. Yuan, Z.; Petree, J.R.; Lee, F.E.-H.; Fan, X.; Salaita, K.; Guidot, D.M.; Sadikot, R.T. Macrophages Exposed to HIV Viral Protein Disrupt Lung Epithelial Cell Integrity and Mitochondrial Bioenergetics via Exosomal MicroRNA Shuttling. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 580, doi:10.1038/s41419-019-1803-y.
378. Gottlieb, A.B.; Krueger, J.G.; Lundblad, M.S.; Göthberg, M.; Skolnick, B.E. First-In-Human, Phase 1, Randomized, Dose-Escalation Trial with Recombinant Anti-IL-20 Monoclonal Antibody in Patients with Psoriasis. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0134703, doi:10.1371/journal.pone.0134703.

Annexes

Annexe 1 : Article : IL-20 cytokines are involved in epithelial lesions associated with virus induced COPD exacerbation in mice

Article accepté le 02/12/2021 dans *biomedicines* (MDPI)



IL-20 Cytokines Are Involved in Epithelial Lesions Associated with Virus-Induced COPD Exacerbation in Mice



Article

IL-20 Cytokines Are Involved in Epithelial Lesions Associated with Virus-Induced COPD Exacerbation in Mice

Mélina Le Roux¹, Anaïs Ollivier¹ , Gwenola Kervoaze¹, Timothé Beke¹, Laurent Gillet² , Muriel Pichavant¹ and Philippe Gosset^{1,*}

¹ CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, CHRU Lille, Institute Pasteur de Lille, University Lille, CNRS UMR9017, Inserm U1019, 59000 Lille, France; melina.le-roux@pasteur-lille.fr (M.L.R.); anais.ollivier@pasteur-lille.fr (A.O.); gwenola.kervoaze@pasteur-lille.fr (G.K.); timotheebeke@gmail.com (T.B.); muriel.pichavant@pasteur-lille.fr (M.P.)

² Immunology-Vaccinology Laboratory, Department of Infection and Parasitic Diseases, FARA, University of Liege, 4000 Liege, Belgium; L.gillet@ulg.ac.be

* Correspondence: philippe.gosset@pasteur-lille.fr; Tel.: +33-320-877-965

Abstract: (1) Background: viral infections are a frequent cause of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exacerbations, which are responsible for disease progression and mortality. Previous reports showed that IL-20 cytokines facilitate bacterial lung infection, but their production and their role in COPD and viral infection has not yet been investigated. (2) Methods: C57BL/6 WT and IL-20 Rb KO mice were chronically exposed to air or cigarette smoke (CS) to mimic COPD. Cytokine production, antiviral response, inflammation and tissue damages were analyzed after PVM infection. (3) Results: CS exposure was associated with an increase in viral burden and antiviral response. PVM infection in CS mice enhanced IFN- γ , inflammation and tissue damage compared to Air mice. PVM infection and CS exposure induced, in an additive manner, IL-20 cytokines expression and the deletion of IL-20 Rb subunit decreased the expression of interferon-stimulated genes and the production of IFN- λ 2/3, without an impact on PVM replication. Epithelial cell damages and inflammation were also reduced in IL-20 Rb^{-/-} mice, and this was associated with reduced lung permeability and the maintenance of intercellular junctions. (4) Conclusions: PVM infection and CS exposure additively upregulates the IL-20 pathway, leading to the promotion of epithelial damages. Our data in our model of viral exacerbation of COPD identify IL-20 cytokine as a potential therapeutic target.

Keywords: COPD; cigarette; viral infection; IL-20 cytokines; lung



Citation: Le Roux, M.; Ollivier, A.; Kervoaze, G.; Beke, T.; Gillet, L.; Pichavant, M.; Gosset, P. IL-20 Cytokines Are Involved in Epithelial Lesions Associated with Virus-Induced COPD Exacerbation in Mice. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1838. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121838>

Academic Editor: Dong-Kwon Yang

Received: 1 November 2021

Accepted: 2 December 2021

Published: 5 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) remains a major cause of morbidity and mortality worldwide. According to the WHO, COPD is the third leading cause of death worldwide, causing 3.23 million deaths in 2019. Characterized by progressive and irreversible airflow limitation, the main risk factor to develop COPD is cigarette smoking. Chronic exposure to cigarette smoke (CS) triggers inflammatory processes that alters lung barrier functions and reduce immune defense mechanisms, leading to increased susceptibility to respiratory infections with both bacteria and viruses [1]. Such infections further alter the clinical status of COPD patients and are responsible for acute exacerbation episodes. These episodes trigger a vicious circle by favoring the development of a new exacerbation and decrease survival rates in patients with acute exacerbations of COPD (AE-COPD), from 80% to 30% over a five-year period [2]. Although AE-COPD are more frequently associated with bacterial infections, virus infections with Influenza A virus (IAV), respiratory syncytial virus (RSV) and rhinovirus (RV) are also frequent as well as bacteria plus virus co-infections.

The outcome of the infection is tightly related to the efficiency of the anti-microbial host response. Both innate and adaptive immune responses participate in the control of viral infection [3,4]. The immune response against viruses mostly implicates the production of interferon (IFN) response. Whereas the anti-viral effect of type II IFN (IFN- γ) is limited, type I (α and β) and type III (λ or IL-28/IL-29) induced the transcription of several hundreds of genes with potential anti-viral activities [5]. In addition, Th17-type cytokines, including interleukin (IL)-22, are also produced during infection with IAV and RSV. This cytokine controls the inflammatory reaction and preserves the lung homeostasis by limiting tissue injury, particularly through the IL-22 ability to maintain the airway epithelial barrier [6,7]. Moreover, IL-17 and IL-22 are essential in order to prevent secondary bacterial invasion. Indeed, these cytokines orchestrate the anti-bacterial response against different bacteria by modulating the secretion of antimicrobial peptides [8]. IL-22 with IL-19, IL-20, IL-24 and IL-26 belong to the IL-20 cytokine subfamily. Whereas IL-22 acts through a specific IL-10Rb-dependent receptor, 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 IL-20Rb chains. Moreover, IL-20 and IL-24 bind the type II IL-20R composed of the IL-22 receptor- α 1 subunit and IL-20Rb [9]. Interestingly, these receptors are strongly expressed in airway epithelial cells (AEC) [10], and blocking antibodies against IL-20Rb subunit can efficiently neutralize the response to IL-20 cytokines (IL-19, IL-20 and IL-24) [10] and modulate cutaneous and lung bacterial infection [10,11]. Because IL-20 cytokines are associated with an increased clinical outcome of COPD [12] and viral infection [13,14], we want to assess their physiopathologic role during viral exacerbation of COPD using WT and IL-20Rb KO mice. We analyzed airway inflammation after infection with pneumonia virus of mice (PVM; family *Paramyxoviridae*), a natural mouse pathogen mimicking RSV pathogenesis [15,16]. In contrast to RSV when used in rodent infection models, PVM undergoes robust replication in mouse AEC in vivo [15]. In this study, we demonstrated, for the first time, that PVM infection induces, in an additive manner with CS exposure, the production of IL-20 cytokines, mainly IL-24, and that these cytokines participate in both the inflammatory reaction and the development of lung epithelial lesions.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Six-to-eight-week-old male wild-type C57BL/6 (H \setminus 2Db) mice were purchased from Janvier (SOPF animal facility, Le Genest-St. Isle, France). IL-20Rb KO mice were generated by the group of Wegenka UM [17] and were a generous gift of Pr J Niess (Bern, Switzerland). They were expanded in our animal facility after back cross with C57BL6/J mice.

Mice were exposed to CS (5 cig/day, 5 days/week) during 12 weeks (whole body exposition chamber; Emka, Scireq, Montreal, QC, Canada), to induce COPD-like disease [18]. The control group was exposed to ambient air. 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 12 h light/dark cycle with food and water provided ad libitum.

2.2. Viral Challenge

For infection, frozen working stocks were diluted in phosphate-buffered saline (PBS). Intranasal (i.n) infection was performed under xylazine (16 mg/kg) ketamine (80 mg/kg) anesthesia with 200 PFU of PVM per mouse. Control mice received 50 μ L of PBS.

2.3. Sample Collection and Processing

Mice were euthanized 9 or 12 days after infection. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluids, lungs, spleens and blood samples were collected and kept on ice until they were processed, or frozen immediately in liquid nitrogen. BAL was performed by instilling 0,5 mL (final volume 2,5 mL) of sterile PBS five times. After centrifugation at 400 \times g for

6 min at 4 °C, the supernatant (cell-free BAL fluid) was stored at −20 °C for cytokine analysis (ELISA), and the cell pellet was used for flow-cytometry analysis.

The left lobe of the lung was mashed with a sterile blade and then digested with collagenase (Collagenase Type VI 17104–019 Gibco by Life technologies, Carlsbad, California United States) at 37 °C. After 15 min of digestion, lungs were homogenized with an 18 G needle and further digested for 15 min. After centrifugation at 400 × g for 6 min at 4 °C, the pellets were resuspended in a 30% Percoll solution (Percoll™ GE Healthcare 17–0891-01, Chicago, IL, United States) and centrifuged at 500 × g for 15 min. Total spleen cells were also isolated from crushed spleen and centrifuged at 400 × g for 6 min at 4 °C. The lung and spleen pellets were resuspended in red blood cells (RBC) lysis buffer during 5 min at room temperature, to remove erythrocytes. The reaction of RBC lysis was stopped with PBS 2% FBS (Gibco by Life technologies, Carlsbad, California United States). After centrifugation at 400 × g for 6 min at 4 °C, pulmonary and spleen cells were resuspended in PBS 2% FBS, then enumerated and used for flow cytometry.

2.4. Flow Cytometry

BAL, lung and spleen total cells were incubated with the appropriate panel of antibodies for 30 min in PBS 2% FCS. Conjugated antibodies were used against mouse CD5 (ref130–102–574, FITC-conjugated), PBS57-loaded CD1 d Tetramer (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), TCRγδ (ref 130–104–016, APC-Vio770 conjugated), TCR-β (ref 130–104–815, V450-conjugated), CD8 (ref 130–109–252, V500-conjugated), CD45 (ref BLE103140, BV605-conjugated), 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, Franklin Lakes, United States; Biolegend, San Diego, United States and Myltenyi Biotech, Paris, France) and CCR2 (ref FAB 5538A, R&D systems, APC conjugated). Data were acquired on a LSR Fortessa (BD Biosciences, Franklin Lakes, United States) and analyzed with FlowJo™ software v7.6.5 (Stanford, CA, USA). Gating strategy has been previously described [8,19]. Absolute cell numbers were calculated according to the total cell number and the frequency of CD45+ immune cells.

2.5. Lung Histology

For histopathological analysis, posterior lobes of lungs were fixed with paraformaldehyde (PFA 4%). Lungs were paraffin-embedded and lung section was stained with hematoxylin-eosin. Lung injury was scored based on remodeling and inflammation, as previously defined [8]. Lesions in bronchial epithelium were also evaluated as cell desquamation, cellular lesions and dissociation. The percentage of altered epithelium was determined by using Image J software (NIH).

For immunohistochemistry (IHC), lung paraffin-embedded section was deparaffined with two successive baths of Safesolv (Labonord ref 00699464) and rehydrated with successive bath of ethanol (two bath of 100%, one of 90%, one of 80% and one of 50%) and one of water (during 5 min for each). The masking epitope was carried out in pH 6.0 citrate buffer for 15 min at 90 °C. We used as primary antibodies an anti-IL-19 antibody [EPN-CIR168] ab154187 (Abcam), an anti-IL-20 antibody (orb13501, Biorbyt, Cambridge, United Kingdom) and an anti-IL-24 antibody (orb228807, Biorbyt, Cambridge, United Kingdom). To quantify the epithelial damages, we used rabbit anti-β-catenin (ref 71–2700), anti-E-cadherin (ref 61–7300) and anti-ZO-1 (ref PA5–19479) antibodies (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, United States). The UltraTek HRP anti-polyvalent Lab Pack (Histoline laboratories, Pantigliate, Italia) was used according to the manufacturer's recommendation. Counterstaining was performed with hematoxylin (Interchim, Montluçon, France).

2.6. Cytokine Quantification by ELISA

Levels of IFN- γ , CXCL-1, IFN- λ 2/3, IL-20, IL-24 (R&D systems, Minneapolis, MN, United States) and IL-19 (Invitrogen, Waltham, MA, United States) were determined in BAL, lung and serum by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the manufacturer's recommendation.

2.7. mRNA Expression Quantification by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total RNA was isolated from mouse lung using NucleoZol reagent (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to manufacturer's instruction. Reverse transcription (RT) was performed with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, United States) according to manufacturer's recommendation.

Quantitative PCR was performed to quantify mRNA of interest with QuantStudio 12 K Flex (Applied Biosystems, Waltham, MA, United States) using SYBRGreen (eBiosciences, Waltham, MA, United States) reagent for all gene except for PVM detection using TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, United States). The primers (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) used in this study are described in Table 1.

Table 1. Sequence of primers used for qPCR.

| Gene | Sequences |
|---------------|---|
| <i>hprt1</i> | Sens: 5' TCC TCC TCA GAC CGC TTT T 3' Antisens: 5' CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC 3' |
| <i>il-19</i> | Sens: 5' TGT GTG CTG CAT GAC CAA CAA 3' Antisens: 5' GGC AAT GCT GCT GAT TCT CCT 3' |
| <i>il-20</i> | Sens: 5' TCT TGC CTT TGG ACT GTT CTC 3' Antisens: 5' GTT TGC AGT AAT CAC ACA GCT TC 3' |
| <i>il-24</i> | Sens: 5' AGC ACT GGC CCT TTC TTC AA 3' Antisens: 5' TGG CAA GAC CCA AAT CGG AA 3' |
| <i>rig-i</i> | Sens: 5' TGC GGA AAT ACA ACG ATG CA 3' Antisens: 5' GCT CGG TCT CAT CGA ATG CTG 3' |
| <i>rsad-2</i> | Sens: 5' TGC TGG CTG AGA ATA GCA TTA GG 3' Antisens: 5' GCT GAG TGC TGT TCC CAT CT 3' |
| <i>pvm</i> | Sens: 5' GCC GTC ATC AAC ACA GTG TGT 3' Antisens: 5' GCC TGA TGT GGC AGT GCT T 3' Probe: 5'[FAM] C GCT GAT AAT GGC CTG AG CA [TAM] 3' |

Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (sem) of the relative gene expression calculated for each experiment in folds ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) using *Hprt1* as house-keeping gene.

2.8. Statistical Analysis

The data are expressed as mean \pm sem. Results were statistically analyzed with prism software (GraphPad version 9, Prism, San Diego, Ca, USA) using the two-way ANOVA analysis. Virus effect was analyzed by Tukey's multiple comparison test, while CS or IL-20 KO effect was analyzed by Sidak's multiple comparison test.

Differences were considered significant when $p < 0.05$, $p =$ non-significant (ns). Significant virus effect (in comparison to non-infected mice) is symbolized by * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Significant CS or IL-20^{-/-} effect are symbolized by # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ and #### $p < 0.0001$.

3. Results

3.1. PVM Infection Exacerbates CS-Induced Inflammation and Antiviral Response

An experimental model of COPD exacerbation was established in mice chronically exposed to CS using PVM as the trigger. The effect of an intranasal challenge with PVM was analyzed 9 or 12 days post infection (dpi) (Figure 1a). In this model, PVM RNA was detected in the lung of Air mice with a peak at 9 dpi, and a significant increased detection

of PVM RNA was observed in CS-exposed mice at the same time. PVM replication was associated with the induction of antiviral response in the lung at 9 dpi both in Air and CS-exposed mice. An up-regulation of IFN-stimulated gene (ISG) expression, namely, *rig-1*, *irf-7* and *rsad-2* mRNA expression, was observed in the lung tissues in Air mice with a higher level in CS-exposed mice (except for *irf-7*). Moreover, this was associated with higher IFN- λ 2/3 production after PVM infection in CS-exposed mice. In summary, higher PVM replication resulted in an increased antiviral response in CS-exposed mice (Figure 1b).

Histological examination of lung tissues showed that PVM infection induced cell recruitment both in the peribronchial and alveolar area in infected mice at 9 dpi with a peak at 12 dpi. PVM infection also induced significant vascular and bronchial epithelial cell damages at 12 dpi in Air-mice. In contrast, CS exposure induced vascular remodeling in non-infected mice and showed a significant effect at 9 dpi on blood vessels and epithelial damages both in bronchi and alveoli (Figure 1d and as illustrated on Figure 1c). Similarly, epithelial cell lesions were of higher intensity in CS-infected mice at 12 dpi (Figure 1d).

PVM infection was associated with an increased recruitment into the BAL and in cells isolated from lung tissues at 9 and 12 dpi (Figure 2). CS-exposure did not affect total cell recruitment in the pulmonary compartment (10 days after the last exposure to CS). CS exposure increased NKT-like cell recruitment but caused no change in T lymphocytes or cDC2 in the lung. After infection, infiltrated cells included NK cells, NKT-like cells, CD4+ and CD8+ T lymphocytes and dendritic cells (cDC2), in BAL of Air mice at 12 dpi. PVM infection also induced the recruitment of NK cells and cDC2 at 9 dpi and cDC2 and of T lymphocytes at 12 dpi in the lung. CS exposure was responsible for a decrease in NK cell recruitment at 9 dpi into the lung. In the BAL, PVM infection increased the recruitment of NK cells, T lymphocytes and cDC2, as described in Bosteels et al. [20]. NK cell response to PVM was different between Air and CS mice. PVM infection also increased inflammatory mediators such as IFN- γ and IL-1 β in BAL fluid, mostly at 9 dpi (Figure 2). IFN- γ production was also induced in the lung at 9 dpi. No effect of CS exposure was observed on these parameters.

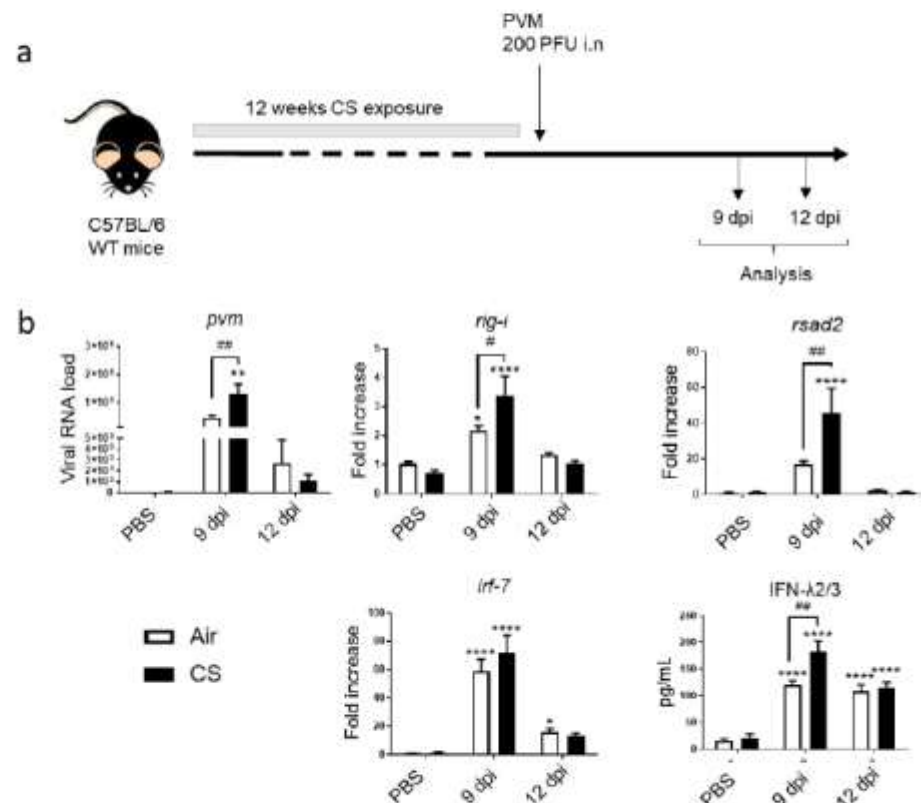


Figure 1. Cont.

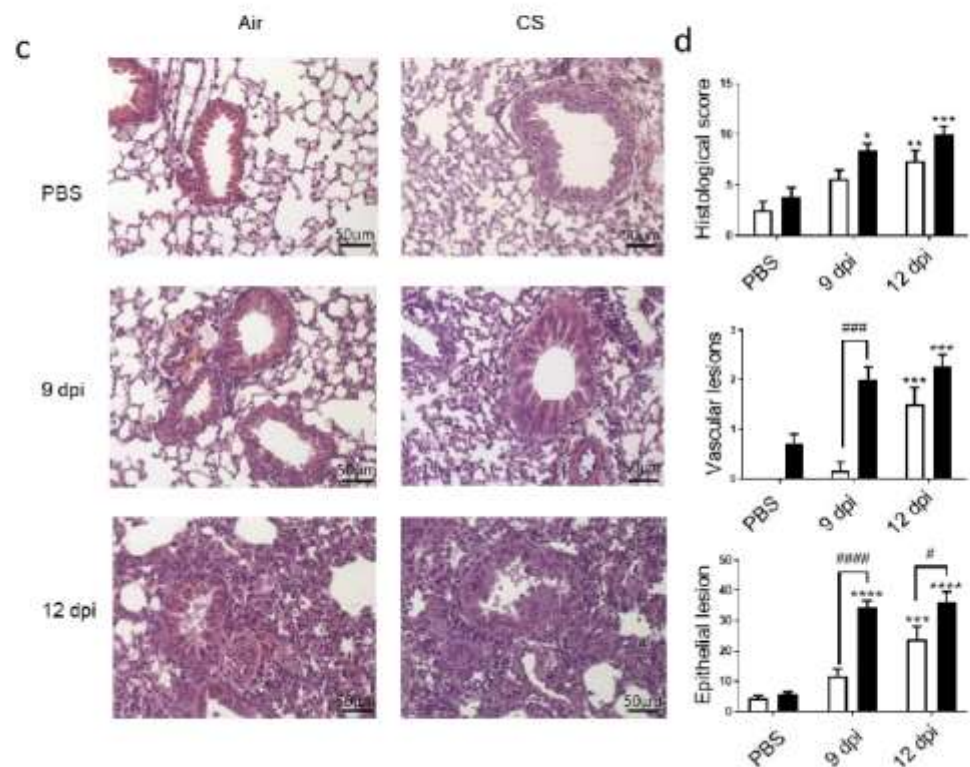


Figure 1. PVM infection exacerbates COPD. (a) Experimental design of the study: the day of the infection was defined as day 0, allowing the association of this time point with the end of cigarette smoke (CS) protocol, consisting of mouse exposure to ambient air (Air) or CS (5 cigarettes/day, 5 days week) for 12 weeks. Analysis was performed at 9 and 12 days post infection (dpi). (b) Viral load and antiviral response, including mRNA expression *rig-i*, *rsad-2* and *irf-7*, was evaluated by RT-qPCR in lung tissues. Results were expressed as fold increase compared to Air mice exposed to PBS using *hprt1* expression as a house keeping gene. IFN- λ 2/3 was evaluated by ELISA (pg/mL). (c) Histological changes were evaluated at 9 and 12 dpi. Representative slides are shown after HE staining. Scale bar = 50 μ m. (d) Histological score analysis including vascular lesion and epithelial damages is expressed as mean \pm SEM. Air mice (white bars) and CS mice (Black bars). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ correspond to virus effect (PVM vs. PBS). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ and #### $p < 0.0001$ correspond to CS effect (CS vs. Air). Three independent experiments have been performed with 3–5 mice in each group per experiment.

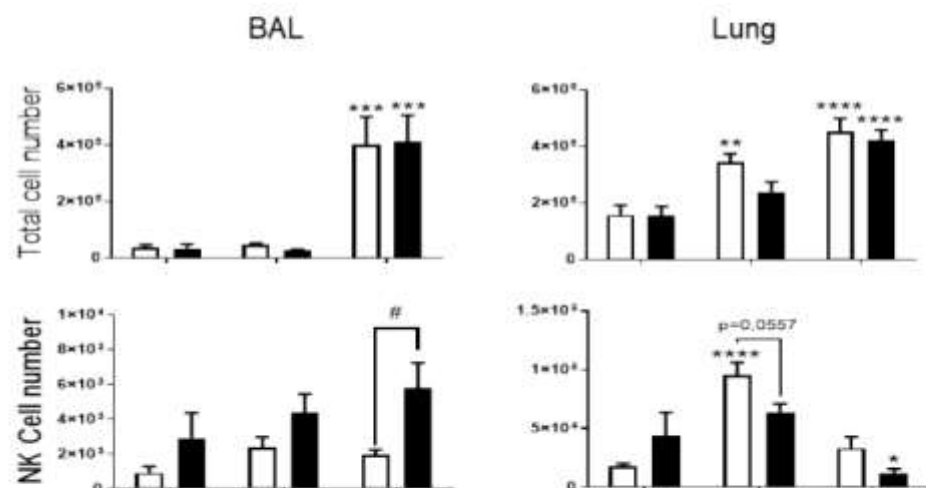


Figure 2. Cont.

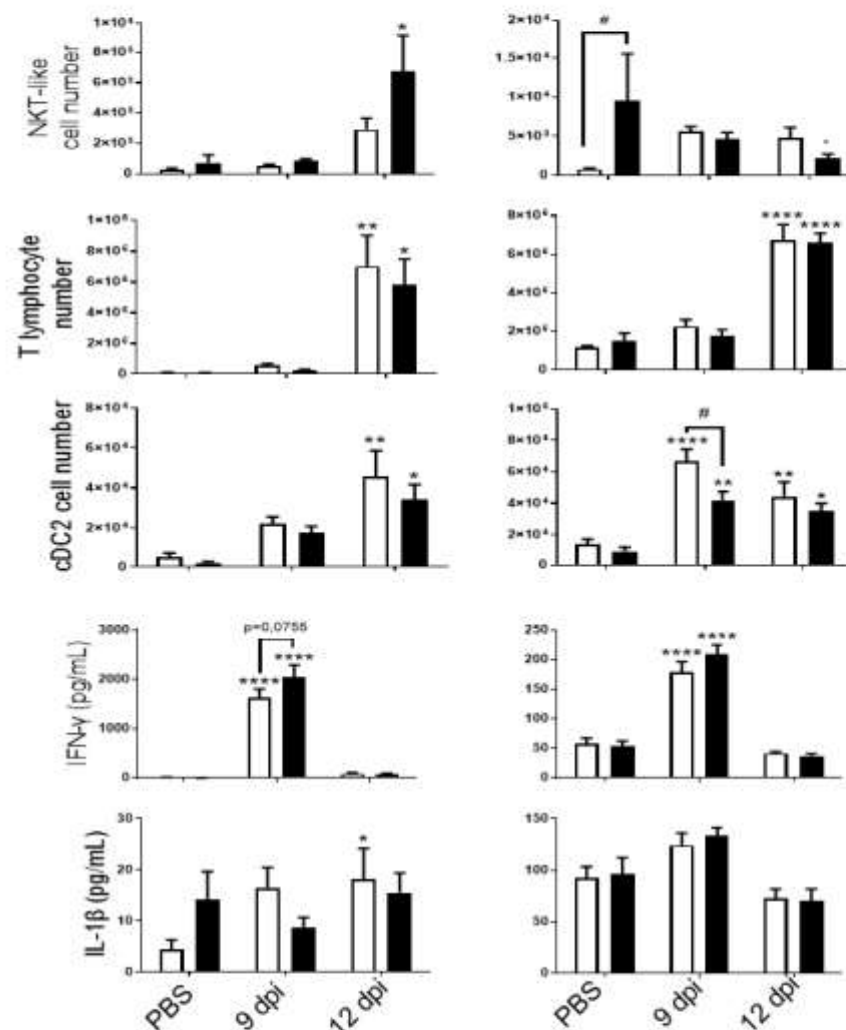


Figure 2. PVM infection induces lung inflammation. Total cell numbers, CD45⁺/TCR β ⁻/NK1.1⁺ NK cells, CD45⁺/TCR β ⁺/NK1.1⁺ NKT-like cells, CD45⁺/TCR β ⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and CD45⁺/F4/80⁻/CD11c⁺/CD11b⁺/CD103⁻ dendritic cells (cDC2) count were evaluated in BAL fluid (left) and lung tissue (right) of Air (white bars) and CS mice (Black bars). IFN- γ and IL-1 β levels were analyzed by ELISA in BAL fluid (left) and lung tissue (right) of Air and CS mice. Data represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ correspond to virus effect (PVM vs PBS). # $p < 0.05$ corresponds to CS effect (CS vs. Air). Three independent experiments have been performed with 3–5 mice in each group per experiment.

At a systemic level, in spleen, no major changes were observed (Supplementary Materials Figure S1) except for the number of NKT-like cells that was decreased after CS exposure. IFN- γ levels were significantly higher in the serum of infected mice and majored after exposure to CS, whereas IL-1 β was not induced after PVM infection.

Altogether, these data showed that PVM replication is more important in CS-exposed mice, leading to a more pronounced lesions within the lung and more inflammation. However, this is not associated with major alterations in the nature of the cell recruitment.

3.2. PVM Infection Modulates IL-20 Pathway

Since IL-20 cytokines are known to be involved in bacterial clearance [10,11], we checked on their involvement in the context of a viral infection. We then analyzed the mRNA expression of IL-20 cytokines in the lung. CS exposure tended to increase IL-19, IL-20 and IL-24 mRNA expression in lung (Figure 3a). Moreover, PVM infection also tended to increase the mRNA expression of the 3 cytokines in Air mice at 9 dpi, whereas it

had an additive effect with CS exposure on IL-20 and IL-24. In parallel, mRNA levels of IL-20Ra and IL-20Rb subunits were induced by PVM infection in lung only at 9 dpi. CS exposure did not significantly affect IL-20Ra and IL-20Rb subunit expression.

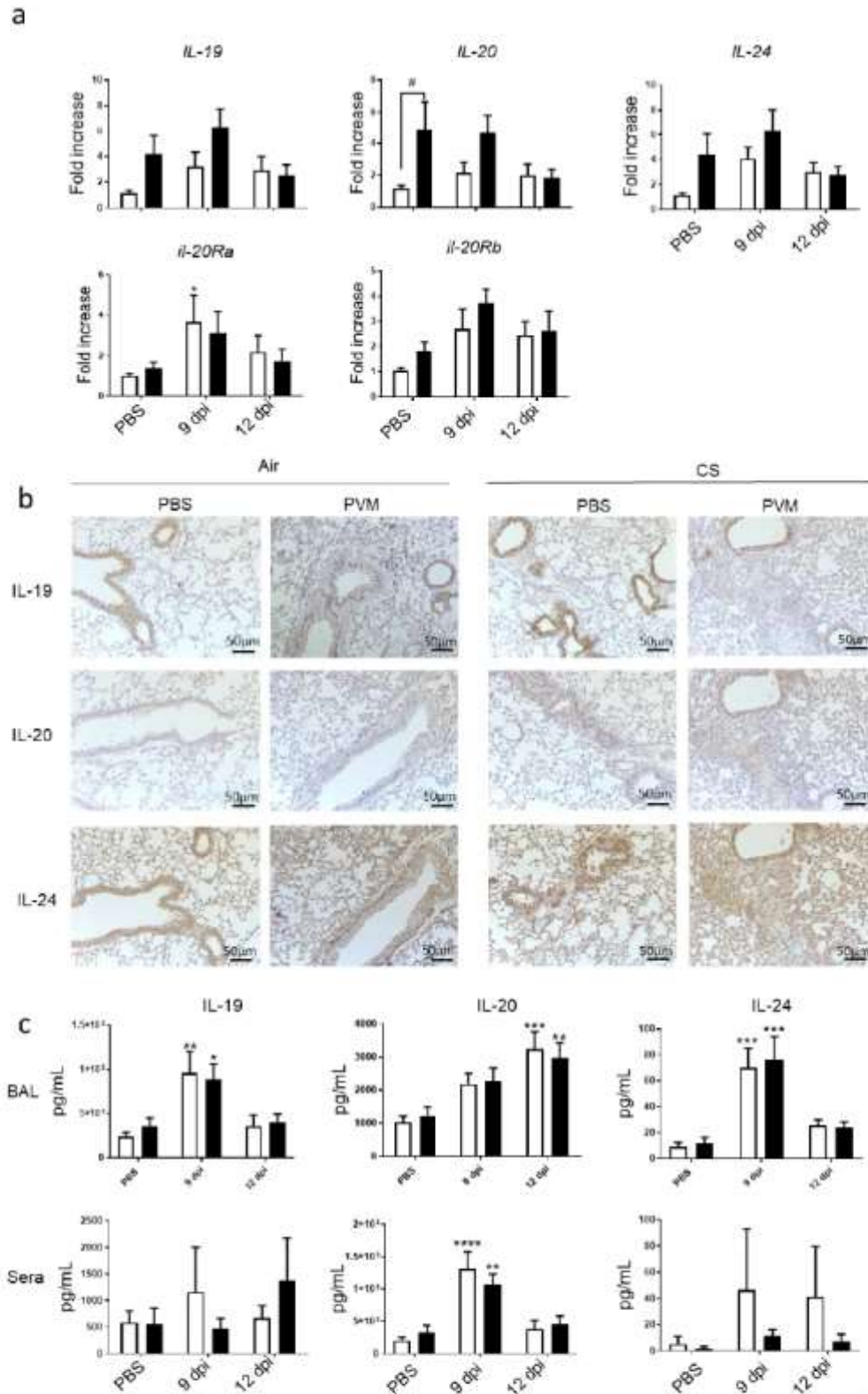


Figure 3. PVM infection modulates IL-20 cytokines. (a) IL-19, IL-20, IL-24, IL-20ra and IL-20rb mRNA levels were evaluated by RT-qPCR in lung tissue at 9 and 12 dpi. Results were expressed as fold increase compared to Air mice exposed to PBS and

using expression of *hprt1* as a housekeeping gene. (b) Expression of IL-19, IL-20 and IL-24 was evaluated on lung sections by immunohistochemistry at 12 dpi in Air and CS mice. Scale bar = 50 μ m. (c) *Il-19*, *Il-20*, and *Il-24* protein level in BAL fluid and sera were analyzed by ELISA and expressed in pg/mL. Results were expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ correspond to virus effect (PVM vs PBS). # $p < 0.05$ corresponds to CS effect (CS vs. Air). Three independent experiments have been performed with 3–5 mice in each group per experiment.

Protein expression was then analyzed by immunohistochemistry on lung sections. IL-19, IL-20 and IL-24 were detected in controls both in Air and CS-exposed mice. However, CS exposure tended to increase IL-19 expression mostly in AEC, whereas staining for IL-20 and IL-24 was more intense in peribronchial infiltrate and in alveolar walls. At 9 dpi after PVM infection in Air mice, a decrease in the staining within the epithelial cells was observed for the three cytokines. In contrast, higher IL-20 and IL-24 expression was observed in peribronchial inflammatory infiltrate and alveolar walls but not for IL-19. In addition, CS-infected mice were characterized by high cell infiltration, which expressed IL-19, IL-20 and IL-24. To confirm these data, protein levels of IL-20 cytokines were also analyzed in BAL fluid (Figure 3b). In the BAL, the secretion of the three cytokines was increased by PVM infection at day 9 for IL-19 and IL-24 and at 12 dpi only for IL-20 (Figure 3c). CS exposure did not alter their concentrations in the BAL. In the sera, no significant changes were observed for IL-19 and IL-24. Blood IL-20 levels were transiently increased with a maximum at 9 dpi without changes in CS-exposed mice.

Altogether, these data showed that infection by PVM increased the expression and the secretion of IL-20 cytokines with a different timing according to the cytokine and the compartment. Our data also confirm that AEC are an important source of these cytokines. Exposure to CS mostly affected their expression within the lung.

3.3. IL-20 Cytokines Have a Deleterious Effect during PVM Infection in CS-Exposed Mice

To evaluate the role of IL-20 cytokines during viral exacerbation of COPD, we exposed IL-20Rb KO mice and WT mice to CS and PVM using the same protocol as described in Figure 1a. As expected, PVM mRNA was detected in the lung of CS WT mice and the IL-20Rb depletion did not affect the PVM mRNA expression in the lung (Figure 4a). Concerning the antiviral response in the pulmonary compartment, *rig-1* and *rsad-2*, mRNA lung expression and IFN- λ 2/3 production in the BAL were reduced in IL-20Rb KO in comparison to WT mice (Figure 4a), whereas *irf-7* was not modulated (data not shown).

Histological analysis revealed that there was no difference in WT and IL-20Rb KO mice in not infected CS-exposed mice. In contrast, this analysis confirmed that PVM infection was associated with a strong inflammation in CS WT mice 12 dpi. Moreover, PVM infection both at 9 and 12 dpi was associated with epithelial and vascular damages in CS-exposed WT mice. Interestingly, the inflammatory infiltrate within the peribronchial and alveolar area, and the tissue lesions, was markedly reduced in infected IL-20Rb KO mice both at 9 and 12 dpi (Figure 4b). This was confirmed by a decrease in the histologic score and the surface of the epithelial lesions (Figure 4b), whereas the vascular damages were not modulated (data not shown).

Inflammatory cell recruitment was measured in the BAL and the lung tissues (Figure 5a). Total cell number was lower in the BAL fluid of IL-20Rb KO mice in comparison with WT mice. However, no significant modulation of lymphocyte or cDC2 counts was observed in KO mice compared to WT mice, whereas the number of NK cells and NKT-like cells tended to be lower in KO mice. In the lung compartment, total cell number as well as NK, NKT-like and T lymphocyte recruitment were not modified in IL-20Rb KO mice. Immunomodulatory cytokine analysis showed an increase of IFN- γ level in the BAL and the lung tissues at 9 dpi in WT mice, whereas IL-1 β concentrations were not significantly modulated (Figure 5b). In IL-20Rb KO infected mice, IFN- γ level was decreased in the lung but not in the BAL. In contrast, IL-1 β level was not significantly modulated by the deletion of IL-20Rb.

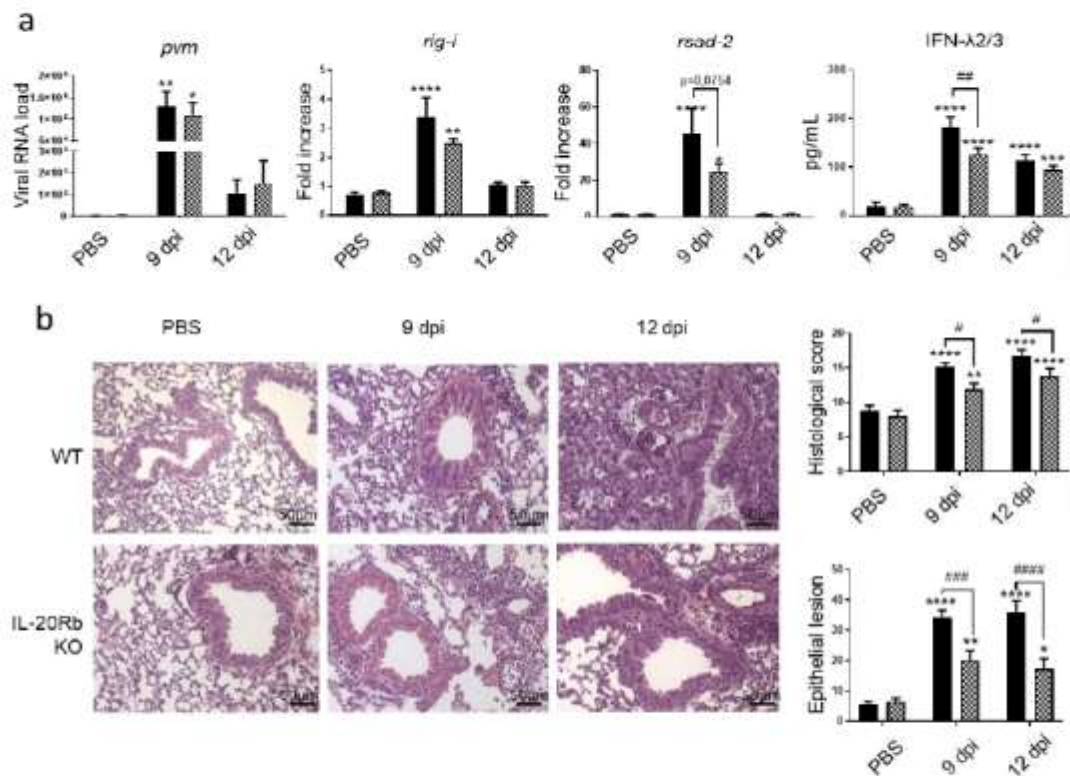


Figure 4. PVM infection induces a lower response in IL-20Rb KO mice exposed to CS. (a) Viral load and antiviral response, including mRNA expression of *rig-1* and *rsad-2*, evaluated by RT-qPCR in lung tissues. Results were expressed as fold increase compared to Air mice exposed to PBS using *hprt1* expression as a housekeeping gene. IFN-λ2/3 was evaluated by ELISA (pg/mL). (b) Histological changes were evaluated at 9 and 12 dpi. Scale bar = 50 μm. Histological score analysis, including epithelial damages, is expressed as mean ± SEM. WT mice (Black bars) and IL-20Rb KO mice (Hashed bars). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ correspond to virus effect (PVM vs. PBS). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ and #### $p < 0.0001$ correspond to IL-20Rb KO effect (IL-20Rb KO vs. WT). Three independent experiments have been performed with 3–5 mice in each group per experiment.

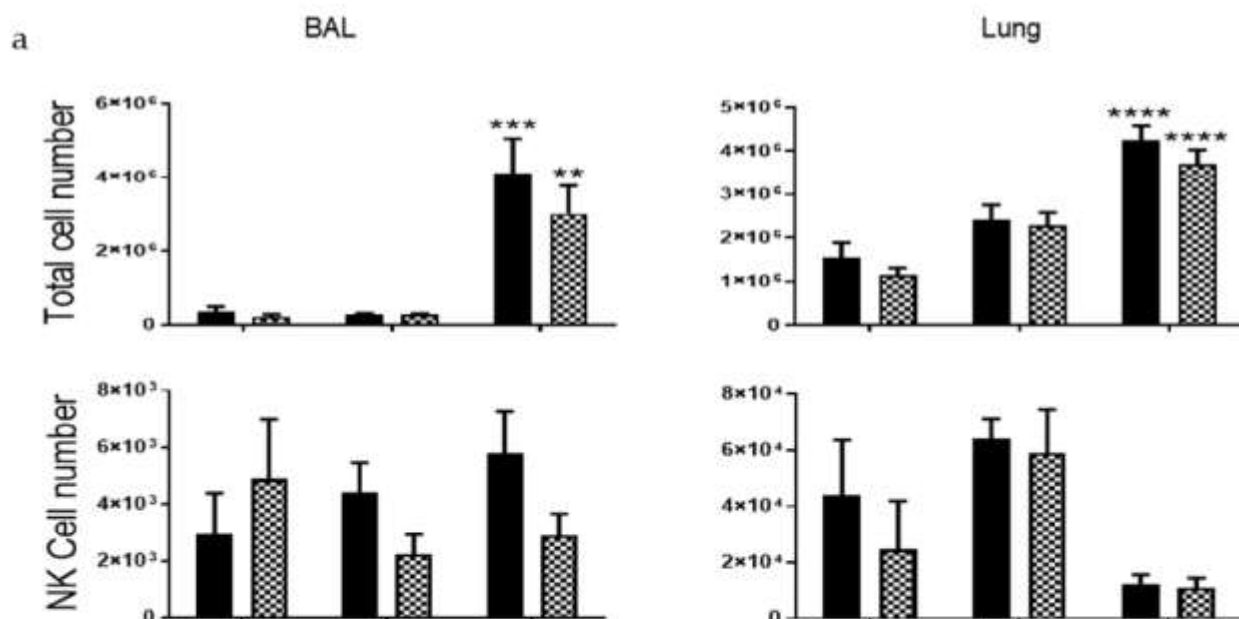


Figure 5. Cont.

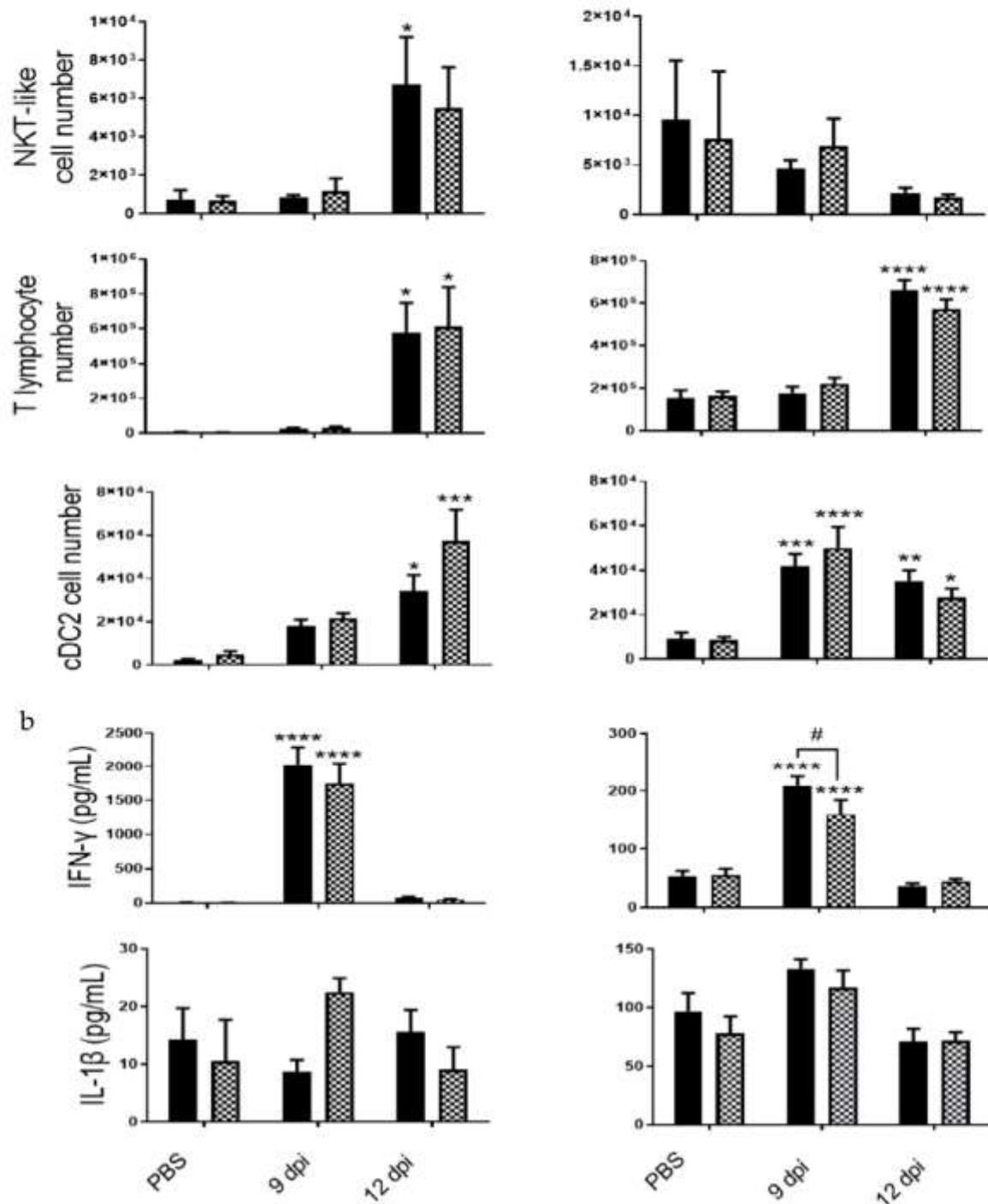


Figure 5. PVM infection induces lung inflammation both in WT and IL-20 KO mice. (a) Total cell number, CD45⁺/TCRβ⁻/NK1.1⁺ NK cells, CD45⁺/TCRβ⁺/NK1.1⁺ NKT-like cells, CD45⁺/TCRβ⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and CD45⁺/F4/80⁻ CD11c⁺/CD11b⁺/CD103⁻ dendritic cells (cDC2) count were analyzed in BAL fluid and lung tissue of WT (white bars) and IL-20Rb KO mice (hashed bars). (b) IFN-γ and IL-1β levels were analyzed by ELISA (pg/mL). Data represent the mean ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ correspond to virus effect (PVM vs PBS). # $p < 0.05$ corresponds to IL-20Rb KO effect (IL-20Rb KO vs. WT). Three independent experiments have been performed with 3–5 mice in each group per experiment.

In the spleen, CS exposure was associated with an increased number of NK and NKT cells in IL-20Rb KO mice. In the blood, the PVM-induced IFN-γ secretion was decreased in IL-20Rb KO mice whereas IL-1β concentrations were unchanged (Supplementary Materials Figure S2).

These data reveal that IL-20 cytokines play a deleterious role in the virus-induced exacerbation of COPD by modulating the inflammation and the tissue lesions, a process associated with decrease in ISG expression and interferon production.

3.4. Implication of IL-20 Cytokines during PVM Infection in Control Mice

To determine if the role of IL-20 cytokines was similar in control mice, we performed the same protocol in Air-exposed mice. As expected, infection by PVM induced a strong anti-viral response with a peak at 9dpi associated with inflammatory reaction and lung tissue lesions (Supplementary Materials Figure S3). The deletion of IL-20Rb receptor in Air-exposed mice amplified the replication of PVM and the expression of *Rsad-2* only at 9dpi but not of *rig-I* and IFN-2/3, whereas the levels were similar at 12dpi for these three targets. Regarding pulmonary lesions, we did not observe significant effect on the histologic score, a result associated with the lack of effect on the cell infiltrate and the cytokine production in the lung (Supplementary Materials Figures S3 and S4). Nevertheless, blocking the IL-20Rb also significantly decreased the epithelial lesions in Air mice at 12 dpi (Supplementary Materials Figure S3b).

Altogether, these data showed that the deletion of IL-20Rb transiently increased the replication of PVM in Air mice without altering the inflammatory reaction. As observed in CS-exposed mice, it also decreased epithelial lesions at 12 dpi.

3.5. IL-20 Cytokines Play a Role in Lung Permeability during PVM Infection

Since IL-20Rb KO mice show fewer epithelial damages, we evaluated the lung permeability by measuring the protein concentration in BAL fluid in CS-exposed mice. As expected, PVM infection in WT mice strongly amplified the protein concentration in the BAL both at 9 and 12 dpi. Interestingly, IL-20-Rb deletion was associated with lower levels of protein in infected mice but not in non-infected mice (Figure 6a). After PVM infection, both WT and IL-20Rb KO mice lose weight (Figure 6b). Only IL-20Rb KO mice had regained weight at 12 dpi in CS-exposed mice. In Air mice, PVM infection also increased the protein concentration in BAL and induced some weight loss (Supplementary Materials Figure S5), similar to in CS-exposed mice. Blocking the IL-20 pathway did not affect these parameters.

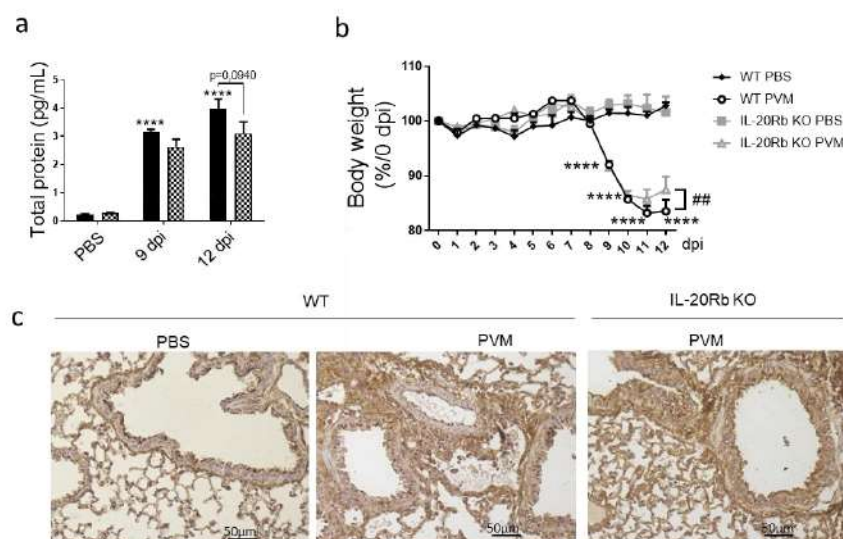


Figure 6. PVM infection modulates lung permeability and E-cadherin protein expression. (a) Lung permeability was analyzed through the quantification of total protein in BAL fluid (pg/mL) in smoking WT mice (Black bars) and IL-20Rb KO mice (Hashed bars). (b) Body weight follow up expressed as percentage of body weight at 0 dpi. (c) Expression of E-cadherin was evaluated on lung sections by immunohistochemistry at 12 dpi in smoking WT mice and IL-20Rb KO mice. Scale bar = 50 μ m. Data represent the mean \pm SEM. **** $p < 0.0001$ correspond to virus effect (PVM vs. PBS). Three independent experiments have been performed with 3–5 mice in each group per experiment.

To confirm these data, we analyzed, by immunohistochemistry, the expression of junction proteins, including E-cadherin (Figure 6c), β -catenin and Zonula Occludens-1 (ZO-1) (data not shown). As suspected, PVM infection was associated with a disorganization of junction proteins both in bronchial and alveolar epithelia, as illustrated by E-cadherin staining at 9 dpi. In infected WT mice, the staining was more diffuse and not limited to the apical side of the bronchial epithelial cells, and these alterations were more pronounced in CS-exposed mice (Figure 6c) compared with Air mice (Supplemental Figure S5c). The staining was also present in inflammatory cells. In contrast, PVM infection in IL-20Rb KO mice strongly reduced these alterations both in Air and CS-exposed mice at 12 dpi.

Altogether, these data revealed that IL-20 overexpression was associated with an increased lung permeability in response to PVM infection, a process associated with intercellular junction disorganization.

4. Discussion

An exacerbation is a striking event in COPD patient, which marks the transition from stability to a rapid decline of lung function [21]. Infection by virus, including RSV, is one of the main factors responsible for COPD exacerbation [22]. Due to the consequences of infection on the progression of the disease [23], it is critical to establish the mechanism by which RSV-induced exacerbation leads to a decline in lung function [24]. Since RSV is not a natural pathogen for mice, we have used PVM, which infects mice and induces a pathology very close to RSV in human [16] to study the mechanism in AE-COPD. In our model mimicking COPD, PVM challenge resulted in a greater virus proliferation associated with enhanced inflammation and epithelial damage in the lungs. Antiviral elements were mainly induced at 9 dpi when the viral load was maximal in the lungs, and the inflammatory response was observed later at 12 dpi. This study is the first one that examines the impact of PVM infection in mice chronically exposed to CS and demonstrates a pathogenic role for IL-20 cytokines.

Antiviral response such as interferon is critical in limiting viral replication [25]. COPD is associated with a decreased antiviral pathway leading to an increased susceptibility to viral infection [26–29]. At steady state, COPD patients show a downregulation of their antiviral components, including a decrease in interferon stimulated-gene and IFN- β expression, especially in the more severe state of the disease [27,30]. In addition, it has been demonstrated that CS extract can directly dampen the response to IAV from human PBMC, as depicted by a reduced production of IFN- β , IFN- γ and RIG-I expression [29]. These findings seem to be different according to the viral trigger that is used. Indeed, in our COPD mimicking model exacerbated by PVM, we observed a significant increase in the antiviral response. This increase in antiviral pathway, including RIG-I, Rsad-2 and IFN- λ 2/3, was linked to an increased PVM detection in the lung of CS-exposed mice. This was consistent with other studies demonstrating the increased expression of antiviral elements such as MDA-5, IFN- β and IFN- λ 1, by bronchial epithelial cells from COPD patient stimulated by rhinovirus or RSV [31,32] and leading to an increased viral burden in mice that, in turn, might be responsible for the increased anti-viral response [33]. Similarly to RSV, PVM infection enhanced inflammation associated with perivascular and bronchial damages in CS-exposed mice [33]. The infiltration of immune cells following PVM infection mainly consists of the recruitment of macrophages, neutrophils, NK, lymphocytes and cDC2 [34–36] and was associated with a major production of IFN- γ in CS-exposed mice, as observed in RSV exacerbated COPD [33].

IL-20 cytokines are associated with many inflammatory diseases, such as psoriasis, rheumatoid arthritis, COPD or infectious diseases [9]. In our study, chronic exposure to CS and PVM infection are able to induce IL-19, IL-20 and IL-24 expression in structure cells and inflammatory cells in the lung. Similarly, IL-24 is also induced by viruses such as IAV or HIV [37,38]. In our study, we observed that CS exposure and viral expression had an additive effect on the expression of these cytokines, a process that we have previously reported for bacterial infection with *Streptococcus pneumoniae* [10]. Most research has been

focused on IL-22, but IL-20 cytokines can induce cell recruitment through the production of chemokines and can modulate the production of antiviral molecules and cytokines [9]. IL-24 supplementation is responsible for increased expression in antiviral elements, including *mxr*, *oas* and *ifn- β* , in A549 AEC, whereas its inhibition decreases interferon response and viral burden [37]. We report here in the PVM context that IL-20Rb depletion reduced production of *rsad-2* and of IFN- λ 2/3 in CS-exposed mice, whereas it enhanced *rsad-2* expression in Air-exposed mice. In parallel, we detected more PVM replication in Air-exposed mice, whereas it was unchanged in CS-exposed mice. The difference might be related to the conjunction of different factors with opposite effects in CS-exposed mice. Indeed, CS exposure alters the anti-viral response and activates the IL-20 pathway leading to the upregulation of the IL-20 cytokines and the IL-20 cytokine receptor subunits, namely, IL-20Ra and IL-20Rb in infected mice. These data suggest that the role of IL-20 cytokines on anti-viral response is dependent on the type of virus and probably of the degree of IL-20 pathway activation. This convergence might also explain why IL-20Rb depletion reduced the lung inflammation and epithelial injury in CS-exposed mice while only decreasing the epithelial lesions in Air-mice. In CS-exposed mice, the effect on inflammation was linked to a decreased number of inflammatory cells within the BAL without modification of their repartition. This suggests that IL-20 cytokines affect a major factor involved in leucocyte recruitment rather than a specific component responsible for the mobilization of leucocyte subtype.

IL-20Rb KO mice exhibited better outcomes of the disease in CS-exposed mice. We previously demonstrated that blocking IL-20Rb pathway promotes bacterial clearance [10], and this effect is associated with a lower histopathological score measuring both the inflammation and the airway remodeling. In this model, the impact on PVM infection is probably related to the decreased alteration of AEC, associated with a better preservation of intercellular junction expression and lung permeability. In Air-exposed mice, the depletion of IL-20Rb only reduced epithelial lesions. We can hypothesize that the effect on lung permeability requires a high level of either IL-20 cytokines or IL-20 receptors. Since lung permeability is identified as a marker of severity, these data suggest that blocking the IL-20 pathway can improve the outcome of this disease. At this stage, we can formulate two hypotheses in order to explain this role for IL-20 cytokines: (1) these cytokines participate in the virus-induced lesions in AEC. We have performed some *in vitro* experiments that did not allow us to show a direct effect of IL-20 cytokine supplementation on *in vitro* response of AEC in terms of cytotoxicity and anti-viral response; (2) our data also suggest that IL-20 cytokine expression might be associated to a loss of epithelial barrier function, particularly when the epithelium is affected by another environmental factor such as CS exposure. Hsu et al. demonstrated that recombinant IL-20 treatment decreased E-cadherin expression in prostate epithelial cells [39]. Additional experiments are required in order to analyze the epithelial permeability in a model of air-liquid interface after viral infection and the role of IL-20 cytokines. Moreover, it has been shown that some polymorphism in IL-19 and IL-20 genes could worsen the outcome of chronic hepatitis B infection [14] and septic shock [40]. IL-20 cytokines may be a common link between these diseases. Therefore, targeting these cytokines and/or their receptors could represent a good approach to treat COPD and some infectious diseases. Therefore, we need to better understand the mechanisms underlying the beneficial effects of the treatment using anti-IL-20Rb antibody on tissue damages, and we need to check if anti-IL-20Rb antibody could limit pulmonary viral infections not only with RSV but also with another important cause of AE-COPD, the influenza A virus.

In conclusion, we herein report for the first time that PVM infection exacerbates CS-induced inflammation. PVM infection modulates the IL-20 pathway and interacts with smoking. Our data identify the IL-20 cytokine pathway as a potential therapeutic target, particularly in the context of viral exacerbation of COPD, due to its ability to limit the epithelial lesions.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines9121838/s1>, Figure S1: PVM infection modulates splenic and blood inflammatory response in Air and CS mice. (a) Total cell number, CD45⁺/TCRβ⁻/NK1.1⁺ NK cells, CD45⁺/TCRβ⁺/NK1.1⁺ NKT like cells, CD45⁺/TCRβ⁺ T lymphocytes and CD45⁺/F4/80⁻/CD11c⁺, CD11b⁺ dendritic cells (cDC2) count were analysed in spleen tissue of Air (white bars) and CS mice (Black bars). (b) Circulating IFN-γ and IL-1β levels were analysed by ELISA in sera. Data represent the mean ± SEM. ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$ correspond to virus effect (PVM vs PBS). ## $p < 0.01$ correspond to CS effect (CS vs. Air). Figure S2: PVM infection modulates splenic and blood inflammatory response in CS-exposed WT and IL-20Rb KO mice. (a) Total cell number, CD45⁺/TCRβ⁻/NK1.1⁺ NK cells, CD45⁺/TCRβ⁺/NK1.1⁺ NKT like cells, CD45⁺/TCRβ⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and CD45⁺/F4/80⁻/CD11c⁺/CD11b⁺ dendritic cells (cDC2) count were analysed in spleen of WT (Black bars) and IL-20Rb KO mice (grey bars). (b) Circulating IFN-γ and IL-1β levels were analysed by ELISA. Data represent the mean ± SEM. *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ correspond to virus effect (PVM vs. PBS). Figure S3: Impact of IL-20Rb depletion on PVM infection in Air-exposed mice. (a) viral load and antiviral response including mRNA expression *rig-i*, *rsad-2*, evaluated by RT-qPCR in lung tissues. Results were expressed as fold increase compared to Air mice exposed to PBS using *hprt1* expression as a housekeeping gene. IFN-λ2/3 was evaluated by ELISA (pg/mL) (b) Histological changes were evaluated at 9 and 12 dpi. Histological score analysis including epithelial damages are expressed as mean ± SEM. WT mice (white bars) and IL-20Rb KO mice (Hashed bars). ## $p < 0.01$, correspond to IL-20Rb KO effect (IL-20Rb KO vs. WT). Three independent experiments have been performed with 3-5 mice in each group per experiment. Figure S4: PVM infection induces lung inflammation both in WT and IL-20Rb KO mice. Total cell number, CD45⁺/TCRβ⁻/NK1.1⁺ NK cells, CD45⁺/TCRβ⁺/NK1.1⁺ NKT like cells, CD45⁺/TCRβ⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and CD45⁺/F4/80⁻/CD11c⁺ dendritic cells (cDC2) count were analysed in BAL fluid and lung tissue of WT (white bars) and IL-20Rb KO mice (hashed bars). IFN-γ and IL-1β levels were analysed by ELISA (pg/mL). Data represent the mean ± SEM. Three independent experiments have been performed with 3-5 mice in each group per experiment. Figure S5: PVM infection affects E-cadherin protein expression in Air mice. (a) Lung permeability was analysed through the quantification of total protein in BAL fluid (pg/mL). (b) The body weight loss was evaluated following PVM infection and was expressed in percentage in comparison to day 0 (c) Expression of e-cadherin was evaluated on lung sections by immunohistochemistry at 12 dpi in Air WT mice (White bars) and IL-20Rb KO mice (Hashed bars). Data represent the mean ± SEM. **** $p < 0.0001$ correspond to virus effect (PVM vs. PBS). Three independent experiments have been performed with 3-5 mice in each group per experiment.

Author Contributions: Conceptualization, L.G., M.P. and P.G.; Data curation, M.L.R., A.O., G.K. and P.G.; Formal analysis, M.L.R., A.O., G.K., T.B. and P.G.; Funding acquisition P.G.; Investigation, M.L.R., A.O., M.P. and P.G.; Methodology, M.L.R., A.O., G.K., T.B., L.G. and M.P.; Project administration, M.L.R., M.P. and P.G.; Resources, A.O., G.K., T.B. and L.G.; Supervision, L.G., M.P. and P.G.; Validation, G.K. and P.G.; Writing—original draft, M.L.R., M.P. and P.G.; Writing—review and editing, L.G., M.P. and P.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding. 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), the University of Lille (Lille, France) and the Region Hauts de France and Fondation de Recherche en Santé Respiratoire (Paris, France). Funders had no role in study design, data collection, data analysis, interpretation or writing of the report.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved according to the guidelines of Animal Care and Use Committee from Nord Pas-de-Calais (agreement no. AF 16/20,090).

Informed Consent Statement: Not applicable, this study does not involve human samples.

Data Availability Statement: Data available on request due to restrictions. The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the potential therapeutic developments.

Acknowledgments: We thank the Animal Resource Center (PLEHTA) and the BICeL flow cytometry core facility of the Institut Pasteur de Lille. 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 Marie-Hélène Gevaert (University of Lille) for histological preparation of lung sections. The following reagent was obtained through the NIH Tetramer Core Facility: PBS57-loaded CD1d tetramer PE-labeled.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Guo-Parke, H.; Linden, D.; Weldon, S.; Kidney, J.C.; Taggart, C.C. Mechanisms of Virus-Induced Airway Immunity Dysfunction in the Pathogenesis of COPD Disease, Progression, and Exacerbation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
- Soler-Cataluña, J.J.; Martínez-García, M.Á.; Sánchez, P.R.; Salcedo, E.; Navarro, M.; Ochando, R. Yy. *Thorax* **2005**, *60*, 925–931. [[CrossRef](#)]
- Majzoub, K.; Wensch, F.; Baumert, T.F. The Innate Antiviral Response in Animals: An Evolutionary Perspective from Flagellates to Humans. *Viruses* **2019**, *11*, 758. [[CrossRef](#)]
- Egli, A.; Santer, D.M.; O’Shea, D.; Tyrrell, D.L.; Houghton, M. The Impact of the Interferon-Lambda Family on the Innate and Adaptive Immune Response to Viral Infections. *Emerg. Microbes Infect.* **2014**, *3*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Okabayashi, T.; Kojima, T.; Masaki, T.; Yokota, S.; Imaizumi, T.; Tsutsumi, H.; Himi, T.; Fujii, N.; Sawada, N. Type-III Interferon, Not Type-I, Is the Predominant Interferon Induced by Respiratory Viruses in Nasal Epithelial Cells. *Virus Res.* **2011**, *160*, 360–366. [[CrossRef](#)]
- Kumar, P.; Thakar, M.S.; Ouyang, W.; Malarkannan, S. IL-22 from Conventional NK Cells Is Epithelial Regenerative and Inflammation Protective during Influenza Infection. *Mucosal Immunol.* **2013**, *6*, 69–82. [[CrossRef](#)]
- Barthelemy, A.; Sencio, V.; Soulard, D.; Deruyter, L.; Faveeuw, C.; Le Goffic, R.; Trottein, F. Interleukin-22 Immunotherapy during Severe Influenza Enhances Lung Tissue Integrity and Reduces Secondary Bacterial Systemic Invasion. *Infect. Immun.* **2018**, *86*. [[CrossRef](#)]
- Koné, B.; Pérez-Cruz, M.; Porte, R.; Hennegrave, F.; Carnoy, C.; Gosset, P.; Trottein, F.; Sirard, J.-C.; Pichavant, M.; Gosset, P. Boosting the IL-22 Response Using Flagellin Prevents Bacterial Infection in Cigarette Smoke-Exposed Mice. *Clin. Exp. Immunol.* **2020**, *201*, 171–186. [[CrossRef](#)]
- Rutz, S.; Wang, X.; Ouyang, W. The IL-20 Subfamily of Cytokines—from Host Defence to Tissue Homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 783–795. [[CrossRef](#)]
- Madouri, F.; Barada, O.; Kervoaze, G.; Trottein, F.; Pichavant, M.; Gosset, P. Production of Interleukin-20 Cytokines Limits Bacterial Clearance and Lung Inflammation during Infection by Streptococcus Pneumoniae. *EBioMedicine* **2018**, *37*, 417–427. [[CrossRef](#)]
- Myles, L.A.; Fontecilla, N.M.; Valdez, P.A.; Vithayathil, P.J.; Naik, S.; Belkaid, Y.; Ouyang, W.; Datta, S.K. Signaling via the IL-20 Receptor Inhibits Cutaneous Production of IL-1 β and IL-17A to Promote Infection with Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 804–811. [[CrossRef](#)]
- Rong, B.; Liu, Y.; Li, M.; Fu, T.; Gao, W.; Liu, H. Correlation of Serum Levels of HIF-1 α and IL-19 with the Disease Progression of COPD: A Retrospective Study. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2018**, *13*, 3791–3803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ermers, M.J.J.; Janssen, R.; Onland-Moret, N.C.; Hodemaekers, H.M.; Rovers, M.M.; Houben, M.L.; Kimpen, J.L.L.; Bont, L.J. IL10 Family Member Genes IL19 and IL20 Are Associated with Recurrent Wheeze after Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Pediatr. Res.* **2011**, *70*, 518–523. [[CrossRef](#)]
- Truelove, A.L.; Oleksyk, T.K.; Shrestha, S.; Thio, C.L.; Goedert, J.J.; Donfield, S.M.; Kirk, G.D.; Thomas, D.L.; O’Brien, S.J.; Smith, M.W. Evaluation of IL10, IL19 and IL20 Gene Polymorphisms and Chronic Hepatitis B Infection Outcome. *Int. J. Immunogenet.* **2008**, *35*, 255–264. [[CrossRef](#)]
- Rosenberg, H.F.; Domachowske, J.B. Pneumonia Virus of Mice: Severe Respiratory Infection in a Natural Host. *Immunol. Lett.* **2008**, *118*, 6–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rosenberg, H.F.; Bonville, C.A.; Easton, A.J.; Domachowske, J.B. The Pneumonia Virus of Mice Infection Model for Severe Respiratory Syncytial Virus Infection: Identifying Novel Targets for Therapeutic Intervention. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *105*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wahl, C.; Müller, W.; Leithäuser, F.; Adler, G.; Oswald, F.; Reimann, J.; Schimbeck, R.; Seier, A.; Weiss, J.M.; Prochnow, B.; et al. IL-20 Receptor 2 Signaling down-Regulates Antigen-Specific T Cell Responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2009**, *182*, 802–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pichavant, M.; Rémy, G.; Bekaert, S.; Le Rouzic, O.; Kervoaze, G.; Vilain, E.; Just, N.; Tillie-Leblond, L.; Trottein, F.; Cataldo, D.; et al. Oxidative Stress-Mediated INKT-Cell Activation Is Involved in COPD Pathogenesis. *Mucosal Immunol.* **2014**, *7*, 568–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sharan, R.; Perez-Cruz, M.; Kervoaze, G.; Gosset, P.; Weynants, V.; Godfroid, F.; Hermand, P.; Trottein, F.; Pichavant, M.; Gosset, P. Interleukin-22 Protects against Non-Typeable Haemophilus Influenzae Infection: Alteration during Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Mucosal Immunol.* **2017**, *10*, 139–149. [[CrossRef](#)]
- Bosteels, C.; Neyt, K.; Vanheerswynghe, M.; van Helden, M.J.; Sichien, D.; Debeuf, N.; De Prijck, S.; Bosteels, V.; Vandamme, N.; Martens, L.; et al. Inflammatory Type 2 CDCs Acquire Features of CDCs and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection. *Immunity* **2020**, *52*, 1039–1056.e9. [[CrossRef](#)]
- Hogea, S.-P.; Tudorache, E.; Fildan, A.P.; Fira-Mladinescu, O.; Marc, M.; Oancea, C. Risk Factors of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations. *Clin. Respir. J.* **2020**, *14*, 183–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. MOHAN, A.; CHANDRA, S.; AGARWAL, D.; GULERIA, R.; BROOR, S.; GAUR, B.; PANDEY, R.M. Prevalence of Viral Infection Detected by PCR and RT-PCR in Patients with Acute Exacerbation of COPD: A Systematic Review. *Respirol. Carlton Vic* **2010**, *15*, 536–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rohde, G.; Wiethege, A.; Borg, L.; Kauth, M.; Bauer, T.T.; Gillissen, A.; Bufe, A.; Schultze-Werninghaus, G. Respiratory Viruses in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Requiring Hospitalisation: A Case-Control Study. *Thorax* **2003**, *58*, 37–42. [[CrossRef](#)]
24. Wilkinson, T.M.A.; Donaldson, G.C.; Johnston, S.L.; Openshaw, P.J.M.; Wedzicha, J.A. Respiratory Syncytial Virus, Airway Inflammation, and FEV1 Decline in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, *173*, 871–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Randall, R.E.; Goodbourn, S. Interferons and Viruses: An Interplay between Induction, Signalling, Antiviral Responses and Virus Countermeasures. *J. Gen. Virol.* **2008**, *89*, 1–47. [[CrossRef](#)]
26. Singanayagam, A.; Loo, S.-L.; Calderazzo, M.; Finney, L.J.; Trujillo Torralbo, M.-B.; Bakhsoliani, E.; Girkin, J.; Veerati, P.; Pathinayake, P.S.; Nichol, K.S.; et al. Antiviral Immunity Is Impaired in COPD Patients with Frequent Exacerbations. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **2019**, *317*, L893–L903. [[CrossRef](#)]
27. Garcia-Valero, J.; Olloquequi, J.; Montes, J.F.; Rodriguez, E.; Martin-Satué, M.; Teixidó, L.; Ferrer Sancho, J. Deficient Pulmonary IFN- β Expression in COPD Patients. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0217803. [[CrossRef](#)]
28. Hsu, A.C.-Y.; Dua, K.; Starkey, M.R.; Haw, T.-J.; Nair, P.M.; Nichol, K.; Zammit, N.; Grey, S.T.; Baines, K.J.; Foster, P.S.; et al. MicroRNA-125a and -b Inhibit A20 and MAVS to Promote Inflammation and Impair Antiviral Response in COPD. *JCI Insight* **2017**, *2*, e90443. [[CrossRef](#)]
29. Wu, W.; Patel, K.B.; Booth, J.L.; Zhang, W.; Metcalf, J.P. Cigarette Smoke Extract Suppresses the RIG-I-Initiated Innate Immune Response to Influenza Virus in the Human Lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2011**, *300*, L821–L830. [[CrossRef](#)]
30. Hilzendeger, C.; da Silva, J.; Henket, M.; Schleich, F.; Corhay, J.L.; Keadze, T.; Edwards, M.R.; Mallia, P.; Johnston, S.L.; Louis, R. Reduced Sputum Expression of Interferon-Stimulated Genes in Severe COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2016**, *11*, 1485–1494. [[CrossRef](#)]
31. Baines, K.J.; Hsu, A.C.-Y.; Tooze, M.; Gunawardhana, L.P.; Gibson, P.G.; Wark, P.A. Novel Immune Genes Associated with Excessive Inflammatory and Antiviral Responses to Rhinovirus in COPD. *Respir. Res.* **2013**, *14*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Collinson, N.; Snape, N.; Beagley, K.; Fantino, E.; Spann, K. COPD Is Associated with Elevated IFN- β Production by Bronchial Epithelial Cells Infected with RSV or HMPV. *Viruses* **2021**, *13*, 911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Foronjy, R.F.; Dabo, A.J.; Taggart, C.C.; Weldon, S.; Geraghty, P. Respiratory Syncytial Virus Infections Enhance Cigarette Smoke Induced COPD in Mice. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90567. [[CrossRef](#)]
34. Watkiss, E.R.T.; Shrivastava, P.; Arsic, N.; Gomis, S.; Van Drunen Littel-van den Hurk, S. Innate and Adaptive Immune Response to Pneumonia Virus of Mice in a Resistant and a Susceptible Mouse Strain. *Viruses* **2013**, *5*, 295–320. [[CrossRef](#)]
35. Van Helden, M.J.G.; van Kooten, P.J.S.; Bekker, C.P.J.; Gröne, A.; Topham, D.J.; Easton, A.J.; Boog, C.J.P.; Busch, D.H.; Zaiss, D.M.W.; Sijts, A.J.A.M. Pre-Existing Virus-Specific CD8+ T-Cells Provide Protection against Pneumovirus-Induced Disease in Mice. *Vaccine* **2012**, *30*, 6382–6388. [[CrossRef](#)]
36. Van Leuven, J.T.; Gonzalez, A.J.; Ijezie, E.C.; Wixom, A.Q.; Clary, J.L.; Naranjo, M.N.; Ridenhour, B.J.; Miller, C.R.; Miura, T.A. Rhinovirus Reduces the Severity of Subsequent Respiratory Viral Infections by Interferon-Dependent and -Independent Mechanisms. *mSphere* **2021**, *6*, e0047921. [[CrossRef](#)]
37. Seong, R.-K.; Choi, Y.-K.; Shin, O.S. MDA7/IL-24 Is an Anti-Viral Factor That Inhibits Influenza Virus Replication. *J. Microbiol. Seoul Korea* **2016**, *54*, 695–700. [[CrossRef](#)]
38. Strumillo, S.T.; Curcio, M.F.; de Carvalho, F.F., Jr.; Sucupira, M.A.; Diaz, R.S.; Monteiro, H.P.; Janini, L.M.R. HIV-1 Infection Modulates IL-24 Expression Which Contributes to Cell Apoptosis in Vitro. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43*, 574–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Hsu, Y.-H.; Wu, C.-Y.; Hsing, C.-H.; Lai, W.-T.; Wu, L.-W.; Chang, M.-S. Anti-IL-20 Monoclonal Antibody Suppresses Prostate Cancer Growth and Bone Osteolysis in Murine Models. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139871. [[CrossRef](#)]
40. Nakada, T.-A.; Wacharasint, P.; Russell, J.A.; Boyd, J.H.; Nakada, E.; Thair, S.A.; Shimada, T.; Walley, K.R. The IL20 Genetic Polymorphism Is Associated with Altered Clinical Outcome in Septic Shock. *J. Innate Immun.* **2018**, *10*, 181–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

IL-20 Cytokines Are Involved in Epithelial Lesions Associated with Virus-Induced COPD Exacerbation in Mice

Mélina Le Roux¹, Anaïs Ollivier¹, Gwenola Kervoaze¹, Thimothé Becke, Laurent Gillet², Muriel Pichavant¹ and Philippe Gosset^{1,*}

¹ CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, CHRU Lille, Institute Pasteur de Lille, University Lille, CNRS UMR9017, Inserm U1019, 59000 Lille, France; melina.le-roux@pasteur-lille.fr (M.L.R.);

anaïs.ollivier@pasteur-lille.fr (A.O.); gwenola.kervoaze@pasteur-lille.fr (G.K.); timotheebeke@gmail.com (T.B.); muriel.pichavant@pasteur-lille.fr (M.P.)

² Immunology-Vaccinology Laboratory, Department of Infection and Parasitic Diseases, FARAH, University of Liege, 4000 Liege, Belgium; L.gillet@ulg.ac.be

* Correspondence: philippe.gosset@pasteur-lille.fr; Tel.: +33-320-877-965

Supplemental Figures

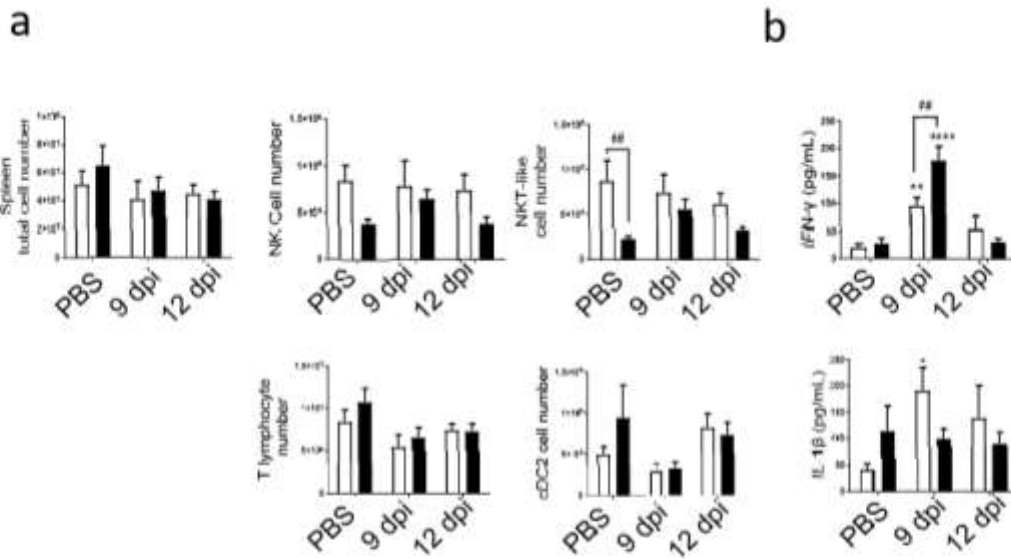


Figure S1. PVM infection modulates splenic and blood inflammatory response in Air and CS mice. (a) Total cell number, CD45+/TCR β -/NK1.1+ NK cells, CD45+/TCR β + /NK1.1+ NKT like cells, CD45+/TCR β + T lymphocytes and CD45+/ F4/80- / CD11c+, CD11b+ dendritic cells (cDC2) count were analysed in spleen tissue of Air (white bars) and CS mice (Balck bars). (b) Circulating IFN- γ and IL-1 β

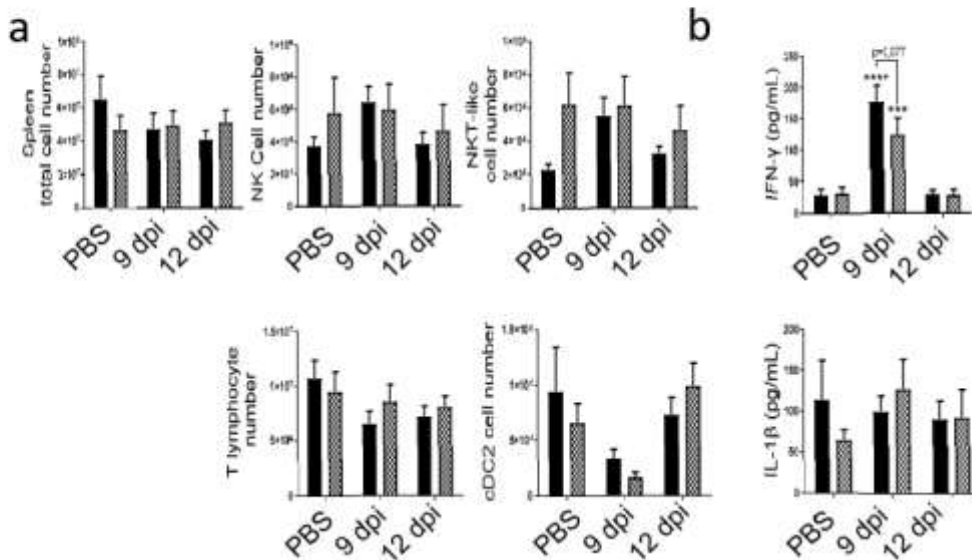


Figure S2. PVM infection modulates splenic and blood inflammatory response in CS-exposed WT and IL-20Rb KO mice. (a) Total cell number, CD45+/TCR β -/NK1.1+ NK cells, CD45+/TCR β + /NK1.1+ NKT like cells, CD45+/TCR β + CD4+ and CD8+ T lymphocytes and CD45+/ F4/80- / CD11c+ / CD11b+ dendritic cells (cDC2) count were analysed in spleen of WT (Black bars) and IL-20Rb KO mice (grey bars). (b) Circulating IFN- γ and IL-1 β levels were analysed by ELISA. Data represent the mean \pm SEM. **** $p < 0.0001$ and **** $p < 0.0001$ correspond to virus effect (PVM vs PBS).

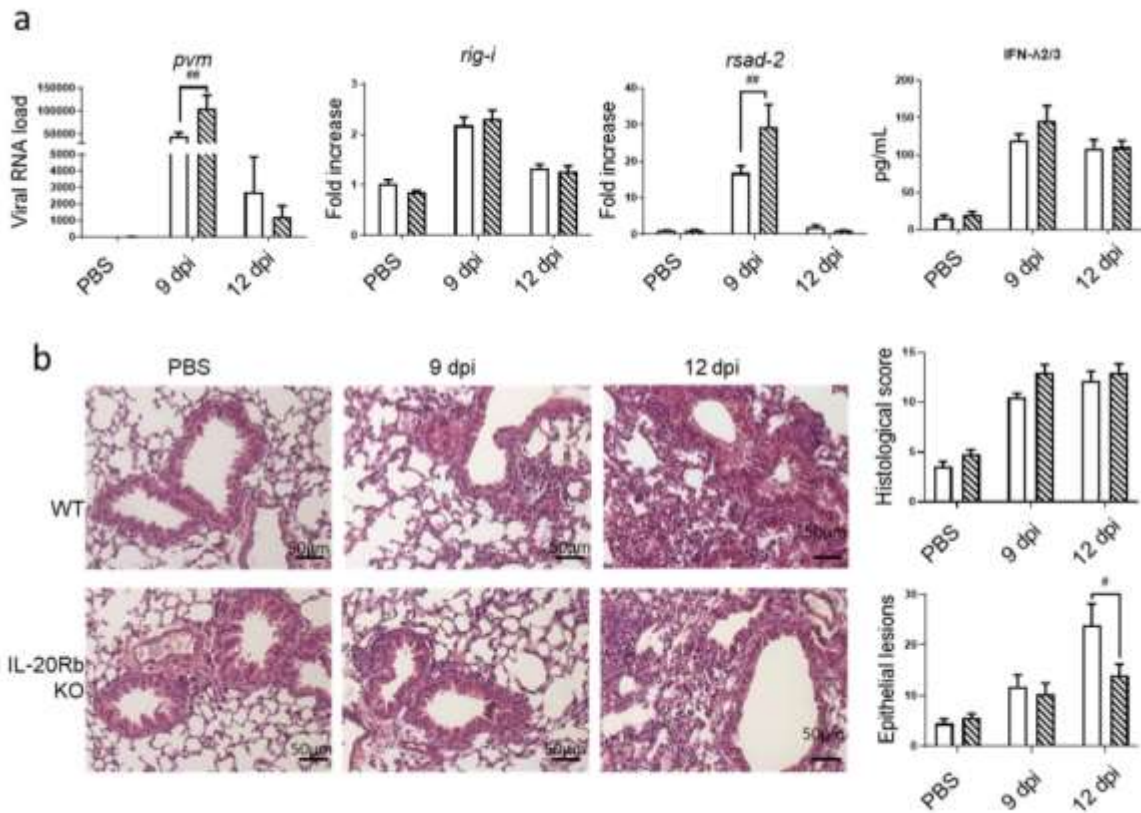


Figure S3. Impact of IL-20Rb depletion on PVM infection in Air-exposed mice. (a) viral load and antiviral response including mRNA expression *rig-i*, *rsad-2*, evaluated by RT-qPCR in lung tissues. Results were expressed as fold increase compared to Air mice exposed to PBS using *hprt1* expression as a housekeeping gene. IFN-λ2/3 was evaluated by ELISA (pg/mL) **(b)** Histological changes were evaluated at 9 and 12 dpi. Scale bar = 50 μm. Histological score analysis including epithelial damages are expressed as mean ± SEM. WT mice (white bars) and IL-20Rb KO mice (Hashed bars).# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, correspond to IL-20Rb KO effect (IL-20Rb KO vs. WT). Three independent experiments have been performed with 3-5 mice in each group per experiment.

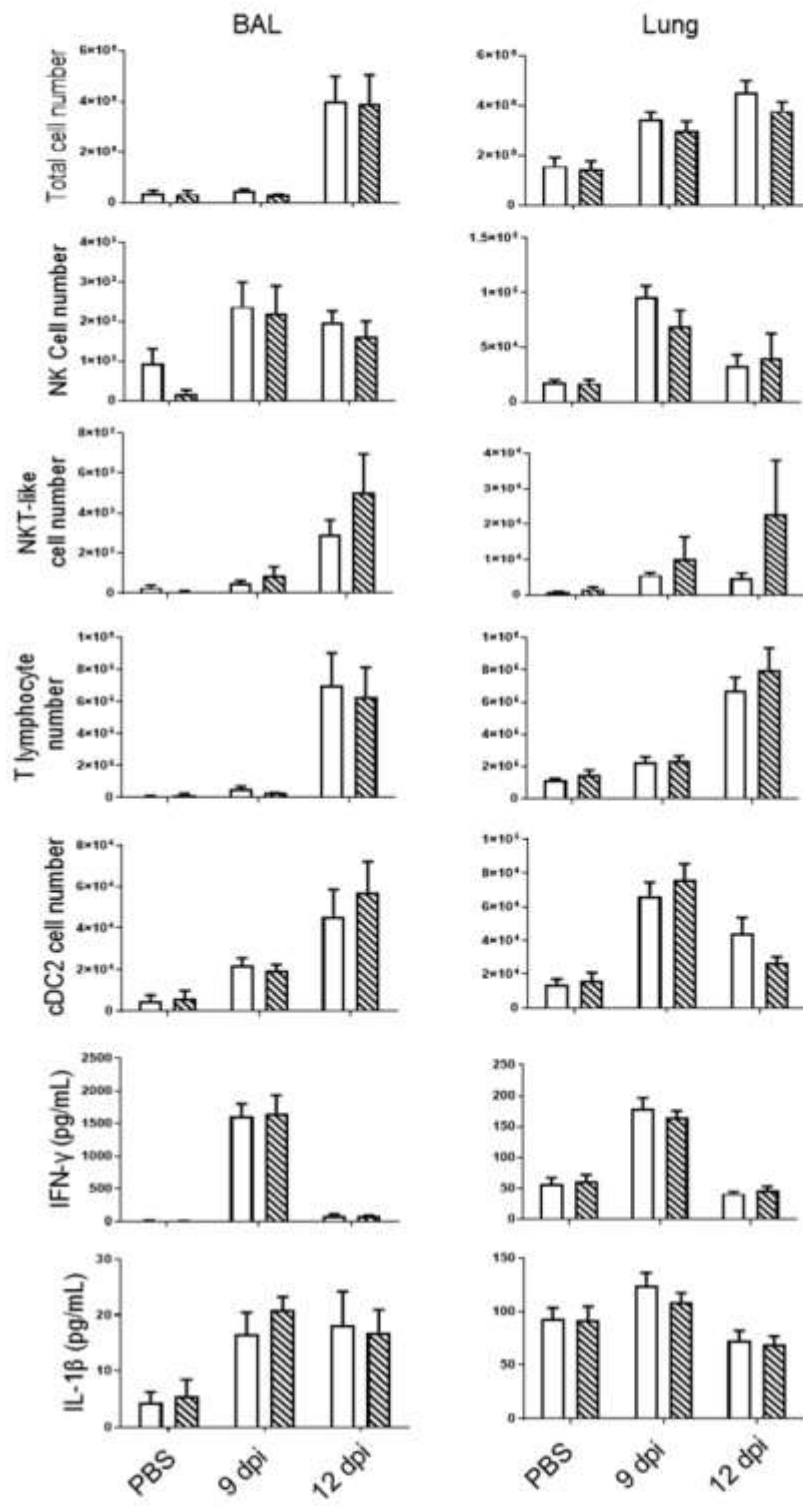


Figure S4. PVM infection induces lung inflammation both in WT and IL-20Rb KO mice. Total cell number, CD45⁺/TCR β ⁻/NK1.1⁺ NK cells, CD45⁺/TCR β ⁺/NK1.1⁺ NKT like cells, CD45⁺/TCR β ⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and CD45⁺/ F4/80⁻/ CD11c⁺ dendritic cells (cDC2) count were analysed in BAL fluid and lung tissue of WT (white bars) and IL-20Rb KO mice (hashed bars). IFN- γ and IL-1 β levels were analysed by ELISA (pg/mL). Data represent the mean \pm SEM. Three independent experiments have been performed with 3-5 mice in each group per experiment.

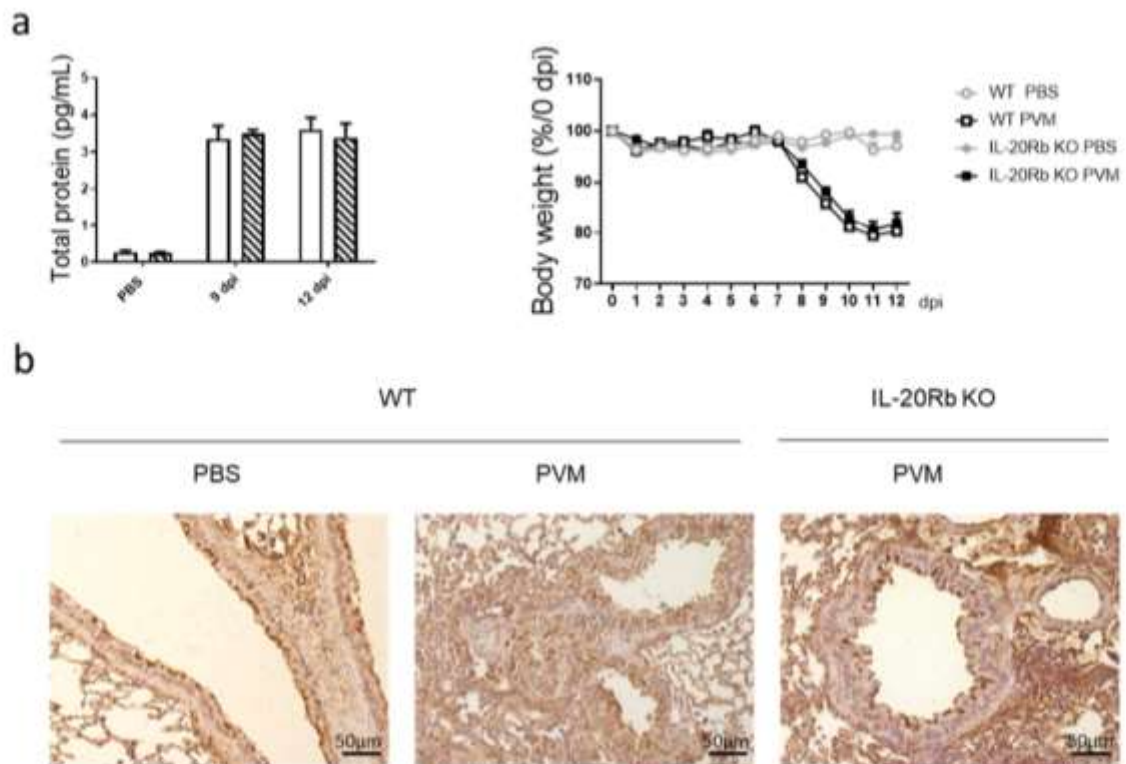


Figure S5. PVM infection affects E-cadherin protein expression in Air mice. (a) Lung permeability was analysed through the quantification of total protein in BAL fluid (pg/mL). (White bars) and IL-20Rb KO mice (Hashed bars). The body weight loss was evaluated following PVM infection and was expressed in percentage in comparison to day 0 (b) Expression of e-cadherin was evaluated on lung sections by immunohistochemistry at 12 dpi in Air WT mice. Scale bar = 50 μ m. Data represent the mean \pm SEM. Three independent experiments have been performed with 3-5 mice in each group per experiment..

Annexe 2 : Documents relatifs au brevet : EP19306068.8**ANTIBODIES SPECIFIC FOR IL20-RB AND USES THEREOF FOR THE
TREATMENT OF ACUTE EXACERBATION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE
PULMONARY DISEASE**

FIELD OF THE INVENTION:

The present invention relates to the field of medicine, in particular of immunology.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) remains a major cause of morbidity and mortality worldwide. This will be the third cause of deaths worldwide in 2030 according to the WHO. COPD is a lung disorder characterized by progressive and irreversible airflow limitation. Cigarette smoking is a primary risk factor for the development of COPD. Chronic exposure to cigarette smoke (CS) triggers inflammatory processes which ultimately alter lung barrier functions and reduce immune defense mechanisms, leading to increased susceptibility to respiratory infections. Such infections further alter the clinical status of COPD patients, indirectly causing extensive morbidity and mortality. Acute exacerbation of COPD (AECOPD) in patients is associated with an inexorable decline in lung function, enhanced oedema as well as airway and systemic inflammation. Bacterial infections by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* are the major cause of AE-COPD (1). The outcome of the infection is tightly related to the efficiency of the anti-bacterial host response. Among the factors orchestrating the anti-bacterial response, Th17 cytokines, including interleukin (IL)-17 and IL22, play a major role in the clearance of *S. pneumoniae* by modulating the secretion of antimicrobial peptides and the recruitment of effector cells (4, 5). These cytokines also maintain the lung homeostasis by limiting tissue injury, this process being essential in order to prevent secondary bacterial invasion (6, 7). IL-22 with IL-19, IL-20, IL-24 and IL-26 belong to the IL20 cytokine family. 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 IL-20Rb chains (8, 9). Moreover, IL-20 and IL-24 bind the type II IL-20R a heterodimeric receptor composed

of the IL-22 receptor- α 1 subunit and IL-20Rb. Thus blocking antibodies against IL-20Rb subunit can efficiently neutralize this pathway. These IL-20 receptors are mainly expressed on epithelial cells and mononuclear phagocytes, but also on activated neutrophils and some lymphocytes (8, 10). The role of IL-20 related cytokines is controversial and exhibited “anti-inflammatory” effects involved in the cutaneous tissue homeostasis and wound-healing. However, Myles et al. have shown that IL-20 related cytokines promote cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice by downregulating IL-17 and IL-22 production (11). Previous data demonstrated that IL-20 cytokines are induced by *S. pneumoniae* (12). In COPD mice, exposure to CS led to higher expression of IL-19 and IL-20 mRNA in the lung and infection with *S. pneumoniae* markedly enhanced the expression of IL-19, IL-20 and IL-24. In an experimental model mimicking the COPD disease in mice developed by chronic exposure to cigarette smoke (CS) (13), it was shown that an increased susceptibility to respiratory pathogens was related to defective IL-22 production (14, 15). In contrast these animals exhibited an increased expression of IL-19, IL20 and IL-24 in response to *S. pneumoniae* or NTHi. Treatment with anti-IL-20Rb blocking antibodies increased the bacterial clearance in control mice infected by *S. pneumoniae* (12) and protected CS-exposed mice from bacterial infection, by decreasing the bacterial burden and the inflammatory infiltrate (WO2016083304). Therefore, there is an interest for generating monoclonal antibodies specific for IL-20Rb with a neutralizing activity for their use in the treatment of AE-COPD.

SUMMARY OF THE INVENTION:

As defined by the claims, the present invention relates to monoclonal antibodies specific for IL-20Rb and their use for therapeutic purposes in particular for the treatment of AE-COPD.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

The present invention relates to antibodies that are specific for IL-20Rb and binds to the extracellular domain of IL-20Rb.

As used herein, the term “IL-20 cytokines” has its general meaning in the art and refers to a subgroup in the IL-10 cytokine family which comprises IL-19 (Exemplary Human

NCBI Reference Sequence: NP_715639.1), IL-20 (Exemplary Human NCBI Reference Sequence: NP_061194.2) and IL-24 (Exemplary Human NCBI Reference Sequence: NP_006841.1). IL20 cytokines are very close to IL-22 and belong to the same subgroup of IL-10 cytokine family. IL-19 and IL-20 act via a receptor complex that consists of the IL-20Ra and IL-20Rb chains present on epithelial, antigen-presenting cells, some lymphocytes and granulocytes. IL-20 and IL-24 are additionally able to signal via a second receptor complex (IL-22Ra/IL-20Rb).

As used herein, the term "IL-20Rb" has its general meaning in the art and refers to the interleukin-20 receptor subunit beta. An exemplary human amino acid sequence of IL-20Rb is represented by SEQ ID NO:1. The extracellular domain of IL-20-RB consists of the amino acid sequence that ranges from the residue at position 30 to the amino acid residue at position 233 in SEQ ID NO:1.

```
SEQ ID NO:1>sp|Q6UXL0|I20RB_HUMAN Interleukin-20 receptor
subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL20RB PE=1 SV=1
MQTFTMVLEEIWTSLSFMWFFYALIPCLLTDEVAIILPAPQNLSVLSTNMKHLMLMWSPIAP
GETVYYSVEYQGEYESLYTSHIWIPSSWCSLTEGPECDVTDDITATVPYNLRVRATLGSQ
TSAWSILKHPFNRNSTILTRPGMEITKDGPHLVIELEDLGPQFEFLVAYWRREPGAEHVV
KMVRSGGIPVHLETMEPGAAYCVKAQTFVKAIGRYSAFSQTECVVEVQGEAIPVLALFAF
VGFMLILVVVPLFVWKMGRLLQYSCCPVVVLPDTLKITNSPQKLISCRREEVDACATAVM
SPEELLRAWIS
```

As used herein the term "antibody" or "immunoglobulin" have the same meaning, and will be used equally in the present invention. The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site that immunospecifically binds an antigen. As such, the term antibody encompasses not only whole antibody molecules, but also antibody fragments as well as variants (including derivatives) of antibodies and antibody fragments. In natural antibodies, two heavy chains are linked to each other by disulfide bonds and each heavy chain is linked to a light chain by a disulfide bond. There are two types of light chain, lambda (1) and kappa (k). There are five main heavy chain classes (or isotypes) which determine the functional activity of an antibody molecule: IgM, IgD, IgG, IgA and IgE. Each chain contains distinct sequence domains. The light chain includes two domains, a variable domain (VL) and a constant domain (CL). The heavy chain includes four (α , γ , δ) to

five (μ , ϵ) domains, a variable domain (VH) and three to four constant domains (CH1, CH2, CH3 and CH4 collectively referred to as CH). The variable regions of both light (VL) and heavy (VH) chains determine binding recognition and specificity to the antigen. The constant region domains of the light (CL) and heavy (CH) chains confer important biological properties such as antibody chain association, secretion, trans-placental mobility, complement binding, and binding to Fc receptors (FcR). The Fv fragment is the N-terminal part of the Fab fragment of an immunoglobulin and consists of the variable portions of one light chain and one heavy chain. The specificity of the antibody resides in the structural complementarity between the antibody combining site and the antigenic determinant. Antibody combining sites are made up of residues 35 that are primarily from the hypervariable or complementarity determining regions (CDRs). Occasionally, residues from nonhypervariable or framework regions (FR) can participate to the antibody binding site or influence the overall domain structure and hence the combining site. CDRs refer to amino acid sequences which together define the binding affinity and specificity of the natural Fv region of a native immunoglobulin binding site. The light and heavy chains of an immunoglobulin each have three CDRs, designated L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 and HCDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectively. An antigen-binding site, therefore, typically includes six CDRs, comprising the CDR set from each of a heavy and a light chain V region. Framework Regions (FRs) refer to amino acid sequences interposed between CDRs. The residues in antibody variable domains are conventionally numbered according to a system devised by Kabat et al. This system is set forth in Kabat et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (hereafter "Kabat et al."). This numbering system is used in the present specification. The Kabat residue designations do not always correspond directly with the linear numbering of the amino acid residues in SEQ ID sequences. The actual linear amino acid sequence may contain fewer or additional amino acids than in the strict Kabat numbering corresponding to a shortening of, or insertion into, a structural component, whether framework or complementarity determining region (CDR), of the basic variable domain structure. The correct Kabat numbering of residues may be determined for a given antibody by alignment of residues of homology in the sequence of the antibody with a "standard" Kabat numbered sequence. The CDRs of the heavy chain variable domain are located at residues 31-35B (VH-CDR1), residues 50-65 (VH-CDR2) and residues 95-102 (VH-CDR3) according to the Kabat numbering system. The CDRs of the light chain variable domain are located at residues 24-34

(VL-CDR1), residues 50-56 (VL-CDR2) and residues 89-97 (VL-CDR3) according to the Kabat numbering system.

As used herein, the terms "monoclonal antibody", "monoclonal Ab", "monoclonal antibody composition", "mAb", or the like, as used herein refer to a preparation of antibody molecules of single molecular composition. A monoclonal antibody composition displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope. Accordingly, the term "human monoclonal antibody" refers to antibodies displaying a single binding specificity which have variable and constant regions derived from human germline immunoglobulin sequences.

In some embodiments, the antibody of the present invention is an antibody molecule selected from the group consisting of a whole antibody, a Fv, a scFv, a Fab, a F(ab)₂, a defucosylated antibody, or a bi-specific antibody.

As used herein, a "whole antibody" or an "intact antibody" is one which comprises an antigen-binding site as well as a CL and at least heavy chain constant domains, CH1, CH2 and CH3. The constant domains may be native sequence constant domains (*e.g.*, human native sequence constant domains) or amino acid sequence variants thereof.

As used herein, the term "antibody fragment" refers to at least one portion of an intact antibody, preferably the antigen binding region or variable region of the intact antibody, that retains the ability to specifically interact with (*e.g.*, by binding, steric hindrance, stabilizing/destabilizing, spatial distribution) an epitope of an antigen. Examples of antibody fragments include, but are not limited to, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv fragments, single chain antibody molecules, in particular scFv antibody fragments, disulfide-linked Fvs (sdFv), a Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains, linear antibodies, single domain antibodies such as, for example, sdAb (either VL or VH), camelid VHH domains, multi-specific antibodies formed from antibody fragments such as, for example, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region, and an isolated CDR or other epitope binding fragments of an antibody. An antigen binding fragment can also be incorporated into single domain antibodies, maxibodies, minibodies, nanobodies, intrabodies, diabodies, triabodies, tetrabodies, v-NAR and bis-scFv (see, *e.g.*,

Hollinger and Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Antigen binding fragments can also be grafted into scaffolds based on polypeptides such as a fibronectin type III (see U.S. Patent No.: 6,703,199, which describes fibronectin polypeptide minibodies). Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, and a residual "Fc" fragment, a designation reflecting the ability to crystallize readily.

As used herein, a "functional fragment or analog of an antibody" is a compound having qualitative biological activity in common with a full-length antibody. For example, a functional fragment or analog of an anti-IgE antibody is one that can bind to an IgE immunoglobulin in such a manner so as to prevent or substantially reduce the ability of such molecule from having the ability to bind to the high affinity receptor, Fc[epsilon]RI.

"Fv" is the minimum antibody fragment that contains a complete antigen-recognition and -binding site. This fragment consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable region domain in tight, non-covalent association. From the folding of these two domains emanate six hypervariable loops (three loops each from the H and L chain) that contribute the amino acid residues for antigen binding and confer antigen binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

Fragments and derivatives of antibodies of this invention (which are encompassed by the term "antibody" as used in this application, unless otherwise stated or clearly contradicted by context), can be produced by techniques that are known in the art. "Fragments" comprise a portion of the intact antibody, generally the antigen binding site or variable region. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; any antibody fragment that is a polypeptide having a primary structure consisting of one uninterrupted sequence of contiguous amino acid residues (referred to herein as a "single-chain antibody fragment" or "single chain polypeptide"), including without limitation (1) single chain Fv molecules (2) single chain polypeptides

containing only one light chain variable domain, or a fragment thereof that contains the three CDRs of the light chain variable domain, without an associated heavy chain moiety and (3) single chain polypeptides containing only one heavy chain variable region, or a fragment thereof containing the three CDRs of the heavy chain variable region, without an associated light chain moiety; and multispecific antibodies formed from antibody fragments. Fragments of the present antibodies can be obtained using standard methods. For instance, Fab or F(ab')₂ fragments may be produced by protease digestion of the isolated antibodies, according to conventional techniques. It will be appreciated that immunoreactive fragments can be modified using known methods, for example to slow clearance *in vivo* and obtain a more desirable pharmacokinetic profile the fragment may be modified with polyethylene glycol (PEG). Methods for coupling and site-specifically conjugating PEG to a Fab' fragment are described in, for example, Leong et al., Cytokines 16 (3): 106-119 (2001) and Delgado et al., Br. J. Cancer 5 73 (2): 175- 182 (1996), the disclosures of which are incorporated herein by reference.

In some embodiments, the antibody of the present invention is a chimeric antibody, a humanized antibody or a human antibody.

As used herein, the term "chimeric antibody" refers to an antibody which comprises a VH domain and a VL domain of a non-human antibody, and a CH domain and a CL domain of a human antibody. In some embodiments, a "chimeric antibody" is an antibody molecule in which (a) the constant region (*i.e.*, the heavy and/or light chain), or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged so that the antigen binding site (variable region) is linked to a constant region of a different or altered class, effector function and/or species, or an entirely different molecule which confers new properties to the chimeric antibody, *e.g.*, an enzyme, toxin, hormone, growth factor, drug, etc.; or (b) the variable region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged with a variable region having a different or altered antigen specificity. Chimeric antibodies also include primatized and in particular humanized antibodies. Furthermore, chimeric antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. For further details, see Jones et al., Nature 321:522-525

(1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). (see U.S. Pat. No. 4,816,567; and Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

As used hereon, the term "humanized antibody" refers to an antibody having variable region framework and constant regions from a human antibody but retains the CDRs of a previous non-human antibody. In some embodiments, a humanized antibody contains minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies and antibody fragments thereof may be human immunoglobulins (recipient antibody or antibody fragment) in which residues from a complementary-determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, a humanized antibody/antibody fragment can comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. Such antibodies are designed to maintain the binding specificity of the non-human antibody from which the binding regions are derived, but to avoid an immune reaction against the non-human antibody. These modifications can further refine and optimize antibody or antibody fragment performance. In general, the humanized antibody or antibody fragment thereof will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a nonhuman immunoglobulin and all or a significant portion of the FR regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody or antibody fragment can also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones et al., *Nature*, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596, 1992.

As used herein the term "human monoclonal antibody", is intended to include antibodies having variable and constant regions derived from human immunoglobulin sequences. The human antibodies of the present invention may include amino acid residues not encoded by human immunoglobulin sequences (*e.g.*, mutations introduced by random or

site-specific mutagenesis *in vitro* or by somatic mutation *in vivo*). However, in some embodiments, the term "human monoclonal antibody", as used herein, is not intended to include antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences.

In some embodiments, the antibody of the present invention is isolated. As used herein, an "isolated antibody" is one that has been separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that may interfere with diagnostic or therapeutic uses of the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous components. In preferred embodiments, the antibody is purified: (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight; (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator; or (3) to homogeneity as shown by SDS-PAGE under reducing or non-reducing conditions and using Coomassie blue or, preferably, silver staining. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

As used herein, the term "binding" refers to a direct association between two molecules, due to, for example, covalent, electrostatic, hydrophobic, and ionic and/or hydrogen-bond interactions, including interactions such as salt bridges and water bridges. In particular, as used herein, the term "binding" in the context of the binding of an antibody to a predetermined antigen or epitope typically is a binding with an affinity corresponding to a K_D of about 10^{-7} M or less, such as about 10^{-8} M or less, such as about 10^{-9} M or less, about 10^{-10} M or less, or about 10^{-11} M or even less. Methods for measuring the K_D of an antibody are well known in the art and include, without limitation, surface plasmon resonance (SPR) technology in a BIAcore 3000 instrument using a soluble form of the antigen as the ligand and the antibody as the analyte. BIACORE® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) is one of a variety of surface plasmon resonance assay formats that are routinely used to epitope bin panels of monoclonal antibodies. Affinities of antibodies can be readily determined using

other conventional techniques, for example, those described by Scatchard et al., (Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949)). Binding properties of an antibody to antigens, cells or tissues may generally be determined and assessed using immunodetection methods including, for example, immunofluorescence-based assays, such as immunohistochemistry (IHC) and/or fluorescence-activated cell sorting (FACS). Typically, an antibody binds to the predetermined antigen with an affinity corresponding to a K_D that is at least ten-fold lower, such as at least 100-fold lower, for instance at least 1,000-fold lower, such as at least 10,000-fold lower, for instance at least 100,000-fold lower than its K_D for binding to a non-specific antigen (*e.g.*, BSA, casein), which is not identical or closely related to the predetermined antigen. When the K_D of the antibody is very low (that is, the antibody has a high affinity), then the K_D with which it binds the antigen is typically at least 10,000-fold lower than its K_D for a non-specific antigen. An antibody is said to essentially not bind an antigen or epitope if such binding is either not detectable (using, for example, plasmon resonance (SPR) technology in a BIAcore 3000 instrument using a soluble form of the antigen as the ligand and the antibody as the analyte), or is 100 fold, 500 fold, 1000 fold or more than 1000 fold less than the binding detected by that antibody and an antigen or epitope having a different chemical structure or amino acid sequence.

As used herein, the term “specificity” refers to the ability of an antibody to detectably bind an epitope presented on an antigen, such as IL-20Rb, while having relatively little detectable reactivity with non-IL-20Rb proteins. In particular, the antibody of the present invention has no specificity for IL-20Ra and IL-22Ra1. Specificity can be relatively determined by binding or competitive binding assays, using, *e.g.*, Biacore instruments, as described elsewhere herein. Specificity can be exhibited by, *e.g.*, an about 10:1, about 20:1, about 50:1, about 100:1, 10,000:1 or greater ratio of affinity/avidity in binding to the specific antigen versus nonspecific binding to other irrelevant molecules (in this case the specific antigen is a IL-20Rb polypeptide). The term “affinity”, as used herein, means the strength of the binding of an antibody to an epitope. The affinity of an antibody is given by the dissociation constant K_d , defined as $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$, where $[Ab-Ag]$ is the molar concentration of the antibodyantigen complex, $[Ab]$ is the molar concentration of the unbound antibody and $[Ag]$ is the molar concentration of the unbound antigen. The affinity

constant K_a is defined by $1/K_d$. Preferred methods for determining the affinity of mAbs can be found in Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), and Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983), which references are entirely incorporated herein by reference. One preferred and standard method well known in the art for determining the affinity of mAbs is the use of Biacore instruments.

In some embodiments, the monoclonal antibody of the present invention cross-competes for binding to IL-20Rb with the monoclonal antibody comprising a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:2 (NY-X3-MN wherein X3 is S or A), ii) the VH-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFVKG) and iii) the VH-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4 (SYYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs: i) the VL-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).

In some embodiments, the monoclonal antibody of the present invention cross-competes for binding to IL-20Rb with the monoclonal antibody comprising a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:8 (NYSMN), ii) the VH-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFVKG) and iii) the VH-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4 (SYYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs: i) the VL-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).

In some embodiments, the monoclonal antibody of the present invention cross-competes for binding to IL-20Rb with the monoclonal antibody comprising a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:9 (NYAMN), ii) the VH-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFVKG) and iii) the VH-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4 (SYYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs: i) the VL-CDR1 as

set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).

As used herein, the term "cross-competes" refers to monoclonal antibodies which share the ability to bind to a specific region of an antigen. In the present disclosure the monoclonal antibody that "cross-competes" has the ability to interfere with the binding of another monoclonal antibody for the antigen in a standard competitive binding assay. Such a monoclonal antibody may, according to non-limiting theory, bind to the same or a related or nearby (e.g., a structurally similar or spatially proximal) epitope as the antibody with which it competes. Cross-competition is present if antibody A reduces binding of antibody B at least by 60%, specifically at least by 70% and more specifically at least by 80% and vice versa in comparison to the positive control which lacks one of said antibodies. As the skilled artisan appreciates competition may be assessed in different assay set-ups. One suitable assay involves the use of the Biacore technology (e.g., by using the BIAcore 3000 instrument (Biacore, Uppsala, Sweden)), which can measure the extent of interactions using surface plasmon resonance technology. Another assay for measuring cross-competition uses an ELISA-based approach. Furthermore, a high throughput process for "binning" antibodies based upon their cross-competition is described in International Patent Application No. WO2003/48731.

In some embodiment, the antibody of the invention comprises a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:2 (NY-X3-MN wherein X3 is S or A), ii) the VH-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFVKG) and iii) the VH-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4 (SYYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs: i) the VL-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).

In some embodiments, the monoclonal antibody of the present invention comprises a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:8 (NYSMN), ii) the VH-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFVKG) and iii) the VH-

CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4 (SYYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs: i) the VL-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).

In some embodiments, the monoclonal antibody of the present invention comprises a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:9 (NYAMN), ii) the VH-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFEVKG) and iii) the VH-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4 (SYYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs: i) the VL-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).

In some embodiments, the antibody of the present invention comprises a heavy chain having 70 % of identity with SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:11 and/or a light chain having 70 % of identity with SEQ ID NO:12.

SEQ ID NO:10: heavy chain of the B7 antibody FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

EVQLVESGGSLVKPGGSLRLSCAASGFTFS NYSMN WVRQAPGKGLEWIS YISGSSRYISYADFEVKG
RFTISRDNATNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR SYYGMDV WGRGTLVTVSS

SEQ ID NO:11 heavy chain of the B7mut antibody FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

EVQLVESGGSLVKPGGSLRLSCAASGFTFS NYAMN WVRQAPGKGLEWIS YISGSSRYISYADFEVKG
RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR SYYGMDV WGRGTLVTVSS

SEQ ID NO:12: light chain of the B7 or B7mut antibody FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

QSVLTQPASVSGSPGQSITISC AGTSSDVGGNYYVS WYQQHPGKAPKLMYI GDSYRPS
GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC SSYTYSTRV FGGGTKLAVLG

According to the invention, a first amino acid sequence having at least 70% of identity with a second amino acid sequence means that the first sequence has 70; 71; 72; 73; 74; 75;

76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99 or 100% of identity with the second amino acid sequence. Sequence identity is frequently measured in terms of percentage identity (or similarity or homology); the higher the percentage, the more similar are the two sequences. Methods of alignment of sequences for comparison are well known in the art. Various programs and alignment algorithms are described in: Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970; Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, *Gene*, 73:237-244, 1988; Higgins and Sharp, *CABIOS*, 5:151-153, 1989; Corpet et al. *Nuc. Acids Res.*, 16:10881-10890, 1988; Huang et al., *Comp. Appls Biosci.*, 8:155-165, 1992; and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.*, 24:307-31, 1994). Altschul et al., *Nat. Genet.*, 6:119-129, 1994, presents a detailed consideration of sequence alignment methods and homology calculations. By way of example, the alignment tools ALIGN (Myers and Miller, *CABIOS* 4:11-17, 1989) or LFASTA (Pearson and Lipman, 1988) may be used to perform sequence comparisons (Internet Program® 1996, W. R. Pearson and the University of Virginia, fasta20u63 version 2.0u63, release date December 1996). ALIGN compares entire sequences against one another, while LFASTA compares regions of local similarity. These alignment tools and their respective tutorials are available on the Internet at the NCSA Website, for instance. Alternatively, for comparisons of amino acid sequences of greater than about 30 amino acids, the Blast 2 sequences function can be employed using the default BLOSUM62 matrix set to default parameters, (gap existence cost of 11, and a per residue gap cost of 1). When aligning short peptides (fewer than around 30 amino acids), the alignment should be performed using the Blast 2 sequences function, employing the PAM30 matrix set to default parameters (open gap 9, extension gap 1 penalties). The BLAST sequence comparison system is available, for instance, from the NCBI web site; see also Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990; Gish. & States, *Nature Genet.*, 3:266-272, 1993; Madden et al. *Meth. Enzymol.*, 266:131-141, 1996; Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997; and Zhang & Madden, *Genome Res.*, 7:649-656, 1997.

In some embodiments, the heavy chain and/or the light chain of the antibody of the invention comprises conservative sequence modifications. The term "conservative sequence modifications" refers to amino acid modifications that do not significantly affect or alter the

biologic function of the protein containing the amino acid sequence. Such conservative modifications include amino acid substitutions, additions and deletions. Modifications can be introduced into a protein by standard techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. A “conservative substitution” is one in which an amino acid is substituted for another amino acid that has similar properties, such that one skilled in the art of peptide chemistry would expect the secondary structure and hydrophobic nature of the polypeptide to be substantially unchanged. Amino acid substitutions are generally therefore based on the relative similarity of the amino acid side-chain substituents, for example, their hydrophobicity, hydrophilicity, charge, size, and the like. Exemplary substitutions that take various of the foregoing characteristics into consideration are well known to those of skill in the art and include: arginine and lysine; glutamate and aspartate; serine and threonine; glutamine and asparagine; and valine, leucine and isoleucine. Amino acid substitutions may further be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity and/or the amphipathic nature of the residues. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine and valine; glycine and alanine; asparagine and glutamine; and serine, threonine, phenylalanine and tyrosine. Other groups of amino acids that may represent conservative changes include: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; and (5) phe, tyr, trp, his. Other families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine, tryptophan), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, one or more amino acid residues within an antibody of the invention can be replaced with other amino acid residues from the same side chain family and the altered antibody can be tested for binding to IL-20Rb.

In some embodiments, the antibody of the present invention comprises the heavy chain as set forth in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:11 and the light chain as set forth in SEQ ID NO:12.

In some embodiments, the antibody (preferably the monoclonal antibody) of the present invention does not comprise a Fc region that mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and thus does not comprise an Fc portion that induces antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC). In some embodiments, the antibody (preferably the monoclonal antibody) of the present invention does not comprise an Fc region that induces complement dependent cytotoxicity (CDC) or antibody-dependent phagocytosis. In some embodiments the antibody (preferably the monoclonal antibody) of the present invention does not lead, directly or indirectly, to the depletion of cells expressing IL-20Rb polypeptides (*e.g.*, do not lead to a 10%, 20%, 50%, 60% or greater elimination or decrease in number of IL-20Rb⁺ Cells). In some embodiments, the antibody (preferably the monoclonal antibody) of the present invention does not comprise an Fc domain capable of substantially binding to a Fc γ RIIIA (CD16) polypeptide. In some embodiments, the antibody (preferably the monoclonal antibody) of the present invention lacks an Fc domain (*e.g.*, lacks a CH2 and/or CH3 domain) or comprises an Fc domain of IgG2 or IgG4 isotype. In some embodiments, the antibody (preferably the monoclonal antibody) of the present invention comprises an Fc domain (*e.g.* of IgG1) with an altered glycosylation profile, resulting in the absence of ADCC activity of the antibody. In some embodiments, the antibody (preferably the monoclonal antibody) of the present invention consists of or comprises a Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, a diabody, single-chain antibody fragment, or a multispecific antibody comprising multiple different antibody fragments. In some embodiments, the antibody (preferably the monoclonal antibody) of the present invention is not linked to a toxic moiety. In some embodiments, one or more amino acids selected from amino acid residues can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has altered C2q binding and/or reduced or abolished CDC. This approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 6,194,551 by Idusogie et al.

As used herein “Fc region” includes the polypeptides comprising the constant region of an antibody excluding the first constant region immunoglobulin domain. Thus, Fc refers to the last two constant region immunoglobulin domains of IgA, IgD, and IgG, and the last three constant region immunoglobulin domains of IgE and IgM, and the flexible hinge N-terminal to these domains. For IgA and IgM Fc may include the J chain. For IgG, Fc comprises immunoglobulin domains Cgamma2 and Cgamma3 (C γ 2 and C γ 3) and the hinge between Cgamma1 (C γ 1) and Cgamma2 (C γ 2). Although the boundaries of the Fc region may vary, the human IgG heavy chain Fc region is usually defined to comprise residues C226 or P230 to its carboxyl-terminus, wherein the numbering is according to the EU index as in Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.). The “EU index as set forth in Kabat” refers to the residue numbering of the human IgG1 EU antibody as described in Kabat et al. supra. Fc may refer to this region in isolation, or this region in the context of an antibody, antibody fragment, or Fc fusion protein. An Fc variant protein may be an antibody, Fc fusion, or any protein or protein domain that comprises an Fc region. Particularly preferred are proteins comprising variant Fc regions, which are non-naturally occurring variants of an Fc region. The amino acid sequence of a non-naturally occurring Fc region (also referred to herein as a “variant Fc region”) comprises a substitution, insertion and/or deletion of at least one amino acid residue compared to the wild type amino acid sequence. Any new amino acid residue appearing in the sequence of a variant Fc region as a result of an insertion or substitution may be referred to as a non-naturally occurring amino acid residue. Note: Polymorphisms have been observed at a number of Fc positions, including but not limited to Kabat 270, 272, 312, 315, 356, and 358, and thus slight differences between the presented sequence and sequences in the prior art may exist.

The terms “Fc receptor” or “FcR” are used to describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The primary cells for mediating ADCC, Cells, express Fc γ RIII, whereas monocytes express Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII and/or Fc γ RIV. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule, an *in vitro* ADCC assay, such as that described in U.S. Pat. No. 5,500,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or

additionally, ADCC activity of the molecules of interest may be assessed *in vivo*, *e.g.*, in an animal model such as that disclosed in Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 95:652-656 (1998). As used herein, the term "effector cells" are leukocytes which express one or more FcRs and perform effector functions. The cells express at least Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII and/or Fc γ RIV and carry out ADCC effector function. Examples of human leukocytes which mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells and neutrophils.

The antibody of the present invention is produced by any technique known in the art, such as, without limitation, any chemical, biological, genetic or enzymatic technique, either alone or in combination. Typically, knowing the amino acid sequence of the desired sequence, one skilled in the art can readily produce said antibodies, by standard techniques for production of polypeptides. For instance, they can be synthesized using well-known solid phase method, preferably using a commercially available peptide synthesis apparatus (such as that made by Applied Biosystems, Foster City, California) and following the manufacturer's instructions. Alternatively, antibodies of the present invention can be synthesized by recombinant DNA techniques well-known in the art. For example, antibodies can be obtained as DNA expression products after incorporation of DNA sequences encoding the antibodies into expression vectors and introduction of such vectors into suitable eukaryotic or prokaryotic hosts that will express the desired antibodies, from which they can be later isolated using well-known techniques.

Accordingly, a further object of the invention relates to a nucleic acid molecule encoding an antibody according to the invention. More particularly the nucleic acid molecule encodes a heavy chain and/or a light chain of an antibody of the present invention.

As used herein, the term "encoding" refers to the inherent property of specific sequences of nucleotides in a polynucleotide, such as, for example, a gene, a cDNA, or an mRNA, to serve as templates for synthesis of other polymers and macromolecules in biological processes having either a defined sequence of nucleotides (*e.g.*, rRNA, tRNA and mRNA) or a defined sequence of amino acids and the biological properties resulting

therefrom. Thus, a gene, cDNA, or RNA, encodes a protein if transcription and translation of mRNA corresponding to that gene produces the protein in a cell or other biological system. Both the coding strand, the nucleotide sequence of which is identical to the mRNA sequence and is usually provided in sequence listings, and the non-coding strand, used as the template for transcription of a gene or cDNA, can be referred to as encoding the protein or other product of that gene or cDNA. Unless otherwise specified, a "nucleotide sequence encoding an amino acid sequence" includes all nucleotide sequences that are degenerate versions of each other and that encode the same amino acid sequence. The phrase "nucleotide sequence that encodes a protein or a RNA" may also include introns to the extent that the nucleotide sequence encoding the protein may in some version contain an intron(s). Typically, said nucleic acid is a DNA or RNA molecule, which may be included in any suitable vector, such as a plasmid, cosmid, episome, artificial chromosome, phage or a viral vector. As used herein, the terms "vector", "cloning vector" and "expression vector" mean the vehicle by which a DNA or RNA sequence (*e.g.*, a foreign gene) can be introduced into a host cell, so as to transform the host and promote expression (*e.g.*, transcription and translation) of the introduced sequence. So, a further object of the invention relates to a vector comprising a nucleic acid of the invention. Such vectors may comprise regulatory elements, such as a promoter, enhancer, terminator and the like, to cause or direct expression of said antibody upon administration to a subject. Examples of promoters and enhancers used in the expression vector for animal cell include early promoter and enhancer of SV40, LTR promoter and enhancer of Moloney mouse leukemia virus, promoter and enhancer of immunoglobulin H chain and the like. Any expression vector for animal cell can be used, so long as a gene encoding the human antibody C region can be inserted and expressed. Examples of suitable vectors include pAGE107, pAGE103, pHSG274, pKCR, pSG1 beta d2-4 and the like. Other examples of plasmids include replicating plasmids comprising an origin of replication, or integrative plasmids, such as for instance pUC, pcDNA, pBR, and the like. Other examples of viral vector include adenoviral, retroviral, herpes virus and AAV vectors. Such recombinant viruses may be produced by techniques known in the art, such as by transfecting packaging cells or by transient transfection with helper plasmids or viruses. Typical examples of virus packaging cells include PA317 cells, PsiCRIP cells, GPenv+ cells, 293 cells, etc. Detailed protocols for producing such replication-defective recombinant viruses

may be found for instance in WO 95/14785, WO 96/22378, US 5,882,877, US 6,013,516, US 4,861,719, US 5,278,056 and WO 94/19478.

As used herein, the term "promoter/regulatory sequence" refers to a nucleic acid sequence (such as, for example, a DNA sequence) recognized by the synthetic machinery of the cell, or introduced synthetic machinery, required to initiate the specific transcription of a polynucleotide sequence, thereby allowing the expression of a gene product operably linked to the promoter/regulatory sequence. In some instances, this sequence may be the core promoter sequence and in other instances, this sequence may also include an enhancer sequence and other regulatory elements which are required for expression of the gene product. The promoter/regulatory sequence may, for example, be one which expresses the gene product in a tissue specific manner.

As used herein, the term "operably linked" or "transcriptional control" refers to functional linkage between a regulatory sequence and a heterologous nucleic acid sequence resulting in expression of the latter. For example, a first nucleic acid sequence is operably linked with a second nucleic acid sequence when the first nucleic acid sequence is placed in a functional relationship with the second nucleic acid sequence. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects the transcription or expression of the coding sequence. Operably linked DNA sequences can be contiguous with each other and, 25 *e.g.*, where necessary to join two protein coding regions, are in the same reading frame.

A further object of the present invention relates to a host cell which has been transfected, infected or transformed by a nucleic acid and/or a vector according to the invention. As used herein, the term "transformation" means the introduction of a "foreign" (*i.e.*, extrinsic or extracellular) gene, DNA or RNA sequence to a host cell, so that the host cell will express the introduced gene or sequence to produce a desired substance, typically a protein or enzyme coded by the introduced gene or sequence. A host cell that receives and expresses introduced DNA or RNA has been "transformed".

The nucleic acids of the invention may be used to produce an antibody of the present invention in a suitable expression system. The term "expression system" means a host cell and compatible vector under suitable conditions, *e.g.*, for the expression of a protein coded for by foreign DNA carried by the vector and introduced to the host cell. Common expression systems include *E. coli* host cells and plasmid vectors, insect host cells and Baculovirus vectors, and mammalian host cells and vectors. Other examples of host cells include, without limitation, prokaryotic cells (such as bacteria) and eukaryotic cells (such as yeast cells, mammalian cells, insect cells, plant cells, etc.). Specific examples include *E. coli*, *Kluyveromyces* or *Saccharomyces* yeasts, mammalian cell lines (*e.g.*, Vero cells, CHO cells, 3T3 cells, COS cells, etc.) as well as primary or established mammalian cell cultures (*e.g.*, produced from lymphoblasts, fibroblasts, embryonic cells, epithelial cells, nervous cells, adipocytes, etc.). Examples also include mouse SP2/0-Ag14 cell (ATCC CRL1581), mouse P3X63-Ag8.653 cell (ATCC CRL1580), CHO cell in which a dihydrofolate reductase gene (hereinafter referred to as "DHFR gene") is defective (Urlaub G et al; 1980), rat YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 cell (ATCC CRL1662, hereinafter referred to as "YB2/0 cell"), and the like. The present invention also relates to a method of producing a recombinant host cell expressing an antibody according to the invention, said method comprising the steps of: (i) introducing *in vitro* or *ex vivo* a recombinant nucleic acid or a vector as described above into a competent host cell, (ii) culturing *in vitro* or *ex vivo* the recombinant host cell obtained and (iii), optionally, selecting the cells which express and/or secrete said antibody. Such recombinant host cells can be used for the production of antibodies of the present invention. Examples of vectors include all those known in the art, including, without limitation, cosmids, plasmids (*e.g.*, naked or contained in liposomes) and viruses (*e.g.*, lentiviruses, retroviruses, adenoviruses, and adeno-associated viruses) that incorporate the recombinant polynucleotide.

Antibodies of the present invention are suitably separated from the culture medium by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

Accordingly a further object of the present invention relates to the antibody of the present invention for use as a drug. More specifically, the present invention provides a method of therapy in a patient in need thereof, comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of an antibody of the present invention.

In some embodiments, the antibody of the present invention is particularly suitable for the treatment of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AE-COPD).

As used herein, the expression "acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease" or "AE-COPD" has its general meaning in the art and refers to worsening of a subject's COPD symptoms from his or her usual state that is beyond normal day-to-day variations, and is acute in onset. Typically, the acute exacerbation of COPD is manifested by one or more symptoms selected from worsening dyspnea, increased sputum production, increased sputum purulence, change in color of sputum, increased coughing, upper airway symptoms including colds and sore throats, increased wheezing, chest tightness, reduced exercise tolerance, fatigue, fluid retention, and acute confusion, and said method comprises reducing the frequency, severity or duration of one or more of said symptoms. Acute exacerbation may have various etiologies, but typically may be caused by viral infections, bacterial infections, or air pollution.

For example, approximately 50% of acute exacerbations are due primarily to the bacteria *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* (all of them causing pneumonia). Viral pathogens associated with acute exacerbations in subjects with COPD include rhinoviruses, influenza, parainfluenza, coronavirus, adenovirus, and respiratory syncytial virus.

In some embodiments, the acute exacerbation of COPD is caused by a bacterial infection. In some embodiments, the acute exacerbation of COPD is caused by a viral infection.

In some embodiments, the acute exacerbation of COPD is caused by air pollution.

In some embodiments, the subject experienced an acute exacerbation of COPD or is at risk of experiencing an acute exacerbation of COPD. In some embodiments, the subject has experienced at least one acute exacerbation of COPD in the past 24 months. In one particular embodiment, the subject has experienced at least one acute exacerbation of COPD in the past 12 months. In some embodiments, subject is a frequent exacerbator. As used herein the term "frequent exacerbator" refers to a subject who suffers from or is undergoing treatment for COPD and who experiences at least 2, and more typically 3 or more, acute exacerbations during a 12 month period.

In some embodiments, "treating" refers to treating an acute exacerbation of COPD, reducing the frequency, duration or severity of an acute exacerbation of COPD, treating one or more symptoms of acute exacerbation of COPD, reducing the frequency, duration or severity of one or more symptoms of an acute exacerbation of COPD, preventing the incidence of acute exacerbation of COPD, or preventing the incidence of one or more symptoms of acute exacerbation of COPD, in a human. The reduction in frequency, duration or severity is relative to the frequency, duration or severity of an acute exacerbation or symptom in the same human not undergoing treatment according to the methods of the present invention. A reduction in frequency, duration or severity of acute exacerbation or one or more symptoms of acute exacerbation may be measured by clinical observation by an ordinarily skilled clinician with experience of treating COPD subjects or by subjective self-evaluations by the subject undergoing treatment. Clinical observations by an ordinarily skilled clinician may include objective measures of lung function, as well as the frequency with which intervention is required to maintain the subject in his or her most stable condition, and the frequency of hospital admission and length of hospital stay required to maintain the subject in his or her most stable condition. Typically, subjective self-evaluations by a subject are collected using industry- recognized and/or FDA-recognized subject reported outcome (PRO) tools. Such tools may allow the subject to evaluate specific symptoms or other subjective measures of quality of life. An example of one subject reported outcome tool is Exacerbations from Pulmonary Disease Tool (EXACT-PRO), which is currently being developed for evaluating clinical response in acute bacterial exacerbations by United

BioSource Corporation along with a consortium of pharmaceutical industry sponsors in consultation with the FDA.

In some embodiments, the treatment is a prophylactic treatment. As used herein, the term "prophylactic treatment" refer to any medical or public health procedure whose purpose is to prevent a disease. As used herein, the terms "prevent", "prevention" and "preventing" refer to the reduction in the risk of acquiring or developing a given condition, or the reduction or inhibition of the recurrence or said condition in a subject who is not ill, but who has been or may be near a subject with the disease.

A further object of the present invention relates to a composition comprising, consisting of or consisting essentially of an antibody of the present invention.

As used herein, "consisting essentially of", with reference to a composition, means that the at least one antibody of the invention as described hereinabove is the only one therapeutic agent or agent with a biologic activity within said composition.

In some embodiments, the composition of the invention is a pharmaceutical composition and further comprises a pharmaceutically acceptable carrier.

The term "pharmaceutically acceptable carrier" refers to an excipient that does not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to an animal, preferably a human. It includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. For human administration, preparations should meet sterility, pyrogenicity, general safety and purity standards as required by regulatory offices, such as, for example, FDA Office or EMA. Pharmaceutically acceptable carriers that may be used in these compositions include, but are not limited to, ion exchangers, alumina, aluminum stearate, lecithin, serum proteins, such as human serum albumin, buffer substances such as phosphates, glycine, sorbic acid, potassium sorbate, partial glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, water, salts

or electrolytes, such as protamine sulfate, disodium hydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, sodium chloride, zinc salts, colloidal silica, magnesium trisilicate, polyvinyl pyrrolidone, cellulose-based substances, polyethylene glycol, sodium carboxymethylcellulose, polyacrylates, waxes, polyethylene-polyoxypropylene- block polymers, polyethylene glycol and wool fat. For use in administration to a patient, the composition will be formulated for administration to the patient. The compositions of the present invention may be administered orally, parenterally, by inhalation spray, topically, rectally, nasally, buccally, vaginally or via an implanted reservoir. The used herein includes subcutaneous, intravenous, intramuscular, intra-articular, intra-synovial, intrasternal, intrathecal, intrahepatic, intralesional and intracranial injection or infusion techniques. Sterile injectable forms of the compositions of this invention may be aqueous or an oleaginous suspension. These suspensions may be formulated according to techniques known in the art using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents. The sterile injectable preparation may also be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally acceptable diluent or solvent, for example as a solution in 1,3-butanediol. Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, Ringer's solution and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile, fixed oils are conventionally employed as a solvent or suspending medium. For this purpose, any bland fixed oil may be employed including synthetic mono-or diglycerides. Fatty acids, such as oleic acid and its glyceride derivatives are useful in the preparation of injectables, as are natural pharmaceutically-acceptable oils, such as olive oil or castor oil, especially in their polyoxyethylated versions. These oil solutions or suspensions may also contain a long-chain alcohol diluent or dispersant, such as carboxymethyl cellulose or similar dispersing agents that are commonly used in the formulation of pharmaceutically acceptable dosage forms including emulsions and suspensions. Other commonly used surfactants, such as Tweens, Spans and other emulsifying agents or bioavailability enhancers which are commonly used in the manufacture of pharmaceutically acceptable solid, liquid, or other dosage forms may also be used for the purposes of formulation. The compositions of this invention may be orally administered in any orally acceptable dosage form including, but not limited to, capsules, tablets, aqueous suspensions or solutions. In the case of tablets for oral use, carriers commonly used include lactose and corn starch. Lubricating agents, such as magnesium stearate, are also typically added. For oral administration in a capsule form,

useful diluents include, *e.g.*, lactose. When aqueous suspensions are required for oral use, the active ingredient is combined with emulsifying and suspending agents. If desired, certain sweetening, flavoring or coloring agents may also be added. Alternatively, the compositions of this invention may be administered in the form of suppositories for rectal administration. These can be prepared by mixing the agent with a suitable non-irritating excipient that is solid at room temperature but liquid at rectal temperature and therefore will melt in the rectum to release the drug. Such materials include cocoa butter, beeswax and polyethylene glycols. The compositions of this invention may also be administered topically, especially when the target of treatment includes areas or organs readily accessible by topical application, including diseases of the eye, the skin, or the lower intestinal tract. Suitable topical formulations are readily prepared for each of these areas or organs. For topical applications, the compositions may be formulated in a suitable ointment containing the active component suspended or dissolved in one or more carriers. Carriers for topical administration of the compounds of this invention include, but are not limited to, mineral oil, liquid petrolatum, white petrolatum, propylene glycol, polyoxyethylene, polyoxypropylene compound, emulsifying wax and water. Alternatively, the compositions can be formulated in a suitable lotion or cream containing the active components suspended or dissolved in one or more pharmaceutically acceptable carriers. Suitable carriers include, but are not limited to, mineral oil, sorbitan monostearate, polysorbate 60, cetyl esters wax, cetaryl alcohol, 2-octyldodecanol, benzyl alcohol and water. Topical application for the lower intestinal tract can be effected in a rectal suppository formulation (see above) or in a suitable enema formulation.

Patches may also be used. The compositions of this invention may also be administered by nasal aerosol or inhalation. Such compositions are prepared according to techniques wellknown in the art of pharmaceutical formulation and may be prepared as solutions in saline, employing benzyl alcohol or other suitable preservatives, absorption promoters to enhance bioavailability, fluorocarbons, and/or other conventional solubilizing or dispersing agents. For example, an antibody present in a pharmaceutical composition of this invention can be supplied at a concentration of 10 mg/mL in either 100 mg (10 mL) or 500 mg (50 mL) single-use vials. The product is formulated for IV administration in 9.0 mg/mL sodium chloride, 7.35 mg/mL sodium citrate dihydrate, 0.7 mg/mL polysorbate 80,

and Sterile Water for Injection. The pH is adjusted to 6.5. An exemplary suitable dosage range for an antibody in a pharmaceutical composition of this invention may be between about 1 mg/m² and 500 mg/m². However, it will be appreciated that these schedules are exemplary and that an optimal schedule and regimen can be adapted taking into account the affinity and tolerability of the particular antibody in the pharmaceutical composition that must be determined in clinical trials. A pharmaceutical composition of the invention for injection (*e.g.*, intramuscular, *i.v.*) could be prepared to contain sterile buffered water (*e.g.*, 1 ml for intramuscular), and between about 1 ng to about 100 mg, *e.g.*, about 50 ng to about 30 mg or more preferably, about 5 mg to about 25 mg, of an antibody of the invention.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURES:

Figure 1: Binding of the recombinant anti-IL-20Rb antibodies (native and mutated B7) produced as murine IgG2a to bind recombinant human IL-20Rb. The binding is compared with the rat anti-IL-20Rb monoclonal antibody (clone 20RNTC). The recombinant IL-20Rb protein is bound overnight at 4°C to maxisorb Nunc plate at 1 µg/ml concentration in PBS. After saturation in PBS plus 10% fetal calf serum for 1h, the antibodies were added at a concentration of 1 µg/ml for 2h. After washings, the antibody binding was detected by addition of a biotinylated anti-murine IgG and then with streptavidin-HRP (Thermoscientific). The reaction is revealed by addition of the TMB substrate and the optical density was read at 495 nm. The results were expressed as the mean ± SEM of the optical density.

Figure 2: Competition between both anti-IL-20Rb antibodies: our human anti-IL20RB antibody (B7) and the rat anti-IL-20Rb monoclonal antibody (clone 20RNTC). Both antibodies are labelled with a fluorochrome (APC, B7* and 20RNTC*) as well as the isotype control (Clone 13R4*). The binding of the B7* (A) and of 20RNTC* (B) (5 µg/ml) was evaluated on bone-marrow-derived dendritic cell (BMDC) in presence of unlabeled

antibodies (either B7, 20RNTC and the control 13R4) at different concentrations (5, 10 and 20 µg/ml). The results were expressed as the percentage of positive cells based on the isotype control (13R4) and this is the mean ± SEM of 2 independent experiments.

Figure 3: Competition between the anti-IL-20Rb antibodies: our human anti-IL20RB antibody (B7), the mutated form of this antibody (Mutated B7) and the rat anti-IL20Rb monoclonal antibody (clone 20RNTC). ELISA plates were coated with recombinant

IL-20RB (1 µg/ml). The binding of each antibody was evaluated in presence or not of a competitor at different concentrations (50, 500 and 5000 ng/ml of 20RNTC, B7 and mutated B7). The binding of the B7 and the 20RNTC antibodies were detected with a biotinylated antimouse or an anti-rat IgG antibody, respectively. This binding was revealed by addition of HRPconjugated streptavidin followed by addition of the substrate TMB. The results were expressed as the optical density (OD).

Figure 4: Capacity of the anti-IL-20Rb antibodies including the 20RNTC, the A7 and the B7 clones to inhibit the response to IL-20 cytokines on human airway epithelial cells (the BEAS-2B cell line). BEAS-2B cells were cultivated until confluence in complete airway epithelial cell culture medium (Promo-Cell) in 24 wells plate (Thermo-Scientific). After overnight starvation of the confluent cells in the same medium without growth factors, BEAS2B cells were preincubated with the different antibodies (5 µg/ml) before stimulation with IL19 or IL-20 (BioTechne, 20 ng/ml). The production of CXCL1 was evaluated by ELISA in cell supernatants collected after 24h incubation (BioTechne, UK) and the results were expressed as a percentage of inhibition where 0% corresponds to the cells with the cytokine plus an isotype control and 100% inhibition to the level obtained in unstimulated cells. The results were expressed as mean ± SEM (n=3).

Figure 5: Capacity of the anti-IL-20Rb antibodies including the 20RNTC, the A7 and the B7 clones to inhibit the response to IL-20 cytokines on murine tracheal epithelial cells (primary cultures). After enzymatic digestion of the trachea with pronase (1.6 mg/ml) during 1 hour, the tracheal epithelial cells were cultivated until confluence in DMEM-F12 medium (Promo-Cell) supplemented with 2% Ultrosor G (Pall Lab.) plus antibiotics in 24 wells

plate (Thermo-Scientific). After overnight starvation of the confluent cells in the same medium without Ultrosor G, tracheal cells were preincubated with the different antibodies (an isotype control (IgG) and the anti-IL-20Rb antibodies our B7 and D6.2 clones and the 20RNTC monoclonal antibody (5 µg/ml)) before stimulation with IL-19 or IL-20 (BioTechne, 20 ng/ml). The production of IL-6 and CXCL1 was evaluated by ELISA in cell supernatants collected after 24h incubation (BioTechne, UK). The results were expressed as mean ± SEM (n=3).

Figure 6: Effect of treatment with the anti-IL-20Rb antibodies including the 20RNTC and the native B7 clones in comparison with an isotype control (IgG) on the infection by *Streptococcus pneumoniae* in mice chronically exposed to cigarette smoke.

Mice have been exposed to cigarette smoke during 12 weeks (5 cigarettes/ day, 5 days/ week) and after this, they have been treated by intraperitoneal administration of 100 µg/mice of each antibody, one day before and one day after the infection with *Streptococcus pneumoniae* (serotype 1, intranasal injection of 4×10^5 cfu). The bacterial load was evaluated at the peak of infection (day 3) in the bronchoalveolar lavages (BAL), the lung tissue and the blood. Results were expressed as mean ± SEM of the cfu per ml (n= 8-10 mice per group).

Figure 7: Effect of treatment with the anti-IL-20Rb antibodies including the 20RNTC and the native B7 clones in comparison with an isotype control (IgG) on the inflammatory cell recruitment due to infection by *Streptococcus pneumoniae* in mice chronically exposed to cigarette smoke.

Mice have been exposed to cigarette smoke during 12 weeks (5 cigarettes/ day, 5 days/ week) and after this, they have been treated by intraperitoneal administration of 100 µg/mice of each antibody, one day before and one day after the infection with *Streptococcus pneumoniae* (serotype 1, intranasal injection of 4×10^5 cfu). The total cell (A) and the neutrophil (B) (identified as CD45⁺, CD11b^{high} and Ly6G^{high}) numbers were evaluated at the peak of infection (day 3) in the bronchoalveolar lavages (BAL) and the lung tissue (obtained after enzymatic digestion with collagenase). Results were expressed as mean ± SEM (n= 8-10 mice per group).

EXAMPLE:

For our study we have developed an experimental model mimicking the COPD disease in mice by chronic exposure to cigarette smoke (CS) (13). These mice present an increased susceptibility to respiratory pathogens that was related to defective IL-22 production (14, 15).

In contrast these animals exhibited an increased expression of IL-19, IL-20 and IL-24 in response to *S. pneumoniae* or NTHi. Treatment with anti-IL-20Rb blocking antibodies increased the bacterial clearance in control mice infected by *S. pneumoniae* (12) and protected CS-exposed mice from bacterial infection, by decreasing the bacterial burden and the inflammatory infiltrate (WO2016083304). Given these results, we hypothesized that IL-20 cytokines might be responsible for the increased susceptibility to bacterial infections in COPD mice through their inhibitory effect of Th17 cytokines production. In order to evaluate their role during the exacerbation of COPD, CS-exposed mice were treated with blocking anti-IL20RB antibodies (clone 20RNTC, 50 µg/mice, intra-peritoneal administration) one day before infection with Sp or NTHi. Measurement of bacterial load showed that treatment with anti-IL-20Rb antibody strongly decreased the bacterial load of Sp in BAL both at day 1 and 3 after infection and lung at day 3 after infection from COPD mice but not in control mice. Moreover, this treatment also reduced the systemic dissemination of the bacteria.

Total and neutrophil counts were increased in COPD mice infected with Sp compared to Air mice. Treatment with anti-IL-20Rb antibodies decreased the number of neutrophils in the BAL. Similarly, the increased recruitment of dendritic cells induced by Sp was inhibited by blocking the IL-20Rb particularly at day 1 post-infection. On lung sections stained with hematoxylin/eosin, blocking the IL-20R receptors significantly inhibited the inflammatory infiltrate and the tissue lesions. Moreover, we observed that this treatment is also effective after preventive or curative administration (either 24h before or after infection). *Our data suggest that IL-20Rb represents a potential therapeutic target in the context of bacteria-induced COPD exacerbations.*

In order to develop a therapeutic tool for AE-COPD, we have selected our own clone of human neutralizing anti-IL-20Rb antibody by using a phage display approach. We have selected these clones according to their strong and specific recognition of the IL-20Rb by ELISA. They did not recognize the IL-20Ra and the IL-22Ra1 subunit. After this, we tested 5

clones for their ability to inhibit in vitro the biological function on airway epithelial cells and dendritic cells (which expressed the IL-20R). Our data revealed that the B7 clone inhibits the inflammatory activity of IL-19 on AEC and dendritic cells. Interestingly, the B7 antibody shows a cross reactivity between human and murine forms of IL-20Rb. Moreover, the B7 antibody seems to bind to a different epitope from the 20RNTC antibody.

After integration of VH/VL region of our human clone B7 in a murine IgG2a isotype, this antibody has been tested in our model of COPD exacerbation and compared to the 20RNTC clone. Our data showed that treatment with the B7 clone decreased the bacterial load and the inflammatory infiltrate at a level similar to the 20RNTC antibody.

REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference 10 into the present disclosure.

CLAIMS:

1. A monoclonal antibody which cross-competes for binding to IL-20Rb with the monoclonal antibody comprising a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:2 (NY-X3-MN wherein X3 is S or A), ii) the VHCDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFKG) and iii) the VH-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4 (SYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs: i) the VL-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).
2. The monoclonal antibody of claim 1 which cross-competes for binding to IL-20Rb with the monoclonal antibody comprising a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:8 (NYSMN), ii) the VH-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFKG) and iii) the VH-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4 (SYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs: i) the VLCDR1 as set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).
3. The monoclonal antibody of claim 1 which cross-competes for binding to IL-20Rb with the monoclonal antibody comprising a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:9 (NYAMN), ii) the VH-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFKG) and iii) the VH-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4 (SYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs: i) the VLCDR1 as set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).
4. The monoclonal antibody of claim 1 which is chimeric, a humanized or a human antibody.
5. A monoclonal antibody having specificity for IL-20Rb which comprises a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:2 (NY-X3MN wherein X3 is S or A), ii) the VH-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFKG) and iii) the VH-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4

- (SYYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs: i) the VL-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).
6. The monoclonal of claim 5 which comprises a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:8 (NYSMN), ii) the VH-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFVKG) and iii) the VH-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4 (SYYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs:
- i) the VL-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).
7. The monoclonal of claim 5 which comprises a heavy chain comprising the following CDRs i) the VH-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:9 (NYAMN), ii) the VH-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:3 (YISGSSRYISYADFVKG) and iii) the VH-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:4 (SYYGMDV) and a light chain comprising the following CDRs:
- i) the VL-CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5 (AGTSSDVGGNYYVS), ii) the VL-CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6 (GDSYRPS) and iii) the VL-CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7 (SSYTYSTRV).
8. The monoclonal antibody of claim 5 which comprises a heavy chain having 70 % of identity with SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:11 and/or a light chain having 70 % of identity with SEQ ID NO:12.
9. The antibody of claim 4 which comprises the heavy chain as set forth in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:11 and the light chain as set forth in SEQ ID NO:12.
10. The antibody of claim 1 or 5 which does not comprise a Fc region that mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and thus does not comprise an Fc portion that induces antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).
11. A nucleic acid molecule encoding for a heavy chain and/or a light chain of the antibody of claim 1 or 5.

12. A host cell which has been transfected, infected or transformed by the nucleic acid of claim 11.
13. The antibody of claim 1 or 5 for use as a drug.
14. A method of therapy in a patient in need thereof, comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the antibody of claim 1 or 5.
15. A method of treating acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in a subject in need thereof comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the monoclonal antibody of claim 1 or 5.
16. A pharmaceutical composition comprising the monoclonal antibody of claim 1 or 5.

ABSTRACT OF THE INVENTION**ANTIBODIES SPECIFIC FOR IL20-RB AND USES THEREOF FOR THE TREATMENT OF ACUTE EXACERBATION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) remains a major cause of morbidity and mortality worldwide. Acute exacerbation of COPD (AE-COPD) in patients is associated with an inexorable decline in lung function, enhanced oedema as well as airway and systemic inflammation. Previous results show that treatment with anti-IL-20Rb blocking antibodies increased the bacterial clearance in control mice infected by *S. pneumoniae* and protected C57BL/6 mice from bacterial infection, by decreasing the bacterial burden and the inflammatory infiltrate. Therefore there is an interest for generating monoclonal antibodies specific for IL-20Rb with a neutralizing activity for their use in the treatment of AE-COPD. The present invention fulfills this need by providing antibodies having specificity for IL-20Rb.



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

| | | |
|---|---|---|
| Submission number | 1000494002 | |
| Application number | EP19306068.8 | |
| File No. to be used for priority declarations | EP19306068 | |
| Date of receipt | 04 September 2019 | |
| Your reference | GOSSET18240MC | |
| Applicant | INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) | |
| Country | FR | |
| Title | ANTIBODIES SPECIFIC FOR IL20-RB AND USES THEREOF FOR THE TREATMENT OF ACUTE EXACERBATION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE | |
| Documents submitted | package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdfText_18240EP.pdf (32 p.) SEQLTXT.txtSequencesASCII_18240EP.ST25.txt | ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-2.pdfDrawings_18240EP.pdf (7 p.) |
| Submitted by | EMAIL=patents@inserm-transfert.fr,CN=Denise HIRSCH,O=SOCIETE INSERM TRANSFERT,C=FR | |
| Method of submission | Online | |
| Date and time receipt generated | 04 September 2019, 09:42:19 (CEST) | |
| Official Digest of Submission | C4:AD:A8:5F:25:DE:05:DB:C4:E2:19:32:3B:4E:B1:2A:3B:8C:33:3E | |

/INPI, section dépôt/



Référence Dossier : BIO18240 – GOSSET /MC

Pôle Pratiques Industrielle
Sectoriel Inera : 01.55.00.00.84
Téléphone : 01.55.00.01.69
E-mail : pcp@inserm-transfert.fr

FICHE PERSONNELLE « INVENTEUR »
(Les champs en jaune sont indispensables notamment pour la rémunération)

Je soussigné(e)

M (Mme) : LE ROUX Méline

Nationalité : française

Adresse personnelle (*) : 38, rue Augereau
59200- Tourcoing

(*) Tout changement d'adresse personnelle ou professionnelle doit être indiqué dans les meilleurs délais
(**) Représente le pourcentage de participation à l'invention pour chaque inventeur, qui conditionne l'intéressement des inventeurs.

| MA SITUATION A L'EPOQUE DE L'INVENTION | | MA SITUATION ACTUELLE | | | |
|--|------------------|---|---------------------|------------------|--|
| Organisme employeur mentionné sur la fiche de paie | Fonction exercée | Laboratoire / Equipe / mixité de l'Equipe /Adresse Téléphone / télécopie / E-mail (*) | Organisme employeur | Fonction exercée | Laboratoire / Equipe / mixité de l'Equipe /Adresse Téléphone / télécopie / E-mail (*) |
| INSERM | Doctorante | CITE, OPHIENFIELD, INSERM U1019- CNRS UMR 9017 1, rue Calmette, Institut Pasteur de LILLE, 59019 - Lille Cedex, FRANCE meline-le-roux@orange.fr | | | |

Mon pourcentage de contribution à l'invention (**): 10 %

Déclare sur l'honneur, avoir pris connaissance du contenu de la demande de brevet (9 306 068 8 déposée le 04 Sept. 2019 intitulée : «ANTIBODIES SPECIFIC FOR IL20-RB AND USES THEREOF FOR THE TREATMENT OF ACUTE EXACERBATION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE»

- J' atteste avoir participé aux travaux ayant donné lieu à la conception de l'invention décrite dans la demande de brevet identifiée ci-dessus.
- Je déclare qu'en application de la procédure en place à Inserm Transfert, j'ai pris connaissance, via un memorandum intitulé « Note sur le Statut d'Inventeur », des critères juridiques de désignation des inventeurs et des conséquences d'une désignation incorrecte.
- Je confirme sur l'honneur que toutes les informations que j'ai fournies à Inserm Transfert au sujet de ma participation à l'invention sont exactes. J'atteste également que j'ai fourni ces informations en sachant que toute déclaration volontairement fautive ou trompeuse peut compromettre la validité de la demande de brevet ou de tout brevet qui en découlerait.
- J'atteste que j'ai réalisé l'invention dans l'une des circonstances suivantes :
 - dans l'exécution de mon contrat de travail, lequel comporte une mission inventive correspondant à mes fonctions effectives ;
 - dans l'exécution des études et recherches qui m'ont été explicitement confiées.
- J'accepte le classement dans la catégorie des inventions de mission.
- J'atteste avoir pris connaissance de la note intitulée « Note d'information sur la procédure » décrivant les actions qui seront entreprises par Inserm Transfert dans le cadre des procédures relatives au brevet, dans le cadre de l'évaluation de la technologie brevetée et dans sa promotion industrielle.