

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE

DOCTORAT
IMMUNOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement le 30 Septembre 2016

Par *Olivier LE ROUZIC*

***Implication de la voie IL-17 / IL-22 dans la susceptibilité aux infections associée
à la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO)***

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Benoit WALLAERT	Président du jury
Monsieur le Professeur Bruno HOUSSET	Examineur
Monsieur le Professeur Fabrice BUREAU	Rapporteur
Monsieur le Professeur Pierre-Régis BURGEL	Rapporteur
Monsieur le Docteur Philippe GOSSET	Directeur de Thèse

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

Remerciements

A mon directeur de thèse, **Monsieur le Docteur Philippe Gosset**, qui m'apprends énormément depuis que j'ai intégré l'équipe en 2010 pour mon Master 2 et qui m'accompagne depuis ce jour dans mon parcours hospitalo-universitaire. Je n'ai pas de mots assez forts pour vous remercier.

A **Madame le Professeur Isabelle Tillie-Leblond** qui m'avait fait l'honneur de m'intégrer à son équipe de recherche et de m'encadrer pour ce travail. J'espère que cette thèse et les travaux qui suivront seront à la hauteur des espérances que vous aviez placées en nous.

A **Monsieur le Professeur Benoit Wallaert** qui m'accompagne depuis le début dans mon projet de carrière hospitalo-universitaire malgré mes doutes. Je vous remercie d'avoir accepté de suivre et de juger ce travail et surtout de toute l'aide que vous m'avez apportée au cours de ces années.

A **Monsieur le Professeur Bruno Housset** qui m'a fait l'honneur de m'intégrer à l'équipe de la cohorte EXACO pour en publier les résultats et avec qui j'ai beaucoup de plaisir à échanger. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de la confiance que vous me portez.

A **Monsieur le Professeur Fabrice Bureau** et **Monsieur le Professeur Pierre-Régis Burgel** qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je vous remercie pour vos critiques qui ont permis d'en améliorer la qualité et la lecture.

A **Madame le Professeur Karine Faure** qui a participé à mon comité de suivi de thèse. Je vous remercie pour tous les conseils que vous m'y avez apportés.

A toute **l'équipe de recherche du Centre d'Infection Pulmonaire et d'Immunité de Lille** que j'ai intégrée depuis 2010 et plus particulièrement à Muriel Pichavant qui m'a toujours apporté son soutien même quand elle était surchargée, c'est-à-dire souvent. J'ai également une pensée pour tous les étudiants qui ont apporté leur pierre à ce travail, Florence Hennegrave, Clémence Mordacq, Cécile Olivier, Bachirou Koné et Romain Leseine.

A toute **l'équipe de recherche des Laboratoires Meakins-Christie** à l'Université McGill de Montréal et plus particulièrement au Docteur Hamid pour m'avoir accueilli pendant un an dans le cadre de ma mobilité. J'ai beaucoup appris à vos côtés.

A toute la **Clinique de Pneumologie du CHRU de Lille** avec des remerciements particuliers à Cécile Chenivresse, Alexis Cortot et Arnaud Scherpereel qui m'accompagne dans mon projet hospitalo-universitaire, à l'équipe du 3^e Est et notamment Nathalie Bautin, Jean-Francois Bervar et Thierry Perez que je rejoins avec un grand plaisir et à **l'équipe des Explorations Fonctionnelles Respiratoires** qui m'ont intégré dans leur équipe cette année et laissé du temps pour la finalisation de mes travaux de recherche.

A tous mes amis et ma famille qui supportent mes silences prolongés et sont malgré tout toujours prêts pour se retrouver pour profiter de chaque instant ensemble.

Enfin, à mes enfants, Agnès et Gabriel et ma femme, Marion, qui subissent les contraintes de ce choix de carrière et continuent de me soutenir et de m'apporter la force nécessaire pour poursuivre. Je ne pourrais pas aller bien loin sans vous. Merci, je vous aime.

Résumé

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes dont le facteur de risque principal est l'exposition chronique à la fumée de cigarette. L'évolution de la maladie est fréquemment associée à une colonisation bactérienne des voies aériennes et ponctuée d'épisodes aigus d'exacerbation de la maladie associés à une morbi-mortalité importante. Ces exacerbations sont principalement d'origine infectieuses et plus particulièrement, associées à une bactérie dans 50 % des cas, majoritairement *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis*. Le contrôle de ces infections bactériennes implique en particulier une réponse immunitaire efficace de type Th17. Cette immunité Th17 médiée principalement par les cytokines IL-17A et IL-22 est impliquée dans la physiopathologie de la BPCO mais n'a été que peu étudiée dans le contexte des exacerbations. Notre hypothèse est que la réponse Th17 aux pathogènes est altérée dans la BPCO, mécanisme qui serait impliqué dans la susceptibilité aux infections respiratoires observée chez les patients.

Différentes approches ont été utilisées pour tester cette hypothèse. Tout d'abord, une approche *ex vivo*, à partir de cellules mononucléées circulantes (PBMC) de patients atteints de BPCO comparées à celles issues de sujets sains non fumeurs et de sujets fumeurs sans obstruction bronchique, montrant un défaut de production par les PBMC en réponse à une activation par *S. pneumoniae* des cytokines IL-17A et IL-22, mais également des cytokines IL-6 et IL-23 produites par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et impliquées dans l'activation de cette immunité Th17. Ensuite, une approche *in vitro*, avec un modèle de cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC) exposées à la fumée de cigarette. Ces MDDC présentaient un défaut de maturation, de production de cytokines pro-Th17 et de leur capacité à activer une réponse lymphocytaire Th17 en réponse à *S. pneumoniae*. Enfin, une approche *in vivo*, utilisant un modèle murin de souris exposées de façon chronique à la fumée de cigarette confirmant ces résultats avec un défaut de réponse IL-17A et IL-22, mais également un défaut de production en réponse à *S. pneumoniae* des cytokines pro-Th17, l'IL-1 β et l'IL-23 par les CPA. Dans ce modèle, l'apport d'IL-22 permettait d'améliorer la clairance bactérienne et de réduire les lésions pulmonaires, suggérant des possibilités thérapeutiques pour améliorer la prise en charge de ces exacerbations infectieuses.

Ces trois approches permettent d'apporter des arguments forts en faveur d'un défaut de réponse Th17 au cours des exacerbations bactériennes de la BPCO, hypothèse confortée par d'autres travaux de notre équipe montrant dans le modèle murin d'exposition chronique à la fumée de cigarette la présence d'un défaut de production d'IL-22 dans la réponse à *Haemophilus influenzae*. Ces travaux doivent maintenant être confirmés par une étude clinique incluant des patients atteints de BPCO en exacerbation mais ouvrent déjà la voie à des perspectives thérapeutiques dans la prise en charge de ces exacerbations bactériennes.

Mots-clés : broncho-pneumopathie chronique obstructive, exacerbation, fumée de cigarette, interleukine 17, interleukine 22, *Streptococcus pneumoniae*

IL-17 / IL-22 pathway involvement in infectious chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exacerbation susceptibility

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic inflammatory disease of the airways mainly due to chronic exposure to cigarette smoke. Evolution of the disease is often associated with bacterial colonization of the airways and punctuated by acute exacerbation of the disease with a frequent related morbi-mortality. These exacerbations are mainly due to infection and almost 50 % are associated with bacteria, often *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis*. Th17 immune response is particularly involved in the control of bacterial infection and is principally mediated by IL-17A and IL-22 cytokines. This Th17 inflammation is involved in COPD physiopathology but there is paucity of data focusing on this immune response during COPD exacerbations. Our hypothesis is that Th17 immune response to pathogens is defective in COPD leading to airways infection susceptibility.

We have tested our hypothesis by different approaches. First, the *ex vivo* responses to *Streptococcus pneumoniae* of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from COPD patients, healthy non smokers and healthy smokers were compared showing decreased production of IL-17A and IL-22 but also of pro-Th17 cytokines IL-6 and IL-23 which are produced by antigen presenting cells (APC). Second, we used an *in vitro* model of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) exposed to cigarette smoke showing a defective MDDC maturation, pro-Th17 cytokines production and ability to promote T-cells Th17 response, in response to *S. pneumoniae*. Finally, an *in vivo* murine model of mice chronically exposed to cigarette smoke showing defective production of IL-17A and IL-22 but also of pro-Th17 cytokines IL-1 β and IL-23 produced by APC, in response to *S. pneumoniae*. In this model, supplementation with IL-22 restored bacterial clearance and limited lung alterations suggesting therapeutic opportunities to improve the management of infectious COPD exacerbation.

Altogether, these results strengthen our hypothesis of a defective Th17 immune response during bacterial COPD exacerbations. They are comforted by other studies in our team showing a defective IL-22 production in response to *Haemophilus influenzae* in our *in vivo* model of mice chronically exposed to cigarette smoke. Now we have to confirm these results in a clinical trial

including COPD patients in exacerbation and to further explore mechanisms involved in order to develop new infectious COPD exacerbation therapeutics.

Keywords : chronic obstructive pulmonary disease, exacerbation, cigarette smoke, interleukin 17, interleukin 22, *Streptococcus pneumoniae*

Table des matières

Remerciements	III
Résumé	IV
Abstract.....	VI
Table des matières	VIII
Liste des Abréviations	XI
INTRODUCTION	1
1. LA BRONCHO-PNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE (BPCO)	1
1.1. DÉFINITION ET ÉPIDÉMIOLOGIE.....	1
1.2. HISTOIRE NATURELLE DE LA MALADIE	1
1.2.1. Facteurs de risque de la BPCO.....	1
1.2.2. Histoire de la maladie.....	2
1.2.3. Place des exacerbations dans l’histoire de la maladie.....	3
1.3. ATTEINTE DES VOIES AÉRIENNES	3
1.3.1. Remodelage de l’épithélium bronchique.....	4
1.3.1.1. Cellules basales de l’épithélium bronchique.....	5
1.3.1.2. Cellules épithéliales et sécrétoires.....	5
1.3.2. Remodelage du muscle lisse.....	6
1.3.3. Remodelage vasculaire.....	6
2. INFLAMMATION CHRONIQUE DANS LA BPCO	7
2.1. ACTIVATION DE LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE PAR LA FUMÉE DE CIGARETTE.....	7
2.2. RÉPONSE INFLAMMATOIRE INNÉE	10
2.2.1. Les macrophages	10
2.2.2. Les polynucléaires neutrophiles	11
2.2.3. Les cellules lymphoïdes innées	12
2.3. CELLULES PRÉSENTATRICES D’ANTIGÈNES PULMONAIRES ET BPCO	14
2.3.1. Les cellules présentatrices d’antigène du poumon	14
2.3.2. Les cellules dendritiques dans la BPCO.....	17
2.3.3. Activation de la réponse immunitaire adaptative	19
2.4. RÉPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE	21
2.4.1. Les lymphocytes T	21
2.4.2. Les lymphocytes B	22
2.4.3. L’auto-immunité dans la BPCO.....	22
3. MICROBIOME PULMONAIRE ET COLONISATION BRONCHIQUE DANS LA BPCO	23
3.1. TECHNIQUES D’ÉTUDE DU MICROBIOME	23
3.2. MICROBIOME PULMONAIRE DU SUJET SAIN	24
3.2.1. Description du microbiome pulmonaire du sujet sain.....	24
3.2.2. Microbiome et immunité de l’hôte.....	25
3.2.3. Mycobiome et virome pulmonaire	26
3.3. MICROBIOME PULMONAIRE DU PATIENT ATTEINT DE BPCO.....	27
3.3.1. Description du microbiome pulmonaire dans la BPCO	27
3.3.2. Microbiome pulmonaire et inflammation bronchique dans la BPCO.....	28
3.3.3. Mycobiome et virome pulmonaire dans la BPCO.....	29
3.4. COLONISATION BACTÉRIENNE DES VOIES AÉRIENNES DANS LA BPCO	30
4. EXACERBATIONS DE LA BPCO	32
4.1. BIOLOGIE DES EXACERBATIONS.....	33
4.1.1. Mécanismes immunologiques.....	33

4.1.2. Différents profils immunologiques des exacerbations	35
4.2. MICROBIOLOGIE DES EXACERBATIONS	36
4.2.1. Les virus	36
4.2.1.1. Lien de causalité entre virus et exacerbation.....	36
4.2.1.2. Mécanismes de la susceptibilité aux infections virales	38
4.2.2. Les bactéries	39
4.2.2.1. Bactéries associées aux exacerbations	39
4.2.2.2. Mécanismes de la susceptibilité aux infections bactériennes.....	40
4.2.3. Les co-infections virus et bactéries	40
5. VOIE IL-17 / IL-22 DANS LA BPCO	42
5.1. IMMUNITÉ TH17 PULMONAIRE	42
5.1.1. Cellules et cytokines Th17	42
5.1.2. Spécificités de l'IL-17A et de l'IL-22.....	43
5.2. CYTOKINES TH17 ET INFLAMMATION CHRONIQUE DE LA BPCO	43
5.2.1. Inflammation Th17 systémique.....	43
5.2.2. Inflammation Th17 pulmonaire.....	44
5.2.3. Régulation de la production d'IL-17	45
5.3. CYTOKINES TH17 ET OBSTRUCTION DES VOIES AÉRIENNES	46
5.4. CYTOKINES TH17 ET DÉVELOPPEMENT DE L'EMPHYSÈME	46
6. OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	48
ARTICLES.....	51
1. LA FUMÉE DE CIGARETTE ALTÈRE LA CAPACITÉ DES CELLULES DENDRITIQUES À INDUIRE UNE RÉPONSE TH17 EN RÉPONSE À <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	51
1.1. ABSTRACT	53
1.2. BACKGROUND	54
1.3. METHODS	56
1.3.1. Cell preparation	56
1.3.2. Preparation of cigarette smoke extract.....	56
1.3.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	57
1.3.4. Activation of human MDDC and design of the coculture.....	57
1.3.5. Flow cytometry	57
1.3.6. Cytokines measurements.....	58
1.3.7. Real Time quantitative PCR.....	58
1.3.8. Endocytosis and bactericidy of <i>S. pneumoniae</i> by MDDC	58
1.3.9. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction assessment	59
1.3.10. Statistical analysis	59
1.4. RESULTS	60
1.4.1. PBMC from COPD patients exhibit a defective pro-Th1 and pro-Th17 response to <i>S. pneumoniae</i> 60	60
1.4.2. CSE inhibits <i>S. pneumoniae</i> -induced MDDC maturation.....	60
1.4.3. CSE-exposed MDDC are responsible for a defective Th1 and Th17 response to <i>S. pneumoniae</i> ..	63
1.4.4. Impact of CSE on <i>S. pneumoniae</i> endocytosis by MDDC.....	65
1.4.5. CSE induced oxidative stress was not implicated in the altered response to <i>S. Pneumoniae</i>	66
1.5. DISCUSSION	69
1.6. CONCLUSION	72
1.7. REFERENCES	73
1.8. ADDITIONAL FILES.....	76
1.9. PRINCIPAUX RÉSULTATS.....	82

2. L'EXACERBATION DE LA BPCO EST FAVORISÉE PAR LE DÉFAUT D'IL-22 AU COURS DE L'INFECTION PAR <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	83
2.1. ABSTRACT	85
2.2. INTRODUCTION	86
2.3. MATERIAL AND METHODS	88
2.3.1. Mice	88
2.3.2. Patients with COPD	88
2.3.3. Reagents and Antibodies	89
2.3.4. Primers	89
2.3.5. Infection by <i>Streptococcus pneumoniae</i> and bacterial counts	90
2.3.6. Assessment of airway inflammation	90
2.3.7. Cell sorting and cocultures	91
2.3.8. Statistical analysis	91
2.4. RESULTS	92
2.4.1. CS-exposed mice display delayed bacterial clearance and exacerbated inflammation upon <i>S. pneumoniae</i> challenge	92
2.4.2. CS-exposed mice display a reduced production of Th17 cytokines in response to <i>S. pneumoniae</i>	94
2.4.3. CS exposure alters the function of pulmonary APC	95
2.4.4. Exogenous IL-22 protects CS-exposed mice from <i>S. pneumoniae</i> infection	98
2.4.5. COPD patients showed impaired Th17 cytokine production in response to <i>S. pneumoniae</i>	100
2.5. DISCUSSION	103
2.6. REFERENCES	106
2.7. SUPPLEMENTAL DATA	110
2.8. PRINCIPAUX RÉSULTATS	114
3. LES CYTOKINES TH17 DANS LA BPCO, REVUE DE LA LITTÉRATURE (EN PRÉPARATION)	115
3.1. TH17 IMMUNITY IN THE LUNG	117
3.2. IL-17 AND IL-22 CYTOKINES AND COPD CHRONIC INFLAMMATION (FIGURE 1)	118
3.3. ROLE OF IL-17 AND IL-22 IN AIRWAY HYPERREACTIVITY	121
3.4. ROLE OF IL-17 AND IL-22 IN EMPHYSEMA	121
3.5. IL-17 AND IL-22 IN COPD EXACERBATIONS (FIGURE 2)	122
3.6. FUTURE DIRECTIONS	126
3.7. REFERENCES	128
<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	<u>135</u>
1. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS	135
1.1. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	135
1.2. REVUE DE LA LITTÉRATURE	136
2. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	137
2.1. DÉFAUT DE RÉPONSE IL-17 ET IL-22 AU COURS DES EXACERBATIONS DE LA BPCO	137
2.1.1. Spécificité immunologique du défaut de réponse Th17	137
2.1.2. Spécificité microbiologique du défaut de réponse Th17	138
2.1.3. Démonstration de ce défaut chez l'homme	138
2.2. MÉCANISMES DE L'ALTÉRATION DE LA MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES	139
2.3. CONSÉQUENCES SUR L'ÉPITHÉLIUM BRONCHIQUE	140
2.3.1. Cytokines Th17 et peptides antimicrobiens	141
2.3.2. Mise en place d'un modèle complexe d'interaction intercellulaires	142
2.4. PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES	146
2.5. CONCLUSION	148
<u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>150</u>

Liste des Abréviations

ADN	: acide désoxyribonucléique
AHR	: récepteur aux hydrocarbures aromatiques (<i>aryl-hydrocarbon receptor</i>)
ARN	: acide ribonucléique
BPCO	: broncho-pneumopathie chronique obstructive
CPA	: cellule présentatrice d'antigène
CRP	: protéine C réactive
DAMPS	: signaux de danger (<i>damage-associated molecular patterns</i>)
DC	: cellule dendritique
GM-CSF	: facteur de stimulation des colonies de granulocytes et macrophages
IFN	: interféron
IL	: interleukine
ILC	: lymphocytes innés
JNK	: janus kinase
LBA	: lavage broncho-alvéolaire
LPS	: lipopolysaccharide
MAPK	: protéines kinases activées par les mitogènes
MDDC	: cellules dendritiques dérivées de monocytes
MMP	: métalloprotéase de la matrice
MPO	: myéloperoxydase
NF- κ B	: facteur nucléaire κ B
NK	: cellule tueuse naturelle (<i>natural killer</i>)
NTHi	: <i>Haemophilus influenzae</i> non typable
PBMC	: cellules mononucléées plasmatiques
PCR	: réaction en chaîne par polymérase
PD-L1	: ligand 1 du programme de mort cellulaire (aussi appelé CD274 ou B7H1)
PPAR- γ	: récepteur gamma activé par le proliférateur du péroxysome (<i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>)
PRR	: récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (<i>pattern recognition receptors</i>)
STAT	: signal de transduction et activateur de la transcription
TGF- β	: facteur de croissance transformant (<i>transforming growth factor beta</i>)
TNF	: facteur de nécrose tumorale (<i>tumor necrosis factor</i>)
TLR	: récepteur de type toll
VEGF	: facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEMS	: volume maximal exprimé lors de la première seconde
VIH	: virus de l'immunodéficience humaine
VRS	: virus respiratoire syncytial

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

1.1. Définition et épidémiologie

La broncho-pneumopathie chronique obstructive, ou BPCO, est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes définie par le comité international GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) comme une maladie que l'on peut prévenir et traiter et qui est caractérisée par une limitation persistante des débits aériens, c'est-à-dire une obstruction des voies aériennes qui ne cède pas complètement après prise d'un traitement bronchodilatateur (1). Elle est associée à une réponse inflammatoire chronique accrue des voies aériennes et des poumons secondaire à l'exposition à des particules ou des gaz nocifs.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 65 millions de personnes dans le monde seraient atteintes d'une forme modérée à sévère de la BPCO et 3,1 millions de personnes en seraient mortes en 2012, ce qui représente 5,6 % de l'ensemble des morts cette année là soit la 3^e cause de mortalité (2). Selon les estimations, elle sera également la 5^e cause de handicap dans le monde d'ici 2020 (3). En France, on estime que sa prévalence est comprise entre 5 et 10 % des adultes de plus de 45 ans avec des taux plus élevés d'hospitalisation et de mortalité par BPCO dans les régions du Nord, de l'Est et de la Bretagne (4). En 2006, la BPCO était mentionnée dans 16 495 certificats de décès dont 7 391 la mentionnant comme cause initiale de décès. Selon les chiffres de l'Assurance Maladie, en 2013, 370 980 personnes étaient prises en charge dans le cadre d'une insuffisance respiratoire chronique grave dont 72 670 sous le code J42 de la CIM-10 (Bronchite chronique, sans précision) (5). Il s'agit donc d'un problème de Santé Publique majeur dans notre pays.

1.2. Histoire naturelle de la maladie

1.2.1. Facteurs de risque de la BPCO

Les facteurs de risques de développer une BPCO sont multiples comprenant des facteurs endogènes, notamment des prédispositions génétiques, et des facteurs exogènes. Ces derniers peuvent être précoces comme l'exposition *in-utero* au tabagisme de la mère, l'exposition pendant

l'enfance au tabagisme passif ou à la pollution, ou encore la survenue d'infections respiratoires sévères dans l'enfance, mais ils peuvent aussi être présents à l'âge adulte comme le tabagisme actif ou les expositions professionnelles (6). Le facteur de risque principal dans nos pays occidentaux est le tabagisme actif. Néanmoins, l'implication de ces autres facteurs qui peuvent s'associer et interagir entre eux pour éventuellement conduire au développement d'une BPCO pourrait expliquer l'hétérogénéité des phénotypes de patients observée en clinique, un phénotype étant défini par une caractéristique ou un ensemble de caractéristiques permettant de décrire des sous-groupes de patients cliniquement pertinents c'est-à-dire avec un pronostic et/ou une réponse thérapeutique différents (7,8).

1.2.2. Histoire de la maladie

La description de l'histoire de la maladie a longtemps été basée sur les travaux de Fletcher et Peto décrivant, chez les patients fumeurs prédisposés à développer une BPCO, un déclin de la fonction respiratoire en accélération continue conduisant inexorablement les patients à l'insuffisance respiratoire chronique puis au décès (9). La sévérité de la BPCO était donc historiquement définie sur la sévérité de l'obstruction bronchique mesurée par le volume expiratoire maximum pendant la première seconde (VEMS) après prise de bronchodilatateur chez des patients présentant une obstruction bronchique non complètement réversible avec :

- un stade léger ou stade I quand le VEMS est supérieur à 80 %,
- un stade modéré ou stade II quand le VEMS est compris entre 50 et 80 %,
- un stade sévère ou stade III quand le VEMS est compris entre 30 et 50 %,
- un stade très sévère ou stade IV quand le VEMS est inférieur à 30 % ou entre 30 et 50 % si le patient présente en plus une insuffisance respiratoire chronique.

Cette classification reste vraie aujourd'hui avec un réel intérêt pronostique mais l'évaluation de la sévérité de la maladie prend maintenant en compte d'autres paramètres notamment la fréquence des exacerbations, les symptômes dont principalement la dyspnée et l'altération de la qualité de vie. De plus, des travaux récents ont démontré que ce schéma ne recouvrait pas l'ensemble des trajectoires conduisant à la BPCO. En effet, si une majorité des patients présente effectivement un déclin accéléré de la fonction respiratoire, une autre partie des patients présente un déclin similaire aux sujets sains et ne développe une BPCO que parce qu'ils n'ont pas eu un développement pulmonaire optimal au cours de l'enfance quelle qu'en soit la raison (prématurité,

infections sévères, expositions environnementales...) suggérant des mécanismes physiopathologiques associés à la maladie pouvant être différents (10). De même, il est maintenant démontré que le déclin de la fonction respiratoire est le plus important dans les stades II et III avec un ralentissement de ce déclin au stade IV suggérant la présence de mécanismes physiopathologiques conduisant à l'obstruction sévère dès les stades précoces de la maladie (11).

1.2.3. Place des exacerbations dans l'histoire de la maladie

L'évolution de la maladie est ponctuée d'épisodes d'exacerbations de la BPCO définies comme une aggravation de l'état respiratoire de base du malade plus importante que les variations quotidiennes habituelles, d'apparition aiguë et persistant au moins 24 heures, et nécessitant un changement thérapeutique par rapport au traitement habituel (12). Elles se manifestent notamment par une majoration de la dyspnée, de la toux et/ou du volume et de la purulence des expectorations. Ces exacerbations sont un événement déterminant dans l'histoire de la maladie. En effet, chaque exacerbation s'associe dans ses suites à un déclin plus important de la fonction respiratoire et à un risque augmenté de refaire une exacerbation dans les semaines qui suivent (13,14). Elles sont associées à une altération de la qualité de vie des patients et sont responsables de coûts importants pour la société (15,16). De plus, elles sont associées à une mortalité significative puisque la moitié des patients présentant une exacerbation sévère, c'est-à-dire ayant nécessité une hospitalisation, seront décédés dans les 4 années qui la suivent (17). La fréquence des exacerbations est corrélée à la sévérité de l'obstruction bronchique mais dès les stades modérés, plus de 20 % des patients présentent des exacerbations fréquentes, c'est-à-dire au moins 2 exacerbations par an, suggérant encore une fois une prédisposition chez certains patients à présenter ces événements dès les stades précoces de la maladie (18).

1.3. Atteinte des voies aériennes

La BPCO est avant tout une maladie des petites voies aériennes qui ont rapidement été identifiées comme le site principal de l'obstruction bronchique associée à cette maladie, c'est-à-dire au niveau des bronchioles de moins de 2 mm de diamètre interne (soit à partir de la 8^e génération bronchique) (19). L'épaississement de la paroi bronchique de ces bronchioles est d'ailleurs négativement corrélé à la fonction respiratoire (20). Dans la BPCO, ces petites voies aériennes sont le site d'une fibrose péri-bronchiolaire, d'un épaississement de la paroi

bronchiolaire et d'une occlusion de la lumière par un exsudat riche en mucus (21). Enfin, ce remodelage comprend également une hypertrophie du muscle lisse bronchique (22).

1.3.1. Remodelage de l'épithélium bronchique

L'épithélium bronchique normal est un épithélium pseudo-stratifié principalement composé de nombreuses cellules ciliées, de cellules caliciformes sécrétant le mucus et de cellules sécrétrices non-muqueuses (*club cells*) (23). Il comprend également des cellules basales qui n'ont pas de contact avec la lumière de la bronche et sont des cellules progénitrices pouvant proliférer et se différencier en un des autres types cellulaires de l'épithélium bronchique pour le régénérer. Chez l'adulte sain, la régénération de l'épithélium bronchique se fait à partir de ces cellules basales et implique des voies de signalisation essentielles dans le développement telles que les voies de signalisation Wnt et Notch (24). Ces voies de signalisation sont ainsi particulièrement importantes dans la régénération d'un épithélium bronchique « sain » après une agression.

La voie Wnt est activée par les protéines solubles Wnt qui activent classiquement un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G de la famille Frizzled associé à un récepteur de la famille LRP conduisant à l'inhibition de la phosphorylation de la β -caténine par la GSK3- β . Cette β -caténine n'étant alors plus détruite peut se rendre dans le noyau et induire la transcription des gènes cibles impliqués notamment dans l'auto-renouvellement des cellules basales (25). Cette voie est en particulier suractivée dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules conférant une résistance à l'apoptose des cellules tumorales ou encore dans l'activation des fibroblastes au cours de la fibrose pulmonaire idiopathique.

La voie Notch est quant à elle impliquée dans la différenciation des différents types cellulaires présents dans l'épithélium bronchique et peu dans le renouvellement du stock de cellules basales (26). Le récepteur transmembranaire Notch est activé par la fixation des protéines transmembranaires Delta-like ou JAG induisant le clivage de Notch et la libération du domaine intracellulaire de Notch qui agit alors comme facteur de transcription (27). La suractivation de cette voie est notamment impliquée dans les phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse et de métastases des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules.

Ces deux voies jouent donc un rôle important dans la réparation et la régénération de l'épithélium chez le sujet sain et sont directement impliquées dans le remodelage observé dans d'autres pathologies pulmonaires.

1.3.1.1. Cellules basales de l'épithélium bronchique

De nombreuses anomalies de l'épithélium sont observées dans la BPCO associant à divers degrés une hyperplasie des cellules basales et des cellules caliciformes, une métaplasie malpighienne, une réduction du nombre de cellules ciliées et de la longueur de leurs cils, une perte des club cells, une altération de la fonction de barrière de l'épithélium bronchique avec augmentation de sa perméabilité, l'apparition d'une transition épithélio-mésenchymateuse et une fibrose sous-muqueuse (23). La présence d'une hyperplasie des cellules basales dès les stades les plus précoces de la maladie laisse à penser que l'initiation de la BPCO commence par une atteinte de ces cellules (23). Cette hypothèse est appuyée par l'observation d'un retard de cicatrisation des cultures d'épithélium bronchiques issus de patients BPCO, y compris aux stades léger et modéré de la maladie (28). Chez les fumeurs actifs, il a été montré une diminution d'expression des gènes liés à la voie de signalisation Notch dans l'épithélium des petites voies aériennes, diminution plus importante si les sujets présentaient également une BPCO suggérant une atteinte de cette voie (29). Cette atteinte pourrait participer à la limitation des capacités des cellules basales des petites voies aériennes à régénérer un épithélium totalement différencié observée dans les cultures de cellules issues de patients BPCO (30).

1.3.1.2. Cellules épithéliales et sécrétoires

Le développement d'une métaplasie épithéliale survient dès les stades légers et modérés de la BPCO (31). Cette métaplasie malpighienne s'associe à une augmentation de la production d'interleukine (IL)-1 β responsable de l'induction d'une réponse pro-fibrotique des fibroblastes adjacents via une activation par le TGF- β dépendante des intégrines $\alpha_v\beta_8$ (32). L'expression de β_8 sur les fibroblastes des petites voies aériennes de patients BPCO est d'ailleurs corrélée à la sévérité de la BPCO et à l'épaisseur de la paroi bronchique. De plus, le TGF- β entretient cette différenciation vers une métaplasie malpighienne par une activation autocrine des cellules épithéliales dépendantes des intégrines $\alpha_v\beta_6$ confortant le rôle central de cette cytokine dans le remodelage des petites voies aériennes.

L'exposition à la fumée de cigarette participe activement à la progression du remodelage des voies aériennes dans la BPCO. Il a ainsi été montré que l'exposition de cellules épithéliales bronchiques à la fumée de cigarette augmente l'expression de la protéine WNT-5B uniquement lorsque les cellules proviennent de patient BPCO (33). Cette augmentation est associée à une

augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le remodelage bronchique médiée par la voie de signalisation TGF- β / Smad3, comme notamment l'expression des gènes de la fibronectine, la métalloprotéase de la matrice (MMP)-2 et la MMP-9. La composition de l'épithélium change ainsi au cours de la maladie avec une hyperplasie des cellules caliciformes participant à l'hypersécrétion de mucus (34). La part du tabagisme dans l'entretien et la progression de ce remodelage peut indirectement être évaluée chez les patients atteints de BPCO et sevrés de leur tabagisme chez qui l'on observe une régression partielle de la métaplasie malpighienne et du nombre de cellules à mucus, un effet qui n'est observé qu'après un sevrage d'au moins 3,5 années (35).

1.3.2. Remodelage du muscle lisse

Le remodelage du muscle lisse bronchique a été bien plus étudié dans l'asthme que dans la BPCO où les données sont relativement éparses. L'hypertrophie du muscle lisse bronchique au niveau des petites voies aériennes est bien décrite (22). Par contre, les mécanismes qui sous-tendent ce remodelage restent méconnus. Chez les patients présentant un emphysème centrolobulaire, il a été montré une augmentation du nombre de mastocytes dans la paroi alvéolaire et au niveau du muscle lisse bronchique (36). La présence de ces mastocytes était associée à la présence d'une hyperréactivité bronchique pouvant suggérer chez ces patients particuliers, des mécanismes physiopathologiques communs avec l'asthme même si aucun de ces patients n'avait d'antécédent d'asthme. Cependant, contrairement à l'asthme, l'hypertrophie musculaire dans la BPCO n'est pas associée à une modification de la biogénèse mitochondriale ni à une augmentation de la consommation d'oxygène suggérant que ce remodelage est associé à des capacités fonctionnelles différentes de celles observées dans l'asthme (37).

1.3.3. Remodelage vasculaire

Il existe encore peu de données sur le remodelage vasculaire au cours de la BPCO. Il a été observé une augmentation de la néo-vascularisation dans la muqueuse des bronches proximales en lien avec le tabagisme (38). Plus particulièrement, chez les BPCO il est noté dans les voies aériennes proximales une fragmentation de la membrane basale qui comprend plus de vaisseaux sanguins alors qu'ils sont moins fréquents dans la lamina propria témoignant de la présence d'une redistribution vasculaire (39). Pour autant, ce remodelage vasculaire ne semble pas étendu à tout l'arbre bronchique, l'hyper-vascularisation n'étant pas retrouvée dans les petites voies aériennes

(40). Il s'associe notamment à un épaississement de l'intima et de la media des vaisseaux diminuant leur calibre et à une muscularisation des artérioles (41). Les mécanismes impliqués sont encore peu définis mais ces variations semblent associées au VEGF et au TGF- β 1 (42). Certains auteurs ayant observé une augmentation d'expression de S100A4 au niveau des vaisseaux bronchiques dans la BPCO, molécule aux propriétés pro-fibrotiques, il est suggéré l'implication d'une transition endothélio-mésenchymateuse, mécanisme qui participerait également à la fibrose de la paroi bronchique (43,44). Dans une étude, les mastocytes, cellules comprenant des facteurs angiogéniques dans leurs granules, ont été retrouvés en densité plus importante dans la zone péri-vasculaire des petites voies aériennes, répartition qui n'était pas retrouvée au niveau du parenchyme pulmonaire, suggérant que ces cellules pourraient également être impliqués dans le remodelage vasculaire péri-bronchique ; mais cela reste à démontrer (45). Le remodelage vasculaire dans la BPCO reste donc un champ encore peu exploré avec un faible niveau de preuve malgré les nombreuses analyses qui pourraient être réalisées sur les coupes histologiques issues de patients BPCO dans le cadre d'autres études sur biopsies bronchiques.

2. Inflammation chronique dans la BPCO

La BPCO est associée à une inflammation chronique des voies aériennes et systémique (46,47). Cette inflammation est déclenchée par l'exposition répétée et chronique à la fumée de cigarette et/ou à des particules nocives. La fumée de cigarette est composée de plusieurs milliers de composants dont beaucoup sont toxiques voire cancérogènes (48). Les mécanismes impliqués dans la genèse de l'inflammation bronchique lors de l'exposition à la fumée de cigarette sont par conséquent multiples et probablement pour beaucoup encore méconnus.

2.1. Activation de la réponse inflammatoire par la fumée de cigarette

Au niveau des cellules épithéliales, la fumée de cigarette induit la production de cytokines inflammatoires par des mécanismes multiples. Tout d'abord, l'exposition directe des cellules épithéliales bronchiques à la fumée de cigarette induit la sécrétion d'IL-1 β et de CXCL8 via l'activation de l'inflammasome et des récepteurs toll-like (TLR) 4 et 9 (49,50). Le stress oxydant associé à cette exposition induit également la sécrétion de CXCL8 via l'activation successive de la NADPH oxydase, de l'AMP-activated protein kinase (AMPK), de la voie des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPKs), du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) et finalement du signal de

transduction et activateur de la transcription 3 (STAT3), une réaction en chaîne significativement inhibée par différents antioxydants (51,52). Enfin, un autre mécanisme directement impliqué est l'augmentation de la stabilité de l'ARN messager du CXCL8 par la fumée de cigarette et l'un de ses composants, l'acroléine, via la voie p38 MAPKs (53).

Tableau 1 : Détection des composants de la fumée de cigarette et des signaux de danger (DAMPS) par les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires et les autres récepteurs de l'immunité innée d'après (54).

	Récepteurs (cellulaire [soluble])
Composants de la fumée de cigarette	
Endotoxine (LPS)	TLR-4, CD14 [protéine de fixation du LPS]
Nicotine	nAChR, TRPA1
Espèces réactives de l'oxygène, radicaux libres	NLRP3
Acroléine	TRPA1
Hydrocarbure aromatique polycyclique	AhR
DAMPS libérés par les cellules stressées, apoptotiques et nécrotiques	
ATP	P2XR, P2YR
Acide urique	NLRP3
HMGB1	TLR-2, TLR-4, TLR-9, RAGE, CD24
Molécules S100	TLR-9, RAGE
Protéines de choc thermique	TLR-2, TLR-4, CD91, CD24, CD14, CD40
β -défensines	TLR-4, CCR6
Interleukine-1 α	Interleukine-1R
ADN (mitochondrial)	TLR-9
Peptides formiques	FPR1
DAMPS libérés par la rupture de la matrice extracellulaire	
Acide hyaluronique	TLR-2, TLR-4, CD44
Fibronectine	TLR-4, intégrine $\alpha_5\beta_1$, intégrine $\alpha_v\beta_3$
Héparane sulfate	TLR-4
Versican	TLR-2
Biglycan	TLR-2, TLR-4, P2XR
N-acétyl-proline-glycine-proline	CXCR1, CXCR2

LPS : lipopolysaccharide TLR : récepteur de type toll, CD : cluster de différenciation, nAChR : récepteur nicotinique de l'acétylcholine, TRPA1 : canal du potentiel récepteur transitoire A1, AhR : récepteur de l'aryl-hydrocarbure, ATP : adénosine triphosphate, P2XR : récepteur purinergique P2XR, P2YR : récepteur purinergique P2YR, NLRP3 : famille de récepteur de type NOD contenant le domaine pyrin 3, HMGB1 : high mobility group box 1, RAGE : récepteur des produits de fin de glycation des protéines, CCR6 : récepteur de chimiokine de type CC 6, ADN : acide désoxyribonucléique, FPR1 : récepteur des peptides formiques 1, CXCR : récepteur de chimiokine de type C-X-C.

Cette exposition s'accompagne également d'une perte de l'intégrité épithéliale par interruption des jonctions cellulaires associées aux molécules ZO-1 et occludines dépendamment de la voie de l'EGFR rendant la barrière épithéliale plus perméable et pouvant potentiellement permettre aux agents agresseurs présents dans les voies aériennes d'activer d'autres cellules sous-épithéliales (55,56). De plus, les cellules épithéliales sont activées indirectement par les signaux de dangers (damage-associated molecular patterns ou DAMPs) générés par l'exposition de leur environnement proche à la fumée de cigarette (**Tableau 1**). Cette exposition induit notamment la nécrose des polynucléaires neutrophiles qui sécrètent alors des DAMPs comme de l'HMGB1 (high mobility group box 1), de l'ADN double brin et de l'ADN mitochondrial, capables d'induire la production de CXCL8 par les cellules épithéliales bronchiques amplifiant la réponse inflammatoire (57). Enfin, la production de cytokines inflammatoires sera d'autant plus importante que la fumée de cigarette inhibe différents systèmes de contrôle. Ainsi, le peroxydase-activated receptor-gamma (PPAR γ) qui réprime l'inflammation dépendante du TLR-4, a son expression diminuée par l'exposition à la fumée de cigarette (58). De même, l'expression de l'enzyme CYP2C8 impliquée dans la production des acides époxyeicosatriénoïques aux propriétés anti-inflammatoires est diminuée (52).

Le nombre des macrophages alvéolaires est augmenté dans les poumons des patients atteints de BPCO (59). Ces cellules jouent un rôle majeur dans la production de facteurs chimiotactiques dans la BPCO, fonction exacerbée après exposition à la fumée de cigarette (60). A l'instar des cellules épithéliales bronchiques, l'exposition de ces macrophages alvéolaires à la fumée de cigarette augmente la stabilité de l'ARN messager de CXCL8 et induit une augmentation de sécrétion de cette cytokine (53,61). Cette production de CXCL8 est associée à une augmentation de la production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène et d'une diminution des taux de glutathion (62). Cet effet est dépendant de la voie p38 MAPKs qui est fortement activée dans la BPCO et est inhibé par l'adjonction d'un antioxydant puissant, la N-acétyl cystéine. Ces données démontrent encore une fois l'importance de la balance oxydants-antioxydants dans les effets de la fumée de cigarette sur les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages alvéolaires (63,64).

Par conséquent, certains des composants de la fumée de cigarette repris dans le **Tableau 1** peuvent activer directement les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) dont font partie les TLR et autres récepteurs de l'immunité innée dont l'inflammasome pour induire la

production de cytokines inflammatoires comme le CXCL8 (54). Ces récepteurs pourront également être indirectement activés par l'augmentation des DAMPs endogènes produits en réponse à l'agression pulmonaire par la fumée de cigarette. A l'activation de ces récepteurs s'ajoute l'augmentation du stress oxydant et l'inhibition de différents mécanismes régulateurs de l'inflammation confirmant le puissant rôle pro-inflammatoire de la fumée de cigarette. Cette réaction inflammatoire semble pouvoir être facilement résolutive initialement, cependant la répétition de l'exposition conduit à une réaction chronique qui devient pérenne et délétère pour le poumon. Ces mécanismes multiples conduisant à la production chronique de cytokines inflammatoires expliquent probablement pourquoi les traitements anti-inflammatoires actuels sont inefficaces pour résoudre définitivement cette inflammation. Par conséquent, le traitement le plus efficace pour améliorer l'inflammation et les symptômes cliniques qui y sont associés comme la bronchite chronique reste l'obtention d'un sevrage tabagique complet et définitif.

2.2. Réponse inflammatoire innée

2.2.1. Les macrophages

Les macrophages sont fortement impliqués dans la BPCO et sont les chefs d'orchestre de la réponse inflammatoire (46). Ils sont quantitativement augmentés dans tous les compartiments pulmonaires et leur nombre dans les voies aériennes est corrélé à la sévérité de la BPCO (20,59). Ces macrophages présentent des particularités les distinguant des macrophages isolés chez les sujets sains fumeurs ou non avec une diminution d'expression de certains de leurs récepteurs comme CD14, CD16, CD40, CD163 ou encore CD206, et une augmentation de sécrétion de MMP-9 et de GM-CSF (65,66). L'augmentation de sécrétion de ces deux molécules est inhibée par les corticostéroïdes mais ce traitement n'a pas d'effet sur la sécrétion du CXCL8 ni sur l'activité de la MMP-9 expliquant en partie la corticorésistance observée au niveau clinique dans la BPCO (66,67). Les macrophages sont également une source importante de MMP-12, protéase impliquée tant dans les mécanismes conduisant à l'inflammation neutrophilique qu'au développement d'un emphysème et au remodelage des voies aériennes (68).

Cette hypersécrétion de molécules pro-inflammatoires et de protéases est associée à une altération de leur capacité à phagocyter des germes comme *Haemophilus influenzae* ou *Streptococcus pneumoniae*, deux germes fréquemment associés aux exacerbations de la BPCO, alors qu'ils conservent leur capacité à endocyter des billes de latex (69,70). Les mécanismes de

ce défaut spécifique de phagocytose évoqués sont multiples. Certains récepteurs impliqués dans l'endocytose comme CD31, CD44, CD71 et CD91 ont une expression diminuée sur les macrophages de patients atteints de BPCO en lien avec la poursuite du tabagisme (71). La contamination fréquente par des virus respiratoires peut être évoquée, les rhinovirus ayant la capacité d'inhiber la phagocytose des bactéries par les macrophages alvéolaires (72). Enfin, cette altération pourrait aussi être liée à une altération de la balance oxydant-antioxydant. En effet, une diminution de l'expression de Nrf2, un facteur de transcription impliqué dans la réponse antioxydante et contrôlant l'activation de NF- κ B, est observé chez les patients BPCO fumeurs (73). Or la restauration de l'activité de ce facteur de transcription dans des macrophages alvéolaires de sujets BPCO améliore la phagocytose des bactéries *Haemophilus influenzae* et *Pseudomonas aeruginosa* (74). Pour finir, ces macrophages alvéolaires présentent aussi une capacité altérée à phagocyter les cellules épithéliales bronchiques apoptotiques démontrant une altération de certains mécanismes de la clairance (75).

Toutes ces altérations participent d'une part à l'initiation comme à l'entretien de l'inflammation chronique et d'autre part, au remodelage bronchique et la destruction du parenchyme pulmonaire conduisant à l'emphysème via la production de protéases (76). Ces altérations favorisent aussi les colonisations et infections bactériennes et peut-être aussi par d'autres pathogènes comme les champignons. Sur un plan thérapeutique, si les corticostéroïdes sont peu efficaces sur ces effets négatifs, il a été montré une amélioration de la phagocytose bactérienne par les macrophages lors d'un traitement par un macrolide, l'azithromycine, pouvant expliquer en partie les bénéfices de ce traitement chez les patients atteints de BPCO et présentant des exacerbations fréquentes (66,77,78).

2.2.2. Les polynucléaires neutrophiles

L'inflammation associée à la BPCO est marquée par la présence importante des polynucléaires neutrophiles (79). Cette accumulation est liée à l'augmentation de production de CXCL8 qui induit le recrutement des polynucléaires neutrophiles via l'activation de leurs récepteurs CXCR1 et CXCR2 (80). L'importance de cette voie a été confirmée dans un modèle murin par l'utilisation d'un antagoniste du CXCR2 qui y inhibe le recrutement des polynucléaires neutrophiles dans le poumon après exposition à la fumée de cigarette (81). Dans la BPCO, la migration des polynucléaires neutrophiles est altérée et ce malgré une expression comparable des

récepteurs CXCR1 et CXCR2 (82). Ils se déplacent de fait plus rapidement mais avec une précision moindre dans leur migration responsable d'un trajet plus long. Il est ainsi suggéré que ces cellules produisant des métalloprotéases comme la MMP-9, protéase impliquée dans le développement de l'emphysème, et présentant l'élastase neutrophilique et des cathepsines à leur surface, peuvent par là même engendrer plus de lésions collatérales liées à ces trajets erratiques (68,83). De plus, dans les petites voies aériennes, leur nombre est corrélé au remodelage épithélial et à l'obstruction bronchique (84). Leur rôle dans la BPCO semble donc essentiellement délétère probablement du fait de la chronicité de la réaction. En effet, leur participation à la sévérité de l'obstruction bronchique et de l'emphysème n'est pas contrebalancée par une amélioration de la clairance bactérienne (85). Les polynucléaires neutrophiles sont donc autant des marqueurs que des acteurs de la sévérité de la BPCO.

2.2.3. Les cellules lymphoïdes innées

Longtemps ignorées, les cellules lymphoïdes innées sont impliquées dans la physiopathologie de la BPCO.

Chez l'homme, il est observé une augmentation de la fréquence des cellules tueuses naturelles (NK) et NKT activées circulantes avec une corrélation négative entre la fréquence des cellules NK CD158b⁺ et la fonction respiratoire (86,87). Ces cellules sont également retrouvées dans les expectorations avec toujours un lien avec le stade de la maladie (88). De plus, chez la souris, le développement secondaire à l'exposition chronique à la fumée de cigarette d'un phénotype proche de la BPCO, est dépendant des cellules NKT innées apportant un argument pour un rôle de ces cellules dans la physiopathologie de la BPCO (86).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont une autre population de cellules lymphoïdes innées jouant un rôle important tant dans la réponse innée immédiate que dans la modulation de la réponse adaptative (89). Elles sont notamment impliquées dans la réponse aux infections et la réponse anti-tumorale et sont une source importante d'IL-17 (90,91). Chez la souris, il a été montré que ces cellules sont essentielles dans la réponse immune à *Streptococcus pneumoniae* (92). De plus, elles sont impliquées dans le développement des follicules lymphoïdes secondaires formant le tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT) (93). Ces caractéristiques qui recouvrent des points névralgiques de la physiopathologie de la BPCO et de ses exacerbations les désignent comme des

cellules potentiellement cruciales dans la BPCO malgré le peu d'études réalisées à ce jour sur leur rôle dans cette maladie.

Les lymphocytes innés (ILC) représentent une population rare de cellules présente notamment au niveau des muqueuses et répondant très rapidement à tout signal de danger (94). Par analogie avec l'immunité adaptative, on les classe en trois groupes (**Figure 1**) :

- les ILC de type 1 (ILC1) qui expriment le facteur de transcription T-bet et sécrètent notamment de l'IFN- γ en réponse à l'IL-12,
- les ILC de type 2 (ILC2) qui expriment GATA3 et sécrètent notamment de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 en réponse à l'IL-25 et l'IL-33,
- les ILC de type 3 (ILC3) qui expriment ROR- γ t et sécrètent de l'IL-17A et de l'IL-22 en réponse à l'IL-23 et l'IL-1 β . Ce dernier groupe est divisé en deux en fonction de l'expression ou non du récepteur NCR.

Cette différenciation n'est pas figée puisqu'en fonction du contexte cytokinique, une ILC peut changer de phénotype et passer par exemple d'un phénotype ILC2 à un phénotype ILC1 (95). Ces trois groupes sont retrouvés dans les poumons de sujets sains (96).

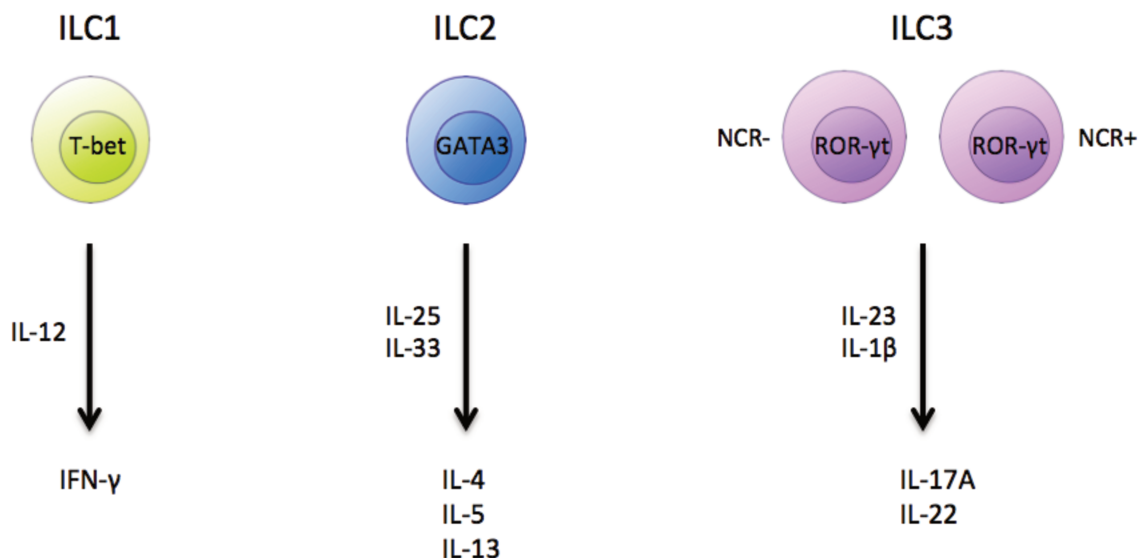


Figure 1 : Principales caractéristiques des 3 groupes de lymphocytes innés d'après (94). ILC : lymphocytes innés, NCR : récepteur cytotoxique naturel, IL : interleukine, IFN : interféron.

Peu de données existent encore dans la BPCO, mais une petite étude a montré que contrairement aux sujets sains où les ILC prédominantes étaient les ILC2 et les ILC3 n'exprimant pas le NCR (NCR⁻), les patients BPCO présentaient une proportion plus importante d'ILC du sous-groupe ILC3 NCR⁻ (96). Ceci était associé à une tendance à une augmentation de sécrétion des cytokines IL-17A et IL-22. Une autre étude a également montré une diminution de la fréquence des ILC2 dans la BPCO avec une augmentation de la fréquence des ILC1 liée à une surexpression de l'IL-1 β (97). Enfin, alors que l'IL-33 active normalement les ILC2 chez les sujets sains par le récepteur ST2, l'exposition à la fumée de cigarette est responsable d'une inhibition de l'expression de ce récepteur sur ces ILC2 et d'une induction de son expression sur les macrophages et les cellules NK (97,98). Ces données encore peu nombreuses suggèrent donc une altération de la fonction des ILC dans la BPCO participant à une inflammation chronique de type Th1 et Th17 dans la maladie. De plus, les ILC1 et les ILC3 étant impliqués dans la réponse anti-infectieuse, il est vraisemblable que ces altérations participent à une altération de cette réponse au cours de la BPCO.

2.3. Cellules présentatrices d'antigènes pulmonaires et BPCO

La dénomination cellule présentatrice d'antigène recouvre toutes les cellules capables d'internaliser un antigène et de l'apprêter pour ensuite le présenter par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH) aux lymphocytes conventionnels afin de les activer. Dans le poumon, il a été montré depuis de nombreuses années que ces cellules présentatrices d'antigène sont composées des cellules dendritiques, des macrophages, des monocytes et des lymphocytes B (99). Ce chapitre se concentrera principalement sur la description et le rôle des cellules dendritiques (DC) qui ont été le plus étudiées et qui ont la spécificité de pouvoir induire l'activation et la différenciation de lymphocytes naïfs.

2.3.1. Les cellules présentatrices d'antigène du poumon

Chez la souris, au moins 4 sous-types de DCs ont été décrits dans les poumons, divisées en DC conventionnelles (cDC) lorsqu'elles expriment fortement le CD11c et en DC plasmacytoïdes (pDC) lorsqu'elles expriment faiblement le CD11c (100). Les principaux marqueurs permettant de les différencier sont résumés dans le **Tableau 2**.

A l'état stable, la population de cDC est divisée en deux sous-populations. La première est située dans l'épithélium bronchique et forme un réseau de DC CD11b⁻ projetant des extensions cellulaires entre les cellules épithéliales et réalisant un échantillonnage régulier des antigènes qui sont présents dans la lumière des voies aériennes. La deuxième est située dans la lamina propria et exprime fortement CD11b. La paroi des voies aériennes comprend également des pDC. Ces trois populations décrites dans les voies aériennes sont également retrouvées dans les parois alvéolaires.

Tableau 2 : Marqueurs des cellules présentatrices d'antigène pulmonaires chez la souris d'après (100).

	Etat stable				Inflammation
	cDC CD11b+	cDC CD11b-	pDC	Macro	iDC
CD11c	fort	fort	faible	fort	+
CD11b	+	-	-	-	+
Sirp1 α	intermédiaire	-	-	-	+
CX3CR1	fort	-	-	-	-
CD103	-	+	-	-	-
CD207	-	+	-	-	-
XCR1	-	fort	-	-	-
Siglec-H	-	-	+	-	-
PDCA1	-	-	+	-	+/-
Siglec-F	-	-	-	+	-
F4/80	-	-	-	+	-
CD2	-	-	-	+	-
Ly6c	-	-	-	-	+
CD14	-	-	-	-	+

Marqueurs exprimés sur les cellules dendritiques (DC) et les macrophages alvéolaires de souris permettant de distinguer les 2 sous-populations de DC conventionnelles (cDC) des DC plasmacytoïdes (pDC), des DC inflammatoires (iDC) et des macrophages alvéolaires (Macro). CD : cluster de différenciation, Sirp1 α : signal regulatory protein α , CX3CR1 : récepteur de la fractalkine, XCR1 : récepteur de chimiokines de type C, Siglec : lectine de type immunoglobuline fixant l'acide sialique, PDCA1 : antigène 1 des pDC, F4/80 : EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1, Ly6c : lymphocyte antigen 6 complex locus c.

Dans un contexte inflammatoire, une nouvelle population de DC dérivées des monocytes apparaît aussi appelées DC inflammatoires (iDC). Ces iDC expriment CD11b, CD11c et Sirp1 α pouvant amener à les confondre avec les cDC résidentes CD11b⁺. Elles expriment également des marqueurs de la lignée monocyttaire Ly6c et CD14 mais qui peuvent être perdus rapidement lorsque ces cellules sont dans le tissu pulmonaire, et la chaîne α du récepteur de haute affinité aux

IgE (FcεRI). L'analyse des prélèvements, notamment des LBA, est compliquée par la présence des macrophages alvéolaires qui expriment également CD11c mais pas CD11b et dont l'autofluorescence peut parfois amener à les confondre en cytométrie en flux avec les cDC CD11b⁻ et CD103⁺.

Chez l'homme, la description des différentes populations de cellules phagocytaires mononuclées pulmonaires du sujet sain a longtemps été perturbée par les populations sanguines contaminant les prélèvements. Une étude récente a permis de faire la part entre les populations tissulaires et les populations circulantes permettant de définir 5 populations de cellules phagocytaires mononuclées tissulaires et 3 sanguines dont les marqueurs sont repris dans le **Tableau 3** (101). Cette étude montrait notamment que les DC pulmonaires et les cellules dérivées des monocytes CD1a⁺ exprimaient plus CD207 (la langerin), les molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 et le récepteur aux chimiokines CCR7 permettant la migration vers les ganglions lymphatiques. Dans ces ganglions, 2 populations de cellules phagocytaires étaient décrites :

- une première ressemblant aux DC pulmonaires caractérisée par le phénotype suivant : HLA-DR^{fort} CD1c⁺ CD1a⁺ CD14⁻ et CD206⁻,
- une deuxième ressemblant aux monocytes / macrophages pulmonaires caractérisée par le phénotype suivant : CD14⁺ CD141⁺ CD206⁺ CD64⁺ CD1c⁻.

CCR7 était fortement exprimé sur la première population de cellules ressemblant aux DC pulmonaires suggérant qu'il s'agissait de cette population qui avait migré.

Une autre étude systématique chez des sujets sains ayant bénéficié d'un prélèvement de sang périphérique et d'une fibroscopie bronchique avec réalisation d'un lavage broncho-alvéolaire et de biopsies bronchiques a montré que la répartition des différents types de DC varie selon le compartiment analysé (102). Ainsi, la muqueuse comprend des monocytes et des DC myéloïdes définies comme les DC exprimant CD1c⁺ ou CD141⁺ et des pDC, phénotype particulier de DC exprimant CD123⁺. La densité de ces cellules phagocytaires mononuclées augmentait progressivement des voies aériennes proximales aux voies aériennes distales.

Tableau 3 : Marqueurs des cellules présentatrices d'antigène pulmonaires chez l'homme sain d'après (101).

	Extravasculaire					Sanguine		
	DC pulm	CD1a+ monoDC	CD1a- monoDC	Mono tissu	Macro Alv	CD141+ DC	CD1c+ DC	CD14+ Mono
CD206	-	+	+	+	+	-	-	-
CD14	-	faible	+	+	faible	-	-	+
CD16	-	-	-	+ / ++	-	-	-	- / + / ++
CD11b	-	faible	+	+	+	-	-	+
CD141	-	-	-	+	+	+	-	-
CD1c	+	+	+	-	-	-	+	-
CD1a	+	+	-	-	-	-	-	-
DEC205	-	-	-	-	-	+	-	-
Clec9a	-	-	-	-	-	+	-	-
CD64	-	-	-	+	+	-	-	+

Marqueurs des différentes populations de cellules phagocytaires mononucléées isolées dans le poumon de sujets sains permettant de distinguer d'une part les populations tissulaires incluant les DC pulmonaires (DC pulm), les cellules dérivées des monocytes (monoDC), les monocytes et les macrophages alvéolaires, et d'autre part, les populations issues de la circulation sanguine incluant les DC BDCA3⁺ (CD141+ DC), les DC BDCA1⁺ (CD1c+ DC) et les monocytes circulants.

2.3.2. Les cellules dendritiques dans la BPCO

Plusieurs études sur des pièces de poumons issues de résections pulmonaires obtenues lors d'exérèse suite à des cancers ont évalué la présence et la maturation des DC dans le cadre de la BPCO avec des résultats discordants. Une des premières études réalisées par Desmedts *et al.* a ainsi montré une augmentation du nombre de DC dans l'épithélium des petites voies aériennes, nombre qui augmentait avec la sévérité de la maladie (103). Cette accumulation a été retrouvée dans d'autres études et concerne surtout les DC myéloïdes (104–107). Elle s'explique par une augmentation d'expression du CCR6 par ces DC myéloïdes qui est le récepteur du CCL20, lui-même augmenté dans la BPCO et inversement corrélé au VEMS (103). De plus, cette accumulation serait accrue par la diminution d'expression du CCR7 sur ces DC limitant leur migration vers les ganglions lymphatiques (108,109). Une seule étude montrait une diminution du nombre des DC chez les patients associant tabagisme actif et BPCO mais contrairement aux autres, il s'agissait d'une étude sur biopsies bronchiques réalisées au cours d'une endoscopie suggérant que la localisation des DC pourrait être différente aux niveaux des grosses bronches (110).

En terme de maturation, la majorité des études mettent en évidence une diminution de la maturation des DC présentes dans les petites voies aériennes comme dans les bronches

proximales et le parenchyme alvéolaire, diminution de la maturation quantifiée par la diminution d'expression de CD83 (107,109,111,112). Ces DC expriment également plus fréquemment CD207 (la langerin), phénotype particulier décrit comme immature (105,107,108,112,113). Toutefois, deux études sur tissus pulmonaires issus de résection trouvent des résultats discordants. La première de Freeman *et al.* met en évidence une augmentation d'expression de CD83 sur les DC myéloïdes augmentant avec la sévérité de la maladie et une augmentation de la molécule de costimulation CD80 sur les DC myéloïdes et plasmacytoïdes (106). La deuxième de Vassallo *et al.* est plus nuancée puisqu'elle retrouve à la fois l'augmentation d'une population de DC exprimant de façon plus importante CD83 et une autre immature exprimant CD207 (108). Selon les données accessibles sur les différentes populations de ces études, ces différences ne semblent pas pouvoir être attribuée à des BPCO de sévérité différente. Cette interprétation est confortée par une étude expérimentale *in vitro* montrant que le sputum des patients atteints de BPCO de tous stades inhibe la maturation des DC induites par le LPS suggérant la présence de facteurs inhibiteurs à tous les stades de la maladie (114). Par contre, les informations sur la poursuite ou non du tabagisme des patients n'étant pas accessible, on ne peut exclure que certaines discordances soient plus liées aux effets du tabac sur la maturation des DC qu'à la BPCO elle-même. Ainsi, il a été montré dans plusieurs études que la fumée de cigarette inhibe la maturation des DC en réponse au LPS (115,116). De plus, aucune information n'est donnée sur la présence ou non d'une colonisation bactérienne qui pourrait impacter sur la maturation de ces DC (117). Enfin, les populations de toutes ces études n'étant pas très importantes, on ne peut exclure que ces discordances soient la conséquence d'un échantillonnage non représentatif.

Les connaissances actuelles sur les DC pulmonaires au cours de la BPCO reposent donc sur des preuves encore faibles qui doivent être étayées. Cependant, l'ensemble de ces données est en faveur de l'accumulation de DC immatures dans les petites voies aériennes des patients atteints de BPCO secondaire d'une part à un recrutement plus important de ces cellules par augmentation de leur expression du CCR6 et de la production de CCL20 pulmonaire, et d'autre part à la diminution de leur maturation et de leur migration vers les ganglions lymphatiques en lien avec leur expression diminuée de CCR7. Ces phénomènes semblent en partie liés à l'exposition à la fumée de cigarette.

2.3.3. Activation de la réponse immunitaire adaptative

Comme tous les monocytes et les macrophages, les DC présentent de très nombreux récepteurs leur permettant de reconnaître un grand nombre d'antigènes natifs ainsi que les antigènes opsonisés comme par exemple les antigènes qui ont été fixés par des immunoglobulines et seront internalisés par les DC grâce aux récepteurs aux fractions constantes des immunoglobulines (118–120). Elles ont également la particularité d'exprimer des molécules de jonction cellulaire comme l'occludine et les claudines leur permettant d'émettre des extensions entre les cellules épithéliales de l'épithélium bronchique pour prélever des antigènes dans le lumière de la bronche sans rompre la barrière épithéliale (121). Après avoir été endocyté, l'antigène va être apprêté, c'est-à-dire dégradé pour lui permettre de pouvoir être présenté par le CMH de classe II au lymphocytes $CD4^+$ ou de classe I aux lymphocytes $CD8^+$ (122). L'intégration de ce signal et des autres signaux de l'environnement induisent la maturation de la DC et sa migration vers les ganglions lymphatiques grâce à l'expression de CCR7. L'activation des lymphocytes T se fait via la création d'une synapse immunologique et la transmission de 3 signaux dont l'association est indispensable pour activer un lymphocyte naïf (**Figure 2**) (123). Le premier signal correspond à la présentation au lymphocyte de l'antigène apprêté dans le CMH. La présentation de ce peptide en l'absence des deux autres signaux entraîne une anergie du lymphocyte T. Le deuxième signal est transmis par les molécules de co-stimulation comme CD80 et CD86. En l'absence du troisième signal, les 2 premiers signaux induisent une prolifération clonale lymphocytaire, c'est-à-dire spécifique de l'antigène, mais sans différenciation et donc sans fonction effectrice. Enfin, le troisième signal correspond aux cytokines immuno-modulatrices qui interviennent dans la polarisation de la réponse du lymphocyte T, comme l'IL-12 qui induit une polarisation lymphocytaire Th1 ou encore les cytokines IL-1 β , IL-6, IL-23 et TGF- β qui induisent une polarisation Th17. Les DC jouent donc un rôle central dans l'activation de la réponse adaptative et de sa polarisation. De plus, elles peuvent également activer de façon différentielle les différentes populations de cellules lymphoïdes innées selon les cytokines qu'elles sécrètent (124). Ces cellules présentatrices d'antigènes sont donc vraisemblablement impliquées dans la polarisation de l'immunité vers des profils Th1 et Th17 observée dans la BPCO.

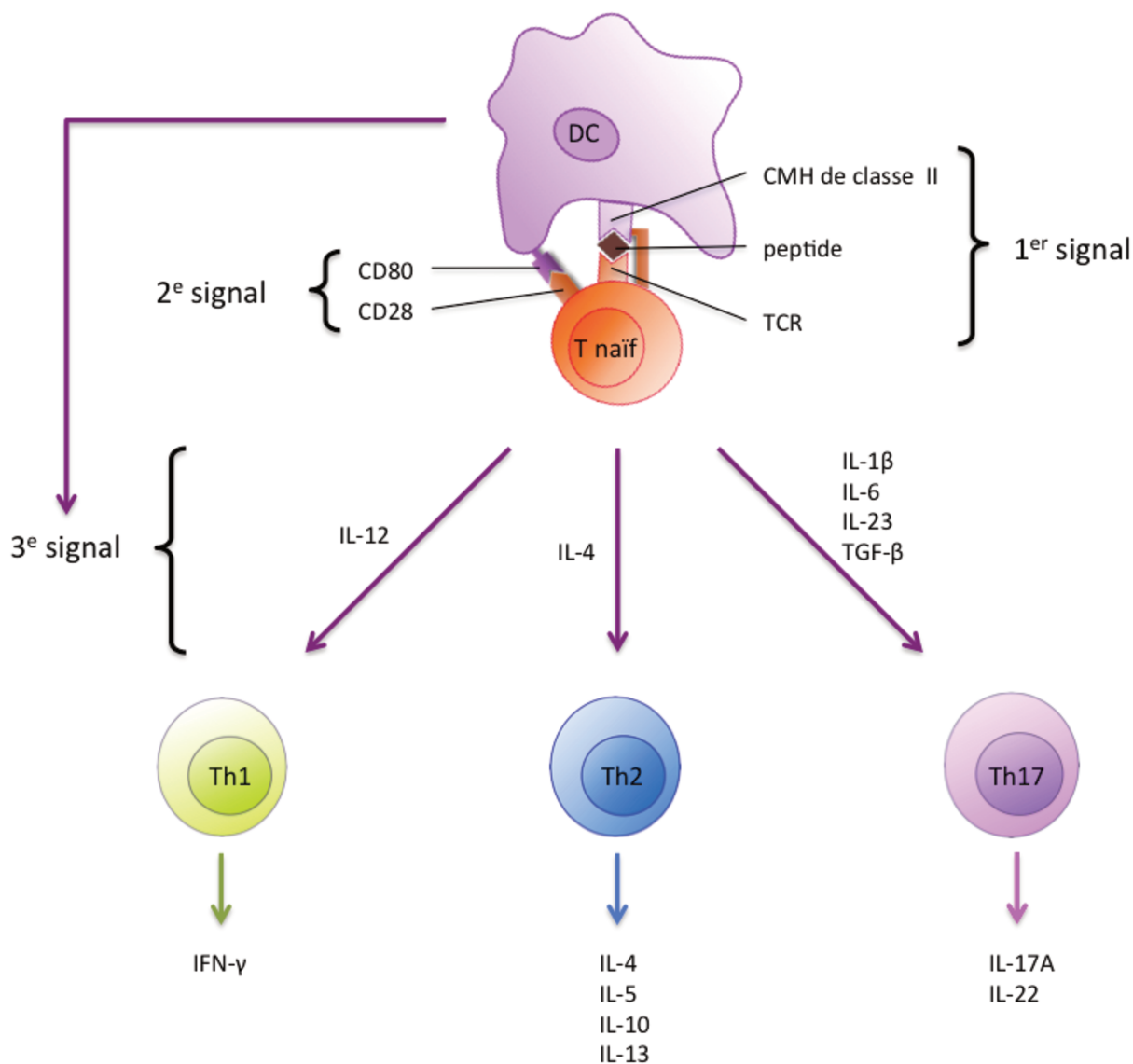


Figure 2 : Activation et polarisation de la réponse adaptative d'après (123,125). La cellule dendritique mature (DC) va activer le lymphocyte T naïf (T naïf) grâce à trois signaux : la présentation de l'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH de classe II pour les lymphocytes $CD4^+$ et de classe I pour les lymphocytes $CD8^+$), l'implication de molécules de costimulation comme CD80 et la production de cytokines immunomodulatrices qui vont orienter la polarisation des lymphocytes T. TCR : récepteur des lymphocytes T, CD : cluster de différenciation, IL : interleukine, TGF- β : facteur de croissance transformant bêta, IFN- γ : interféron gamma.

2.4. Réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative n'est pas indispensable au développement d'une inflammation chronique et d'un emphysème comme cela a été montré dans un modèle murin utilisant des souris *scid* ne présentant pas de système immunitaire adaptatif (126). Pour autant, ces lymphocytes T et B ont un rôle probablement amplificateur dans la physiopathologie de la BPCO (46).

2.4.1. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ sont retrouvés en nombre plus important dans la muqueuse bronchique quand la sévérité de la maladie augmente (20). Classiquement, la BPCO est associée à la présence de lymphocytes T CD8⁺ et de lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 (sécrétant notamment de l'IFN- γ) et Th17 (sécrétant notamment de l'IL-17A) (**Figure 2**) (46). Le nombre de lymphocytes T CD8⁺ pulmonaires est corrélé au déclin de la fonction respiratoire (127). Cette inflammation lymphocytaire n'est pas que pulmonaire puisque l'on retrouve également une augmentation de la fréquence des lymphocytes Th1 et Th17 dans le sang circulant des patients BPCO (128). La balance Th17 / lymphocytes T régulateurs est également déséquilibrée au profit des premiers au cours de la BPCO (129). Ce déséquilibre est négativement corrélé à la fonction respiratoire suggérant que tant l'inflammation Th17 que la perte de mécanismes régulateurs sont impliquées dans la progression de la maladie. Les lymphocytes T CD8⁺ sécrétant de l'IL-17 (Tc17) circulants sont également augmentés chez les patients BPCO et leur nombre est négativement corrélé au VEMS mesuré (130). Le rôle de ces cellules Th17 et Tc17 sera détaillé au chapitre 3 des résultats de cette thèse. Sur le plan physiopathologique, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques produisent des perforines et du granzyme B qui sont des enzymes très impliquées dans le développement de l'emphysème pulmonaire (131). Ce développement implique autant les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques de type Tc1 (sécrétant de l'IFN- γ) que Tc17 (132). De plus, le potentiel cytotoxique de ces cellules est également corrélé à la sévérité de la BPCO (133). Cela pourrait être en lien avec l'augmentation de l'expression des TLR sur les lymphocytes T CD8⁺ pulmonaires des patients BPCO en rapport avec la sévérité de la BPCO (134).

2.4.2. Les lymphocytes B

L'immunité adaptative humorale n'est pas en reste puisqu'il est observé dans la BPCO la présence de follicules secondaires dans la muqueuse des petites voies aériennes et que le nombre de lymphocytes B est corrélé à l'obstruction bronchique (135). La formation de ces follicules lymphoïdes dépend notamment des cytokines IL-17A et IL-17F qui jouent des rôles vraisemblablement différents, l'IL-17A étant retrouvé en périphérie des follicules et l'IL-17F en leur sein. Ces cytokines semblent en partie sécrétées par les lymphocytes T $\gamma\delta$ (93,136,137). La prolifération oligoclonale des lymphocytes B dans ces follicules évoque une prolifération antigène-spécifique dont la cible n'est pas clairement identifiée : antigène bactérien, composant de la fumée de cigarette ou encore auto-antigène, notamment un produit de dégradation de la matrice extracellulaire ou de cellules apoptotiques (138). Dans la BPCO, ces lymphocytes B sont protégés de l'apoptose induite par la fumée de cigarette par l'augmentation d'expression du facteur d'activation des lymphocytes B (BAFF) (139). Comme ces cellules sécrètent des anticorps et peuvent agir comme cellules présentatrices d'antigène, il a été suggéré qu'elles pouvaient être impliquées dans le développement d'une certaine auto-immunité dans la maladie (140).

2.4.3. L'auto-immunité dans la BPCO

De fait, des mécanismes auto-immuns impliquant les lymphocytes T et B ont été décrits dans la BPCO (140). Ainsi dans un modèle expérimental, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'un néo-antigène alvéolaire conduit à la destruction du parenchyme pulmonaire démontrant la capacité de ces lymphocytes T cytotoxiques à induire une réponse inflammatoire suffisante pour léser le poumon (141). Une étude plus convaincante montre la présence fréquente d'auto-anticorps de type IgG à haute affinité dirigés contre les cellules épithéliales pulmonaires dans le sang circulant de patients BPCO (142). *In vitro*, la mise en contact du plasma de ces patients avec des cultures de cellules épithéliales pulmonaires augmente la toxicité cellulaire de 46%. D'autres auto-anticorps ciblant les cellules endothéliales, les pneumocytes de types II ou encore l'élastine ont été décrits dans la BPCO avec une prévalence d'auto-anticorps retrouvée dans une étude de 68% chez les patients contre moins de 15% pour les sujets contrôles fumeurs ou non, appuyant cette hypothèse d'une auto-immunité dans la maladie (140,142).

L'inflammation chronique au cours de la BPCO met donc en jeu l'ensemble des différents acteurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative. Son activation est principalement liée à l'exposition au tabagisme qui agit via de nombreuses voies différentes mais nous verrons qu'elle sera également modulée par la flore microbienne des voies aériennes.

3. Microbiome pulmonaire et colonisation bronchique dans la BPCO

3.1. Techniques d'étude du microbiome

Le microbiome est défini comme l'ensemble des communautés écologiques d'organismes commensaux, symbiotiques ou pathogènes qui vivent au sein de notre organisme. Ce nouveau champs d'étude a pris son essor il y a quelques années lorsque les nouvelles techniques d'analyse moléculaire indépendantes des milieux de culture ont mis en évidence la présence d'organismes dans les voies aériennes antérieurement considérées comme stériles et leur grande diversité (143). En effet, l'on estime que 70% des bactéries associées aux muqueuses de l'organisme ne peuvent pas croître dans les milieux de cultures et que la majorité des 20-30% restant sont difficiles à cultiver (144). Par conséquent, les techniques de séquençage de l'ADN ribosomal bactérien 16S permettent de détecter plus de phyla et de genres bactériens que les techniques de cultures standards (145). Si l'on prend l'exemple de l'étude du microbiome dans le sputum, la comparaison avec des cultures standard montre que seul le genre *Enterobacteriaceae* est plus fréquemment détecté par les cultures que par séquençage génomique. Le séquençage détecte ainsi mieux les genres *Haemophilus* et *Moraxella* qui ont un impact clinique démontré au niveau respiratoire, les genres difficiles à faire croître sur milieu de cultures comme les genres *Treponema*, *Mycoplasma*, *Eikenella*, *Kingella* ou *Capnocytophaga*, les genres de bactéries à développement anaérobies qui peuvent être sous-diagnostiqués lorsque seules des cultures en milieu aérobie sont réalisées comme *Veillonella*, *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Pascardovia* et *Bulleidia*, et les genres *Actinomyces* et *Rothia*. On estime par ces techniques qu'il y a ainsi entre 10 à 100 bactéries pour 1000 cellules de l'hôte dans le poumon (146).

La comparaison des résultats des études du microbiome pulmonaire n'est pas évidente puisque les analyses sont faites sur des types de prélèvements différents (sputum, brossage bronchique, lavage broncho-alvéolaire, biopsies pulmonaires), ce qui pourrait modifier les résultats. Ainsi,

lorsque l'on compare le lavage broncho-alvéolaire (LBA) au brossage bronchique protégé, tout deux réalisés en intra-pulmonaire, les résultats sont discordants avec pour certains une plus grande diversité de communautés bactériennes avec le brossage bronchique et pour d'autres aucune différence significative (147,148). Par contre, il semble que l'analyse des sputum et des aspirations bronchique donnent de manière prévisible des résultats moins représentatifs des voies aériennes distales (149). De plus, la répartition des bactéries dans un même poumon n'est pas toujours homogène pouvant induire des résultats différents selon la zone prélevée (150). Ainsi, l'analyse d'explants de poumon issus de patient atteints de BPCO très sévère ayant bénéficié d'une transplantation pulmonaire a montré une hétérogénéité de la répartition des espèces au sein d'un même poumon avec notamment dans un même poumon la prédominance dans une bronche d'*Haemophilus*, dans une autre de *Sténotropomonas* et dans la majorité des autres de *Pseudomonas*. De plus, il existe au sein des voies aériennes, d'une part un gradient depuis le microbiote oro-pharyngé jusqu'au poumon profond où la densité va décroissante, et d'autre part, une évolution progressive de sa composition. Dans les études, la variabilité inter-individu peut être importante suggérant que pour que les résultats soient interprétables et extrapolables, il faut d'abord réaliser un phénotypage précis des patients afin de faire des liens entre les variations observées et d'éventuelles caractéristiques comme la présence d'une bronchite chronique, d'un tabagisme actif et/ou d'exacerbations fréquentes (150).

3.2. Microbiome pulmonaire du sujet sain

3.2.1. Description du microbiome pulmonaire du sujet sain

La première description du microbiome des voies aériennes basses chez le sujet sain utilisant des techniques de séquençage génique a démontré le caractère non stérile des voies aériennes et permis d'identifier la prédominance des germes du phylum Bacterioidetes dont *Prevotella spp.* et des Firmicutes ainsi que dans une moindre mesure des Proteobacteria (151).

Charlson *et al.* ont suggéré que le microbiome pulmonaire du sujet sain n'était que la résultante de l'inhalation du microbiome oro-pharyngé (152). Dickson *et al.* ont apporté des éléments en faveur de cette hypothèse en montrant des similitudes entre le microbiome du poumon profond et celui des voies aériennes supérieures avec une décroissance de la diversité proportionnelle à la distance à ces mêmes voies aériennes supérieures (148). La contribution ORL dans la constitution du microbiome pulmonaire par un mécanisme de micro-inhalation n'est

aujourd'hui plus discutée. Pour autant, Morris *et al.* ont montré que certains genres comme *Haemophilus*, *Enterobacteriaceae* et *Methylobacterium* sont en quantité bien plus importante dans les poumons que dans la bouche (153). De plus, le microbiome pulmonaire est différent du microbiome nasal qui se distingue d'une part par une proportion moindre des genres *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium* et *Neisseria*, et d'autre part par une proportion plus importante des genres *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* (154). Le microbiome pulmonaire présente donc bien des spécificités par rapport au microbiome des voies aériennes supérieures.

Chez les sujets sains, les genres les plus fréquemment retrouvés d'un individu à l'autre au niveau du microbiome pulmonaire sont comparables sur un plan qualitatif avec *Streptococcus* (Firmicute), *Prevotella* (Bacteroidetes) et *Veillonella* (Firmicute). Cependant, les proportions des différents phyla sont très variables d'un sujet à un autre (150). Il semblerait que la diversité des communautés bactériennes soit une caractéristique essentielle du microbiome des sujets sains, les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques présentant une diminution de cette diversité (155).

3.2.2. Microbiome et immunité de l'hôte

Le développement du microbiome dans la prime enfance est un événement déterminant pour le système immunitaire. En effet, les souris élevées dans des conditions stériles strictes ne développent pas d'organes lymphoïdes secondaires et n'ont pas de cellules lymphoïdes démontrant l'importance du microbiome dans le développement du système immunitaire (156). Chez la souris, le microbiome se met en place durant les deux premières semaines de vie (157). Cet événement est associé à un changement qualitatif avec initialement une prédominance des Gammaproteobacteria et Firmicutes qui évolue vers une prédominance des Bacteroidetes. La voie du ligand 1 du programme de mort cellulaire (PD-L1) est alors activée permettant d'une part, une transition d'une immunité orientée Th2 qui favorise le développement d'une maladie allergique vers une immunité mieux contrôlée avec prolifération de lymphocytes T régulateurs et d'autre part, l'induction d'une tolérance aux aéro-allergènes.

Chez l'homme, le suivi du microbiome des voies aériennes supérieures de nourrissons jusque l'âge de 2 ans a montré l'installation précoce du microbiome et identifié des patterns associés à la stabilité du microbiome et la survenue d'infections respiratoires (158). Ainsi, la colonisation

précoce par les genres *Moraxella*, *Corynebacterium* et *Dolosigranulum* était associée à une stabilité du microbiome et à une fréquence moindre d'infection respiratoire haute. Inversement, la colonisation par les genres *Haemophilus* et *Streptococcus* était associée à une instabilité du microbiome et la survenue d'infections respiratoires hautes. Ces résultats sont concordants avec une autre étude montrant une diminution du risque de développer des otites moyennes aiguës chez les enfants colonisés par *Corynebacterium* et *Dolosigranulum*, deux germes corrélés à une nutrition par allaitement maternel (159). Dans un autre modèle murin, il a également été suggéré que le microbiome pulmonaire participait au maintien d'une activité anti-tumorale dépendante des lymphocytes T $\gamma\delta$ produisant de l'IL-17 (160). Toutes ces données montrent l'importance du microbiome et de l'équilibre des espèces qui le composent dans le développement et le maintien de l'homéostasie du système immunitaire inné et adaptatif.

3.2.3. Mycobiome et virome pulmonaire

Très peu d'études et toutes avec un faible nombre de sujets se sont intéressées à ce sujet. Concernant le mycobiome pulmonaire, une étude a mis en évidence des modifications qualitatives significatives du mycobiome pulmonaire chez les sujets asthmatiques par rapport à des sujets contrôles non-atopiques (161). Les espèces les plus fréquemment retrouvées chez les sujets sains étaient *Eremothecium sincaudum*, *Systemostrema alba*, *Cladosporium cladosporioides* et *Vanderwaltozyma polyspora*. Dans une étude réalisée chez un petit nombre de patients atteints de mucoviscidose, Delhaes *et al.* montraient des proportions de populations fongiques encore différente des deux groupes précités suggérant qu'il existe une modulation du mycobiome dépendante de la pathologie sous-jacente (155).

Sur le plan du virome pulmonaire, les données sont quasi inexistantes vraisemblablement pour des raisons techniques. Dans une étude basée sur un faible nombre de sujets, Young *et al.* ont comparé des prélèvements issus de patients transplantés pulmonaires à des sujets infectés par le VIH et des sujets sains (162). Malheureusement, l'analyse métagénomique du virome n'a pas été réalisée chez les sujets sains. Chez les patients transplantés, les résultats montrent une fréquence plus importante d'*Anelloviruses*, *Papilloma viruses* et *Herpes viruses*, abondance associée à une dysbiose bactérienne suggérant des interactions possibles entre microbiome et virome. Dans cette étude, l'analyse par PCR quantitative retrouve des taux détectables d'ADN d'*Anelloviruses* chez

les sujets sains apportant un argument en faveur de la présence de virus dans les bronches de sujets sains.

Le mycobiome et le virome pulmonaires nécessitent donc d'être mieux caractérisés avant de pouvoir évaluer leur impact sur le système immunitaire et leurs interactions avec le microbiome des voies aériennes.

3.3. Microbiome pulmonaire du patient atteint de BPCO

3.3.1. Description du microbiome pulmonaire dans la BPCO

Contrairement au sujet sain, les études antérieures utilisant les techniques standard de cultures bactériennes avaient démontré que les voies aériennes des patients atteints de BPCO ne sont pas stériles (163). Dans une étude basée sur des LBA avec un faible nombre de sujets, Erb-Downward *et al.* n'ont pas observé de modification de la charge bactérienne des voies aériennes au cours de la BPCO par rapport aux sujets sains et aux fumeurs sans BPCO mais ils notaient une perte de la diversité corrélée à la sévérité de la maladie (150). Ce dernier point reste discuté, certaines études décrivant une diversité microbienne comparable aux sujets sains (146) voire parfois augmentée (164), d'autres une diminution de la diversité en lien avec la sévérité de la BPCO (165). Au-delà de la sévérité de la maladie, d'autres facteurs confondants peuvent également intervenir comme la prise de corticostéroïdes inhalés et de bronchodilatateurs qui sont associés à des profils de microbiomes différents (164).

En terme de proportion des espèces bactériennes, les études montrent souvent des résultats différents probablement explicables par les faibles effectifs de patients de sévérité variable. Ainsi dans deux études analysant le LBA, la première reposant sur 4 patients BPCO observe une prédominance des espèces de *Pseudomonas* alors que la deuxième reposant sur 8 patients rapporte plutôt une grande diversité avec des représentants des genres *Streptococcus*, *Prevotella*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Fusobacterium* et *Neisseria* (149). Une autre étude par Garcia-Nuñez *et al.* détecte principalement les phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes* et *Bacteroides* comme chez les témoins avec en plus la présence d'*Actinobacteria* (165). Dans une étude sur tissus pulmonaires issus de résection de cancer ou de poumon pour transplantation pulmonaire avec 8 patients présentant une BPCO très sévère comparés à 8 contrôles non fumeurs et 8 contrôles fumeurs d'âges comparables, Sze *et al.* ont observé une prédominance du phyla

Firmicutes chez les patients BPCO attribuée à une augmentation du genre *Lactobacillus* (146). Des résultats à prendre avec précaution, la population de patient BPCO pouvant bénéficier d'une transplantation étant très restreinte et peu représentative de la majorité des patients. Pour autant, cette étude se comparant également à des tissus pulmonaires issus de patients atteints de mucoviscidose confirme encore la spécificité du microbiome dans la BPCO.

La description du microbiome dans la BPCO reste donc limité aujourd'hui en raison du faible nombre d'études publiées sur le sujet, études de faibles effectifs avec des populations très différentes responsables de résultats très variables et non comparables.

3.3.2. Microbiome pulmonaire et inflammation bronchique dans la BPCO

Les effets du microbiome pulmonaire sur l'inflammation bronchique dans la BPCO sont probables mais les études sont encore insuffisantes pour en comprendre tous les mécanismes. Ainsi, il a été montré à partir de LBA de sujets sains que l'inflammation pulmonaire mesurée par la quantité de lymphocytes et neutrophiles dans le LBA ainsi que la mesure du NO exhalée, est plus importante lorsqu'ils présentent une abondance relative plus élevée de pathogènes d'origine supra-glottique. Ces données suggèrent que l'intensité de l'inflammation des voies aériennes est influencée par la composition du microbiome (166).

Larsen *et al.* ont tenté d'évaluer expérimentalement l'effet que ce microbiome pouvait avoir sur les cellules dendritiques humaines en exposant ces dernières à différentes bactéries commensales ou pathogènes fréquemment associées à l'asthme et la BPCO (117). Toutes les bactéries étudiées induisaient une maturation des cellules dendritiques marquée par l'augmentation des marqueurs membranaires CD83, CD40 et CD86. Par contre, comparativement aux bactéries décrites comme commensales (*Prevotella* spp., *Veillonella* spp. et *Actinomyces* spp.), les bactéries pathogènes *Haemophilus* spp. et *Moraxella* spp. induisaient une augmentation 3 à 5 fois supérieure des cytokines IL-12, IL-23 et IL-10 démontrant des propriétés pro-inflammatoires plus importantes. De plus, la coculture avec *Prevotella* spp. inhibait l'induction de la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques en réponse à *Haemophilus influenzae* sans modification de la production l'IL-12 et d'IL-10, suggérant que le microbiome commensal participe également au contrôle de l'inflammation générée par les espèces pathogènes.

Dans une autre étude réalisée dans un modèle murin d'inflammation chronique ressemblant à la BPCO induit par l'exposition répétée au LPS d'*Escherichia coli* et à de l'élastase, Yadava *et al.* montrent que ces souris ont une meilleure fonction pulmonaire et une inflammation réduite en l'absence de microbiome pulmonaire (167). De plus, les souris qui ont toujours un microbiome présentent une diminution de sa diversité au profit d'une augmentation de la représentation des genres *Pseudomonas* et *Lactobacillus* avec une diminution du genre *Prevotella*. Ces modifications sont associées à une production d'IL-17A. Cette inflammation IL-17A est non seulement diminuée chez les souris sans microbiome mais peut aussi être induite chez une souris naïve chez qui l'on transfère le microbiome pulmonaire d'une souris présentant déjà une inflammation. Cette étude démontre ainsi clairement la capacité d'un microbiome issu d'un contexte inflammatoire chronique à induire de lui-même une inflammation de type Th17 et donc potentiellement sa capacité à entretenir une inflammation chronique préexistante.

3.3.3. Mycobiome et virome pulmonaire dans la BPCO

Cui *et al.* ont analysé le mycobiome dans la BPCO mais dans le cadre de sujets infectés par le VIH ce qui représente un biais important (168). Pour autant, l'espèce la plus enrichie chez les patients atteints de BPCO et infectés par le VIH était *Pneumocystis*. Ce résultat doit être pris avec précaution dans ce contexte d'immunosuppression. Cependant, il a déjà été montré une prévalence de la colonisation par *Pneumocystis jiroveci* de 37% chez les patients atteints de BPCO très sévère, colonisation qui était corrélée à la sévérité de l'obstruction bronchique et indépendante des antécédents de tabagisme (169). De plus, dans un modèle murin immunocompétent, l'association d'une infection par *Pneumocystis murina* et d'une exposition chronique à la fumée de cigarette augmentait la charge pulmonaire de *Pneumocystis murina*, accélèrait le développement d'un emphysème et augmentait l'inflammation pulmonaire (170). L'analyse du mycobiome dans la BPCO semble donc pouvoir apporter des éléments importants dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie.

Il n'existe pas d'étude à proprement parler du virome dans la BPCO. Cependant, il a été montré par PCR quantitative la présence de virus chez des patients BPCO à l'état stable avec mise en évidence du Virus Respiratoire Syncytial (23,5%), de Rhinovirus (7%), de Coronavirus (6%) et de Virus Parainfluenzae (1%) suggérant que ces virus peuvent persister dans les voies aériennes sans manifestation d'exacerbation (171). De plus, deux études convergent pour suggérer que les

virus pourraient participer au développement de la maladie. Tout d'abord, Matsuse *et al.* ont comparé 20 patients de 60 ans sans obstruction bronchique à 20 autres de 65 ans à tabagisme égal présentant une BPCO, et recherché la présence d'adénovirus sur des pièces de tissus pulmonaires issus de résection pour nodule solitaire (172). L'ADN viral était retrouvé chez la majorité des patients (90% des BPCO versus 44% des contrôles sur les échantillons congelés). De plus, le nombre de copies était plus important chez les patients ayant une BPCO et étaient localisées chez ces patients au niveau des cellules épithéliales. Ensuite, Vitalis *et al.* ont comparé 12 cochons d'Inde infectés par un adénovirus de type 5 à 12 autres contrôle et les ont exposés après plus d'un mois à la fumée de cigarette (173). L'association de l'infection chronique à adénovirus avec exposition à la fumée de cigarette était associée à une exacerbation de l'inflammation pulmonaire. Ces deux études qui ne permettent pas de tirer de conclusions définitives, suggèrent néanmoins la possibilité d'un lien entre infection virale chronique et développement d'une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes.

3.4. Colonisation bactérienne des voies aériennes dans la BPCO

La colonisation bactérienne des voies aériennes dans la BPCO a été bien étudiée et est associée à l'inflammation bronchique, la présence de bronchiectasies et aux symptômes de la maladie (174). Ainsi, dans le LBA de patients BPCO, la présence d'au moins une bactérie potentiellement pathogène est associée à une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles, des taux de CXCL8 et de MMP-9 activée (175). Dans le sputum, la charge bactérienne est corrélée à l'activité de l'élastase leucocytaire et aux taux de myéloperoxydase, de CXCL8 et de leukotriène B4 (176).

Il est démontré que ces colonisations et infections des voies aériennes jouent un rôle important dans la physiopathologie de la BPCO. Ceci a conduit à l'hypothèse du « cercle vicieux » décrite par Sethi (**Figure 3**) supposant que l'exposition chronique à la fumée de cigarette ou à un autre irritant bronchique altère la réponse immune pulmonaire et favorise l'installation et la persistance de bactéries pathogènes dans les voies aériennes (177). Ainsi, l'installation d'une nouvelle souche pathogène entraîne une augmentation aiguë de l'inflammation bronchique responsable d'une exacerbation clinique associée à de nouvelles lésions pulmonaires (178). La persistance de la souche pathogène ou colonisation s'associe à une inflammation chronique plus modérée mais

qui persiste. Ces deux phénomènes s'associent pour promouvoir les altérations tissulaires et la progression de la BPCO, et pour favoriser une nouvelle surinfection et/ou colonisation.

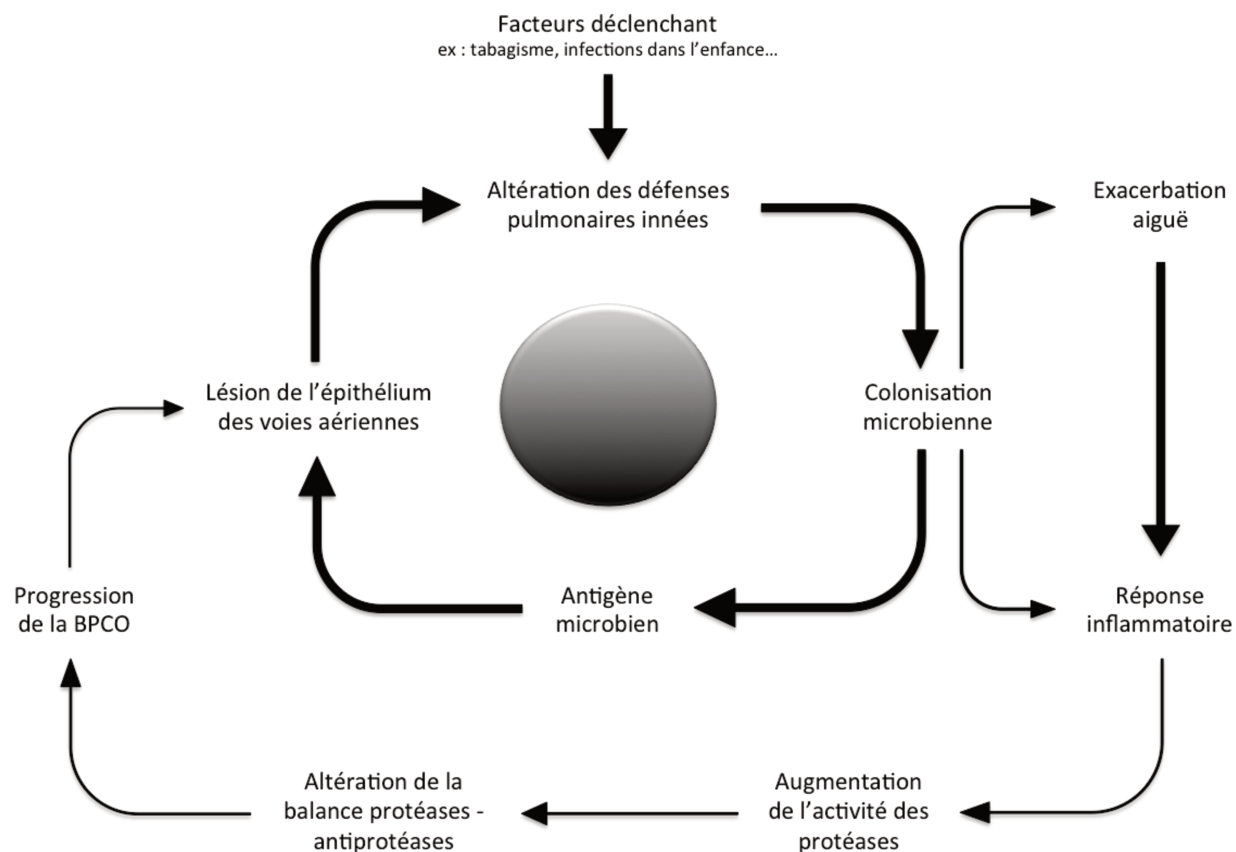


Figure 3 : Hypothèse du « cercle vicieux » liant infection et inflammation dans la BPCO d'après (177).

Le germe le plus fréquemment isolé dans la BPCO à l'état stable et qui joue certainement un rôle majeur dans la maladie est *Haemophilus influenzae* (177). Ainsi, les taux de TNF- α dans le sputum sont les plus élevés chez les patients BPCO et chez les sujets fumeurs sans obstruction bronchique colonisés par *Haemophilus influenzae*, comparativement à ceux mesurés dans le sputum de patients BPCO sans colonisation. Ces données démontrent l'impact majeur de cette colonisation par cette espèce y compris en l'absence d'obstruction bronchique (179). Les mécanismes impliqués dans l'inflammation induite par *Haemophilus influenzae* non typable (NTHi) comprennent notamment l'activation de NF- κ B par une voie dépendante du TLR2 et des

voies de signalisation p38-MAPKs et IKK α / β -I κ B α (180,181). NTHi peut également interagir avec l'épithélium bronchique en se fixant au récepteur du facteur d'activation des plaquettes (PAF) (182). *Moraxella catarrhalis* et *Streptococcus pneumoniae* sont moins fréquemment isolés et semblent avoir un impact moins important sur la maladie à l'état stable (177). *Moraxella catarrhalis* active notamment la voie NF- κ B via ERK1/2 mais avec comme conséquence la production de prostaglandine E₂ par l'épithélium bronchique, molécule impliquée notamment dans la résolution de l'inflammation favorisant ainsi la colonisation bactérienne (183). Cette colonisation est également associée à un déséquilibre de la balance protéases / anti-protéases avec une augmentation de l'élastase neutrophilique et diminution de l'inhibiteur de la protéase leucocytaire sécrété (SLPI) (184). Enfin, *Pseudomonas aeruginosa* n'est isolé que chez les patients sévères et/ou avec bronchiectasies et a un impact probablement important à ce stade. Il a été notamment montré qu'il induisait la production de CXCL8 via l'activation de NF- κ B dans les cellules épithéliales (185). Toutes ces espèces influencent différemment l'inflammation bronchique. La colonisation à *Pseudomonas aeruginosa* est associée à une activation des polynucléaires neutrophiles sécrétant de la myéloperoxydase dans le sputum. Ce résultat est supérieur à celui associé à la colonisation par NTHi qui est lui-même supérieur à celui associé à la colonisation par *Moraxella catarrhalis* (176).

Au total, ces espèces bactériennes colonisant fréquemment les voies aériennes des patients atteints de BPCO ont un impact sur l'inflammation pulmonaire plus important pour *Haemophilus influenzae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cette colonisation a un impact significatif sur la progression de la maladie notamment par son association avec la survenue d'exacerbation de la BPCO (186). Les mécanismes responsables de cette colonisation sont probablement multiples et impliquent certainement les effets immunosuppresseurs de la fumée de cigarette (61,187,188). D'autres éléments comme la réponse IL-17 et IL-22, cytokines clés dans la réponse aux pathogènes, pourraient être impliqués dans ce phénomène de colonisation des voies aériennes au cours de la BPCO.

4. Exacerbations de la BPCO

Comme défini précédemment, l'exacerbation de la BPCO se définit cliniquement par une majoration aiguë et soutenue des symptômes respiratoires au-delà des variations quotidiennes

habituelles chez un patient atteint de BPCO et nécessitant une modification des thérapeutiques (12). Le diagnostic n'est retenu qu'après avoir éliminé les autres pathologies pouvant s'accompagner d'une majoration des symptômes respiratoires comme par exemple l'insuffisance cardiaque aiguë ou les pneumonies (1).

La fréquence des différentes étiologies varient selon les études et la population étudiée mais les étiologies infectieuses semblent être majoritaires avec 25-50 % des exacerbations associées à des bactéries et 25-50 % des exacerbations associées à des virus (189). La pollution atmosphérique, notamment lors des pics de pollution, est un autre facteur associé aux exacerbations de BCPO augmentant le nombre d'hospitalisation et la mortalité (190,191). Pour autant, jusqu'à un tiers des exacerbations sévères n'ont pas de cause précise mise en évidence soulignant les limites de nos moyens diagnostiques et possiblement notre méconnaissance de facteurs étiologiques autres (1).

4.1. Biologie des exacerbations

4.1.1. Mécanismes immunologiques

Sur le plan biologique, l'exacerbation s'accompagne d'une majoration de l'inflammation, de l'activité des protéases et du stress oxydant créant de nouvelles lésions pulmonaires et favorisant ainsi la progression de la maladie et la survenue d'exacerbations ultérieures (177). Cette inflammation sera non seulement bronchique mais touchera également les voies aériennes supérieures et s'accompagnera d'une inflammation systémique (192).

Tout d'abord sur le plan inflammatoire, les taux des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, CXCL8, TNF- α et GM-CSF ainsi que ceux de la protéine cationique des éosinophiles (ECP) et du leucotriène B4 (LTB4) sont augmentés dans le sputum (193–197). Au niveau sanguin, les concentrations d'IL-6 et de la CRP sont augmentés témoignant d'une majoration de l'inflammation systémique (193,196). Dans certains contextes, cette inflammation peut être amplifiée comme par exemple par une synergie entre la signalisation du TNF- α et l'activation par NTHi au niveau des cellules épithéliales bronchiques conduisant à une expression encore plus importante de CXCL8 et une activation supérieure de la voie NF- κ B (198).

Ces cytokines et chimiokines entraînent une augmentation du recrutement des polynucléaires neutrophiles, des éosinophiles et des lymphocytes au niveau des voies aériennes et d'une

augmentation des neutrophiles circulants (196,197). La poursuite d'un tabagisme pourrait être un élément déterminant dans la sévérité de l'exacerbation, l'exposition à la fumée de cigarette étant associé dans un modèle murin à un recrutement plus important des neutrophiles dépendant de CXCR2 secondaire à une production exacerbée d'IL-1 α par les macrophages alvéolaires (199). L'élévation des éosinophiles peut par contre sembler surprenante, ces cellules étant plus associées à l'inflammation de type allergique comme dans l'asthme. Pourtant des travaux récents suggèrent qu'ils ont un rôle dans la physiopathologie des exacerbations. Ainsi, la présence d'éosinophiles à des taux supérieurs à 2 % dans le sang à l'état stable est associée à une réduction significative de la fréquence des exacerbations si le patient prend des corticostéroïdes inhalés (200). Plus significatif, une étude réalisée chez des patients hospitalisés pour exacerbation montrent que le traitement par corticothérapie systémique n'est efficace que chez les patients ayant plus de 2% d'éosinophiles dans le sang à l'inclusion permettant de réduire les échecs de traitement de 66% s'ils n'avaient pas de corticothérapie systémique à 11% avec ce traitement (201). Les éosinophiles étant très cortico-sensibles, ces données suggèrent que l'amélioration observée est liée à l'inhibition de ces cellules quand bien même leur rôle reste à déterminer. Concernant les ILC, une étude récente utilisant un modèle murin exposé à la fumée de cigarette a montré que les infections par le virus influenza ou par les bactéries *Staphylococcus aureus* ou NTHi était associée à une diminution de la population ILC2 qui se transformait en ILC1, mécanisme pouvant participer à l'augmentation de l'inflammation de type Th1 (97). Le devenir des ILC3 dans ce contexte n'est pas analysé.

Ensuite, au cours des exacerbations la balance protéase / anti-protéases est davantage déséquilibrée avec d'un coté une majoration des taux de l'élastase neutrophilique et de la MMP-9 ainsi que de l'activité de la myéloperoxydase (MPO) et de l'autre une diminution de l'inhibiteur des protéases leucocytaires (SLPI) (184,193,197). Cette production accrue de cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et de protéases notamment par les macrophages peut être expliqué en partie par une activation amplifiée de la voie NF- κ B durant les exacerbations (202). Enfin, le stress oxydant est exacerbé dans les voies aériennes comme le montre l'augmentation des taux de 8-isoprostane, 8-OH-dGuanosine, 3-nitrotyrosine et de nitrites (195,197,203).

Au total, l'exacerbation clinique est associée à une exacerbation des mécanismes immuno-pathologiques associés à la pathologie à l'état stable expliquant le lien entre exacerbation et progression de la maladie (13,46).

4.1.2. Différents profils immunologiques des exacerbations

Toutes les exacerbations n'ont pas le même profil inflammatoire. Celui-ci dépend probablement du facteur causal de cette exacerbation d'une part et du phénotype de la BPCO propre au patient d'autre part, comme par exemple la présence d'une colonisation bronchique préexistante. Ainsi, Bafadhel *et al.* ont décrit 4 profils inflammatoires différents associés aux exacerbations de la BPCO (204) :

- un premier profil associé aux exacerbations d'origine bactérienne de type pro-inflammatoire avec notamment une élévation des polynucléaires neutrophiles, de l'IL-1 β dans les sputum et de la CRP dans le sang. L'association entre élévation de l'IL-1 β dans le sputum et le caractère bactérien de l'exacerbation a également été retrouvé dans une étude récente de Damera *et al.* évaluant par protéomique les profils inflammatoires associés aux exacerbations de la BPCO (205),
- un deuxième profil associé aux exacerbations d'origine virale, profil associé à une diminution plus importante du VEMS et une inflammation plutôt de type Th1 avec élévation du CXCL10 circulant,
- un troisième profil associé aux exacerbations éosinophiliques avec une élévation des éosinophiles dans le sang supérieurs à 2 %,
- et enfin un quatrième profil pauci-inflammatoire.

Ce travail démontre l'hétérogénéité des exacerbations notamment sur le plan immunologique qui amènera probablement à des prises en charges spécifiques dans le futur. Ainsi, Aaron *et al.* ont testé l'éta nercept, un anti-TNF- α , au cours des exacerbations de la BPCO (206). Ils n'ont pas mis en évidence d'efficacité supérieure par rapport à la corticothérapie mais il n'y avait pas de différence significative en terme d'échec de traitement après 90 jours de suivi. Dans une analyse de sous-groupe, la corticothérapie était plus efficace lorsque les éosinophiles circulants étaient supérieurs à 2 % et l'éta nercept tendait à être plus efficace lorsqu'ils étaient inférieurs à 2 % suggérant l'intérêt d'une thérapeutique ciblée sur le profil immunologique. Des travaux supplémentaires sont néanmoins nécessaire pour valider ces clusters, définir la thérapeutique adaptée et personnalisée au profil identifié, et trouver des marqueurs spécifiques utilisables en pratique clinique pour identifier ces clusters et prédire la réponse à un traitement particulier.

4.2. Microbiologie des exacerbations

4.2.1. Les virus

Le rôle des virus dans les exacerbations de la BPCO a longtemps été débattu, les limites des techniques de détections antérieures limitant l'étude de leur implication au cours de ces événements. Ceci a changé avec le développement des techniques de détection par PCR très sensibles mais posant la question de la pertinence clinique de la mise en évidence d'une séquence nucléaire de virus dans les prélèvements respiratoires dont la viabilité n'est pas démontrée.

4.2.1.1. Lien de causalité entre virus et exacerbation

De nouvelles conditions basées sur le postulat historique de Koch ont été définies pour retenir un lien causal entre la mise en évidence d'un pathogène par technique moléculaire et la maladie supposée infectieuse. Ils permettent aujourd'hui de déterminer si les virus peuvent être la cause d'exacerbation de la BPCO (207) :

1. *La séquence nucléaire de l'agent supposé pathogène doit être mise en évidence dans la majorité des cas de la maladie infectieuse et préférentiellement au niveau du site de l'infection.* Ce point doit être pondéré par le fait qu'il existe d'autres causes d'exacerbation de la BPCO notamment bactérienne, on ne peut donc s'attendre à les mettre en évidence dans la majorité des prélèvements (177). Dans une revue systématique par Zwaans *et al.* ayant inclus 19 études soit 1728 patients en exacerbations, les virus les plus fréquemment détectés dans des prélèvements des voies aériennes supérieures et basses étaient les rhino-/entérovirus (16,4%), le virus respiratoire syncytial (VRS) (9,9%) et le virus influenzae (7,83%) (208). Venaient ensuite les coronavirus (4,1%), le virus parainfluenzae (3,4%), le métapneumovirus humain (2,8%), les adénovirus (2,1%) et le bocavirus (0,6%). Ces données confirment la mise en évidence courante de virus au cours des exacerbations de la BPCO au niveau des voies aériennes. De plus, dans 7 des 8 études ayant comparés des prélèvements réalisés au niveau des voies aériennes supérieures et basses, la prévalence de détection de la séquence nucléaire virale était plus importante dans les voies aériennes basses ce qui est plus pertinent sur un plan physiopathologique.

2. *Aucune copie de la séquence nucléique, ou des taux plus faibles, ne doit être isolée dans les tissus non atteints par la maladie et chez les sujets non atteints.* Dans une étude de Seemungal *et al.* portant sur 83 patients atteints de BPCO, des virus respiratoires étaient détectés dans 39,2 % de l'ensemble des exacerbations (59% de rhinovirus, 28,7% de VRS, 10,6% de coronavirus, 9,1% de virus influenza A et 4,5% de virus influenza B) ce qui représentait 64% des patients (171). 6 patients seulement avaient le même virus mis en évidence lors de deux exacerbations différentes et aucun virus n'était détecté plus de deux fois chez le même patient durant les différentes exacerbations. A l'état stable, 68 patients ont été prélevés retrouvant 23,5 % de VRS et 16% d'autres virus (45% de rhinovirus, 36,4% de coronavirus, et 9,1% de virus para-influenza) apportant un argument en faveur de la moindre fréquence de mise en évidence de ces virus en dehors des exacerbations.
3. *Lors de la résolution de la maladie, le nombre de copie de la séquence nucléique doit diminuer voire devenir indétectable, l'inverse devant être observé en cas de rechute.* Dans un modèle expérimental de Mallia *et al.*, 11 patients atteints de BPCO et 12 sujets sains dont 9 fumeurs actifs ont été infectés par voie nasale par du rhinovirus (209). La charge virale dans les voies aériennes supérieures et inférieures de ces patients diminuaient significativement lors de la résolution des symptômes avec une bonne corrélation entre la charge virale et l'inflammation chez les sujets BPCO. De même, dans une autre étude évaluant les exacerbations naturelles à rhinovirus, la prévalence de prélèvements positifs et la charge virale étaient supérieures en exacerbation par rapport à l'état de base et la charge virale devenait indétectable après 35 jours post-exacerbation (210).
4. *Lorsque la mise en évidence de la séquence nucléique précède la maladie ou que le nombre de copie est corrélé avec la sévérité de la maladie, la causalité est plus probable.* Dans le modèle expérimental de Mallia *et al.* cité ci-dessus, contrairement aux sujets sains, les sujets atteints de BPCO développaient des symptômes d'atteinte respiratoire basse associés à une aggravation de leur obstruction bronchique répondant à la définition d'une exacerbation dans 10 cas sur 11 (209). L'inflammation des voies aériennes et systémique était significativement augmentée et corrélée à la charge

virale. Le stress oxydant généré et l'activité des protéases étaient aussi significativement supérieur chez ces patients (197).

5. *La nature du micro-organisme déduit de la séquence doit être compatible avec les caractéristiques biologiques connues de ce groupe d'organisme.* La spécificité des séquences et le rôle pathogène des virus respiratoires est maintenant bien établi notamment le lien entre rhinovirus et rhinite ou virus influenza et grippe.
6. *Les corrélations tissus atteints et séquences nucléiques devraient être réalisées au niveau cellulaire pour démontrer l'hybridation in situ spécifique de la séquence sur le site de l'infection.* Ce point demande à être exploré dans le contexte de la BPCO.
7. *Ces preuves doivent être reproductibles.* Les analyses systématiques de la littérature démontrent la mise en évidence récurrente des virus respiratoires au cours des exacerbations de la BPCO avec une association qui semble de plus en plus évidente avec l'inflammation des voies aériennes (208,211).

Sur la base de ces éléments, il semble raisonnable de considérer que les virus peuvent causer des exacerbations de la BPCO. Par contre en pratique clinique, le lien direct de causalité entre la mise en évidence d'un virus respiratoire au cours d'une exacerbation de BPCO et la survenue de cette exacerbation reste incertaine et du ressort du clinicien qui va intégrer l'ensemble des données à sa disposition et si nécessaire les compléter par d'autres examens pour *in fine* retenir une étiologie particulière à l'exacerbation.

4.2.1.2. Mécanismes de la susceptibilité aux infections virales

La susceptibilité aux exacerbations virales des patients BPCO peut être en partie expliquée par une diminution de la réponse interféron de type I (IFN- α et IFN- β) et de type 3 (IFN- λ) au rhinovirus des macrophages alvéolaires observée chez les patients BPCO par rapport aux sujets sains fumeurs ou non (209). De plus, l'exposition de cellules épithéliales trachéo-bronchiques de patients atteints de BPCO au rhinovirus montre une expression des gènes impliqués dans le stress oxydant et la réponse aux virus, NOX1, MMP-12, ICAM1, DDX58/RIG-I, STAT-1 et STAT-2, et une sécrétion des protéines IL-6, IL-8 et CXCL1, significativement supérieures à celles obtenus avec les cellules issus de sujets sains (212). La charge virale est également augmentée. L'augmentation d'expression d'ICAM-1, molécule d'adhérence et site de fixation du rhinovirus, décrite sur les cellules épithéliales bronchiques dans la BPCO facilite vraisemblablement

l'adhérence du virus et l'infestation des cellules (212–214). Cette infection par le rhinovirus majore également la résistance aux corticostéroïdes en entraînant une activation des voies NF- κ B et des janus kinases (JNK) inhibant le passage nucléaire du récepteur α aux glucocorticoïdes dans les cellules épithéliales bronchiques (215). La fumée de cigarette a un effet synergique sur l'inflammation induite par les virus en augmentant l'expression de TLR3 sur les macrophages alvéolaires, responsable d'une sécrétion de CXCL8 d'autant plus importante (216). Cet effet est d'autant plus marqué que l'exposition à la fumée de cigarette des cellules épithéliales bronchiques stabilise le microRNA HuR qui stabilise en retour l'ARN messager de CXCL8 en réponse au rhinovirus (217,218). Ces quelques travaux démontrent l'existence d'une altération de la réponse aux virus chez certains patients atteints de BPCO et d'une synergie de l'infection virale avec l'exposition à la fumée de cigarette pouvant favoriser la survenue d'exacerbations d'origine virale.

4.2.2. Les bactéries

4.2.2.1. Bactéries associées aux exacerbations

Comme pour les virus, la bactérie détectée dans les prélèvements respiratoires au cours d'une exacerbation n'est pas toujours la cause première de cette exacerbation, la colonisation bactérienne des voies aériennes étant courante dans la BPCO (177). Par conséquent, le lien entre augmentation de la charge bactérienne et survenue d'une exacerbation n'est pas clairement établi, certaines études ne mettant pas en évidence de variation entre l'état stable et l'exacerbation de la BPCO (219). Les bactéries les plus fréquemment associées aux exacerbations sont *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis* avec en plus *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de BPCO sévère à très sévère (177). Le lien de causalité entre la mise en évidence d'une de ces bactéries et la survenue de l'exacerbation n'est pour autant pas toujours clair. Ainsi, Sethi *et al.* ont montré dans une population de patients suivis plusieurs années que l'isolement dans les prélèvements aériens de *Streptococcus pneumoniae* et de *Moraxella catarrhalis* était significativement associé à une fréquence plus élevée d'exacerbation alors que ce n'était pas le cas pour *Haemophilus influenzae* et *Pseudomonas aeruginosa* (219). Par contre, le risque d'exacerbation en lien avec une infection bactérienne semble lié à l'acquisition d'une nouvelle souche bactérienne (220). Cette acquisition est associée à une augmentation significative de l'inflammation systémique évaluée par la concentration sanguine

de la CRP par rapport aux exacerbations sans germe authentifié mais également par rapport aux exacerbations associées à la mise en évidence d'une souche bactérienne déjà présente à l'état stable (178). L'inflammation bronchique est également exacerbée avec des taux de TNF- α et des taux d'élastase neutrophilique significativement plus augmentés dans le sputum des patients atteints de BPCO présentant une exacerbation avec germe authentifié par rapport aux exacerbations sans germe authentifié montrant l'impact plus important des infections bactériennes sur l'inflammation bronchique comme déjà montré dans d'autres études (192).

4.2.2.2. Mécanismes de la susceptibilité aux infections bactériennes

Plusieurs défauts de la réponse immunitaire innée et adaptative ont été décrits au cours de la BPCO pour expliquer cette susceptibilité aux infections bactériennes. Parmi ceux-ci, les altérations de la barrière épithéliale décrites précédemment sont le premier facteur favorisant la colonisation bactérienne des voies aériennes comme la diminution du nombre de cellules ciliées associée à des anomalies de leur cils, l'augmentation des cellules à mucus avec altération quantitative et qualitative de ce mucus, et l'augmentation de la perméabilité épithéliale (23). Les peptides antimicrobiens jouent également un rôle de première ligne dans la défense contre les pathogènes des voies aériennes (221). Leur expression est modifiée dans la BPCO mais avec des résultats parfois discordants d'une étude à l'autre pour une même molécule ne permettant pas de tirer de conclusion définitive à leur sujet (222). L'altération de la phagocytose bactérienne par les macrophages semble être un facteur déterminant (69,70). Enfin, une altération de la réponse adaptative lymphocytaire de type Th1 au LPS, et donc par extension aux bactéries gram négatives, a été décrite dans la BPCO avec un défaut de production d'IFN- γ lié à la diminution d'expression du TLR4 (223). Il existe donc déjà un certain nombre de mécanismes suggérés comme impliqués dans la susceptibilité aux infections bactériennes dans la BPCO. Le devenir de la voie IL-17 / IL-22 n'ayant pas été évalué de manière approfondi, ce travail vient en complément de ces études pour démontrer la présence associée d'un déficit de cette voie qui jouerait un rôle important dans la susceptibilité aux infections bactériennes

4.2.3. Les co-infections virus et bactéries

La fréquence de la co-détection de virus et bactérie varie entre 8 à 25 % selon les études (192,204,224–231). La survenue de pneumonies bactériennes dans les suites d'une infection grippale étant classique, il a logiquement été proposé un schéma avec dans l'ordre une infection

bronchique virale suivie d'une surinfection bactérienne. Ainsi, dans une étude anglaise de Hutchinson *et al.* incluant des patients en exacerbation, 36% des patients n'ayant qu'un virus détecté à l'inclusion présentaient une bactérie à des taux cliniquement significatifs dans leurs prélèvements bronchiques dans les 7 jours qui suivaient (225). De plus, 70% des patients pour lesquels seule une bactérie avait été isolée rapportait la présence de symptômes évocateurs d'une infection virale lors de l'apparition des signes en lien avec l'exacerbation actuelle suggérant que certaines de ces exacerbations pourraient également être des surinfections bactériennes secondaires.

Plus récemment, George *et al.* ont observé deux profils différents d'évolution des charges virales et bactériennes durant l'exacerbation (210). Un premier groupe de patient présentait uniquement une charge virale de rhinovirus détectable lors de la prise en charge, charge qui diminuait progressivement pour devenir indétectable alors que parallèlement apparaissait et augmentait une charge bactérienne qui atteignait un pic au 14^e jour évoquant un mécanisme de surinfection secondaire. Le deuxième groupe présentait dès l'inclusion des charges virales et bactériennes détectables qui diminuaient parallèlement jusqu'au 7^e jour avec ré-augmentation de la charge bactérienne au 14^e jour suggérant cette fois une co-infection au sens propre avec reprise de la croissance bactérienne à l'arrêt de l'antibiothérapie. La meilleure démonstration vient du modèle expérimental d'infection de patients BPCO par le rhinovirus de Mallia *et al.* (232). Alors que la charge virale atteint son pic entre le 5^e et le 9^e jour avant de diminuer progressivement jusqu'au 21 jour, il est observé une augmentation de la charge bactérienne à partir du 5^e jour pour atteindre un pic au 15^e jour avant de diminuer. Une analyse complémentaire a démontré que le pathogène mis en évidence dans cette expérience n'était pas liée à une surinfection bronchique par une nouvelle souche bactérienne mais à la prolifération d'une espèce déjà présente dans le microbiome pulmonaire avant l'infection (233).

L'inverse est également possible puisque Hutchinson *et al.* ont observé chez 10% des patients pour lesquels seule une bactérie était isolée à l'inclusion, la mise en évidence de virus au 5^e jour, suggérant une possible surinfection virale (225). Peu d'études expérimentales ont été réalisées dans ce sens mais un travail utilisant des lignées de cellules épithéliales bronchiques montre que la pré-exposition de ces cellules à NTHi ou *Pseudomonas aeruginosa* augmente la réponse inflammatoire lors d'une surinfection par le VRS et non le virus influenza ou les adénovirus

suggérant la possibilité d'un effet synergique dans le sens infection bactérienne avec surinfection virale (234).

Tous ces travaux montrent la complexité des interactions pouvant exister entre virus et bactéries qui semblent se favoriser l'un l'autre. Ce phénomène se traduit par une susceptibilité accrue à une nouvelle surinfection, phénomène qui se traduit cliniquement par un risque augmenté de refaire une exacerbation dans les 8 semaines qui suivent une première exacerbation (14).

5. Voie IL-17 / IL-22 dans la BPCO

5.1. Immunité Th17 pulmonaire

5.1.1. Cellules et cytokines Th17

Les cytokines IL-17 et IL-22 sont surtout produites par les lymphocytes et notamment les cellules Th17. Ces lymphocytes Th17 ont un profil lymphocytaire nouvellement décrit se différenciant à partir de lymphocytes T CD4⁺ naïfs stimulés par un antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigènes en présence d'IL-6 et d'IL-1 β chez l'homme ou d'IL-6 et de TGF- β chez la souris (235). L'IL-23 intervient secondairement pour induire une différenciation complète et soutenir la production des cytokines. La famille des cytokines IL-17 comprend 6 membres mais l'activité anti-pathogène est principalement liée aux cytokines IL-17A, IL17F et à l'hétéro-dimère IL-17A/F composé d'une sous-unité d'IL-17A et une d'IL-17F (236). Les lymphocytes Th17 mais également les cellules innées comme les lymphocytes T $\gamma\delta$, les ILC3, les cellules NK et NKT produisent de l'IL-17A, de l'IL-17F et de l'IL-22 qui sont des cytokines essentielles dans la réponse immune de l'hôte contre des infections de ses muqueuses (237). Le récepteur des cytokines IL-17A, IL-17F et IL-17A/F est le complexe associant une sous-unité A et C du récepteur à l'IL-17 (IL-17RA-IL-17RC) (236). Le récepteur de l'IL-22 est un hétéro-dimère composé de la sous-unité 1 du récepteur de l'IL-22 (IL-22RA) et la sous-unité 2 du récepteur de l'IL-10 (IL-10R2) (238). L'activation des récepteurs de l'IL-17 ou de l'IL-22 exprimés sur les cellules épithéliales bronchiques induit la sécrétion de facteurs de différenciation ou chimio-attractants pour les polynucléaires neutrophiles comme le granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), des chimiokines comme CXCL8, des cytokines comme l'IL-6 et des peptides antimicrobiens comme les β -défensines et les protéines de la famille S100 (236,238).

5.1.2. Spécificités de l'IL-17A et de l'IL-22

En plus des fonctions citées ci-dessus, l'IL-22 contribue à la protection et à la régénération tissulaire par l'induction de la sécrétion des mucines par les cellules caliciformes et de la prolifération des cellules épithéliales (239). A l'inverse, le recrutement des polynucléaires neutrophiles est principalement secondaire à l'activation par l'IL-17A et l'IL-17A/F, la neutralisation de l'IL-17F ou de l'IL-22 n'ayant aucun effet sur ce recrutement (240). Ces données montrent que ces cytokines ont des spécificités qui n'excluent pas des interactions et recoupement de fonction entre elles. Par exemple, lors d'une infection bactérienne, la double activation par l'IL-17A et l'IL-22 induit une synergie augmentant encore davantage la production de peptides antimicrobiens et de chimiokines (241).

Selon le contexte et leur concentration relative, ces cytokines peuvent avoir des effets bénéfiques comme des effets négatifs (242). Par conséquent, l'expression relative de l'IL-17A et de l'IL-22 est régulée finement par différents facteurs de transcription comprenant STAT3, ROR γ t, c-Maf et AHR, eux-mêmes activés par différentes combinaisons de cytokines notamment IL-1 β , IL-6, IL-23 et TGF- β , suggérant un rôle important de régulation par les cellules présentatrices d'antigène dont les cellules dendritiques qui sécrètent ces cytokines (239).

5.2. Cytokines Th17 et inflammation chronique de la BPCO

5.2.1. Inflammation Th17 systémique

En comparaison aux sujets sains non fumeurs et aux fumeurs sans obstruction bronchique, les concentrations sanguines d'IL-17A des patients atteints de BPCO sont élevées alors que les concentrations sanguines d'IL-22 sont élevés tant dans la BPCO que chez les fumeurs sans obstruction bronchique (243). Contrairement à l'IL-22, les concentrations sanguines d'IL-17A augmentent avec la sévérité de la BPCO et sont négativement corrélées avec l'obstruction bronchique quantifiée par le VEMS en pourcentage de la théorique. Le nombre de lymphocytes Th17 et de lymphocytes T CD8⁺ produisant de l'IL-17A (Tc17) dans le sang des patients atteints de BPCO est également plus élevé et associés à la sévérité de l'obstruction bronchique (128,130). Les lymphocytes Th1 sont plus nombreux dans le sang des patients atteints de BPCO et des fumeurs sans obstruction bronchique mais leur nombre n'est pas corrélé à l'obstruction

bronchique suggérant que l'inflammation systémique de type Th17 serait la plus en lien avec la physiopathologie de la BPCO.

5.2.2. Inflammation Th17 pulmonaire

Dans les voies aériennes, la concentration en IL-17A et en IL-22 augmente avec la sévérité de la BPCO (243). Les concentrations d'IL-17A dans le sputum sont corrélées avec celles des facteurs chimiotactiques pour les polynucléaires neutrophiles CXCL8 et IL-6, et avec le degré d'obstruction bronchique (244). Par conséquent, la physiopathologie de la BPCO et l'inflammation neutrophilique qui s'y associe, semblent très liées à l'IL-17. Le marquage immuno-histo-chimique de biopsies bronchiques montre une fréquence plus importante de cellules positives pour l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22 dans la BPCO, y compris dans les cellules endothéliales (245). Comme supposé, les lymphocytes Th17 et Tc17 sont plus fréquents tout au long de l'arbre bronchique et dans les parois alvéolaires des poumons de patients atteints de BPCO (246,247). Dans les petites voies aériennes, les cellules positives pour l'IL-17A et l'IL-17F comprennent non seulement des lymphocytes T mais également des polynucléaires neutrophiles, des mastocytes et des lymphocytes B démontrant les sources potentielles multiples de ces cytokines dans la BPCO (136). La formation d'un tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT) est une caractéristique de la BPCO (20). L'IL-17A participe au développement des follicules lymphoïdes en induisant la production de CXCL12 mais les cellules positives pour l'IL-17A restent à la périphérie de ces follicules alors que les cellules positives pour l'IL-17F sont présentes au sein du follicule suggérant que l'IL-17A et l'IL-17F ont des rôles différents en lien avec la différenciation des lymphocytes T et B respectivement (136,137).

Dans les modèles murins, l'exposition à la fumée de cigarette induit la prolifération des lymphocytes Th17 et Tc17 (132). Dans ce contexte, l'IL-17A est aussi produit par les cellules immunitaires innées comprenant les cellules NK et NKT ainsi que les lymphocytes T $\gamma\delta$ sans production détectable par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (248). Dans notre modèle de souris exposées de façon chronique à la fumée de cigarette, les résultats étaient comparables avec l'observation d'une expansion des cellules NKT produisant de l'IL-17A (86). Cette production d'IL-17A par ces cellules est importante car l'inflammation induite par l'exposition à la fumée de cigarette est réduite chez les souris déficientes en IL-17A ou lors de l'usage d'un anticorps neutralisant de l'IL-17A (248). De plus, les souris déficientes en cellules

NKT perdaient leur capacité à développer une inflammation et une altération de leur fonction respiratoire au moins pendant les premières étapes d'exposition à la fumée de cigarette. Des résultats similaires étaient suggérés pour les lymphocytes T $\gamma\delta$ qui sont également une source importante de ces cytokines (248).

5.2.3. Régulation de la production d'IL-17

La production de l'IL-17 est contrôlée par les cytokines régulatrices comprenant l'IL-10 et le TGF- β (249). Les concentrations d'IL-10 dans les expectorations sont plus faibles chez les patients atteints de BPCO et négativement corrélées à l'obstruction bronchique (243,244). Ce changement dans la balance entre l'IL-10 et l'IL-17A a été associé à la diminution de l'activité de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), un facteur d'induction de tolérance ayant la capacité de contrôler le stress oxydant, chez les patients atteints de BPCO (244). A l'inverse, une étude rapporte une augmentation des concentrations en IL-10 et TGF- β dans le plasma des patients atteints de BPCO, augmentation associée à une augmentation de l'activité régulatrice des lymphocytes T circulants mais il manque des contrôles fumeurs sains dans cette étude pour pouvoir totalement interpréter ces résultats (250). Dans notre modèle murin exposé de façon chronique à la fumée de cigarette, il est observé une augmentation de l'expression de l'IL-10 dans les poumons. Cette augmentation vise vraisemblablement à contrôler l'inflammation, les souris déficientes en IL-10 exposées de façon chronique à la fumée de cigarette présentant une réponse IL-17 exacerbée associée à une altération plus importante de leur fonction respiratoire.

Nous faisons l'hypothèse que la physiopathologie de la BPCO comprend deux niveaux de production des cytokines Th17, une première en lien avec l'activation des cellules immunitaires innées et une seconde liée au développement des lymphocytes Th17. Cela pourrait aussi correspondre à des mécanismes de production différents puisque les cellules innées sont activées très rapidement par les cellules épithéliales et les cellules dendritiques exposées à la fumée de cigarette. A l'inverse, le développement des lymphocytes T Th17 nécessite un circuit plus complexe qui pourrait impliquer une réponse auto-immune et/ou une altération des mécanismes de régulation.

5.3. Cytokines Th17 et obstruction des voies aériennes

La relation entre IL-17 et obstruction des voies aériennes a été démontrée dans différents modèles expérimentaux. Kim *et al.* ont montré que les souris sauvages nourries avec un régime riche en graisse pendant 12 semaines développent une hyperréactivité bronchique et non les souris déficientes en IL-17 (251). Cet effet est dépendant de l'expansion des ILC3 induite par l'IL-1 β , cytokine qui est élevée chez les patients atteints de BPCO (252). Les souris déficientes pour le gène RAG soumises au même régime riche en graisse développent également une hyperréactivité bronchique démontrant que cet effet est indépendant de la production d'IL-17 par les cellules de l'immunité adaptative. Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres modèles de souris exposés à différents toxiques aériens. Pichavant *et al.* ont montré que les souris sauvages exposées durant 5 jours à de l'ozone développent une hyperréactivité bronchique (253). Cet effet est associé à une augmentation des polynucléaires neutrophiles et dépend de l'activation des cellules NKT et de l'IL-17. Plus récemment, notre équipe a confirmé l'implication de l'IL-17A produite par les cellules iNKT dans la pathogenèse de l'hyperréactivité bronchique dans un modèle de souris exposées 12 semaines à la fumée de cigarette, un effet dépendant de l'activation des cellules iNKT par le stress oxydant dans les cellules dendritiques CD11b⁺ (86). Dans un autre modèle de souris exposées 3 jours à la fumée de cigarette, Li *et al.* ont montré que l'injection d'IL-22 recombinante seule ou en association avec l'exposition à la fumée de cigarette induit une hyperréactivité bronchique associée à une élévation de l'IL-17A et des polynucléaires neutrophiles démontrant les potentiels effets délétères de cette cytokine (254). Enfin, McGovern *et al.* ont montré dans un modèle de souris exposées à la chlorure que le développement d'une hyperréactivité bronchique est dépendante des polynucléaires neutrophiles (255). Ces résultats sont concordants avec les données cliniques montrant une corrélation entre les concentrations d'IL-17A et le nombre de polynucléaires neutrophiles dans les expectorations de patients atteints de BPCO (243). Toutes ces données suggèrent que les cytokines Th17 produites par les cellules de l'immunité innée dans un contexte inflammatoire induisent le développement d'une obstruction des voies aériennes dépendante du recrutement des polynucléaires neutrophiles.

5.4. Cytokines Th17 et développement de l'emphysème

L'emphysème est la conséquence de la destruction des parois alvéolaires, phénomène fréquemment retrouvé dans la BPCO (46). Harrison *et al.* ont montré dans un modèle de souris

exposées 6 mois à la fumée de cigarette que l'augmentation de lymphocytes Th17 exprimant CCR6 est associée à un élargissement des espaces aériens (256). Bracke *et al.* ayant démontré précédemment que les souris déficientes pour CCR6 étaient protégées contre le développement d'un emphysème induit par l'exposition à la fumée de cigarette, cela suggère un rôle délétère de ces cellules (257). Les mécanismes physiopathologiques responsable de l'induction de la différenciation des lymphocytes Th17 et de leur activation lors de l'exposition à la fumée de cigarette ne sont pas encore complètement clarifiés. Ainsi, Chen *et al.* ont montré *in vitro* que cette différenciation dépend du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AHR) qui commande théoriquement la production d'IL-22 (258). Cependant, l'activation de l'inflammasome semble être aussi importante, l'induction de l'IL-17A étant diminuée dans les souris déficientes pour le récepteur de l'IL-1 ou pour NLRP3 (259,260). Enfin, l'expression du miR-22 induite par la fumée de cigarette dans les cellules présentatrices d'antigène est également nécessaire pour conduire au développement d'un emphysème dépendant des cellules Th17, démontrant l'existence de voies de signalisation multiples pouvant être impliquées dans ce phénomène (261).

La pathogénicité de l'IL-17A a été confirmée par Kurimoto *et al.* qui ont montré que les souris déficientes pour l'IL-17A sont protégées contre le développement d'un emphysème induit par l'élastase (262). Cet effet protecteur est associé à une réduction des polynucléaires neutrophiles et des facteurs chimioattractants pour les neutrophiles KC et MIP-2. Ce résultat renforce les résultats antérieurs de Chen *et al.* qui ont démontré que la signalisation de l'IL-17RA est nécessaire au développement d'un emphysème (258). Dans son modèle, l'association de l'IL-17A avec l'IL-22 augmente l'expression des MMP, molécules qui sont impliquées dans la destruction tissulaire (46). De plus, l'utilisation de souris déficientes en IL-17A et la neutralisation de l'IL-17A chez les souris sauvage sont associées à une diminution du recrutement des macrophages et des polynucléaires neutrophiles, des chimiokines CCL2 et CCL3 et de l'expression de MMP-12 en réponse à la fumée de cigarette (248). Ces données suggèrent que l'IL-17A et l'IL-22 sont impliquées dans le développement de l'emphysème via l'induction de la libération de protéases par les cellules immunes et les cellules épithéliales (46,263). Néanmoins, Chang *et al.* ont démontré que l'IL-17A induit par la fumée de cigarette peut aussi induire directement l'apoptose des cellules alvéolaires de type 2 (264). Par conséquent, l'IL-17A et l'IL-22 favorisent le développement d'un emphysème via l'induction de la production de protéases et de l'apoptose des cellules alvéolaires.

Tout ceci démontre l'implication des cytokines IL-17 et IL-22 dans la physiopathologie de la BPCO à l'état stable. Les cellules produisant ces cytokines comprennent tant des cellules de l'immunité adaptative que des cellules de l'immunité innée. Les cellules présentatrices d'antigène et plus particulièrement les cellules dendritiques jouant un rôle central dans l'activation de l'immunité adaptative et interagissant également fortement avec les cellules lymphoïdes innées, il est donc vraisemblable qu'elles jouent un rôle déterminant dans cette polarisation Th17.

6. Objectifs de la thèse

En raison de leur impact sur la morbi-mortalité des patients, la prise en charge et la prévention des exacerbations est un objectif prioritaire. Leurs étiologies majoritairement infectieuses et la présence de patients présentant des exacerbations fréquentes dès les stades précoces suggèrent la présence d'une susceptibilité aux à ces infections responsable de ces mécanismes d'exacerbation. L'immunité Th17 étant fortement impliquée et altérée dans la BPCO et le rôle des cytokines IL-17A et IL-22 déterminant dans le contrôle des infections bactériennes et fongiques, nous avons émis l'hypothèse que la réponse IL-17A et IL-22 aux pathogènes était altérée au cours de la BPCO participant à la susceptibilité aux infections associée à la maladie.

L'objectif principal de cette thèse est de démontrer la présence de ce déficit de réponse IL-17A et IL-22 au cours des exacerbations infectieuses de la BPCO. Les objectifs secondaires sont tout d'abord de définir les populations sources de ces cytokines au cours de l'exacerbation à *Streptococcus pneumoniae* parmi les cellules T conventionnelles et les cellules lymphoïdes innées et décrire lesquelles sont à l'origine du défaut de production IL-17A et IL-22, puis d'évaluer le rôle des cellules présentatrices d'antigène dans ce défaut de réponse avec la mise en place d'un modèle de cellules dendritiques exposées à la fumée de cigarette pour évaluer l'impact direct de cette exposition et les mécanismes impliqués, ensuite d'évaluer le retentissement sur la réponse de l'épithélium à l'agression en terme de production de peptides antimicrobiens et de régénération, tout ceci devant amener à proposer de nouvelles cibles thérapeutiques ciblant ce déficit.

Trois approches expérimentales seront utilisées, une approche *ex vivo* utilisant des cellules mononucléées de patients atteints de BPCO qui seront exposées à *Streptococcus pneumoniae* pour quantifier leur réponse pro-Th17 et Th17 et la comparer à celle de cellules issues de sujets

sains non fumeurs et de fumeurs sans obstruction bronchique, une approche *in vitro* avec tout d'abord utilisation d'un modèle de cellules dendritiques dérivées de monocytes du sang qui seront exposées à la fumée de cigarette puis à *Streptococcus pneumoniae* puis secondairement mise en coculture avec des lymphocytes T autologues pour évaluer leur capacité induire une réponse Th17, et enfin une approche *in vivo* avec un modèle de souris exposées de façon chronique à la fumée de cigarette avant d'être infectées par *Streptococcus pneumoniae*. Pour répondre définitivement à l'objectif principal, une étude clinique centrée sur l'évaluation de la réponse IL-17A et IL-22 au cours des exacerbations de la BPCO sera mise en place.

ARTICLES

ARTICLES

1. La fumée de cigarette altère la capacité des cellules dendritiques à induire une réponse Th17 en réponse à *Streptococcus pneumoniae*

La fumée de cigarette représente la principale cause de développement d'une BPCO. Elle est responsable de l'activation de nombreux types cellulaires mais aussi de l'altération de certaines fonctions cellulaires. La mise en évidence d'un défaut de production des cytokines IL-17 nous a permis de montrer un défaut fonctionnel des cellules présentatrices d'antigènes et notamment des cellules dendritiques. Cela se traduit en particulier par un défaut de production d'IL-1 β et d'IL-23, deux cytokines favorisant la production des cytokines IL-17. Cette altération de la réponse IL-17 a aussi été décelée dans les cellules mononucléées de patients BPCO. Afin de préciser par quel mécanisme, ce défaut de réponse s'établit, nous avons testé l'impact de l'exposition à la fumée de cigarette sur l'activation par le pneumocoque des cellules dendritiques humaines issues de la différenciation de monocytes. L'impact de cette exposition a été évalué sur le phénotype de ces cellules notamment l'expression de molécules de costimulation, la production de cytokines immuno-modulatrices et leur capacité à induire la production d'IL-17A et IL-22 par les lymphocytes T. De plus, le mécanisme d'action de la fumée de cigarette a été analysé en se focalisant sur le stress oxydant occasionné par cette exposition.

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

Olivier Le Rouzic^{1,2,3,4,5}, Bachirou Koné^{1,2,3,5}, Jerome Kluza^{6,7}, Philippe Marchetti^{6,7}, Florence Hennegrave⁴, Cécile Olivier⁴, Gwenola Kervoaze^{1,2,3,5}, Eva Vilain^{1,2,3,5}, Clémence Mordacq^{1,2,3,5,8}, Nicolas Just⁹, Thierry Perez⁴, Nathalie Bautin⁴, Muriel Pichavant^{1,2,3,5}, Philippe Gosset^{1,2,3,5}.

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

² CNRS, UMR 8204, F-59000 Lille, France

³ Inserm, U1019, F-59000 Lille, France

⁴ CHU Lille, Service de Pneumologie Immunologie et Allergologie, F-59000 Lille, France

⁵ Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

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

⁷ Inserm, UMR-S 1172, F-59000 Lille, France

⁸ CHU Lille, Service de Pédiatrie, F-59000 Lille, France

⁹ CH Roubaix, Service de Pneumologie, F-59100 Roubaix, France

Corresponding author:

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

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease, dendritic cells, streptococcus pneumoniae, smoking, interleukin-1 β , interleukin-23, Th17 cytokines

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

Facteur d'impact : 3,751

1.1. Abstract

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

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

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

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

1.2. Background

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

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

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

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

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

1.3. Methods

1.3.1. Cell preparation

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

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

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

FEV1%, percentage of the forced expiratory lung volume in the first second; PO₂, blood partial pressure of oxygen; BODE: index combining *Body mass index, airflow obstruction, dyspnea and exercise capacity (6-minute walk test)*. Results are expressed as mean ± SEM. ND: not determined.

1.3.2. Preparation of cigarette smoke extract

Cigarette smoke extract (CSE) was prepared according to the method described by Blue and Janoff [19]. Briefly, the smoking apparatus consisted of a 60-ml syringe to which a cigarette was attached. CSE was prepared by drawing 60 ml of cigarette smoke through the filter into the syringe and then slowly bubbling the smoke into 10 ml of basal Airway Epithelial Cell Medium

(PromoCell). Two Kentucky research cigarettes 3RF4 were smoked per 10 ml of medium. The final solution was filtered through 0.2 μm filters and used immediately at 4% dilution.

1.3.3. *Streptococcus pneumoniae*

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

1.3.4. Activation of human MDDC and design of the coculture

Immature MDDC were exposed to 4% CSE for 3 hours in RPMI 1640 before activation by *S. pneumoniae* or by the Lipopolysaccharide as a positive control (LPS, *E.coli* serotype O55B5, 1 $\mu\text{g/ml}$) (Invivogen, San Diego, CA). To stop bacterial growth, 100 UI/ml Penicillin and 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin were added to the culture medium 1 hour after *S. pneumoniae* has been added. After an overnight incubation at 37°C , supernatants were harvested and MDDC collected and divided in two groups, one to analyze their phenotype in flow cytometry and one to analyze their APC function in coculture with autologous T-cells (5 x 10⁴ MDDC per 5 x 10⁵ T-cells in 500 μL RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 5 days at 37°C). Cell viability assessed by trypan blue staining confirmed that exposure to CSE did not increase cell toxicity in unstimulated and *S. pneumoniae*-stimulated MDDC (data not shown). For cocultures, a condition with T-cells alone in a well coated by anti-CD3 antibodies (20 $\mu\text{g/ml}$, BD Biosciences, San Diego, CA) was used as a positive control of T-cells activation.

1.3.5. Flow cytometry

MDDC were labelled (30 min at 4°C) with different mix of FITC-conjugated anti-CD36, -CD86, -CD209, -CCR7 or -CD1a, PE-conjugated anti-B7H1, -CD80 or -CD54, APC-conjugated anti-CD83, -CD40 or -CD11c, PECy5-conjugated anti-HLA-DR and corresponding IgG isotype controls (BD Pharmingen™, BD Biosciences). After been washed and fixed in 0.25% paraformaldehyde (PFA), MDDC were gated using FSC and SSC on a FACSCalibur flow cytometer with CellQuest software (BD biosciences). For intracellular staining, T-cells were incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS plus brefeldin A (10 $\mu\text{g/ml}$) for 6 hours at

37°C. Cells were first labelled (30 min at 4°C) with APC-Cy7-conjugated anti-CD45, Alexa Fluor 700-conjugated anti-CD4 and AmCyan-conjugated anti-CD8. After 15 min incubation, cells were fixed, permeabilized (Kit, BD Biosciences) and labelled with FITC-conjugated anti-IFN- γ , APC-conjugated anti-IL-17, PE-conjugated anti-IL-22 or the related isotype controls. Results are expressed as the difference between median fluorescence intensity (MFI) with the specific antibody and the isotype control (Δ MFI).

1.3.6. Cytokines measurements

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

1.3.7. Real Time quantitative PCR

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

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

S. pneumoniae was first labelled with pHrodo™ SE (Molecular Probes®, Invitrogen®) and stored at 4°C protected from light according to manufacturer's instructions. CSE was added 3 hours before MDDC dye-labelled *S. pneumoniae* exposure (MOI 20). After a 30 min-incubation at 37°C, cells were washed and a flow cytometer analysis was immediately performed with

488nm argon-ion laser using a R-phycoerythrin emission filter. One condition of MDDC was incubated at 4°C as an endocytosis negative control. Results are expressed in MFI. Endocytosis of viable bacteria after a 3-hours CSE exposure (MOI 10), was studied in MDDC as described by Zhou [20].

1.3.9. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction assessment

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

1.3.10. Statistical analysis

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

1.4. Results

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

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

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

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

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

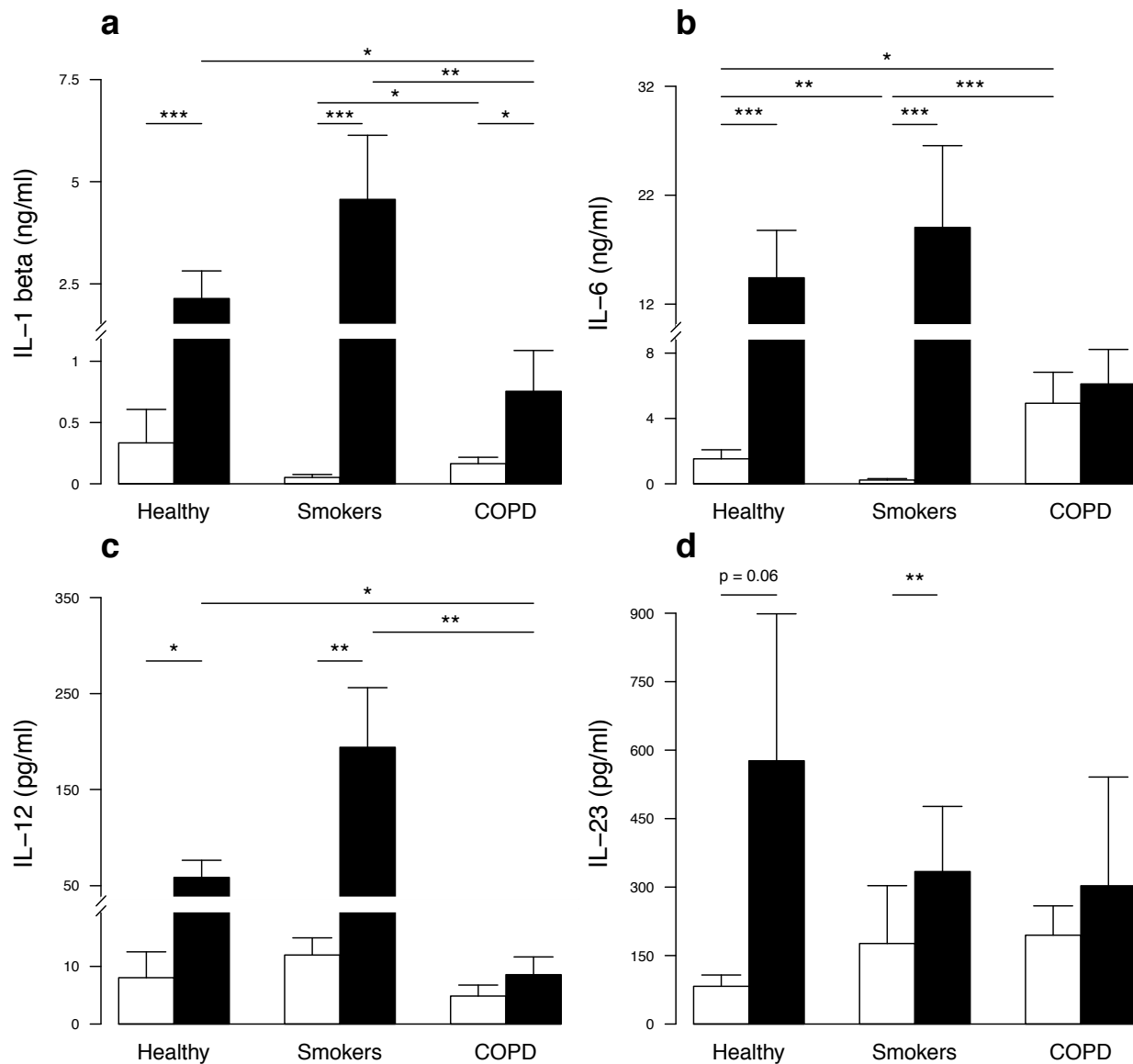


Figure 1: *S. pneumoniae*-induced cytokine secretion by PBMC from non-smoker healthy subjects (n=14), smokers without COPD (n=13) and COPD patients (n=9). Supernatants were collected after 24h incubation without stimulation (white columns) or after addition of *S. pneumoniae* (black columns). (a) IL-1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

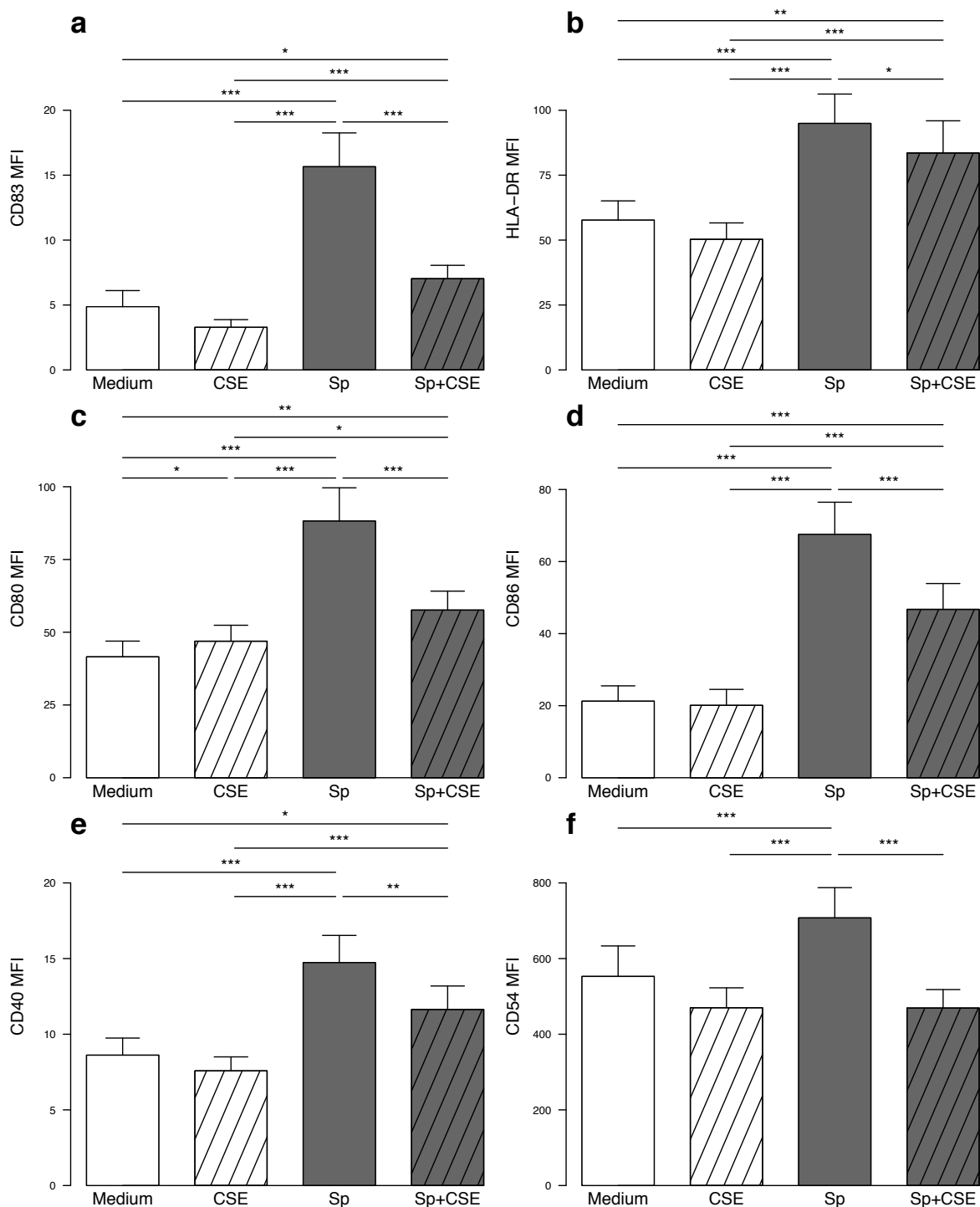


Figure 2: *In vitro* exposure to cigarette smoke extract (CSE) modulate the phenotype of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) from healthy subjects activated by *S. pneumoniae* (Sp). Expression of (a) CD83, (b) HLA-DR, (c) CD80, (d) CD86, (e) CD40 and (f) CD54 was evaluated by flow cytometry in MDDC exposed to CSE and then activated or not by *S. pneumoniae* for 24h. Data are reported as mean fluorescence intensity (MFI) \pm S.E.M. of 27 experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

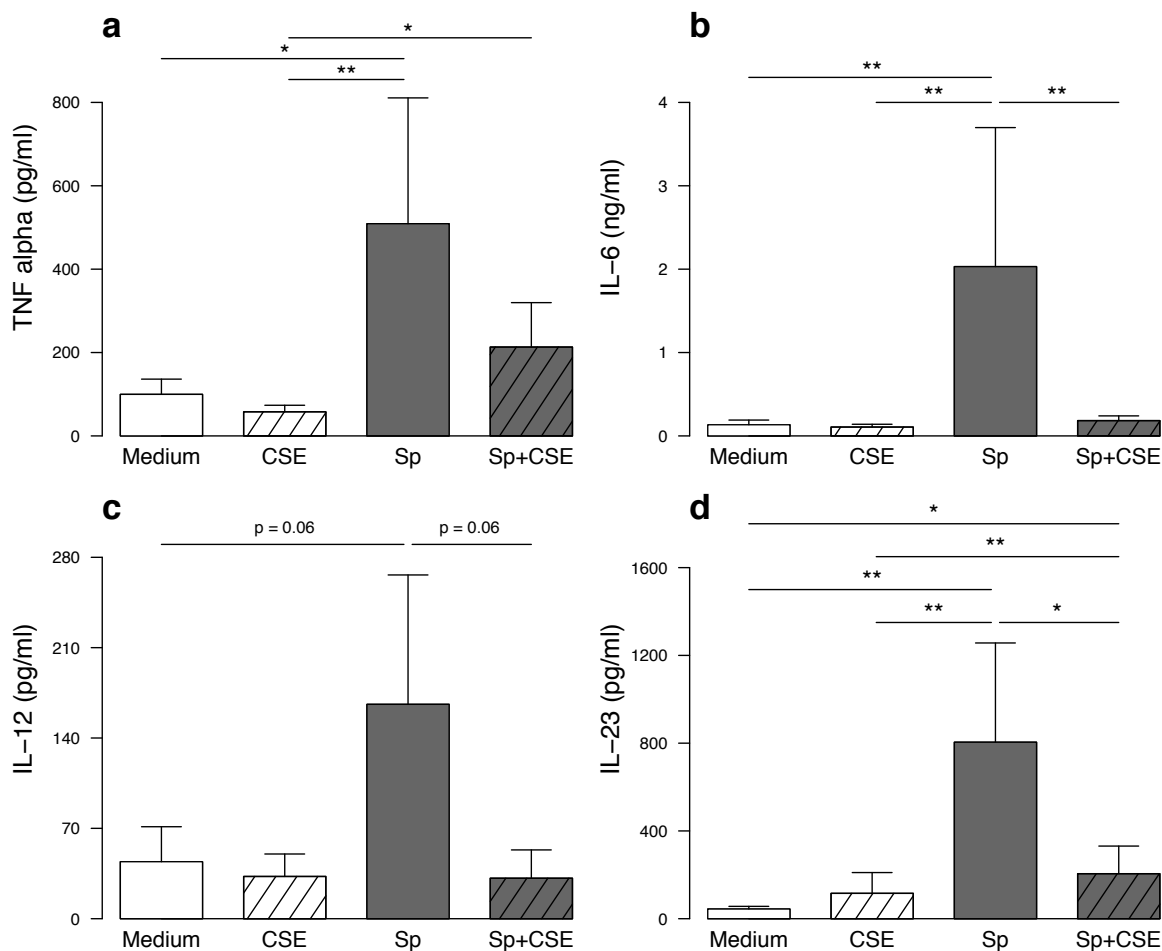


Figure 3: *In vitro* exposure to cigarette smoke extract (CSE) modulates the secretion of cytokines by monocyte-derived dendritic cells (MDDC) from healthy subjects activated by *S. pneumoniae* (Sp). Levels of (a) TNF- α , (b) IL-6, (c) IL-12 and (d) IL-23 were quantified by ELISA in MDDC culture supernatants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

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

To evaluate the effects of CSE on the crosstalk MDDC/T-cells, we next performed coculture experiments between MDDC and autologous T-cells. T-cells cultured with *S. pneumoniae*-exposed MDDC secreted significantly higher levels of IFN- γ , IL-17 and IL-22 (Fig. 4a-c). Intracellular staining confirmed the T-cell origin of these cytokines (Additional file 5). In contrast, when MDDC were pre-exposed to CSE prior *S. pneumoniae* activation, T-cells secreted lower levels of IFN- γ and IL-17 with a similar trend for IL-22 (Fig. 4a-c). MDDC only exposed

to CSE had no effect on IL-17 secretion but induced a slightly higher IFN- γ and lower IL-22 production ($p < 0.05$). Exposure to CSE had no impact on IL-10 and IL-4 levels (Fig. 4d and data not shown).

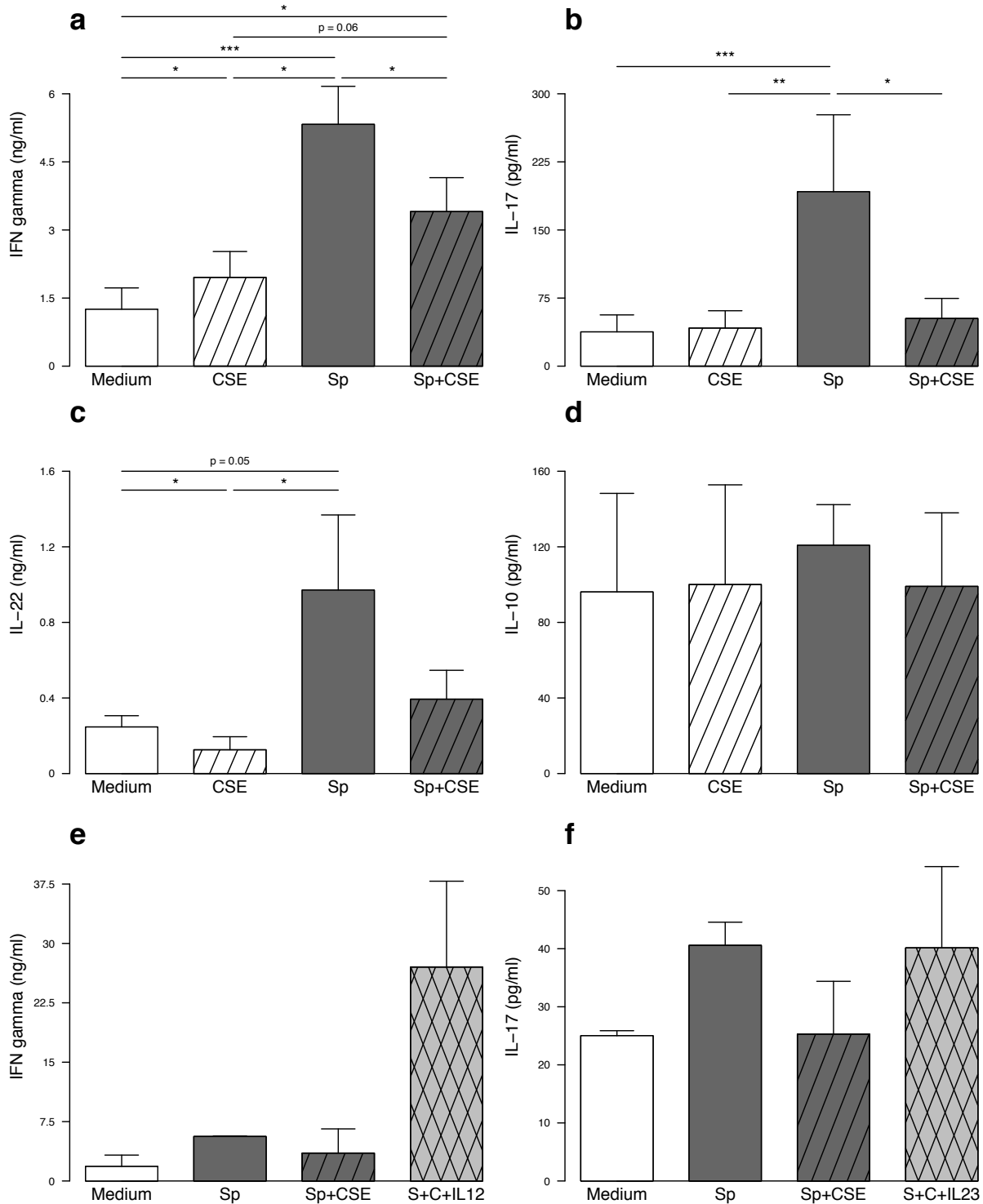


Figure 4: *In vitro* exposure to cigarette smoke extract (CSE) of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) altered their ability to prime T-cells. MDDC were exposed to CSE and then activated or not by *S. pneumoniae* (Sp). After 24 hours incubation, MDDC were then cocultured 5 days with autologous T-cells. Levels of (a) IFN- γ , (b) IL-17, (c) IL-22 and (d) IL-10 were quantified by ELISA in coculture supernatants. In some experiments, either recombinant human IL-12 or IL-23 were added to the cocultures with CSE- and Sp-exposed MDDC in order to quantify their ability to restore (e) IFN- γ or (f) IL-17 secretion, respectively. Data are reported as mean \pm S.E.M. of 14 and 3 experiments for a-d and e-f, respectively. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

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

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

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

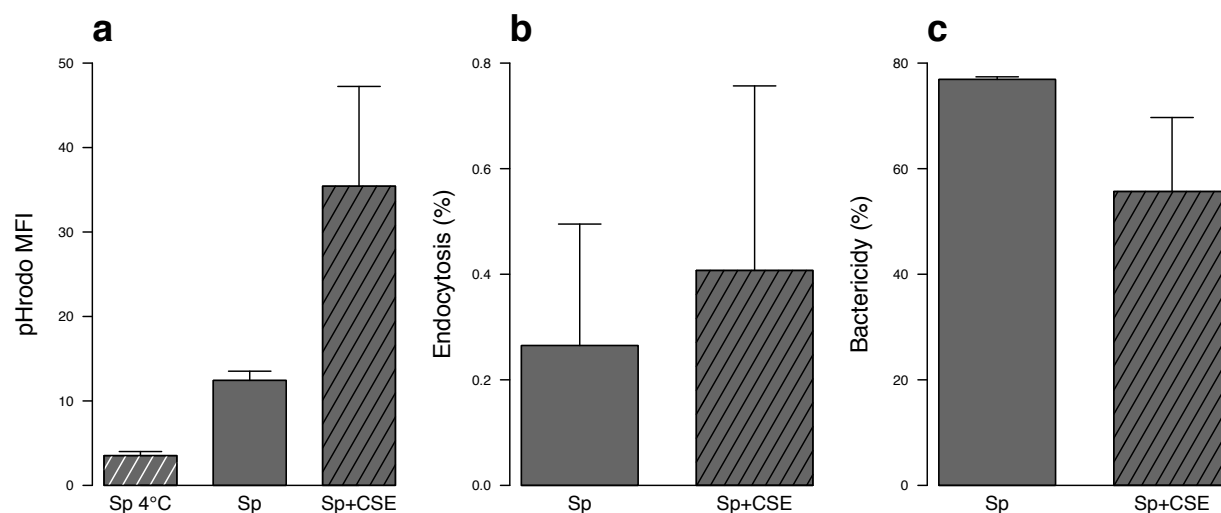


Figure 5: *In vitro* exposure to cigarette smoke extract (CSE) is associated with higher endocytosis of *S. pneumoniae* (Sp) by monocyte-derived dendritic cells (MDDC). **(a)** Mean fluorescence intensity (MFI) of internalized dye-labelled Sp was measured by flow cytometry. One condition was put at 4°C to inhibit endocytosis as a negative control. **(b)** Proportion of viable internalized Sp after one hour exposure were quantify to measure bacteria endocytosis as described by Zhou (265). **(c)** After one more hour incubation, internalized still viable Sp were quantify to measure the proportion of killed Sp. Data represent mean \pm S.E.M. of 4 and 2 experiments for a and b-c respectively. There was no statistical difference between groups.

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

We next focused on the impact of oxidative stress in the repressive effect of CSE on DC maturation. As expected, CSE exposure, despite the presence or not of *S. pneumoniae*, increased the expression of heme oxygenase 1 (HO1) within MDDC (Fig. 6a). This was confirmed by increased fluorescence in DCFDA-pre-treated MDDC after 3h incubation (data not shown). Oxidative stress involvement in CSE inhibitory effects was next tested by adding before CSE exposure, antioxidants targeting different oxidative pathways. After addition of N-Acetyl-Cystein (NAC), the inhibitory effect of CSE on co-maturation marker expression and cytokine expression was not reversed except for CD80 and CD86 for which NAC tended to increase their expression ($p=NS$) (Fig. 7, Additional file 6). Similarly, two other antioxidants, tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) and butylated hydroxyanisole (BHA) were not able to reverse CSE inhibitory effects (data not shown). Whereas cytoplasmic oxidative stress did not persist after 6h incubation, co-activation with CSE and *S. pneumoniae* induced a mitochondrial oxidative stress depicted by increased MitoSOX fluorescence (Fig. 6b). Again, MitoTEMPO a mitochondrially-targeted

antioxidant could not reverse CSE inhibitory effects (data not shown). Moreover, MDDC pretreatment by NAC and MitoTEMPO did not restore the production of IFN- γ and IL-17 by T-cells in cocultures (data not shown).

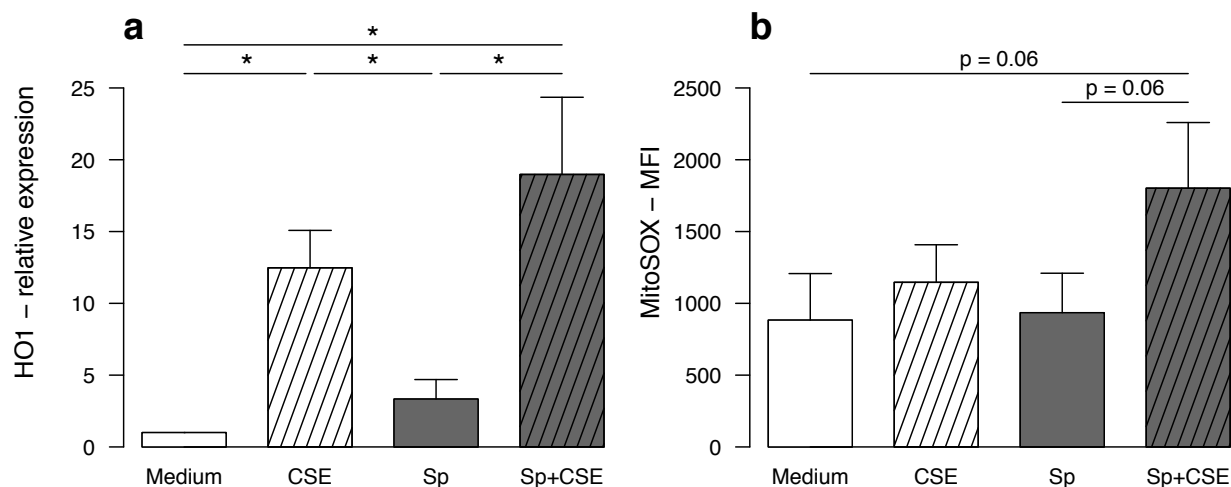


Figure 6: *In vitro* exposure to cigarette smoke extract (CSE) induced an oxidative stress in monocyte-derived dendritic cell (MDDC) from healthy subjects activated by *S. pneumoniae* (Sp). (a) Expression of Heme-oxygenase (HO)-1 was evaluated by qRT-PCR in MDDC exposed to CSE and then activated or not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

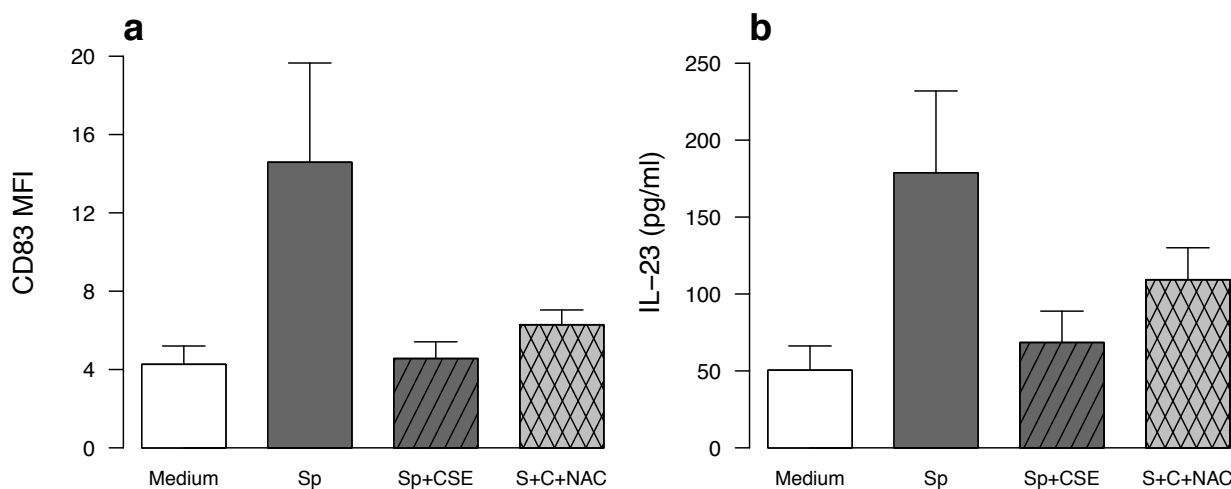


Figure 7: Treatment with the anti-oxidant N-acetylcystein (NAC) did not reverse the inhibitory effect of cigarette smoke extract (CSE) on the phenotype and the secretion of cytokines by monocyte-derived dendritic cell (MDDC) activated by *S. pneumoniae* (Sp). The expression of (a) CD83 and the secretion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

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

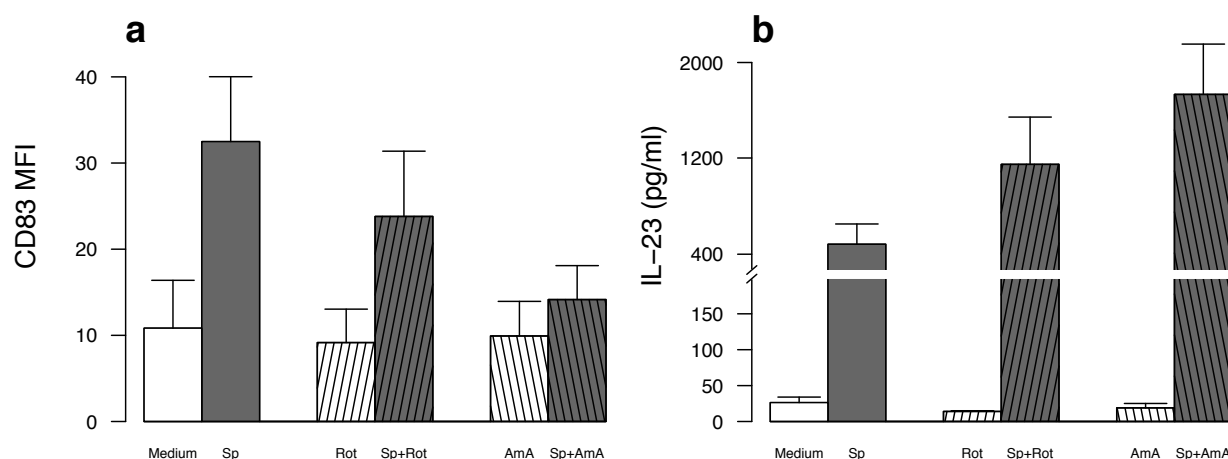


Figure 8: *In vitro* exposures to rotenone (Rot) and antimycin A (AmA) inhibit the phenotype of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) activated by *S. pneumoniae* (Sp) but not the secretion of cytokines. (a) Expression of CD83 and (b) the secretion of IL-23 were evaluated by flow cytometry and ELISA,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

1.5. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

1.6. Conclusion

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

1.7. References

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

14. Kroening PR, Barnes TW, Pease L, Limper A, Kita H, Vassallo R. Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2008;181:1536–47.
15. Chang Y, Nadigel J, Boulais N, Bourbeau J, Maltais F, Eidelman DH, et al. CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.* 2011;12:43.
16. Zhang X, Zheng H, Zhang H, Ma W, Wang F, Liu C, et al. Increased interleukin (IL)-8 and decreased IL-17 production in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) provoked by cigarette smoke. *Cytokine.* 2011;56:717–25.
17. Andelid K, Tengvall S, Andersson A, Levänen B, Christenson K, Jirholt P, et al. Systemic cytokine signaling via IL-17 in smokers with obstructive pulmonary disease: a link to bacterial colonization? *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2015;10:689–702.
18. Pichavant M, Sharan R, Le Rouzic O, Olivier C, Hennegrave F, Rémy G, et al. IL-22 Defect During *Streptococcus pneumoniae* Infection Triggers Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *EBioMedicine.* 2015;2:1686–96.
19. Blue ML, Janoff A. Possible mechanisms of emphysema in cigarette smokers. Release of elastase from human polymorphonuclear leukocytes by cigarette smoke condensate in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1978;117:317–25.
20. Zhou H, Kobzik L. Effect of concentrated ambient particles on macrophage phagocytosis and killing of *Streptococcus pneumoniae*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2007;36:460–5.
21. Wei J, Xiong X-F, Lin Y-H, Zheng B-X, Cheng D-Y. Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ.* 2015;3:e1199.
22. Pinto-Plata VM, Livnat G, Girish M, Cabral H, Masdin P, Linacre P, et al. Systemic cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD. *Chest.* 2007;131:37–43.
23. Sethi S. Infection as a comorbidity of COPD. *Eur. Respir. J.* 2010;35:1209–15.
24. Vassallo R, Walters PR, Lamont J, Kottom TJ, Yi ES, Limper AH. Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a Lung Tissue Research Consortium study. *Respir. Res.* 2010;11:45.
25. Tsoumakidou M, Koutsopoulos AV, Tzanakis N, Dambaki K, Tzortzaki E, Zakyntinos S, et al. Decreased small airway and alveolar CD83+ dendritic cells in COPD. *Chest.* 2009;136:726–33.
26. Liao S-X, Ding T, Rao X-M, Sun D-S, Sun P-P, Wang Y-J, et al. Cigarette smoke affects dendritic cell maturation in the small airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mol. Med. Rep.* 2015;11:219–25.

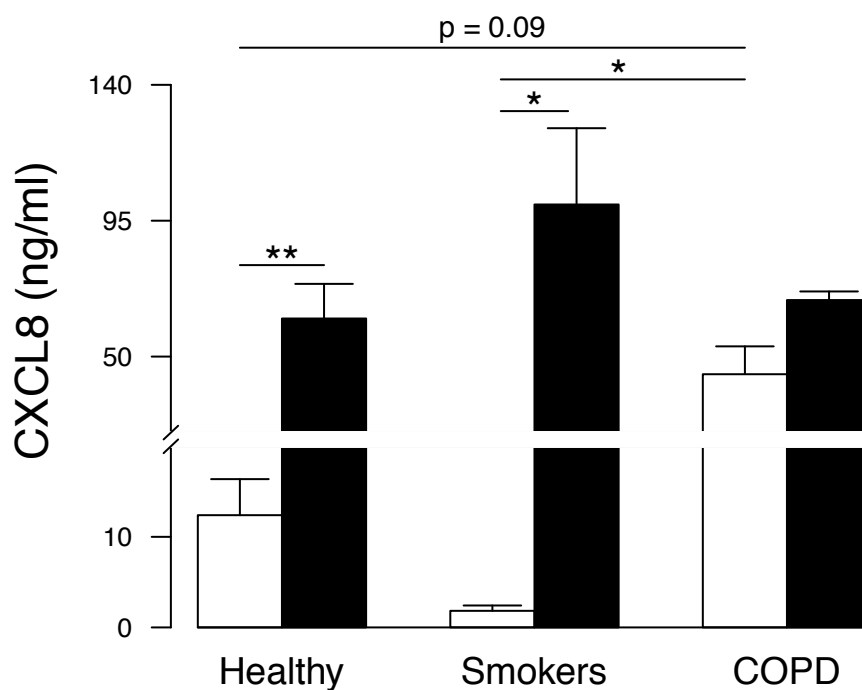
27. Givi ME, Folkerts G, Wagenaar GTM, Redegeld FA, Mortaz E. Cigarette smoke differentially modulates dendritic cell maturation and function in time. *Respir. Res.* 2015;16:131.
28. Castera L, Hatzfeld-Charbonnier AS, Ballot C, Charbonnel F, Dhuique E, Velu T, et al. Apoptosis-related mitochondrial dysfunction defines human monocyte-derived dendritic cells with impaired immuno-stimulatory capacities. *J. Cell. Mol. Med.* 2009;13:1321–35.
29. Smet EGD, Mestdagh P, Vandesompele J, Brusselle GG, Bracke KR. Non-coding RNAs in the pathogenesis of COPD. *Thorax.* 2015;70:782–91.
30. Lu W, You R, Yuan X, Yang T, Samuel ELG, Marcano DC, et al. The microRNA miR-22 inhibits the histone deacetylase HDAC4 to promote TH17 cell-dependent emphysema. *Nat. Immunol.* 2015;16:1185–94.
31. Phipps JC, Aronoff DM, Curtis JL, Goel D, O'Brien E, Mancuso P. Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2010;78:1214–20.
32. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 2001;106:255–8.
33. Hertzén E, Johansson L, Wallin R, Schmidt H, Kroll M, Rehn AP, et al. M1 protein-dependent intracellular trafficking promotes persistence and replication of *Streptococcus pyogenes* in macrophages. *J. Innate Immun.* 2010;2:534–45.
34. Gorvel L, Textoris J, Banchereau R, Ben Amara A, Tantibhedhyangkul W, von Bargen K, et al. Intracellular Bacteria Interfere with Dendritic Cell Functions: Role of the Type I Interferon Pathway. *PLoS ONE.* 2014;9:e99420.
35. Tardif V, Riquelme SA, Remy S, Carreño LJ, Cortés CM, Simon T, et al. Carbon monoxide decreases endosome-lysosome fusion and inhibits soluble antigen presentation by dendritic cells to T cells. *Eur. J. Immunol.* 2013;43:2832–44.

1.8. Additional files

Additional file 1: Primer sequences

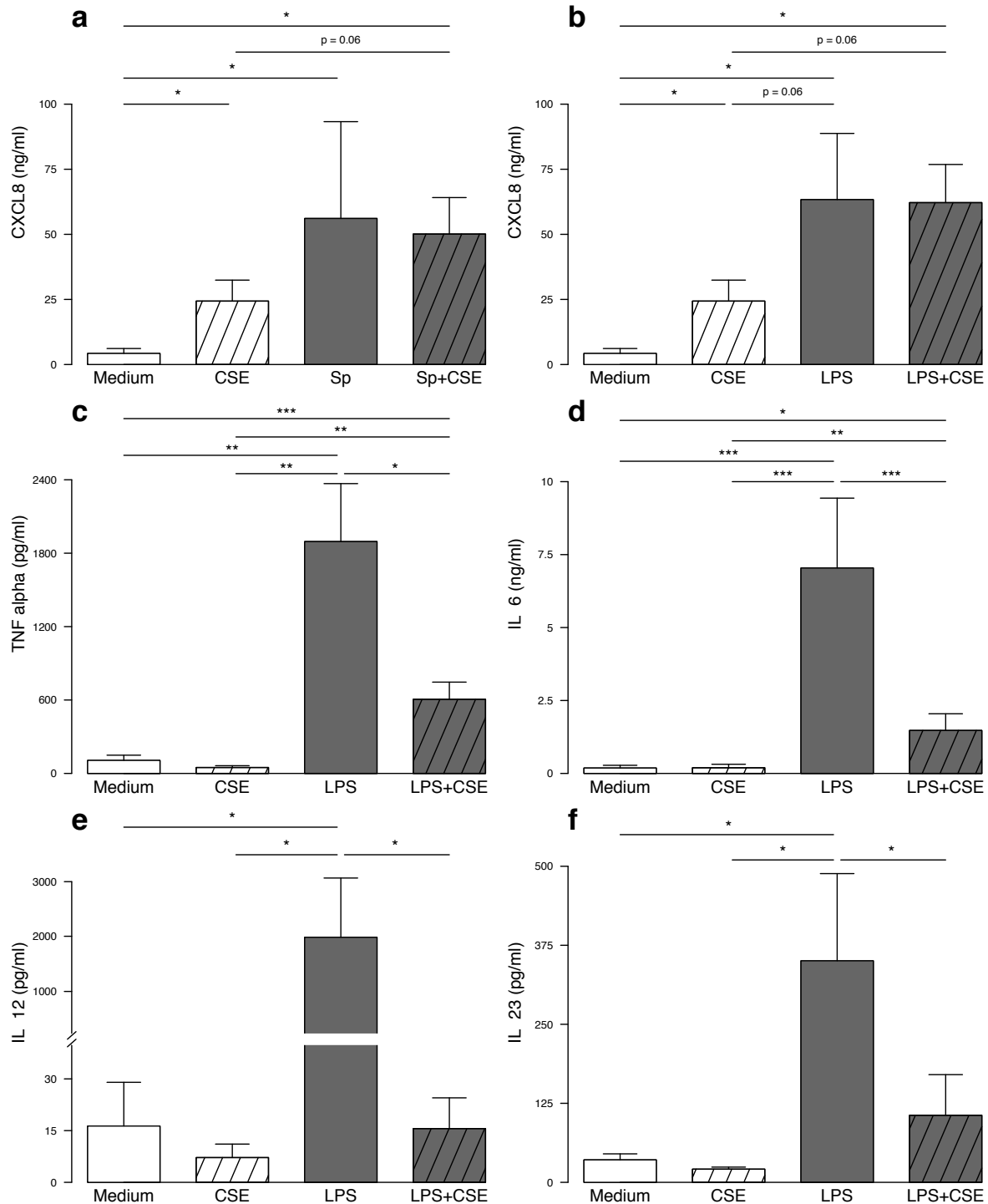
Primers	Forward	Reverse
β -actin	5'-TCCTCACCTGAAGTACCCCA-3'	5'-AGCCACACGCAGCTCATTGT-3'
HO1	5'-ATGGCCTCCCTGTACCACATC-3'	5'-TGTTGCGCTCAATCTCCTCCT-3'

Additional file 2



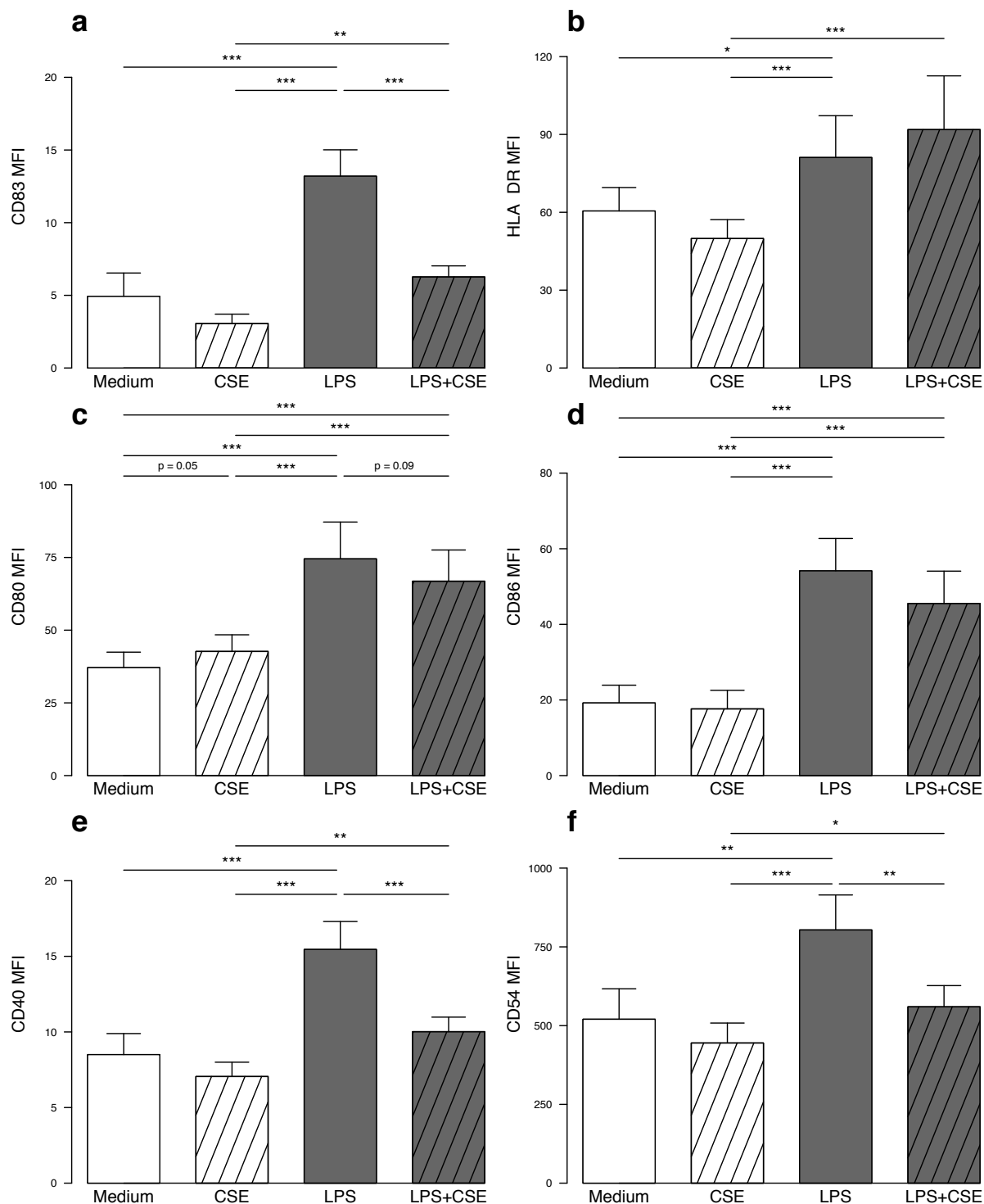
Additional file 2: *S.pneumoniae*-induced CXCL8 secretion by PBMC from non-smoker healthy subjects (n=14), smokers without COPD (n=13) and COPD patients (n=9). Supernatants were collected after 24h incubation without stimulation (white columns) or after addition of *S.pneumoniae* (black column). Data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

Additional file 3



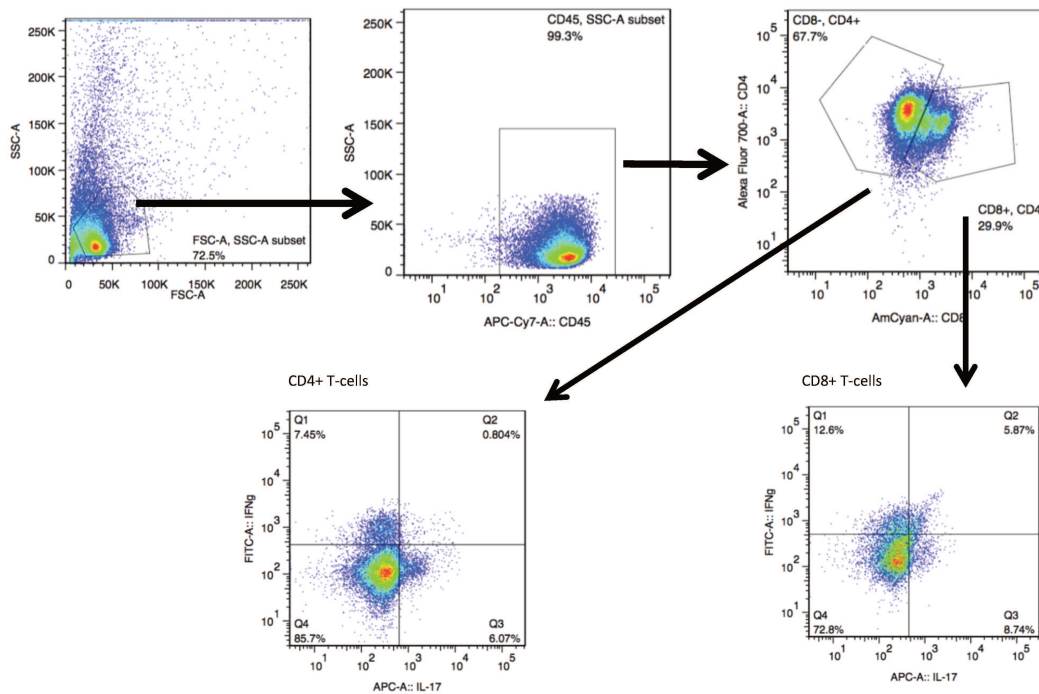
Additional file 3: In vitro exposure to cigarette smoke extract (CSE) modulate the secretion of cytokines by monocyte-derived dendritic cells (MDDC) from healthy subjects activated by (a) *S. pneumoniae* (Sp) or by (b-f) LPS. Levels of (a-b) CXCL8, (c) TNF alpha, (d) IL-6, (e) IL-12 and (f) IL-23 were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

Additional file 4

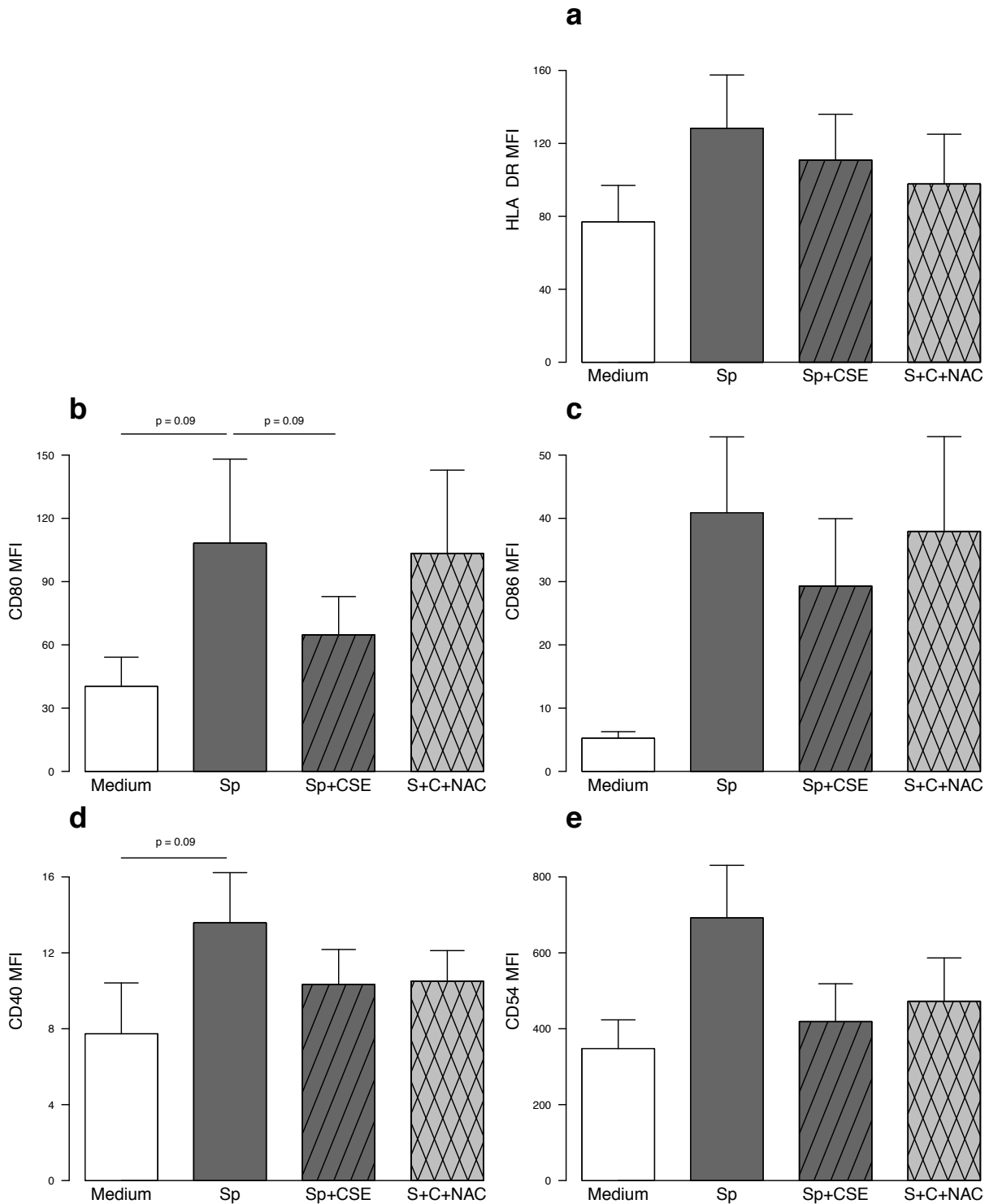


Additional file 4: In vitro exposure to cigarette smoke extract (CSE) modulate the phenotype of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) from healthy subjects activated by LPS. Expression of (a) CD83, (b) HLA-DR, (c) CD80, (d) CD86, (e) CD40 and (f) CD54 was evaluated by flow cytometry in MDDC exposed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

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

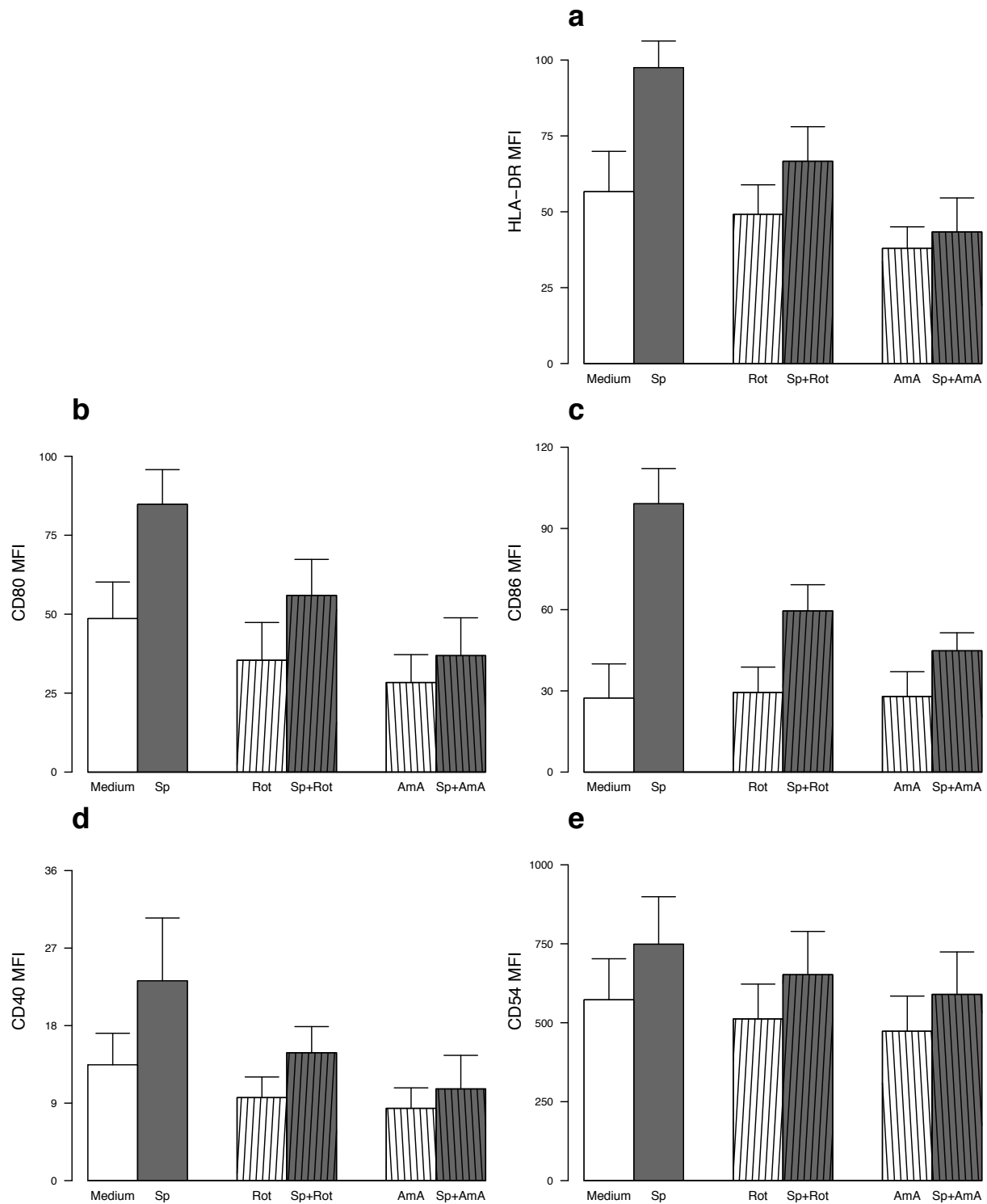


Additional file 6



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

Additional file 7



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

1.9. Principaux résultats

Ce travail a permis de montrer que l'exposition des cellules dendritiques humaines à la fumée de cigarette induit à la fois un défaut de maturation, de production de cytokines pro-Th1 et pro-Th17 et d'activation des lymphocytes T se traduisant par une réduction de la production d'IFN- γ , d'IL-17A et d'IL-22. Ces effets délétères ne semblent pas complètement liés au stress oxydant cytoplasmique ou au stress mitochondrial occasionné par la fumée de cigarette même si ces processus modulent l'activation de ces cellules. Malgré différents tests, nous n'avons pas pu identifier un mécanisme d'action unique de la fumée de cigarette permettant d'expliquer l'ensemble des effets observés. Nous pouvons supposer que cette exposition entraîne une modification de la phagocytose des bactéries comme nous l'avons montré dans cet article et ainsi provoquer des modifications au niveau de la mobilisation des récepteurs de reconnaissance et/ou des molécules de signalisation associées. De plus, l'exposition à la fumée de cigarette entraîne aussi un défaut de production d'IL-1 β et d'IL-23 par les cellules mononucléées de patients BPCO et pas chez les sujets fumeurs. Ces données montrent que l'altération de la fonction des DC est spécifique de la BPCO et suggère l'existence d'un mécanisme physiopathologique propre à ces patients.

2. L'exacerbation de la BPCO est favorisée par le défaut d'IL-22 au cours de l'infection par *Streptococcus pneumoniae*

Plusieurs défauts de la réponse immunitaire innée et adaptative ont été décrits au cours de la BPCO pour expliquer la susceptibilité aux infections bactériennes parmi lesquels une altération de la barrière épithéliale, une anomalie fonctionnelle des cellules ciliées, une augmentation des cellules à mucus et un défaut de phagocytose dans les macrophages alvéolaires. La BPCO est aussi associée à des modifications de la réponse lymphocytaire avec une activation chronique des lymphocytes T et des cellules lymphoïdes innées. Cette activation chronique de ces cellules notamment par l'exposition par la fumée de cigarette pourrait être associée à un désensibilisation de ces cellules vis à vis de la réponse aux bactéries. C'est pourquoi, nous avons mesuré le niveau d'expression de l'IL-17A et de l'IL-22, 2 cytokines essentielles dans la défense antibactérienne du poumon. Pour cela, nous avons développé un modèle d'exacerbation de la BPCO par *Streptococcus pneumoniae* chez des souris ayant été exposées à la fumée de cigarette pendant 12 semaines. Une fois avoir montré l'existence d'un défaut de production d'IL-17A et d'IL-22 en réponse à *Streptococcus pneumoniae*, nous avons recherché le mécanisme d'action en se focalisant sur le rôle des cellules présentatrices d'antigène et en particulier des cellules dendritiques pulmonaires et des macrophages alvéolaires. De plus, nous avons souhaité valider cette observation expérimentale chez les patients BPCO en mesurant la capacité des cellules mononucléées à produire les cytokines Th17 après exposition au pneumocoque. Deux groupes contrôles ont été inclus avec des sujets contrôles non-fumeurs et des sujets fumeurs sans signe clinique de BPCO.

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

Muriel Pichavant, PhD^{1,2,3,4,5}, Riti Sharan, PhD^{1,2,3,4,5}, **Olivier Le Rouzic**, MD^{1,2,3,4,5,6}, Cécile Olivier, MD^{1,2,3,4,5,6}, Florence Hennegrave, MD^{1,2,3,4,5,6}, Gaëlle Rémy, PhD^{1,2,3,4,5}, Magdiel Pérez-Cruz, PhD^{1,2,3,4,5}, Bachirou Koné, MSc^{1,2,3,4,5}, Pierre Gosset, MD⁷, Nicolas Just, MD⁸, Philippe Gosset, PhD^{1,2,3,4,5}

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

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

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

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

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

⁶ Service de Pneumologie, Hôpital Calmette, CHRU, Lille, France ;

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

⁸ Service de Pneumologie, Hôpital Victor Provo, Roubaix, France.

Corresponding author:

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

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

Article publié dans EBioMedicine 2 (2015) 1686-1696

2.1. Abstract

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

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

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

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

2.2. Introduction

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

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

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

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

2.3. Material and Methods

2.3.1. Mice

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

2.3.2. Patients with COPD

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

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

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

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

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

2.3.3. Reagents and Antibodies

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

2.3.4. Primers

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

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

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

2.3.5. Infection by *Streptococcus pneumoniae* and bacterial counts

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

2.3.6. Assessment of airway inflammation

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

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

IgG1 mAb. Cells were acquired on a Fortessa cytometer (Becton Dickinson), and analyzed using the FlowJo software.

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

2.3.7. Cell sorting and cocultures

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

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

2.3.8. Statistical analysis

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

2.4. Results

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

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

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

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

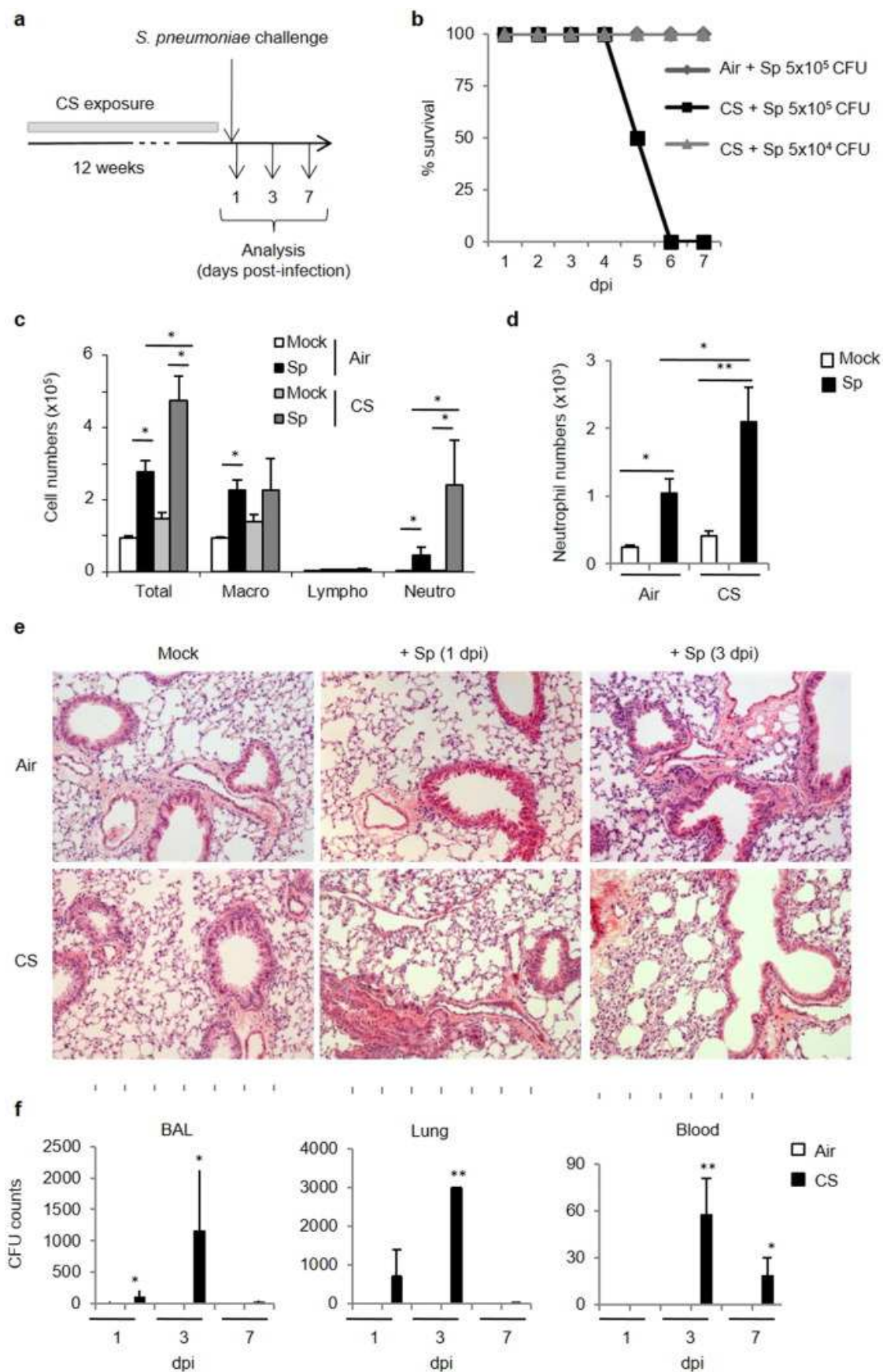


Figure 1- CS-exposed mice are more susceptible to *S. pneumoniae*.

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

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

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

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

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

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

2.4.3. CS exposure alters the function of pulmonary APC

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

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

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

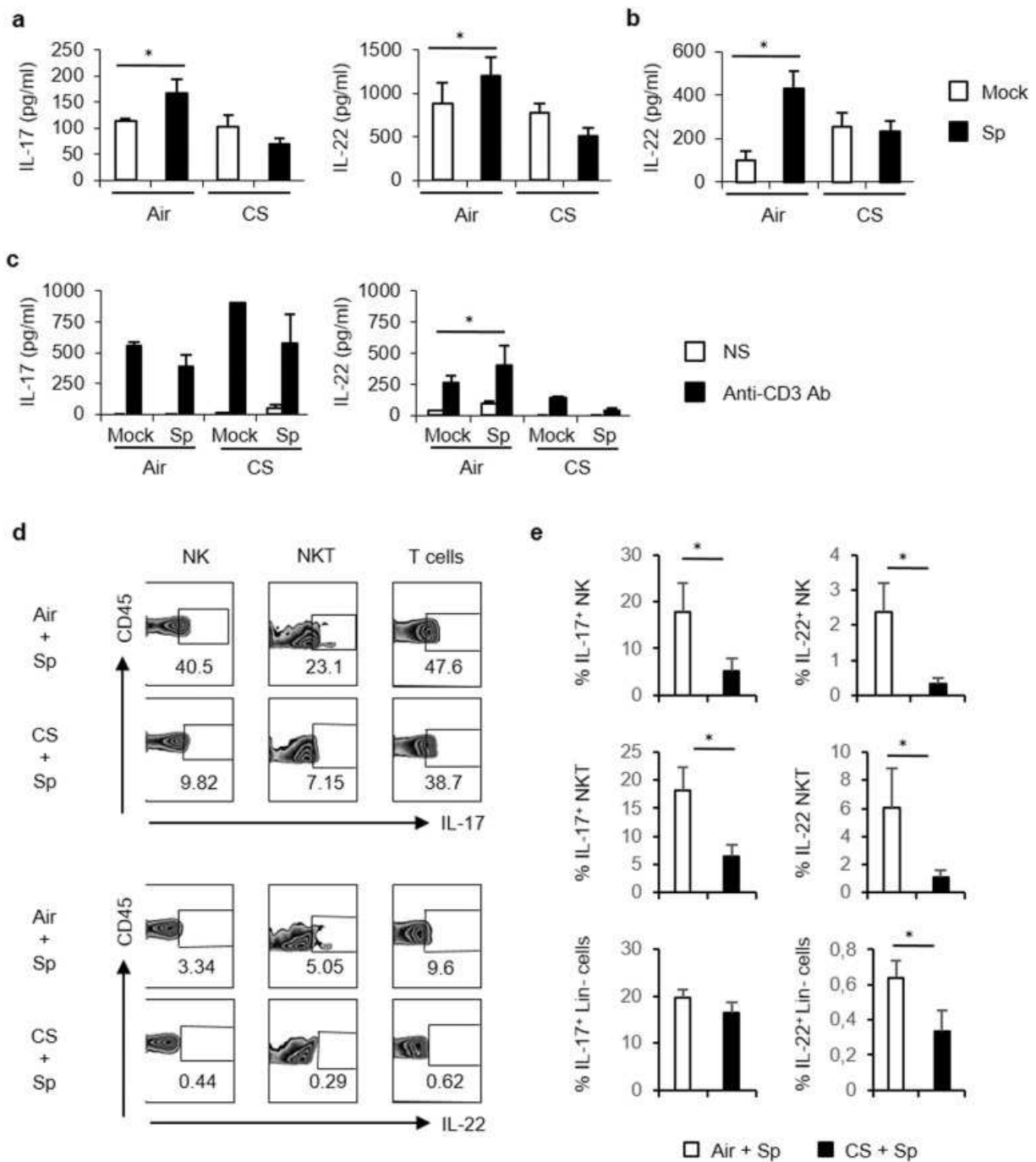


Figure 2- CS-exposed mice exhibit a defective immune response to *S. pneumoniae*.

Mice were chronically exposed to air or CS over a period of 12 weeks and then intranasally challenged with 5×10^4 CFU of *S. pneumoniae* (Sp) or with PBS (Mock). IL-17 and IL-22 levels were evaluated in BAL fluids (a), blood (b) and in the supernatants of restimulated pulmonary cells without (NS) or with anti-CD3 Ab (c). IL-17 and IL-22 producing cells were identified by intracellular staining among pulmonary NK cells (CD45⁺ TCR β ⁻ NK1.1⁺), NKT-like cells

(CD45+ TCR β + NK1.1+), T cells (CD45+ TCR β + NK1.1-) and Lin-negative cells (CD45+ CD3- CD11c- CD11b- CD45Rb- NK1.1- CD90.2+ CCR6+) cells (d and e). We have reported representative dot blot of the selected sub-populations and percentages of cytokine+ cells among the respective cell population are represented (c). The mean percentage of IL-17+ and IL-22+ cells was calculated for NK, NKT and Lin- cells (d). Results are expressed as mean \pm SEM (n= 48-80 mice per group). One representative experiment out of three independent ones is shown concerning intracellular staining. *: p<0.05 vs controls (one-way ANOVA test).

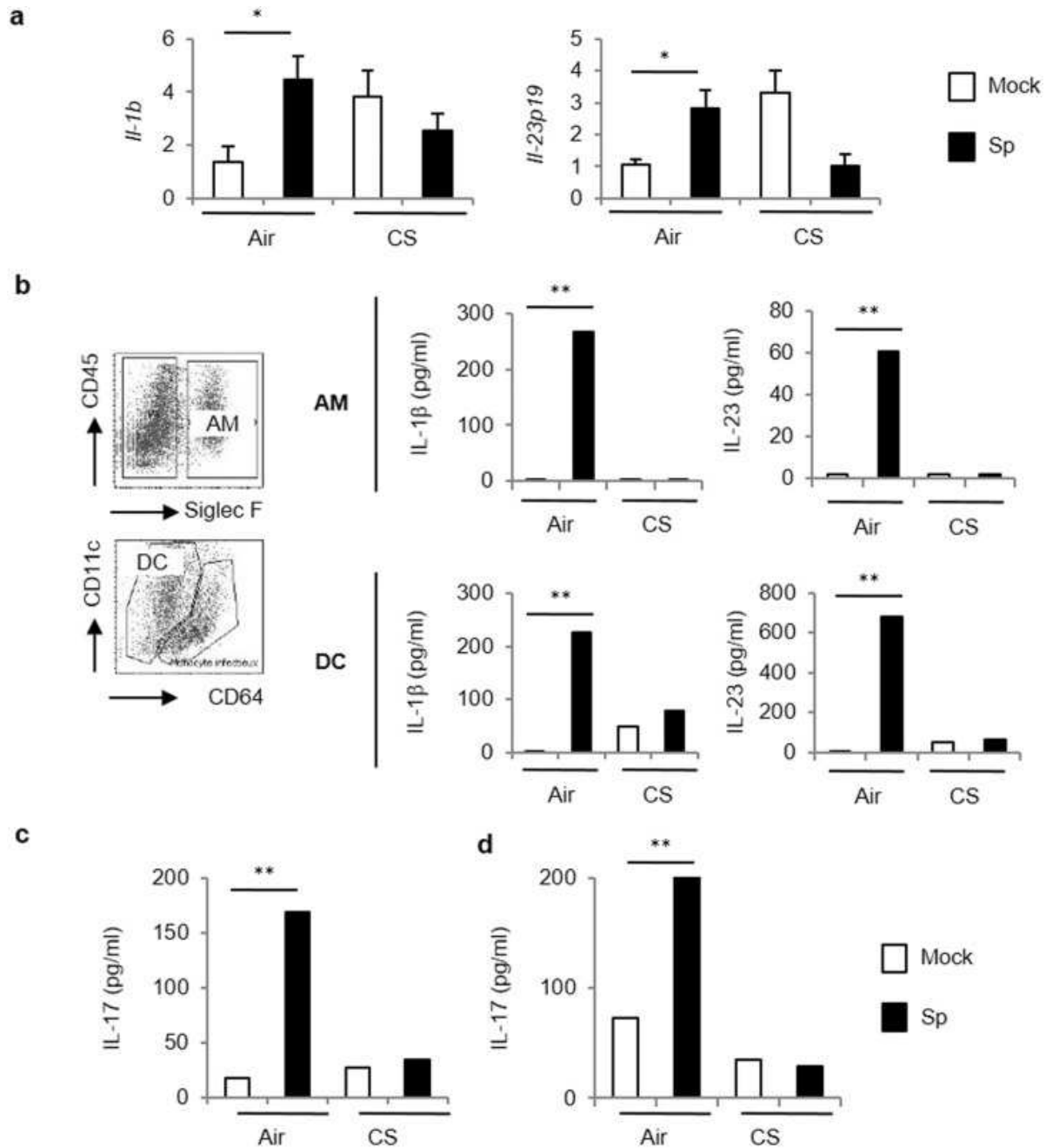


Figure 3- CS-exposed mice exhibited a defective response of pulmonary APC to *S. pneumoniae*.

Mice were chronically exposed to air or CS over a period of 12 weeks and then intranasally challenged with 5×10^4 CFU of *S. pneumoniae* (Sp) or with PBS (Mock). IL-1b and IL-23 mRNA levels were measured in lung tissues 24h post-infection (a). CD45⁺ Siglec F⁺ AM and CD11c⁺ Ia⁺ CD64⁺ DC were sorted by flow cytometry 24 hours post-infection. IL-1 β and IL-23 levels were evaluated by ELISA in supernatants 24 hours later (b). Cocultures were performed between sorted AM (c) or DC (d) and splenic CD4⁺ T cells purified from air mice. Supernatants were collected 48 hours later and levels of IL-17 were evaluated by ELISA. Data represent mean \pm SEM (n=6-10 mice per group per experiment). One representative experiment out of three ones is shown concerning cell sorting and cocultures with T cells.

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

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

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

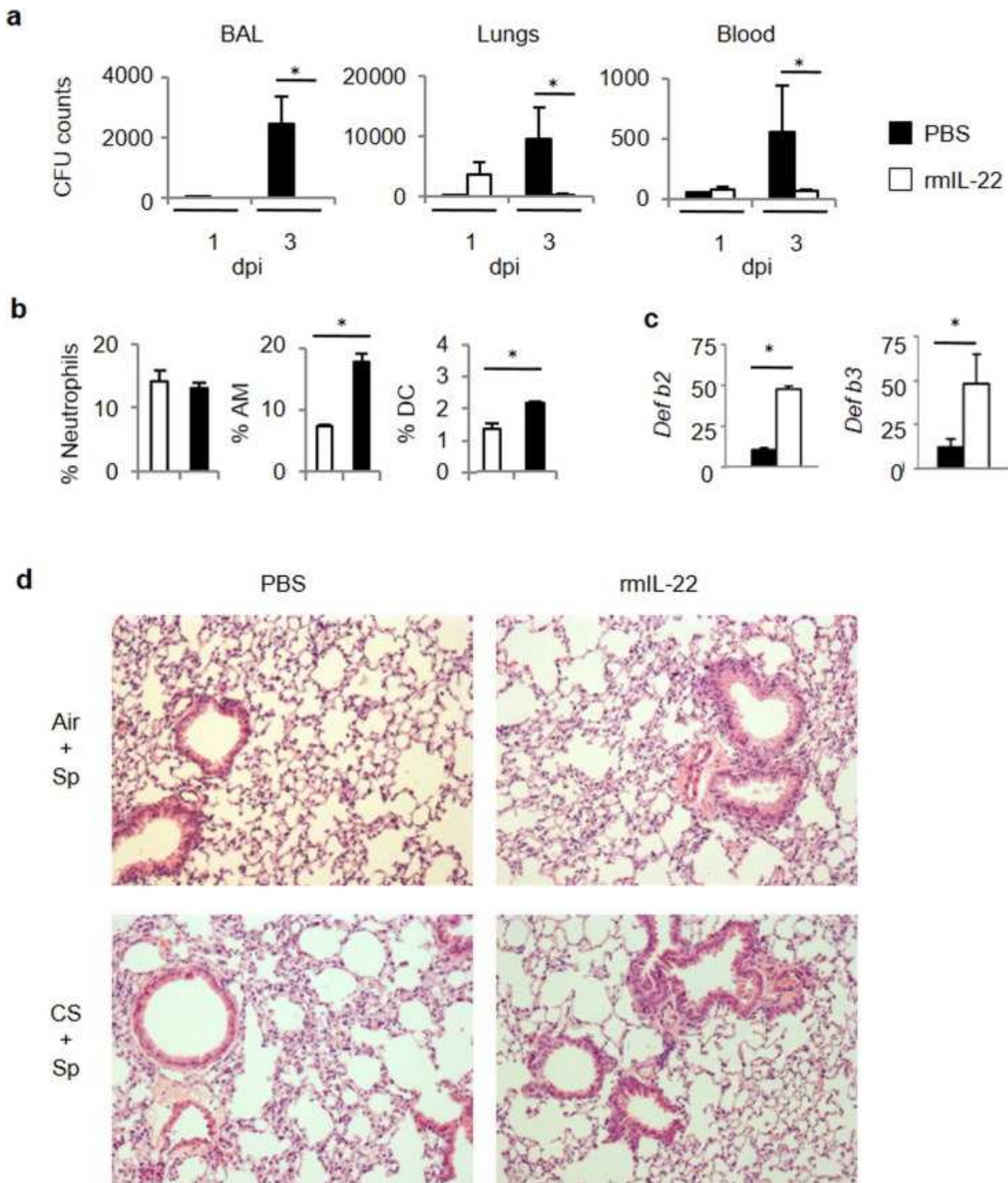


Figure 4- Exogenous IL-22 improves the clearance of *S. pneumoniae* in CS-exposed mice.

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

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

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

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

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

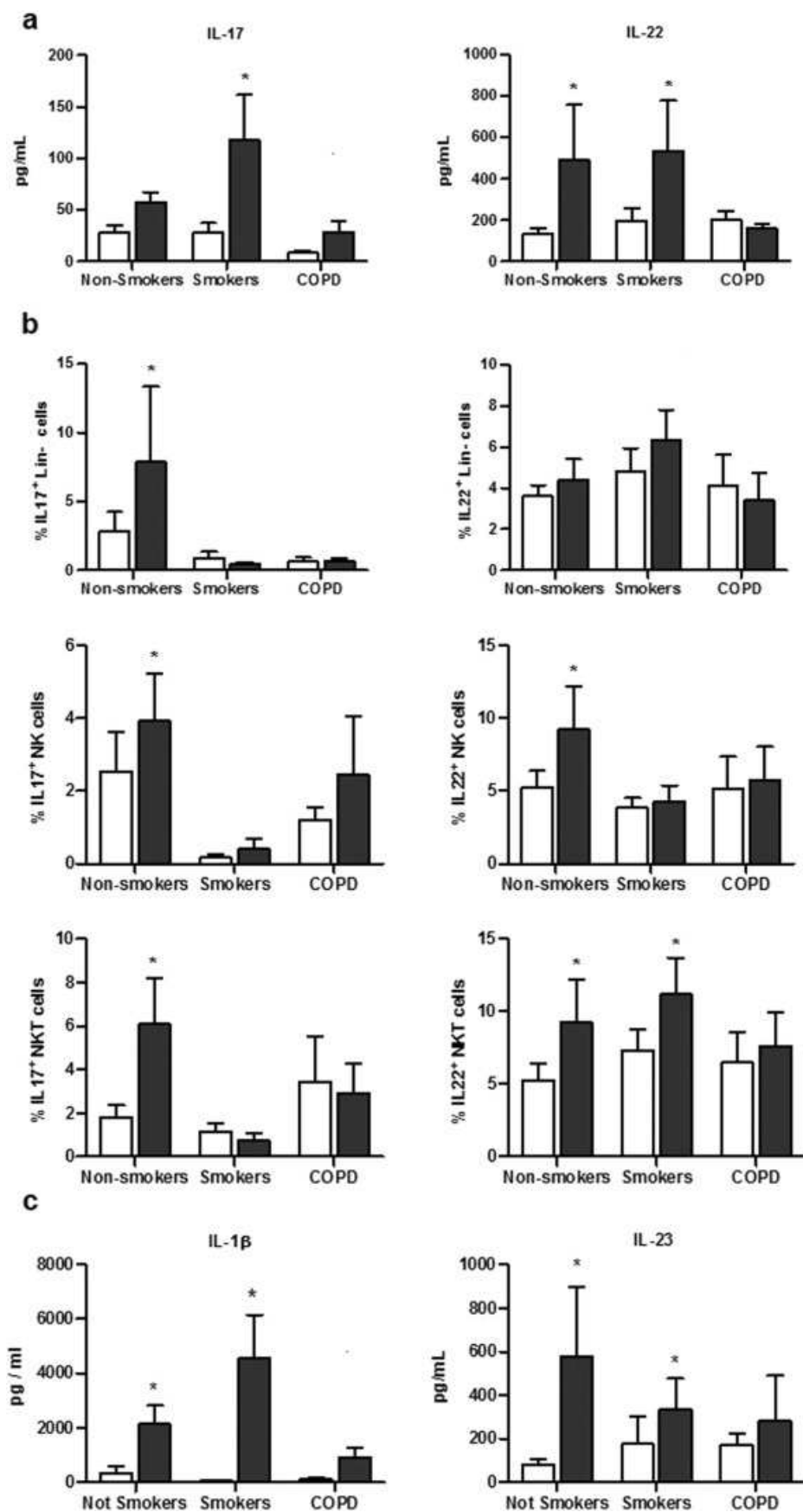


Figure 5- COPD patients have a defective cytokine response to *S. pneumoniae*.

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

2.5. Discussion

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

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

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

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

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

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

2.6. References

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

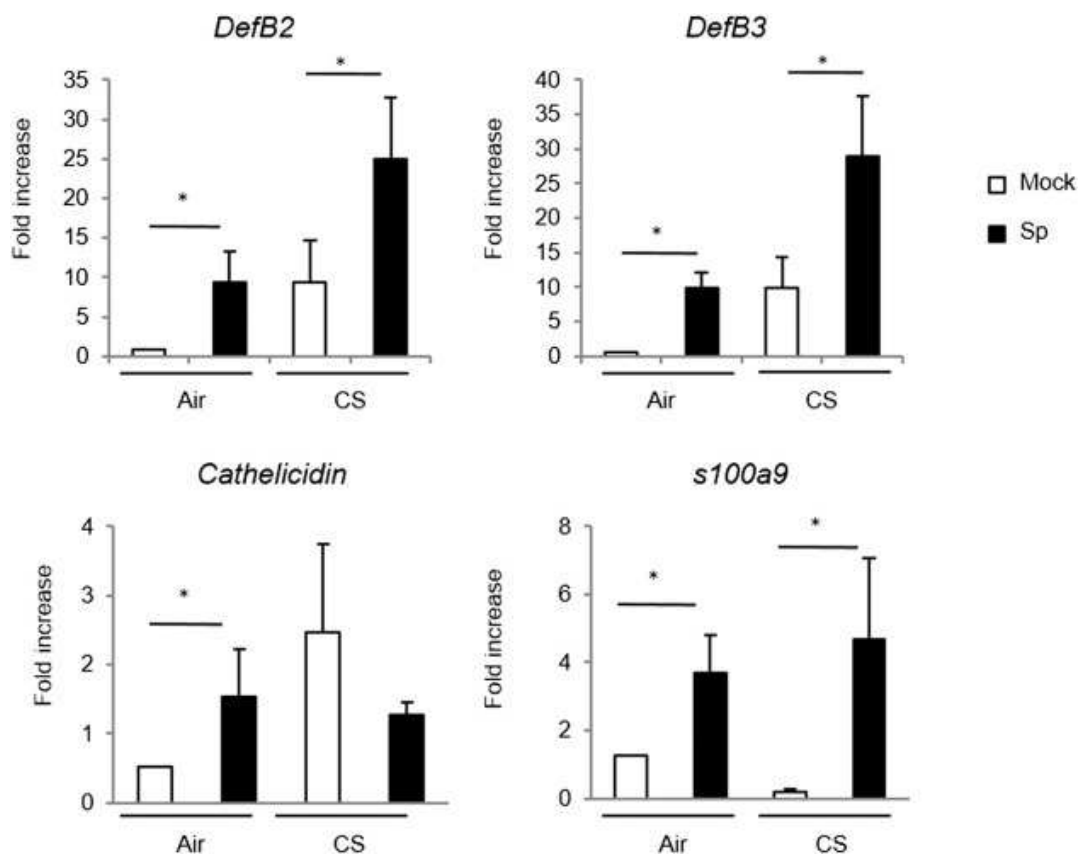
13. Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah, and R. Sabat. 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21:241-254.
14. Sonnenberg, G. F., L. A. Fouser, and D. Artis. 2011. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces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

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

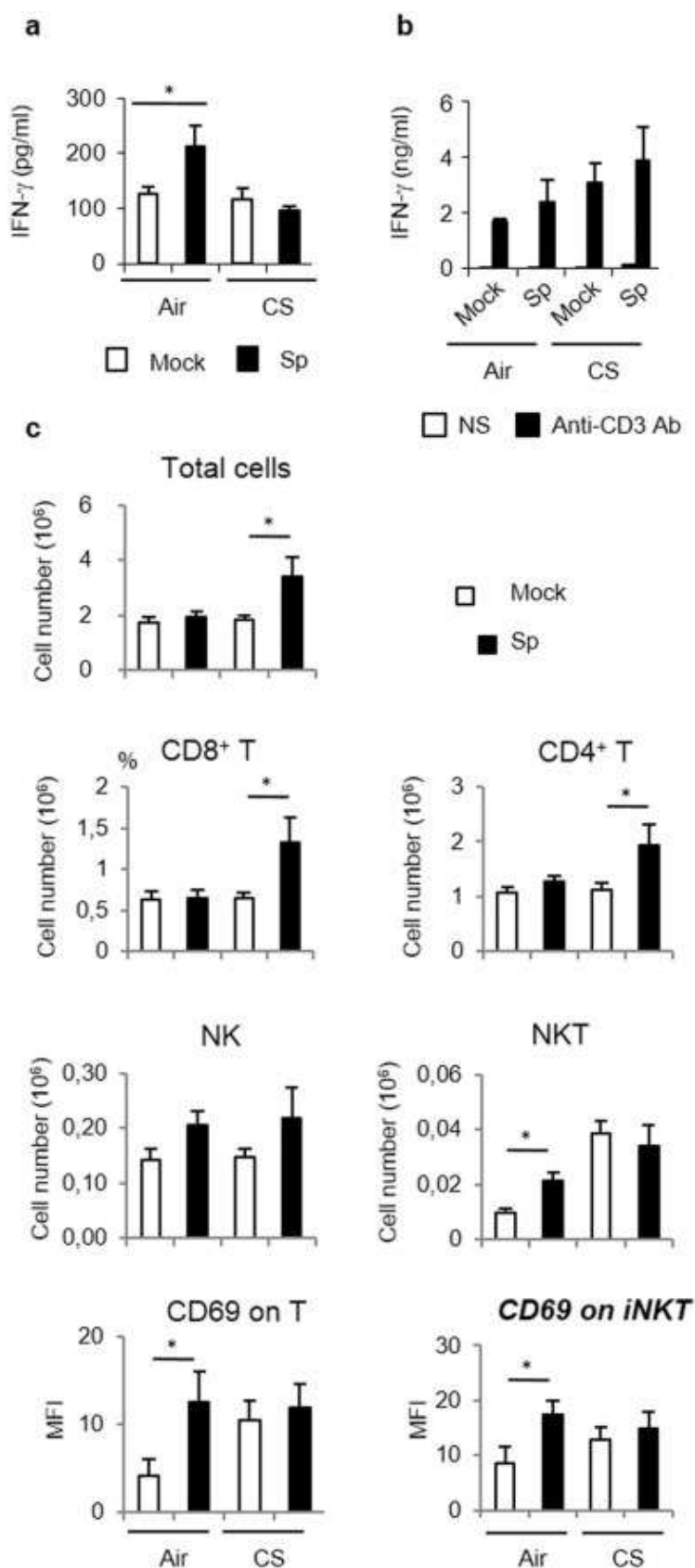
37. Cash, H. L., C. V. Whitham, C. L. Behrendt, and L. V. Hooper. 2006. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313:1126-1130.
38. Pace, E., M. Ferraro, M. I. Minervini, P. Vitulo, L. Pipitone, G. Chiappara, L. Siena, A. M. Montalbano, M. Johnson, and M. Gjomarkaj.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

2.7. Supplemental data

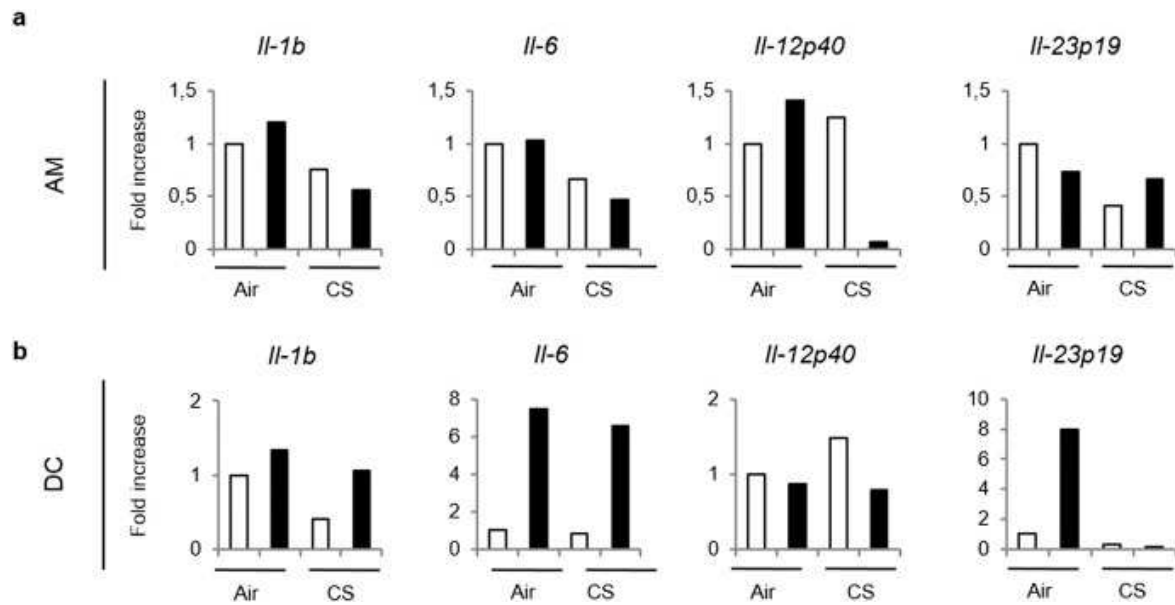
Supplemental Figure 1



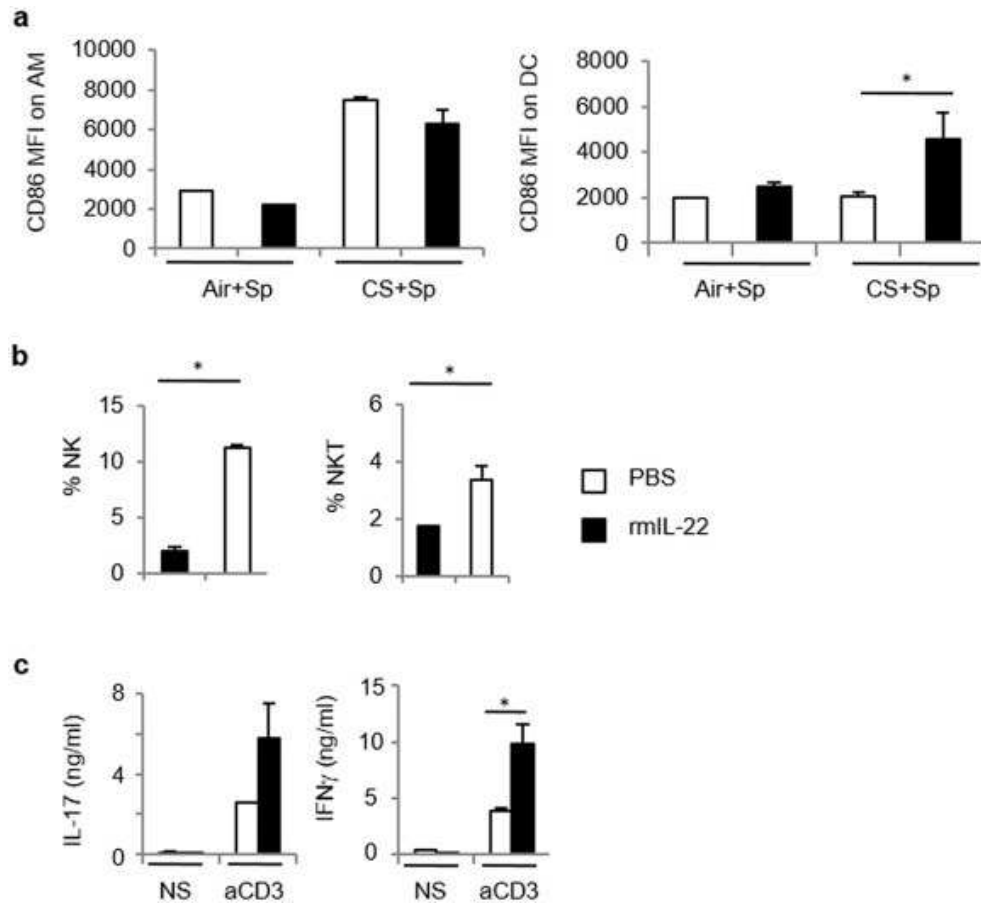
Supplemental Figure 2



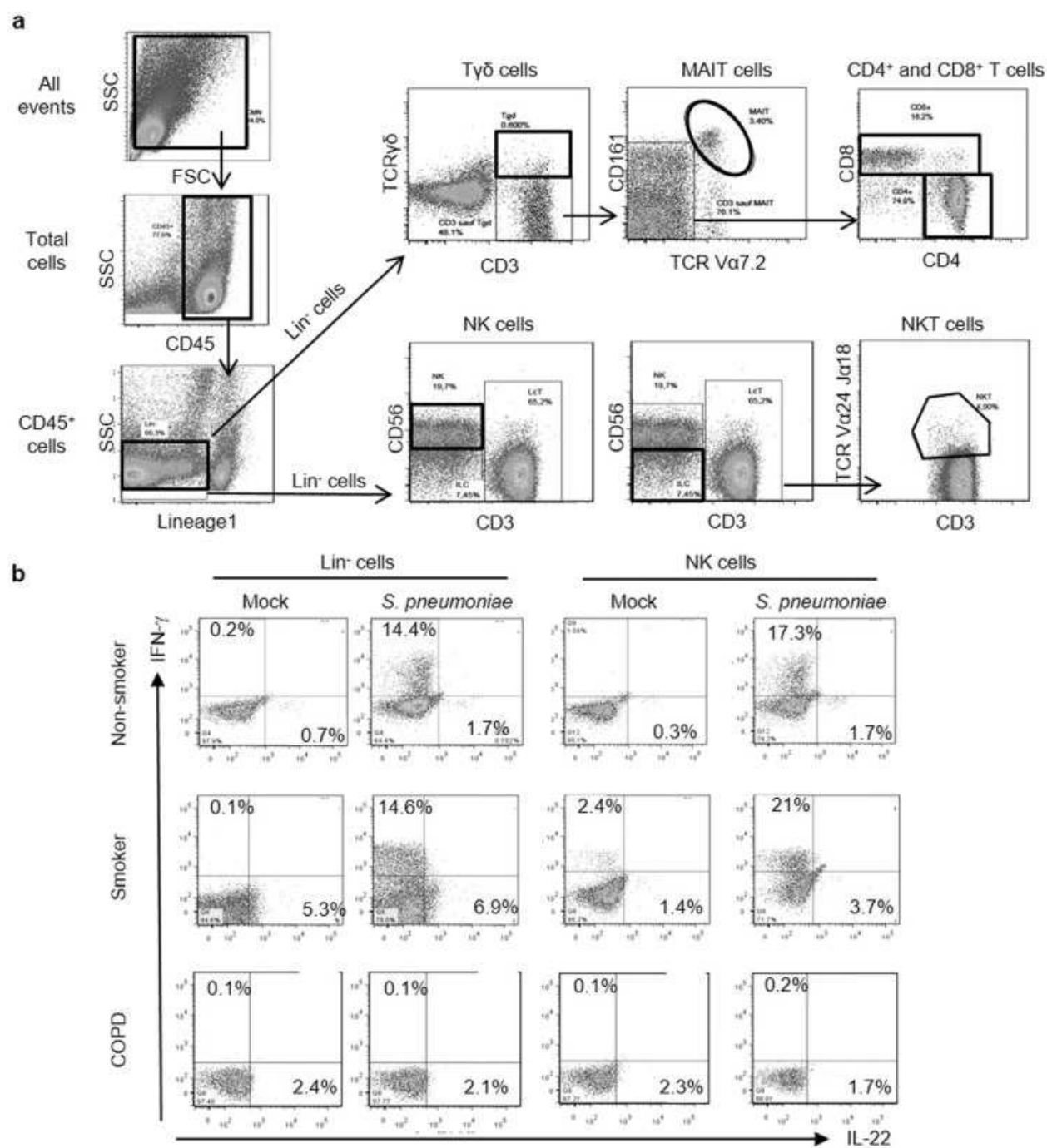
Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 5



2.8. Principaux résultats

Ces données montrent que la production des cytokines Th17 en réponse à *Streptococcus pneumoniae* est altérée à la fois dans le modèle expérimental murin de BPCO et *in vitro* dans les cellules mononucléées de patients atteints de BPCO. Ce défaut de réponse touche essentiellement les cellules NK et NKT et dans une moindre mesure les cellules T conventionnelles. Nous avons aussi démontré le mécanisme d'action en mettant en évidence une réduction de la production d'IL-1 β et d'IL-23 par les cellules présentatrices d'antigènes des souris exposées de façon chronique à la fumée de cigarette. Cela se traduit par une incapacité de ces cellules à induire une production d'IL-17A par les cellules T. Un défaut similaire d'expression de ces cytokines pro-Th17 a été retrouvé chez les cellules mononucléées circulantes stimulées par *Streptococcus pneumoniae* de patients atteints de BPCO. Il nous reste cependant à identifier le mécanisme par lequel se développe ce défaut de réponse des cellules présentatrices d'antigène. Nous pouvons supposer que l'exposition à la fumée de cigarette participe à cette altération de la fonction de ces cellules. De plus, les causes de l'exacerbation ne sont pas uniquement liées à *Streptococcus pneumoniae* et elles impliquent d'autres bactéries, en particulier *Haemophilus influenzae* non typable, une bactérie impliquant des mécanismes d'activation très différents de ceux de *Streptococcus pneumoniae*. Un autre modèle d'exacerbation de la BPCO par *Haemophilus influenzae* non typable a été développé pour analyser si ce défaut est également retrouvé dans ce contexte.

3. Les cytokines Th17 dans la BPCO, revue de la littérature (en préparation)

Dans les deux travaux expérimentaux présentés dans ce document, nous démontrons que la BPCO s'accompagne d'un défaut d'expression d'IL-17A et d'IL-22 en réponse à *Streptococcus pneumoniae*. De plus, le laboratoire vient de montrer que la réponse à *Haemophilus influenzae* non typable est également diminuée avec un défaut spécifique d'IL-22. Parallèlement à cela, il est maintenant bien établi que ces mêmes cytokines participent au développement de la BPCO. Cette discordance apparente implique vraisemblablement des voies de signalisation différentes qui pourraient s'antagoniser.

Ces données suggèrent de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient être utilisées soit pour bloquer le développement de la BPCO, soit pour limiter les conséquences de l'exacerbation. Afin de clarifier ces différents processus et de bien évaluer l'impact de ces données sur le développement de nouvelles thérapeutiques, il nous a semblé important de faire une mise au point sur les données disponibles concernant le rôle des cytokines IL-17A / IL-22 dans la BPCO. Nous avons ainsi décortiqué les mécanismes très différents régissant le développement de la BPCO et ceux conduisant à l'augmentation de la susceptibilité à l'infection chez ces patients et à l'exacerbation de la pathologie.

Manuscrit de travail en vue d'une soumission dans European Respiratory Journal.

**Th17 cytokines in Chronic Obstructive Pulmonary Disease:
the good and the bad faces of Dr Jekyll and Mr Hydes!**

Premier auteur : Olivier Le Rouzic^{1,2,3,4,5}

Dernier auteur : Philippe Gosset^{1,2,3,4}

Autres auteurs : Emilie Frealle^{1,2,3,4,6}, Muriel Pichavant^{1,2,3,4}, Antoine Guillon^{7,8,9}, Mustapha Si-Tahar^{8,9} (ordre non défini)

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

² CNRS, UMR 8204, F-59000 Lille, France

³ Inserm, U1019, F-59000 Lille, France

⁴ Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

⁵ CHU Lille, Service de Pneumologie Immunologie et Allergologie, F-59000 Lille, France

⁶ CHU Lille, Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale, F-59000 Lille France

⁷ CHRU de Tours, Service de Réanimation Polyvalente, F-37000 Tours, France

⁸ Université François Rabelais de Tours, F-37000 Tours, France

⁹ Inserm, U1100 – Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, F-37032 Tours, France

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a chronic inflammatory disease of the airways mainly due to cigarette smoke exposure (1). The disease is characterized by persistent airway limitation that is usually progressive and punctuated by clinical exacerbations mainly related to viral and bacterial infections (2). These exacerbations have a strong impact on health status, exercise capacity, lung function and on mortality (3). Understanding underlying immune mechanisms responsible for disease progression and this susceptibility to infection is crucial to guide future therapeutics. As Th17 cytokines play a key role to drive protective immune response against mucosal infection, this review focuses on the role of Th17 cytokines, interleukin-17 (IL-17) and IL-22, in COPD pathophysiology and exacerbations (4).

3.1. Th17 immunity in the lung

Th17 cells is a new T cell subset differentiated from naïve CD4⁺ T cells stimulated with an antigen presented by antigen presenting cells (APC) in presence of IL-6 and IL-1 β in humans or IL-6 and TGF- β in mice (5). IL-23 will secondarily promote complete differentiation and sustained IL-17 production. Th17 cells but also innate cells like $\gamma\delta$ T cells, type 3 innate lymphoid cells (ILC3), natural killer (NK) or NKT cells produce IL-17A, IL-17F and IL-22 which are key cytokines in host immune response against mucosal infections (4). IL-17 family consists of six members but antimicrobial activity is mainly associated with IL-17A, IL-17F and IL-17A/F heterodimer members (6). IL-17A, IL-17F and IL-17A/F receptor is the IL-17 receptor A (IL-17RA)-IL-17RC complex. IL-22 is a member of the IL-10 family like IL-19 and IL-20, and is mostly coexpressed with IL-17 (7). IL-22 receptor is a heterodimer receptor complex composed of IL-22 receptor subunit 1 (IL-22RA) and IL-10R2 (8). Activation of IL-17 or IL-22 receptors expressed on bronchial epithelial cells induces secretion of neutrophils chemotactic factors as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) or chemokine CXC ligand (CXCL)8, cytokines like IL-6 and antimicrobial peptides such as β -defensins and S100 proteins (6,8). IL-22 contributes also to tissue protection and regeneration by inducing mucus-associated protein secretion from goblet cells and epithelial cells proliferation (7). However, neutrophil recruitment is mainly related to IL-17A and IL-17A/F as neutralization of IL-17F or IL-22 has no effects on it suggesting specific role of each cytokines which do not exclude inter-cytokine interactions (9). In particular, during bacterial infection IL-22 synergize with IL-17A to induce antimicrobial peptides and chemokine production (10). These cytokines have both beneficial and deleterious

effects that depend on their relative production (11). Therefore, differential expression of IL-17 and IL-22 is tightly regulated by different transcriptional factors including STAT3, ROR γ t, c-Maf and AHR which are activated by different combinations of cytokines including IL-1 β , IL-6, IL-23 or TGF- β suggesting an important driving role of APC that produce these cytokines (7).

3.2. IL-17 and IL-22 cytokines and COPD chronic inflammation (Figure 1)

Compared to nonsmokers (NS) and healthy smokers without airways obstruction (HS), blood IL-17A protein levels from COPD patients are higher whereas IL-22 concentration was higher in COPD and HS compared to NS (12). The blood concentrations of IL-17A but not IL-22 increased with COPD stages and are negatively correlated with airflow limitation measured by percentage of forced expiratory volume in the first second (FEV1%). This is associated with a higher number of Th17 cells and IL-17-producing CD8+ T-cells (Tc17) in the blood of COPD patients compared to NS and HS, these numbers being related with airflow limitation severity (13, 14). Interestingly, Th1 cells are elevated in blood from COPD and HS but are not correlated to airways obstruction suggesting that systemic Th17 inflammation may be more relevant in COPD physiopathology. In the airways, IL-17A and IL-22 concentrations increase with COPD severity (12). These levels of IL-17A in the sputum are correlated with those of neutrophil chemotactic mediators, CXCL8 and IL-6, concentration and with airway obstruction (15). Therefore, the first step of COPD physiopathology and particularly, the neutrophilic inflammation, seems strongly dependant of IL-17. Immunostaining of bronchial biopsies showed higher IL-17A, IL-17F and IL-22 positive cells in COPD patients including endothelial cells (16). As suspected, Th17 and Tc17 cells are more frequent throughout bronchial airways and in lung alveolar wall of COPD patients (17, 18). But in small airways, IL-17A and IL-17F positive cells included not only T cells but also neutrophils, mast cells and B-cells demonstrating the multiple cell sources of these cytokines in the disease (19). The formation of bronchial associated lymphoid tissue (BALT) is a characteristic feature during COPD physiopathology (20). IL-17A contribute to lymphoid follicles development via activation of CXCL12 but IL-17A positive cells are found in there periphery whereas IL-17F positive cells are throughout the follicles suggesting different roles for IL-17A and IL-17F related to the differentiation of T and B cells, respectively (19, 21).

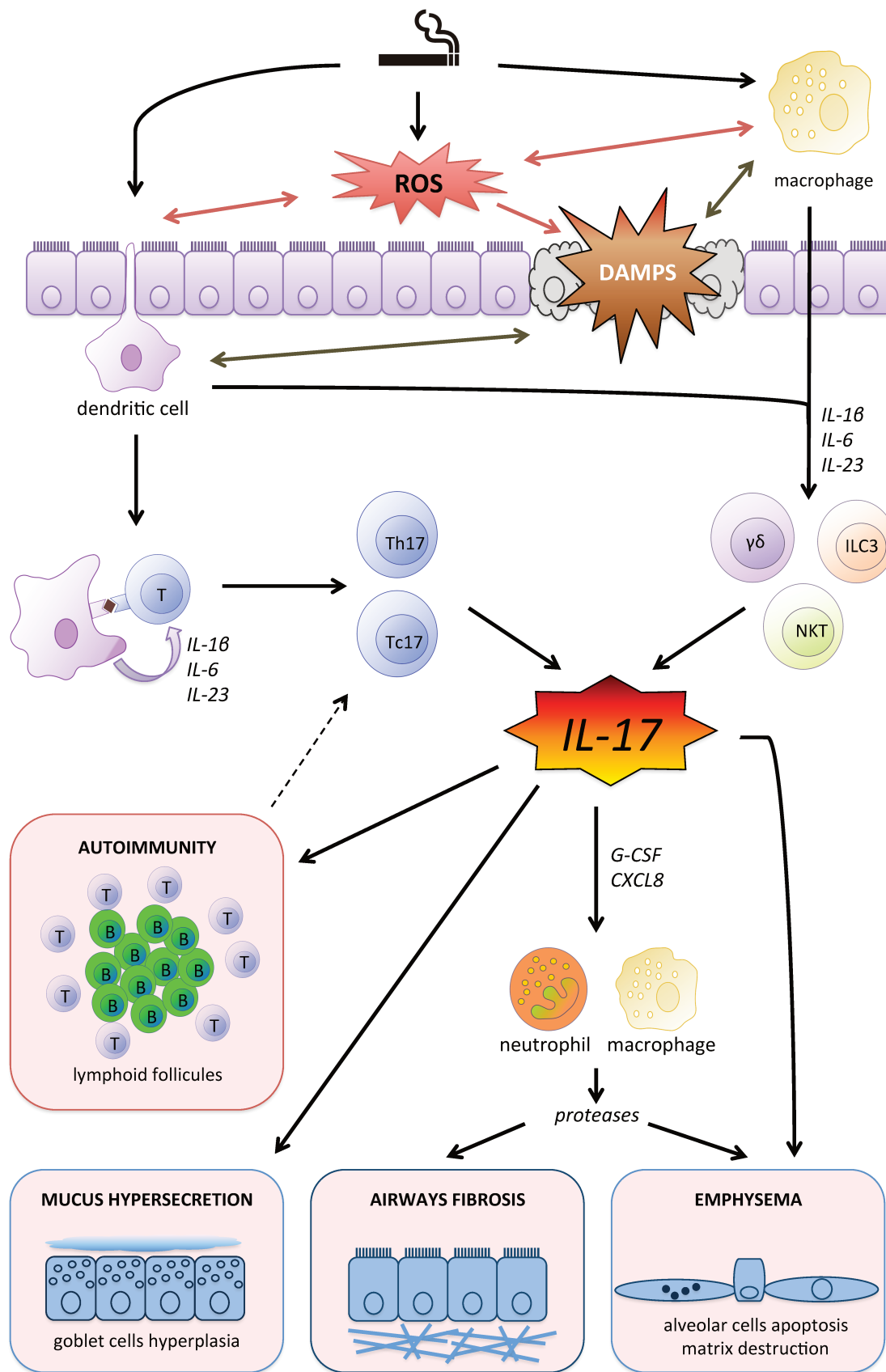


Figure 1: IL-17 in stable COPD physiopathology. ROS: reactive oxygen species, DAMPS: damage-associated molecular patterns, IL: interleukin, T: T-cell, B: B-cell, $\gamma\delta$: gamma delta T cell, ILC3: innate lymphoid cell type 3, NKT: natural killer T cell, G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor, CXCL8: interleukin 8.

In murine model, cigarette smoke induced expansion of Th17 and Tc17 cells (22). However, innate immune cells are also involved as there is an increased IL-17A production by NK cells, NKT and $\gamma\delta$ T-cells in cigarette smoke exposed mice with no detection in macrophages and neutrophils (23). We obtain similar results in our model of chronically exposed mice exhibiting expansion of IL-17A producing NKT (24). These production of IL-17A by these cells are important as cigarette smoke induced inflammation is reduced in *Il17a*^{-/-} mice or when using neutralization of IL-17A (23). In our hands, mice deficient in NKT cells are unable to develop inflammation and lung function alteration at least during the first step of the exposure to CS. Similar findings has been suggested for $\gamma\delta$ T-cells that are an important cell sources for these cytokines (23).

The production of IL-17 is controlled by regulatory cytokines including IL-10 and TGF- β (25). Interestingly, sputum IL-10 concentrations are lower in COPD patients and negatively correlated to airways obstruction (12, 15). This change of the balance between IL-10 and IL-17A was shown to be related to decreased activity of indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), a tolerance inducer with abilities to control oxidative stress, in COPD patients (15). Conversely, Kalathil *et al.* reported an increased concentration of IL-10 and TGF- β in plasma of COPD patients associated with an increased regulatory activity in circulating T cell although this study did not included smokers as controls (26). In our hands, in vivo exposure to cigarette smoke induced IL-10 expression in the lung and *il10*^{-/-} mice exposed to cigarette smoke have a higher IL-17 response associated with a more severe alteration of lung function (Manuscript in preparation).

We can hypothesized that COPD physiopathology implicates two waves of Th17 cytokines production, a first one related to activation of innate immune cells and a second one associated to the development of Th17 cells. This might also correspond to different mechanisms of production since innate lymphocytes are quickly activated by airway epithelial cells and dendritic cells (DC) exposed to cigarette smoke. In contrast, the development of Th17 cells requires a more complex process probably involving auto-immune response and an alteration of the regulatory mechanisms.

3.3. Role of IL-17 and IL-22 in airway hyperreactivity

Association between IL-17 and airway obstruction was confirmed in different experimental models. Kim *et al.* showed that wild-type but not *Il17*^{-/-} mice fed with a high fat diet for 12 weeks develop airway hyperreactivity (27). This effect was dependent of expansion of innate lymphoid cells producing IL-17A (ILC3) induced by IL-1 β , a cytokine which is elevated in COPD patients (28). Interestingly, high fat diet fed *Rag*^{-/-} mice also developed airway hyperreactivity demonstrating that this effect was independent of adaptive immune cells production of IL-17. Similar results were obtained in mice models exposed to different environmental toxics. Pichavant *et al.* showed that wild-type mice exposed 5 days to ozone develop airway hyperreactivity (29). This was associated with neutrophil increase and dependent of NKT activation and of IL-17. More recently, we confirmed the involvement of IL-17A produced by iNKT in airway hyperreactivity pathogenesis in a model of mice exposed 12 weeks to cigarette smoke, an effect that depended on iNKT activation by CD11b⁺ DC and on oxidative stress (24). In a model of 3-days cigarette smoke exposure, Li *et al.* showed that injection of recombinant IL-22 alone or in association with cigarette smoke induced airway hyperreactivity with increased IL-17A and neutrophils demonstrating possible deleterious effects of this cytokine (30). Finally, McGovern *et al.* showed in a model of mice exposed to chlorine that airway hyperreactivity development was dependent of neutrophils (31). Interestingly, the relationship was conformed by the correlation between IL-17A concentrations with sputum neutrophil counts (12). Altogether, these data suggest that Th17 cytokines produced by innate immune cells in inflammatory context will induce airway obstruction through neutrophil recruitment.

3.4. Role of IL-17 and IL-22 in emphysema

Emphysema is the consequence of alveolar wall destruction, which is common in COPD (32). Harrison *et al.* showed in a mouse model exposed six months to cigarette smoke that increase of CCR6 positive Th17 cells was associated with airspace enlargement (33). As Bracke *et al.* had already demonstrated that *Ccr6*^{-/-} mice were protected against cigarette smoke-induced emphysema, this suggests a pathogenic role of these cells (34). Molecular mechanisms of cigarette smoke-induced Th17 differentiation and activation are not fully clarified. In fact, Chen *et al.* showed in vitro that this differentiation is aryl-hydrocarbon receptor (AHR)-dependent (35). However, inflammasome activation seems to be also important as IL-17A induction is reduced in

Il1r1^{-/-} mice (36). Finally, cigarette smoke-induced microRNA miR-22 expression in antigen-presenting cells is also required to promote Th17 cell-dependent emphysema demonstrating that different pathways may be involved (37). Pathogenic role of IL-17A was confirmed by Kurimoto *et al.* showing that *Il17a*^{-/-} mice were protected against elastase-induced emphysema, an effect which is associated with reduced neutrophil chemotactic factors KC and MIP-2, and neutrophils (38). Furthermore, Chen *et al.* demonstrated that IL-17RA signaling is required for emphysema development (35). In their model, combination of IL-17 and IL-22 increased the expression of matrix metalloproteinases, molecules involved in tissue destruction (32). Moreover, IL-17A knockout (KO) mice and neutralization of IL-17A in wild-type (WT) mice reduced macrophage and neutrophil recruitment and chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), CCL3 and matrix metalloproteinase (MMP)-12 mRNA expression in response to acute CS exposure (23). These data suggest that IL-17A and IL-22 induce emphysema via proteases release by immune cells and epithelial cells (32, 39). However, Chang *et al.* demonstrated that cigarette smoke-induced IL-17A could also directly induce apoptosis of type II alveolar cells (40). Therefore, IL-17A and IL-22 promote emphysema through proteases production and alveolar cells apoptosis induction.

3.5. IL-17 and IL-22 in COPD exacerbations (Figure 2)

Under normal conditions without chronic inflammation, IL-17 and IL-22 are key factors to control extracellular bacterial and fungal infections (41–43). In COPD exacerbations, these cytokines are also important but their involvement seems to be more complex and may depend of the responsible pathogen. In a small clinical study, Andelid *et al.* showed that COPD patients with airway colonization by opportunistic pathogens exhibited lower blood IL-17A concentration (44). In their subgroup of patients with an exacerbation, blood IL-17A was undetectable. In another population, Zhang *et al.* showed decreased sputum IL-17A concentrations during COPD exacerbation correlated with disease severity (45). However, the interpretation of both studies were not possible since the exacerbation etiologies were not defined. Nontypeable *Haemophilus Influenzae* (NTHi) is the most common bacteria associated with COPD exacerbation (2). During NTHi-associated COPD exacerbation, Roos *et al.* described increased sputum IL-17A concentration (36). Despite decreased neutrophils recruitment in *Il17a*^{-/-} mice and in wild type mice treated with a neutralizing IL-17A antibody, no increased bacterial burden nor delayed bacterial clearance were observed showing that IL-17A was not involved in the protection against

NTHi during COPD. In contrast, we demonstrated in our murine model of COPD exacerbation by NTHi, a protective effect of IL-22 which is decreased in COPD mice compared to mice not exposed to cigarette smoke (46). *Streptococcus pneumoniae* is another bacteria frequently associated with COPD exacerbations (2). IL-17A and IL-22 was shown to be involved in protective host response against this bacteria and again, IL-22 seems to play a key role in protective effects (41, 42, 47). In addition, exposure to bacteria of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from COPD patients to *Streptococcus pneumoniae* did not increase IL-17 and IL-22 production in contrast with healthy non-smokers and smokers (48). We obtained similar results with our murine model and demonstrated that this defective IL-17A and IL-22 response was related to a reduced production of IL-1 β and IL-23 by AM and DC. In this context, we observed as previously shown with LPS, that cigarette smoke exposure altered the response of DC to *S. pneumoniae*, leading to a decreased ability to promote Th17 differentiation of T cells. Interestingly, *S. pneumoniae* exposure of PBMC including circulating DC from smokers without airways' obstruction was not associated with a defect in Th17 cytokine secretion in contrast with blood cells from COPD patients whereas the phenotype of lung DC was similarly modified in both populations (49). These data suggest that defective systemic response to bacteria is a specific feature of COPD which may be the consequence of the conjugate effect of exposure to CS, systemic chronic inflammation associated with the disease and/or host predisposition to develop the disease. Altogether, these data suggest that impaired balance between IL-17A and IL-22 with a defective production of the second is a main feature in COPD leading to bacterial infection and colonization of the airways.

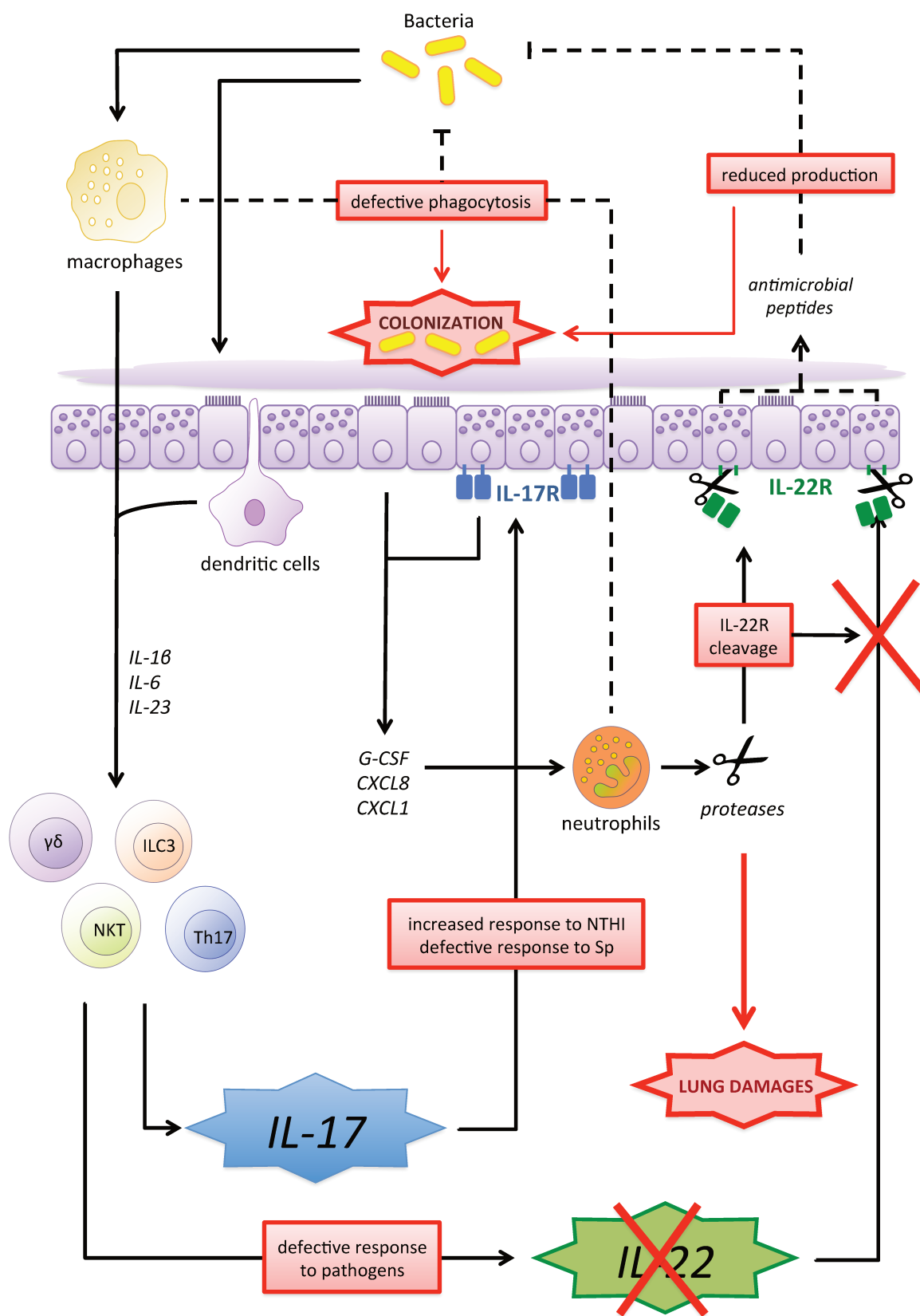


Figure 2: Defective IL-22 and differential IL-17 responses during COPD exacerbations. IL: interleukin, $\gamma\delta$: gamma delta T cell, ILC3: innate lymphoid cell type 3, NKT: natural killer T cell, G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor, CXCL8: interleukin 8, CXCL1: chemokine C-X-C motif ligand 1, IL-17R: IL-17 receptor, IL-22R: IL-22 receptor.

Viruses like influenza virus and rhinovirus (HRV) are also associated with COPD exacerbations (2). In wild-type mice non-exposed to cigarette smoke, influenza virus induce production of IL-17A and IL-22 by conventional T-cells and innate lymphoid cells with IL-22-dependent protective effects against secondary bacterial infection (42, 50, 51). Most of the effects of IL-22 in this context are related to its maintenance on the epithelial barrier and the effect on airway remodeling. However, we cannot exclude the modulation of the production of antimicrobial peptides. Conversely, Guillon *et al.* showed in a model of mice chronically exposed to cigarette smoke an alteration of IL-22-dependent signaling during influenza virus infection (52). In this model, influenza virus induced IL-22R expression on bronchial epithelial cells that was cleaved by neutrophil proteases leading to decrease production of antimicrobial peptides. This result was comforted by increased levels of soluble fragment of IL-22R in sputa from COPD patients with acute exacerbations. HRV are the most frequent viruses associated with COPD exacerbation which could be explained by defective immune response (2). In fact, IL-17A synergistically enhanced HRV-16-induced production of CXCL8 and β -defensin-2 and suppressed production of RANTES (53). However, antimicrobial peptide concentration in sputa from COPD patients during HRV-induced exacerbation were lower with an inverse correlation with bacterial load (54). Thus, in COPD, viruses infections may lead to increased inflammation and as a consequence to increased symptoms in the context of pre-existing IL-17A high levels. This may be associated with increased risk of subsequent bacterial infection due to altered antimicrobial peptides response to IL-17A and IL-22.

Although COPD patients are known to be at risk for invasive or chronic necrotizing aspergillosis (IA, CNA), no data are available on the role of Th17 response in fungal infections in COPD context (55, 56). Nevertheless, *Aspergillus fumigatus*, which is the main species responsible for these infections, has been shown to induce IL-17A, IL-17F and IL-22 secretion through the Dectin-1 dependent production of IL-1 β , IL-6 and IL-23 (57). A defective expression of Dectin-1 was also found in individuals with hematological malignancies who developed IA

when compared to patients who had no evidence of invasive fungal infection (58). These data suggest an important role for Th17 response in IA, and support a potential role for alterations of the Th17 response in *A. fumigatus* infections in the course of COPD.

3.6. Future Directions

On the whole, Th17 cytokines play important but opposite roles during both stable state and exacerbation of COPD. The IL-17A increase seems to be more related to chronic inflammation leading to airway obstruction and emphysema whereas the IL-22 defect seems to be responsible for the lack of control of infection either by bacteria and fungi but also with viruses. Thus, it seems essential to decipher the cytokine specific mechanisms implicated in these alterations.

As underlined above, the production of IL-17 implicate different cell sources and mechanisms of activation. Direct activation of antigen presenting cells (including airway epithelial cells) by cigarette smoke can lead to activation of NKT cells, a process blocked by preventive administration of anti-oxidants (24). Nevertheless, clinical trials evaluating the effects of the antioxidant N-acetylcysteine in COPD showed mixed results with significant reduction in exacerbations frequency but no clear changes in disease progression emphasizing the need of new therapeutic targets (59). The development of a Th17 response probably implicated the modification of self proteins responsible to the emergence of auto-immune reaction associated with an altered regulatory T cell function. Therefore, blocking IL-17A production seems to be a promising therapeutic target in COPD patients as reported in mice model since neutralizing IL-17 pathway minimizes structural changes associated with the disease without diminishing the control of bacterial infections. However these studies had a preventive design, additional studies are still needed to evaluate IL-17 pathway inhibition benefits when the disease is already established. Moreover, clinical data from patients treated for psoriasis with IL-17 inhibitors showed higher rates of infections and candidiasis suggesting that this treatment may be associated with higher exacerbations and/or fungal infections in the context of COPD (60). Therefore, further studies are needed to thoroughly evaluate benefit-risk of inhibiting IL-17 pathway in patients with already established COPD.

During bacterial and viral infection, the defect in IL-22 production associated with the defective response of APC (particularly AM and DC) seems to be a key feature of the exacerbation. However, we cannot exclude that this mechanism was also associated with a

dysfunction of lymphocytes as suggested in our model with NTHi (46). To decipher the mechanism responsible to the altered production and function of IL-22 seems essential in order to propose therapeutic approach in this context. As shown in by our data, this defect is related to an altered ability of APC to promote the production of IL-22 by lymphocytes. Although the oxidative stress did not seems as important, we can also suspect that exposure to cigarette smoke altered the phagolysosome trafficking which secondarily should impact on the signaling pathways triggered by bacteria. A dysregulation of the miRNA expression after exposure to cigarette smoke has been reported and is also implicated in DC dysfunction although their role during the exacerbation has not yet evaluated (37). In addition, we cannot exclude the generation of inhibitory factors such as IL-10 in this context. Interestingly, our data showed that IL-22 supplementation increases bacterial clearance and markedly reduces both the lung inflammation and the tissue lesions underlining the interest of an immuno-therapeutic approach aiming to boost this response to bacteria. Treatment able to restore an efficient response of APC to bacteria might be of great interest in this context. Two strategies might be planned: either to remove the block inhibiting the pro-IL-22 cytokine production or to boost IL-22 producing cells with immuno-stimulants. Some adjuvants such as Flagellin had the ability to promote the IL-22 response through the stimulation of an axis DC-ILC3 and so, to promote the clearance of bacteria in control mice (47). We have now evaluated the preventive effect of flagellin on bacteria-induced COPD exacerbation in our experimental murine models and this treatment accelerates the bacterial clearance and prevents the inflammatory reaction and tissue lesions associated with infections with Sp or NTHi in COPD mice (Manuscript in preparation). Nebulization of this adjuvant in association with other treatments of the COPD exacerbation may be of great interest in COPD patients as it would improve local IL-22 production in the infection site and reduce the systemic side effects. Moreover, the function of IL-22 was also altered due to the specific cleavage of its receptor by neutrophil proteases (52). Thus, deciphering anti-proteases blocking neutrophil proteases might have a double interest by protecting the IL-22R on airway epithelium and by limiting the degradation of the extracellular matrix.

Altogether, these data pave the way for the development of future therapeutic or preventive approaches both during the development of COPD as well as during the exacerbation by carefully modulate the balance between IL-17 and IL-22.

3.7. References

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease - Updated 2015. 2015;
2. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008;359:2355–2365.
3. Pavord I, Jones P, Burgel PR, Rabe KF. Exacerbations of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2016;21.doi:10.2147/COPD.S85978.
4. McAleer JP, Kolls JK. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunol Rev* 2014;260:129–144.
5. Rathore JS, Wang Y. Protective role of Th17 cells in pulmonary infection. *Vaccine* 2016;34:1504–1514.
6. Pappu R, Rutz S, Ouyang W. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends Immunol* 2012;33:343–349.
7. Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol Rev* 2013;252:116–132.
8. Sabat R, Ouyang W, Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:21–38.
9. Liang SC, Long AJ, Bennett F, Whitters MJ, Karim R, Collins M, Goldman SJ, Dunussi-Joannopoulos K, Williams CMM, Wright JF, Fouser LA. An IL-17F/A Heterodimer Protein Is Produced by Mouse Th17 Cells and Induces Airway Neutrophil Recruitment. *J Immunol* 2007;179:7791–7799.
10. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler JL, Dubin PJ, Pilewski JM, Myerburg MM, Mason CA, Iwakura Y, Kolls JK. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008;14:275–281.
11. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 2010;207:1293–1305.
12. 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.
13. Vargas-Rojas MI, Ramírez-Venegas A, Limón-Camacho L, Ochoa L, Hernández-Zenteno R, Sansores RH. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2011;105:1648–1654.

14. 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.
15. Maneechotesuwan K, Kasetsinsombat K, Wongkajornsilp A, Barnes PJ. Decreased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and IL-10/IL-17A ratio in patients with COPD. *Thorax* 2013;68:330–337.
16. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, Magno F, D'Anna SE, Zanini A, Brun P, Casolari P, Chung KF, Barnes PJ, Papi A, Adcock I, Balbi B. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol* 2009;157:316–324.
17. Chang Y, Nadigel J, Boulais N, Bourbeau J, Maltais F, Eidelman DH, Hamid Q. CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2011;12:43.
18. Zhang J, Chu S, Zhong X, Lao Q, He Z, Liang Y. Increased expression of CD4+IL-17+ cells in the lung tissue of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and smokers. *Int Immunopharmacol* 2013;15:58–66.
19. Eustace A, Smyth LJC, Mitchell L, Williamson K, Plumb J, Singh D. Identification of cells expressing IL-17A and IL-17F in the lungs of patients with COPD. *Chest* 2011;139:1089–1100.
20. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645–2653.
21. Roos AB, Sandén C, Mori M, Bjermer L, Stampfli MR, Erjefält JS. IL-17A Is Elevated in End-Stage Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Contributes to Cigarette Smoke-induced Lymphoid Neogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:1232–1241.
22. Zhou H, Hua W, Jin Y, Zhang C, Che L, Xia L, Zhou J, Chen Z, Li W, Shen H. Tc17 cells are associated with cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema. *Respirology* 2015;20:426–433.
23. Bozinovski S, Seow HJ, Chan SPJ, Anthony D, McQualter J, Hansen M, Jenkins BJ, Anderson GP, Vlahos R. Innate cellular sources of interleukin-17A regulate macrophage accumulation in cigarette- smoke-induced lung inflammation in mice. *Clin Sci Lond Engl* 1979 2015;129:785–796.
24. Pichavant M, Rémy G, Bekaert S, Le Rouzic O, Kervoaze G, Vilain E, Just N, Tillie-Leblond I, Trottein F, Cataldo D, Gosset P. Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunol* 2014;7:568–578.

25. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–517.
26. Kalathil SG, Lugade AA, Pradhan V, Miller A, Parameswaran GI, Sethi S, Thanavala Y. T-Regulatory Cells and Programmed Death 1+ T Cells Contribute to Effector T-Cell Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:40–50.
27. Kim HY, Lee HJ, Chang Y-J, Pichavant M, Shore SA, Fitzgerald KA, Iwakura Y, Israel E, Bolger K, Faul J, DeKruyff RH, Umetsu DT. IL-17 producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med* 2014;20:54–61.
28. Pauwels NS, Bracke KR, Dupont LL, Pottelberge GRV, Provoost S, Berghe TV, Vandenaabeele P, Lambrecht BN, Joos GF, Brusselle GG. Role of IL-1 α and the Nlrp3/caspase-1/IL-1 β axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD. *Eur Respir J* 2011;38:1019–1028.
29. Pichavant M, Goya S, Meyer EH, Johnston RA, Kim HY, Matangkasombut P, Zhu M, Iwakura Y, Savage PB, DeKruyff RH, Shore SA, Umetsu DT. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med* 2008;205:385–393.
30. Li J, Zhou W, Huang K, Jin Y, Gao J. Interleukin-22 exacerbates airway inflammation induced by short-term exposure to cigarette smoke in mice. *Acta Pharmacol Sin* 2014;35:1393–1401.
31. McGovern TK, Goldberger M, Allard B, Farahnak S, Hamamoto Y, O’Sullivan M, Hirota N, Martel G, Rousseau S, Martin JG. Neutrophils Mediate Airway Hyperresponsiveness after Chlorine-Induced Airway Injury in the Mouse. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;52:513–522.
32. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:183–192.
33. Harrison OJ, Foley J, Bolognese BJ, Long E, Podolin PL, Walsh PT. Airway infiltration of CD4+ CCR6+ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement. *Immunol Lett* 2008;121:13–21.
34. Bracke KR, D’hulst AI, Maes T, Moerloose KB, Demedts IK, Lebecque S, Joos GF, Brusselle GG. Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation and Emphysema Are Attenuated in CCR6-Deficient Mice. *J Immunol* 2006;177:4350–4359.
35. Chen K, Pociask DA, McAleer JP, Chan YR, Alcorn JF, Kreindler JL, Keyser MR, Shapiro SD, Houghton AM, Kolls JK, Zheng M. IL-17RA Is Required for CCL2 Expression, Macrophage Recruitment, and Emphysema in Response to Cigarette Smoke. *PLOS ONE* 2011;6:e20333.

36. Roos AB, Sethi S, Nikota J, Wrona CT, Dorrington MG, Sandén C, Bauer CMT, Shen P, Bowdish D, Stevenson CS, Erjefält JS, Stampfli MR. IL-17A and the Promotion of Neutrophilia in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:428–437.
37. Lu W, You R, Yuan X, Yang T, Samuel ELG, Marcano DC, Sikkema WKA, Tour JM, Rodriguez A, Kheradmand F, Corry DB. The microRNA miR-22 inhibits the histone deacetylase HDAC4 to promote TH17 cell-dependent emphysema. *Nat Immunol* 2015;16:1185–1194.
38. Kurimoto E, Miyahara N, Kanehiro A, Waseda K, Taniguchi A, Ikeda G, Koga H, Nishimori H, Tanimoto Y, Kataoka M, Iwakura Y, Gelfand EW, Tanimoto M. IL-17A is essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice. *Respir Res* 2013;14:5.
39. Overbeek SA, Braber S, Koelink PJ, Henricks PAJ, Mortaz E, Loi ATL, Jackson PL, Garssen J, Wagenaar GTM, Timens W, Koenderman L, Blalock JE, Kraneveld AD, Folkerts G. Cigarette Smoke-Induced Collagen Destruction; Key to Chronic Neutrophilic Airway Inflammation? *PLOS ONE* 2013;8:e55612.
40. Chang Y, Al-Alwan L, Audusseau S, Chouiali F, Carlevaro-Fita J, Iwakura Y, Bagloli CJ, Eidelman DH, Hamid Q. Genetic deletion of IL-17A reduces cigarette smoke-induced inflammation and alveolar type II cell apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014;306:L132-143.
41. Ivanov S, Fontaine J, Paget C, Macho Fernandez E, Van Maele L, Renneson J, Maillet I, Wolf NM, Rial A, Léger H, Ryffel B, Frisch B, Chabalgoity JA, Sirard JC, Benecke A, Faveeuw C, Trottein F. Key Role for Respiratory CD103+ Dendritic Cells, IFN- γ , and IL-17 in Protection Against *Streptococcus pneumoniae* Infection in Response to α -Galactosylceramide. *J Infect Dis* 2012;doi:10.1093/infdis/jis413.
42. Ivanov S, Renneson J, Fontaine J, Barthelemy A, Paget C, Fernandez EM, Blanc F, Trez CD, Maele LV, Dumoutier L, Huerre M-R, Eberl G, Si-Tahar M, Gosset P, Renauld JC, Sirard JC, Faveeuw C, Trottein F. Interleukin-22 Reduces Lung Inflammation during Influenza A Virus Infection and Protects against Secondary Bacterial Infection. *J Virol* 2013;87:6911–6924.
43. Wozniak KL, Hole CR, Yano J, Fidel PL, Wormley FL. Characterization of IL-22 and antimicrobial peptide production in mice protected against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Microbiology* 2014;160:1440–1452.
44. Andelid K, Tengvall S, Andersson A, Levänen B, Christenson K, Jirholt P, Åhrén C, Qvarfordt I, Ekberg-Jansson A, Lindén A. Systemic cytokine signaling via IL-17 in smokers with obstructive pulmonary disease: a link to bacterial colonization? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2015;10:689–702.

45. Zhang X, Zheng H, Zhang H, Ma W, Wang F, Liu C, He S. Increased interleukin (IL)-8 and decreased IL-17 production in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) provoked by cigarette smoke. *Cytokine* 2011;56:717–725.
46. Sharan R, Perez-Cruz M, Kervoaze G, Gosset P, Weynants V, Godfroid F, Hermand P, Trottein F, Pichavant M, Gosset P. Interleukin-22 protects against non-typeable *Haemophilus influenzae* infection: alteration during chronic obstructive pulmonary disease. *Mucosal Immunol* 2016;doi:10.1038/mi.2016.40.
47. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov D, Porte R, Deruy E, Chabalgoity J, Renauld J, Eberl G, Benecke A, Trottein F, Faveeuw C, Sirard J. Activation of Type 3 Innate Lymphoid Cells and Interleukin 22 Secretion in the Lungs During *Streptococcus pneumoniae* Infection. *J Infect Dis* 2014;
48. Pichavant M, Sharan R, Le Rouzic O, Olivier C, Hennegrave F, Rémy G, Pérez-Cruz M, Koné B, Gosset P, Just N, Gosset P. IL-22 Defect During *Streptococcus pneumoniae* Infection Triggers Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *EBioMedicine* 2015;2:1686–1696.
49. 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.
50. Sichelstiel A, Yadava K, Trompette A, Salami O, Iwakura Y, Nicod LP, Marsland BJ. Targeting IL-1 β and IL-17A Driven Inflammation during Influenza-Induced Exacerbations of Chronic Lung Inflammation. *PLOS ONE* 2014;9:e98440.
51. Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Renneson J, Blanc F, Pichavant M, Dumoutier L, Ryffel B, Renauld JC, Gosset P, Gosset P, Si-Tahar M, Faveeuw C, Trottein F. 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.
52. Guillon A, Jouan Y, Brea D, Gueugnon F, Dalloneau E, Baranek T, Henry C, Morello E, Renauld J-C, Pichavant M, Gosset P, Courty Y, Diot P, Si-Tahar M. Neutrophil proteases alter the interleukin-22-receptor-dependent lung antimicrobial defence. *Eur Respir J* 2015;ERJ-02151-2014.doi:10.1183/09031936.00215114.
53. Wiehler S, Proud D. Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L505-515.
54. Mallia P, Footitt J, Sotero R, Jepson A, Contoli M, Trujillo-Torralbo M-B, Keadze T, Aniscenko J, Oleszkiewicz G, Gray K, Message SD, Ito K, Barnes PJ, Adcock IM, Papi A, Stanciu LA, Elkin SL, Kon OM, Johnson M, Johnston SL. Rhinovirus Infection Induces Degradation of Antimicrobial Peptides and Secondary Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:1117–1124.

55. Guinea J, Sandoval-Denis M, Escribano P, Peláez T, Guarro J, Bouza E. *Aspergillus citrinoterreus*, a New Species of Section *Terrei* Isolated from Samples of Patients with Nonhematological Predisposing Conditions. *J Clin Microbiol* 2015;53:611–617.
56. Delsuc C, Cottreau A, Frealle E, Bienvenu A-L, Dessein R, Jarraud S, Dumitrescu O, Le Maréchal M, Wallet F, Friggeri A, Argaud L, Rimmelé T, Nseir S, Ader F. Putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with chronic obstructive pulmonary disease: a matched cohort study. *Crit Care* 2015;19:421.
57. Werner JL, Gessner MA, Lilly LM, Nelson MP, Metz AE, Horn D, Dunaway CW, Deshane J, Chaplin DD, Weaver CT, Brown GD, Steele C. Neutrophils Produce Interleukin 17A (IL-17A) in a Dectin-1- and IL-23-Dependent Manner during Invasive Fungal Infection □. *Infect Immun* 2011;79:3966–3977.
58. Camargo JF, Bhimji A, Kumar D, Kaul R, Pavan R, Schuh A, Seftel M, Lipton JH, Gupta V, Humar A, Husain S. Impaired T Cell Responsiveness to Interleukin-6 in Hematological Patients with Invasive Aspergillosis. *PLOS ONE* 2015;10:e0123171.
59. Sanguinetti CM. N-acetylcysteine in COPD: why, how, and when? *Multidiscip Respir Med* 2016;11:8.
60. van de Kerkhof PCM, Griffiths CEM, Reich K, Leonardi CL, Blauvelt A, Tsai T-F, Gong Y, Huang J, Papavassilis C, Fox T. Secukinumab long-term safety experience: A pooled analysis of 10 phase II and III clinical studies in patients with moderate to severe plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2016;75:83–98.e4.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Synthèse des résultats

1.1. Résultats expérimentaux

Ce travail met en évidence la présence d'un défaut de réponse des cytokines IL-17A et IL-22 en réponse à *Streptococcus pneumoniae* dans la BPCO par 3 approches différentes : *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo*. Ce déficit de production par les lymphocytes Th17 et les cellules innées semble lié à une altération des cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques et macrophages) qui perdent leur capacité à induire cette réponse.

Dans le modèle *in vivo*, les souris exposées de façon chronique à la fumée de cigarette et présentant un phénotype proche de celui de la BPCO, présentent un défaut de production de l'IL-17A et de l'IL-22, en réponse à *Streptococcus pneumoniae*, par les lymphocytes T conventionnels et les cellules innées NK, NKT avec un effet plus marqué pour l'IL-22. Ceci est associé à une inflammation pulmonaire plus importante et un retard de clairance de la bactérie qui sont tout deux améliorés par l'apport d'IL-22 recombinante. Ce défaut de production d'IL-17A et IL-22 est associé à un défaut de synthèse d'IL-1 β et d'IL-23 par les cellules présentatrices d'antigène, cellules dendritiques et macrophages, et une incapacité de ces cellules à induire la production d'IL-17A par les lymphocytes T CD4⁺ suggérant que l'altération de ces cellules pourraient en être la cause.

Dans le modèle *in vitro*, l'exposition à la fumée de cigarette de cellules dendritiques dérivées de monocytes inhibe leur maturation secondaire à l'exposition à *Streptococcus pneumoniae*. Ce défaut de maturation s'associe notamment à un défaut de production des cytokines pro-Th17, IL-6 et IL-23, et une incapacité à induire la production d'IL-17A et d'IL-22 par les lymphocytes T autologues. Cette production d'IL-17A est restaurée lors de l'ajout d'IL-23 recombinante dans le milieu de coculture suggérant que le défaut de production des cytokines pro-Th17 par les cellules dendritiques est déterminant dans cette incapacité à activer les lymphocytes T conventionnels. Ce travail n'a pas permis d'identifier clairement le ou les mécanismes par lesquels la fumée de cigarette inhibe la fonction de ces cellules dendritiques mais suggère que l'altération du trafic des phagolysosomes pourrait être impliquée.

L'analyse *ex vivo* de PBMC de patients atteints de BPCO conforte ces résultats. En effet, l'exposition de ces cellules à *Streptococcus pneumoniae* montre un défaut de production d'IL-17A et surtout d'IL-22 par rapport aux PBMC de sujets sains et de fumeurs sans BPCO. L'analyse des populations cellulaires sources de ces cytokines montrent un défaut d'induction de la production d'IL-17A et IL-22 par les cellules lymphoïdes innées notamment NK et NKT également observé en partie chez les PBMC issues de sujets fumeurs sans BPCO. Cela s'associe à un défaut de production des cytokines pro-Th17 IL-6 et IL-23 en réponse à *Streptococcus pneumoniae* renforçant l'hypothèse d'une altération de l'induction de la réponse Th17 par les cellules présentatrices d'antigène, principales sources de ces cytokines.

1.2. Revue de la littérature

L'analyse de la littérature a mis en évidence le peu de données sur le rôle des cytokines IL-17 et IL-22 au cours des exacerbations de la BPCO et nous a permis de montrer la complexité de leur implication qui pourrait dépendre du pathogène responsable. De fait, les rares données issues de patients en exacerbation peuvent sembler discordantes. Ainsi, Andelid *et al.* ont montré que les patients atteints de BPCO et colonisés par un pathogène opportuniste au niveau des voies aériennes présentaient des concentrations sanguines d'IL-17A diminuées avec des taux indétectables dans le sous-groupe de patients ayant présenté une exacerbation (266). Zhang *et al.* ont également montré une diminution des concentrations d'IL-17A dans les expectorations pendant l'exacerbation de la BPCO, diminution corrélée à la sévérité de la BPCO (267). Ces deux études ne donnaient malheureusement pas l'étiologie de ces exacerbations. A l'inverse, Roos *et al.* ont décrit une augmentation des concentrations d'IL-17A dans les expectorations de patients présentant une exacerbation associée à *Haemophilus influenzae* (259). Cependant, dans leur modèle de souris déficientes en IL-17A ou sauvages traitées avec un anticorps neutralisant de l'IL-17A, il n'était pas observé d'augmentation de la charge bactérienne ni de retard de la clairance bactérienne après infection par NTHi suggérant que l'IL-17A n'est pas indispensable dans la protection contre NTHi au cours de la BPCO. Dans le laboratoire, il a été confirmé une augmentation de l'IL-17A lors d'une infection par *Haemophilus influenzae* chez les souris exposées de manière chronique à la fumée de cigarette mais associée à une diminution de la production d'IL-22 qui elle a un rôle protecteur contre ce pathogène dans ce contexte

d'inflammation chronique (268). L'altération de la balance IL-17 / IL-22 semble donc être un élément déterminant dans les exacerbations bactériennes de la BPCO.

2. Discussion et perspectives

2.1. Défaut de réponse IL-17 et IL-22 au cours des exacerbations de la BPCO

Au cours de ce travail, un défaut de réponse IL-17A et IL-22 à *Streptococcus pneumoniae* a été mis en évidence sur des données expérimentales. L'extrapolation de ce travail à la clinique et la perspective de nouvelles thérapeutiques amènent à se poser la question de la spécificité de ce défaut sur le plan immunologique, de sa spécificité au plan microbiologique et de son implication dans le contexte réel des exacerbations bactériennes mais également des colonisations bronchiques.

2.1.1. Spécificité immunologique du défaut de réponse Th17

Ce travail montre non seulement la présence d'un défaut de réponse Th17 mais également une altération de la réponse Th1 à *Streptococcus pneumoniae* illustrée par une réponse IFN- γ diminuée. Les trois approches montrent que ce défaut Th1 est associé à un défaut de production de la cytokine pro-Th1, IL-12, confortant le rôle central de l'altération de la réponse des cellules présentatrices d'antigènes dans la susceptibilité aux infections. La réponse IFN- γ joue également un rôle important dans le contrôle des infections bactériennes et notamment à *Streptococcus pneumoniae* suggérant que la correction du défaut de réponse IFN- γ pourrait être une cible intéressante dans la prise en charge des exacerbations et éventuellement de leur prévention (269,270). Cependant, l'IFN- γ est également impliqué à l'état stable dans le développement de l'emphysème (271). L'apport exogène de cette cytokine ou l'induction directe de sa production pourrait donc être délétère sur la progression de la BPCO, problématique assez proche de celle de la modulation de l'IL-17A discutée dans la revue intégrée à la partie résultats de cette thèse. Par contre, une approche ponctuelle avec l'apport d'un adjuvant induisant la réponse IFN- γ au cours d'une exacerbation bactérienne ou la modulation des voies de contrôles de cette production d'IFN- γ , comme celle de l'IL-18 qui participe à la physiopathologie de la BPCO via l'induction notamment d'IFN- γ et d'IL-17A, pourraient être envisagées (272).

2.1.2. Spécificité microbiologique du défaut de réponse Th17

Ce travail est centré sur la réponse à *Streptococcus pneumoniae*, l'une des 3 bactéries les plus fréquemment associée aux exacerbations de la BPCO avec *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* (177). Sur un plan physiopathologique et dans l'optique de traitements futurs, se pose maintenant la question de la spécificité de ce défaut de réponse Th17 à une espèce voire un sérotype particulier. L'importance de ces cytokines IL-17 et IL-22 chez le sujet sain sans inflammation chronique dans le contrôle des infections par les bactéries extracellulaires et par les champignons suggère qu'un défaut de réponse de ces cytokines devrait être associé à une augmentation de la susceptibilité aux infections pour l'ensemble de ces pathogènes (269,273–275). Cependant, il est montré qu'en fonction du sérotype, le *Streptococcus pneumoniae* peut activer différents récepteurs et donc être responsable de réponses immunes différentes. Par exemple, les sérotypes 1 et 8 activeraient moins le récepteur NLRP3 de l'inflammasome et les sérotypes 3 et 14 seraient spécifiquement reconnus par le récepteur CD209 (DC-SIGN) (276,277). Le sérotype 1 de *Streptococcus pneumoniae* utilisé dans cette thèse est l'un des sérotypes les plus fréquemment associés aux pneumonies sévères chez les patients atteints de BPCO (278). Par contre, il n'est que rarement isolé au cours des exacerbations de la BPCO posant la question de l'extrapolation de ces résultats à ce contexte particulier (279). Pour toutes ces raisons, ces résultats devront donc être confirmés avec des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* plus fréquemment associés aux exacerbations, notamment les sérotypes 9V, 19F, 15A, 11A et 3 plus fréquemment associés à des rechutes, et les sérotypes 15A, 16F, 3 et 33F plus fréquemment associés à des réinfections, c'est-à-dire impliquées dans de nouvelles exacerbations liées à des sérotypes différents (280). Cependant, les résultats de cette thèse ne sont pas spécifiques à *Streptococcus pneumoniae* puisque dans un autre travail du laboratoire, il a été montré que le défaut de réponse IL-22 était aussi observé pour NTHi (268). Ainsi, le défaut de réponse IL-22, et probablement plus l'altération de la balance IL-17A / IL-22, semble être un facteur non spécifique à *Streptococcus pneumoniae* impliqué dans la susceptibilité et la sévérité des exacerbations d'origine bactérienne de la BPCO.

2.1.3. Démonstration de ce défaut chez l'homme

Les trois approches expérimentales présentées dans ce travail doivent maintenant être complétées par une étude clinique afin de démontrer la réalité de ce défaut de réponse Th17 au

cours des exacerbations bactériennes. Cette étude nommée COPD1722 sera mise en place prochainement et a déjà été acceptée par le Comité de Protection des Personnes de la Région Nord-Ouest. Elle est enregistrée sur Clinical Trial avec le code NCT02655302. Cette étude régionale multicentrique réunissant 4 hôpitaux de la métropole lilloise a comme objectif d'inclure 100 patients lors d'une hospitalisation pour exacerbation de BPCO sur une durée de 3 ans. Lors de l'exacerbation et à distance de celle-ci (8 à 16 semaines) seront notamment collectés des expectorations et des prélèvements sanguins afin de réaliser des analyses immunologiques et microbiologiques. Un suivi des exacerbations et de la fonction respiratoire sera réalisé pendant 4 ans. L'objectif principal est de démontrer la présence d'un défaut de réponse IL-17 et IL-22 au cours des exacerbations bactériennes en se basant sur le taux de ces cytokines dans les expectorations. Ces cytokines et d'autres marqueurs importants de l'inflammation seront dosés également dans les expectorations et le sang périphérique. Les mesures réalisées en exacerbations et à l'état stable seront comparées et interprétées en fonction des données microbiologiques incluant des analyses bactériologiques standard, une recherche de virus respiratoires et des bactéries atypiques par qPCR, une analyse mycologique des expectorations et une analyse du microbiome par métagénomique. Les résultats de cette étude apporteront un éclairage important sur le lien entre immunité Th17 et la physiopathologie de la BPCO, notamment de ses exacerbations.

2.2. Mécanismes de l'altération de la maturation des cellules dendritiques

Comme rappelé ci-dessus, le ou les mécanismes par le ou lesquels la fumée de cigarette inhibe la maturation des cellules dendritiques induite par *Streptococcus pneumoniae* n'ont pas été clairement identifiés. L'inhibition de la maturation des cellules dendritiques normalement induite par l'exposition au LPS a déjà été décrite précédemment (115). La même équipe a montré que cette inhibition de la production d'IL-12 et d'IL-23 était liée au stress oxydant avec un effet protecteur de la N-Acétyl-Cystéine (116). Malgré une tendance à une amélioration de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 et de la production d'IL-23, aucun antioxydant parmi ceux testés dans notre modèle à différentes doses décrites comme efficaces dans les autres publications n'a permis de corriger significativement l'effet de la fumée de cigarette. Ce résultat négatif semble refléter la présence d'un ou plusieurs autres mécanismes indépendants du stress oxydant. Pour autant les données de la littérature sur le sujet et la

reproduction partielle des effets observés par l'induction d'un stress oxydant mitochondrial suggèrent que ce stress oxydant participe mais n'est pas indispensable à l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques en réponse à *Streptococcus pneumoniae*.

Contrairement au LPS qui agit principalement via son action sur le TLR4, *Streptococcus pneumoniae* agit via plusieurs récepteurs et nécessite notamment d'être internalisé pour que ses antigènes puissent être apprêtés puis présentés par le CMH. Dans notre modèle *in vitro*, nous avons montré une endocytose de la bactérie plus importante par les cellules dendritiques préalablement exposées à la fumée de cigarette et des résultats encore préliminaires semblent montrer une diminution de la bactéricidie de ces bactéries phagocytées. Or, l'hème-oxygénase 1 (HO-1) qui est augmentée dans notre modèle et le monoxyde de carbone qui est présent dans la fumée de cigarette sont tout deux associés à une inhibition de la fusion endosome-lysosome (281). De plus, l'inhibition du trafic des phagolysosomes par d'autres bactéries comme *Coxiella burnetii* et *Brucella abortus* est associée à une diminution de la maturation des cellules dendritiques (282). Enfin, il a été montré que l'activité bactéricide des macrophages dépendait de l'induction d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales, production dépendante de la voie de signalisation de TRAF6 dont la dégradation est augmentée lors de l'exposition à la fumée de cigarette (283,284). Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que le défaut de maturation des cellules dendritiques est lié, au moins en partie, à l'altération du trafic des phagolysosomes, hypothèse que nous projetons de tester prochainement à l'aide de notre modèle *in vitro* de cellules dendritiques dérivées de monocytes exposées à la fumée de cigarette.

2.3. Conséquences sur l'épithélium bronchique

Ce travail s'est principalement concentré sur la démonstration de ce défaut de réponse IL-17 et IL-22 aux bactéries dans la BPCO et les cellules immunitaire impliquées. Il reste un dernier acteur que nous n'avons pas encore exploré de façon approfondie qui est l'épithélium bronchique. En effet, l'épithélium bronchique est l'un des tous premiers types cellulaires en contact avec les bactéries dans les voies aériennes, avec les cellules dendritiques qui projettent des extensions de leur cytoplasme dans la lumière bronchique, ainsi qu'avec les macrophages alvéolaires, présents dans la lumière bronchique et alvéolaire. Or, cet épithélium produit un certain nombre de signaux en réponse à l'agression par la fumée de cigarette et/ou à un agent pathogène qui participent à la modulation de la réponse inflammatoire et plus particulièrement au

recrutement des cellules dendritiques et à la modulation de leur phénotype (285). L'épithélium bronchique joue donc vraisemblablement un rôle dans l'inhibition de la réponse IL-17 – IL-22 vraisemblablement en modulant l'effet de ces cytokines.

Ces cytokines et plus particulièrement l'IL-22 induisent la production de peptides antimicrobiens et permettent la régénération de l'épithélium (239). Au cours de l'exacerbation de la BPCO, le récepteur de l'IL-22 et non celui de l'IL-17 est spécifiquement clivé par des protéases du neutrophile, empêchant ainsi la production de peptides antimicrobiens ou le maintien de la barrière épithéliale (286). La pertinence de ces résultats expérimentaux est confortée par la mise en évidence d'une augmentation des taux du fragment soluble du récepteur de l'IL-22 dans les expectorations de patients atteints de BPCO en exacerbation aiguë. Le défaut de signalisation IL-22 impacte donc également en retour la réponse de l'épithélium à l'infection.

2.3.1. Cytokines Th17 et peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens jouent un rôle important dans la réponse immune innée aux pathogènes (221). Des données montrent qu'ils sont modulés au cours de la BPCO mais avec des résultats discordants dans la littérature (222). Ainsi, pour la β -défensine 2, qui est le peptide antimicrobien qui est le plus efficace contre *Streptococcus pneumoniae* et qui est induit via l'activation du TLR2 par ce même pathogène, les études cliniques montrent qu'elle est diminuée dans les voies aériennes des patients atteints de BPCO et augmentée dans le parenchyme pulmonaire (221,222,287). Par contre, dans nos modèles d'infection de souris exposées de façon chronique à la fumée de cigarette à *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*, nous n'avons pas observé de défaut d'expression de ce peptide par contre, il y avait un défaut d'induction de la cathelicidine (268,288).

Des travaux préliminaires ont été réalisés pour évaluer la production de β -défensine 2 par des cellules épithéliales bronchiques primaires exposées à un extrait de fumée de cigarette, à *Streptococcus pneumoniae* et/ou à de l'IL-17A ou de l'IL-22. Les expériences d'optimisation ont mis en évidence que seules les cellules bien différenciées comme des cellules bronchiques primaires avec un faible passage et n'ayant pas été congelées produisent ce peptide à des taux détectables. Nos données montrent, en dépit de l'absence d'induction par *Streptococcus pneumoniae* dont l'exposition doit encore être optimisée, que l'expression de la β -défensine 2 semble être inhibée par la fumée de cigarette et stimulée faiblement par l'IL-22 et fortement par

l'IL-17A (**Figure 4**). L'IL-22 n'avait aucun effet sur l'expression de deux autres peptides antimicrobiens, S100A8 et S100A9, alors que l'IL-17A multipliait leur expression par 2 à 3 fois sans commune mesure sur ses effets puissants sur l'expression de la β -défensine 2 suggérant qu'il pourrait exister une spécificité d'action de l'IL-17A et l'IL-22. Ces travaux doivent être poursuivis pour confirmer ou infirmer ces résultats préliminaires et analyse l'effet conjugué de l'IL-17 et de l'IL-22 associées ou non à la fumée de cigarette.

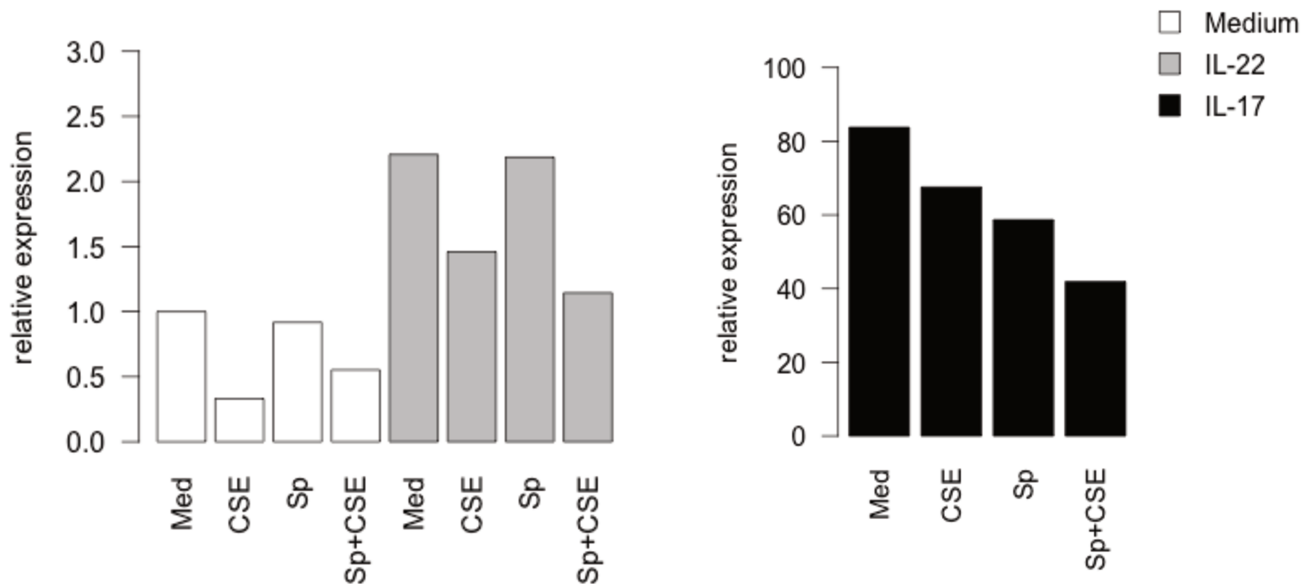


Figure 4 : Expression de la β -défensine 2 mesurée par PCR 6 heures après la simulation des cellules épithéliales bronchiques par *Streptococcus pneumoniae* (Sp) (n=1 en duplicate). Les résultats sont rendus en expression relative par rapport à l'expression de la GAPDH. En grisé les conditions stimulés par l'IL-22, en noir par l'IL-17A. Med = milieu seul, CSE = extrait de fumée de cigarette.

2.3.2. Mise en place d'un modèle complexe d'interaction intercellulaires

Dans le but d'explorer plus avant le rôle de l'épithélium dans la modulation de la réponse IL-17 / IL-22 et en retour, l'impact de ces cytokines sur la production de peptides antimicrobiens et le remodelage épithélial, un nouveau model expérimental incluant les deux types cellulaires prédominants de la paroi bronchique, les cellules épithéliales et les fibroblastes, a été développé.

Des cellules épithéliales bronchiques primaires ont été différenciées en interface air-liquide pendant 5 semaines en coculture avec des fibroblastes bronchiques situés dans la chambre

inférieure sans contact physique entre ces deux populations cellulaires. Ce système étant également destiné à étudier les mécanismes impliqués dans le développement d'un syndrome de recouvrement asthme-BPCO (ACOS), les deux populations de cellules ont été mixées avec 4 conditions au final associant :

1. des cellules épithéliales d'un patient BPCO avec des fibroblastes de BPCO
2. des cellules épithéliales d'un patient BPCO avec des fibroblastes d'asthmatique
3. des cellules épithéliales d'un patient asthmatique avec des fibroblastes de BPCO
4. des cellules épithéliales d'un patient asthmatique avec des fibroblastes d'asthmatique

Dans cette étude préliminaire visant à démontrer la faisabilité de ce modèle et la présence d'interaction intercellulaires, une seule source a été utilisée pour les cellules épithéliales de BPCO et d'asthmatique combinées à 4 sources pour chaque type de fibroblastes. Aucun stimuli particulier n'a été ajouté.

La différenciation épithéliale était bonne pour les conditions avec épithélium asthmatique avec une résistance épithéliales croissant significativement tout au long des cocultures et une bonne différenciation en histologie (**Figures 5 et 6**). Concernant l'épithélium de BPCO, les résistances ont chuté brutalement la dernière semaine de coculture après une augmentation continue suggérant un problème qui n'a pas été authentifié, raison pour laquelle seules les conditions avec épithélium asthmatiques ont été analysées.

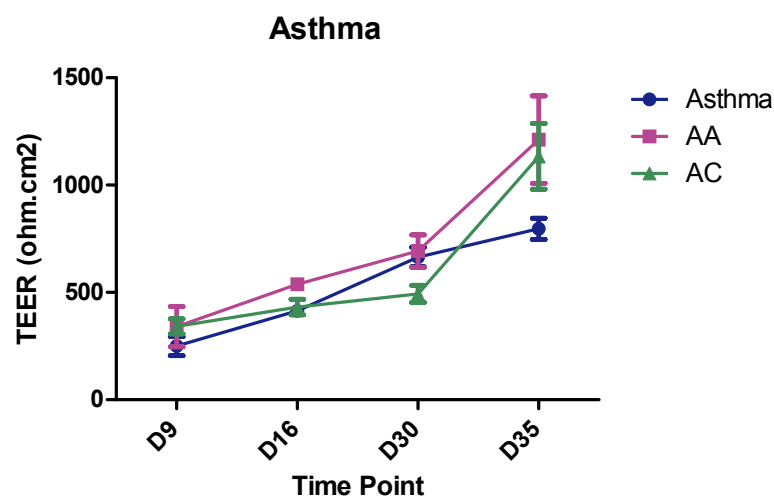


Figure 5 : résistances électriques trans-épithéliales au cours de la différenciation en air-liquide de l'épithélium asthmatique en coculture avec des fibroblastes d'asthmatiques (AA), de BPCO (AC) ou seul (Asthma).

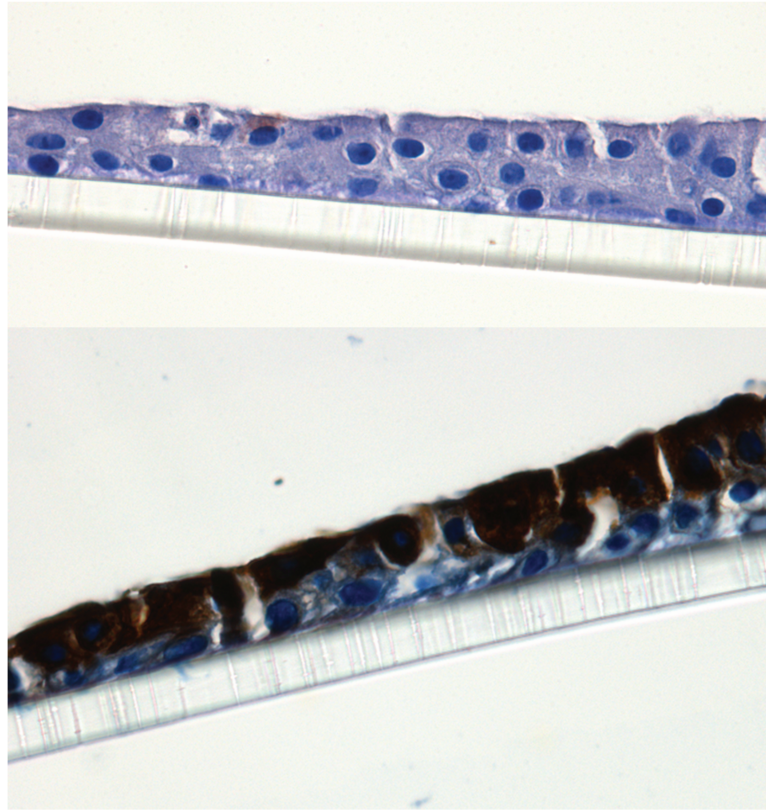


Figure 6 : cross-section de l'épithélium asthmatique sur la membrane de l'insert issus des cocultures montrant en coloration Hématéine et Eosine un aspect pseudo-stratifié (*au-dessus*) et au marquage à la cytokératine 18, une bonne différenciation (*au-dessous*).

L'analyse de l'expression génique par microarray distinguait clairement les conditions où les cellules épithéliales du même sujet asthmatique avaient été mises en coculture avec des fibroblastes bronchiques de patients asthmatiques de celles avec des fibroblastes de patients atteints de BPCO démontrant l'impact des interactions entre ces deux types cellulaires (**Figures 7 et 8**). De plus, parmi les gènes significativement modulés, ressortaient notamment des gènes impliqués dans le remodelage des voies aériennes (**Tableau 4**).

Ces résultats qui sortent en partie du champ de cette thèse mettent en évidence la faisabilité de ce modèle qui intègre les interactions épithélium – fibroblastes dans sa conception et sa pertinence dans la perspective d'une évaluation du remodelage et des effets protecteurs ou non

des cytokines IL-17A et IL-22. Ce modèle pourra ensuite être complexifié pour évaluer les interactions avec d'autres types cellulaires notamment les cellules dendritiques et les effets sur la réponse immune Th17.

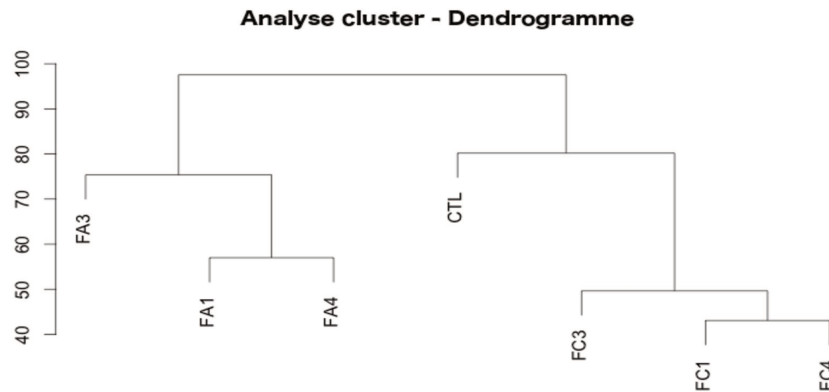


Figure 7 : Analyse cluster de l'expression génique des conditions d'épithélium asthmatique avec fibroblastes asthmatiques (FA), BPCO (FC) ou sans fibroblastes (CTL) par analyse des distances entre les différentes conditions. Les chiffres correspondent à des fibroblastes bronchiques issus de donneurs différents.

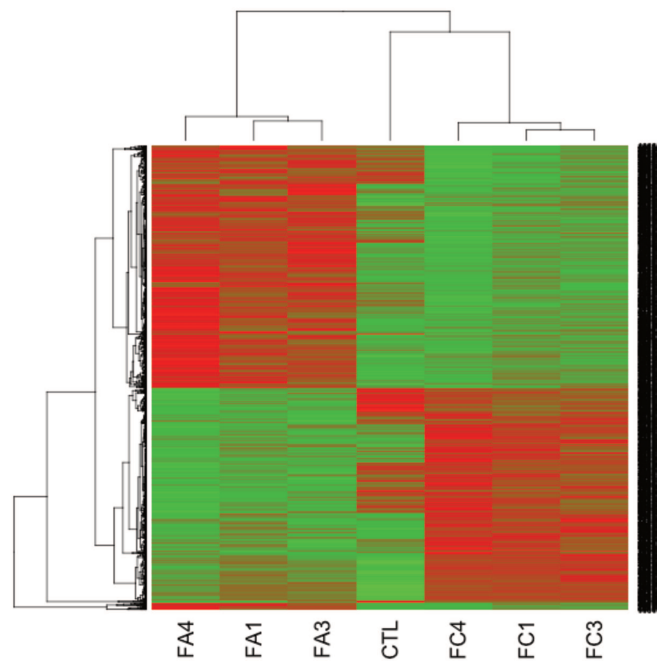


Figure 8 : Représentation heat map de la différence d'expression génique entre les conditions de coculture avec les fibroblastes de patients asthmatiques (FA) et ceux de patients BPCO (FC). Les gènes sur-exprimés sont en vert, les sous-exprimés en rouge.

Tableau 4 : Expression différentielle de gènes associés au remodelage des voies aériennes

Gènes		variation en log ₂	p ajusté
TGF- α	Transforming Growth Factor alpha	- 1.29	0.005
TGF- β 2	Transforming Growth Factor beta 2	- 1.39	0.004
MMP9	Matrix Metallopeptidase 9	- 3.08	0.029
MMP10	Matrix Metallopeptidase 10	- 1.56	0.005
TIMP2	Metalloproteinase Inhibitor 2 precursor	- 1.49	0.005
SERPINB2	Plasminogen activator inhibitor 2	- 2.74	0.004
SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor-1	- 2.27	0.005
LOXL1	Lysyl Oxidase Like 1	+ 1.12	0.032
LOXL4	Lysyl Oxidase Like 4	+ 1.74	0.005
COL4A1	Collagen type IV alpha-1 subunit	- 1.04	0.008
ECM1	Extracelullar Matrix Protein 1 precursor	- 2.63	0.027
EDN1	Endothelin 1	- 1.58	0.009
EDN2	Endothelin 2	- 1.61	0.042

Quelques gènes associés au remodelage des voies aériennes dont l'expression est significativement différente entre les conditions avec fibroblastes BPCO (FC) et celles avec fibroblastes asthmatiques (FA).

2.4. Perspectives thérapeutiques

Ce travail et la revue de la littérature évoquent deux axes de recherche pour de nouvelles thérapeutiques ciblant la voie IL-17A et IL-22 ; une première visant à contrôler l'inflammation chronique qui semble principalement liée à l'IL-17 et une deuxième visant à restaurer la réponse IL-22 au cours des exacerbations.

En effet, les données de la littérature montrent a montré l'impact délétère de l'augmentation de l'IL-17A dans la physiopathologie de la BPCO à l'état stable mais également en exacerbation notamment lorsque cette cytokine démontre une synergie avec les virus responsable d'une inflammation encore plus importante (289). Inversement, l'inhibition de cette voie ne semble pas

aggraver les infections respiratoires bactériennes (259). Cette dernière information doit toutefois être tempérée, l'utilisation d'anti-IL-17 dans le psoriasis étant associée à une fréquence augmentée d'infections et de candidose (290). Enfin, les études expérimentales montrent un effet bénéfique lors de l'inhibition préventive de l'IL-17A. La démonstration de l'efficacité et du caractère favorable du rapport bénéfice-risque d'une inhibition de cette voie dans le contexte d'une BPCO déjà établie reste donc à faire. L'inflammation Th1 étant également délétère en chronique dans la BPCO, une thérapeutique ciblant l'IL-18 impliquée dans l'activation de ces deux voies pourrait également être envisagée comme discuté ci-dessus (272).

Dans le contexte de l'infection bactérienne, qui plus est dans le modèle de souris exposées de façon chronique à la fumée de cigarette et présentant un phénotype proche de la BPCO, l'apport exogène d'IL-22 recombinante a démontré son efficacité en terme de clairance de la bactérie et de réduction de l'inflammation et des lésions pulmonaires induites par l'infection (268,273,288,291). Une meilleure connaissance des mécanismes et voies de signalisations impliquées dans l'inhibition de la réponse IL-22 permettraient sans doute d'envisager d'autres cibles thérapeutiques pour traiter ce déficit comme par exemple un traitement qui inhiberait le clivage du récepteur de l'IL-22 observé au cours des exacerbations de la BPCO et permettrait ainsi une augmentation de la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales bronchiques et une amélioration de la régénération épithéliale (286).

De façon intéressante, la flagelline, un agoniste du TLR5 administré par voie inhalée, augmente la production d'IL-22 par les ILC3 dans le contexte d'infection à *Streptococcus pneumoniae* et améliore la survie des souris (292). L'administration de cette molécule pourrait être envisagée comme traitement adjuvant des thérapeutiques habituelles de l'exacerbation et éventuellement en aérosol afin d'avoir un effet maximal au niveau du site de l'infection tout en minimisant les effets secondaires systémiques. De plus, la flagelline a démontré son efficacité comme adjuvant dans des vaccins ce qui devrait faciliter la mise en place rapide de nouvelles études cliniques, le profil de sécurité de la molécule étant déjà en partie évalué chez l'homme (293). Dans un travail préliminaire utilisant les cellules mononucléées circulantes (PBMC) de sujets sains non fumeurs, de fumeurs sans obstruction bronchique et de BPCO, 3 adjuvants différents ont été testés, le LPS qui est un agoniste du TLR4, la flagelline (FliC) qui est un agoniste du TLR5 et l'oligonucléotide CpG qui est un agoniste du TLR9. Seule la flagelline avait un effet significatif sur les PBMC de patients atteints de BPCO en induisant la

production d'IL-17A et dans une moindre mesure d'IL-22 (**Figure 9**). Ces résultats devront être répétés mais apporte un argument supplémentaire en faveur d'un bénéfice de cette molécule comme adjuvant de la prise en charge des exacerbations de la BPCO.

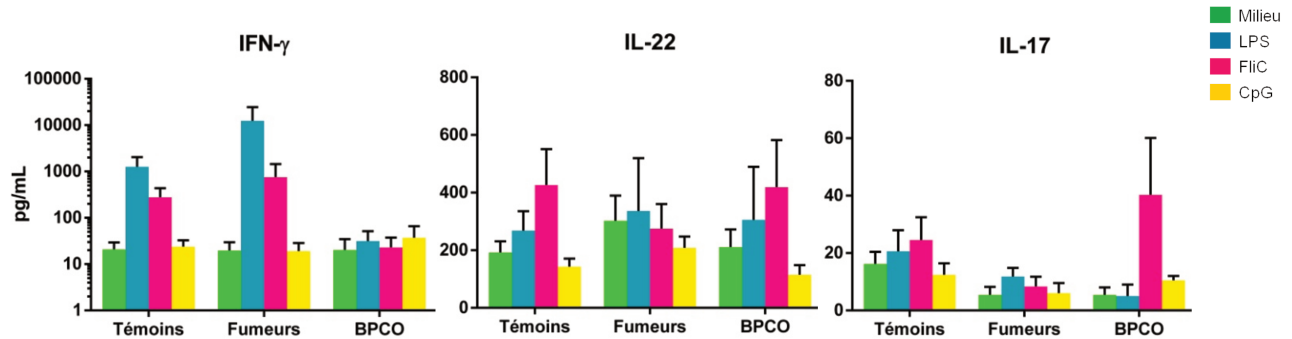


Figure 9 : Production d'IFN- γ , d'IL-22 et d'IL-17 par les PBMC de sujets témoins non fumeurs (n=9), de sujets fumeurs non obstructifs (n=5) et de patients atteints de BPCO (n=3) en réponse aux différents immunostimulants : LPS, Flagelline (FliC) et CpG. Les résultats sont exprimés en moyennes (pg/mL) \pm SEM.

2.5. Conclusion

Des arguments de plus en plus nombreux témoignent d'une altération de la réponse IL-17A et IL-22 au cours des exacerbations bactériennes de la BPCO. Celle-ci devrait être confirmée dans l'étude COPD1722 qui débutera prochainement et apportera de nombreuses informations sur les rapports entre cette immunité, les différents pathogènes impliqués, le microbiome, et les phénotypes des patients BPCO. De plus, ce projet a pour objectif d'identifier des marqueurs diagnostiques et pronostiques chez ces patients. Des études expérimentales complémentaires sont également nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes responsables de ce déficit et leur conséquence sur la physiopathologie de la maladie en terme de remodelage bronchique et colonisation des voies aériennes et d'interaction avec le microbiome pulmonaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease - Updated 2015. GOLD; 2015.
2. OMS | Principales causes de mortalité dans le monde [Internet]. [cited 2016 Jul 4]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/>
3. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 1997 May 24;349(9064):1498–504.
4. Fuhrman C, Delmas M-C. Épidémiologie descriptive de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) en France. *Rev Mal Respir*. 2010 Feb;27(2):160–8.
5. ameli.fr - Prévalence [Internet]. [cited 2016 Jul 4]. Available from: <http://www.ameli.fr/l-assurance-maladie/statistiques-et-publications/donnees-statistiques/affection-de-longue-duree-ald/prevalence/prevalence-des-ald-en-2013.php>
6. Postma DS, Bush A, van den Berge M. Risk factors and early origins of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2015 Mar 7;385(9971):899–909.
7. Agustí A, Calverley PMA, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, et al. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res*. 2010;11:122.
8. Han MK, Agustí A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, et al. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Sep 1;182(5):598–604.
9. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J*. 1977 Jun 25;1(6077):1645–8.
10. Lange P, Celli B, Agustí A, Boje Jensen G, Divo M, Faner R, et al. Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*. 2015 Jul 9;373(2):111–22.
11. Tantucci C, Modena D. Lung function decline in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012 Feb;95.
12. Rodriguez-Roisin R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest*. 2000 May;117(5 Suppl 2):398S–401S.
13. Celli BR, Thomas NE, Anderson JA, Ferguson GT, Jenkins CR, Jones PW, et al. Effect of Pharmacotherapy on Rate of Decline of Lung Function in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Aug 15;178(4):332–8.
14. Hurst JR, Donaldson GC, Quint JK, Goldring JJP, Baghai-Ravary R, Wedzicha JA. Temporal Clustering of Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Mar 1;179(5):369–74.
15. Kessler R, Ståhl E, Vogelmeier C, Haughney J, Trudeau E, Löfdahl C-G, et al. Patient understanding, detection, and experience of COPD exacerbations: an observational, interview-based study. *Chest*. 2006 Jul;130(1):133–42.

16. Wouters EFM. The burden of COPD in The Netherlands: results from the Confronting COPD survey. *Respir Med.* 2003 Mar;97 Suppl C:S51-59.
17. Suissa S, Dell’Aniello S, Ernst P. Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: severe exacerbations and mortality. *Thorax.* 2012 Nov;67(11):957–63.
18. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2010 Sep 16;363(12):1128–38.
19. Hogg JC, Macklem PT, Thurlbeck WM. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med.* 1968 Jun 20;278(25):1355–60.
20. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med.* 2004 juin;350(26):2645–53.
21. Hogg JC, Timens W. The Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2009;4(1):435–59.
22. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, et al. CD8+ T-Lymphocytes in Peripheral Airways of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Mar 1;157(3):822–6.
23. Shaykhiev R, Crystal RG. Early Events in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Smoking-induced Reprogramming of Airway Epithelial Basal Progenitor Cells. *Ann Am Thorac Soc.* 2014 Dec;11(Suppl 5):S252–8.
24. Rock J, Königshoff M. Endogenous Lung Regeneration. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Dec 15;186(12):1213–9.
25. Königshoff M, Eickelberg O. WNT Signaling in Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 Jan 1;42(1):21–31.
26. Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong Y-Y, Hogan BL. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011 Jun 3;8(6):639–48.
27. Yuan X, Wu H, Han N, Xu H, Chu Q, Yu S, et al. Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: biological significance and therapeutic application. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* 2014;7:87.
28. Perotin J-M, Adam D, Vella-Boucaud J, Delepine G, Sandu S, Jonvel A-C, et al. Delay of airway epithelial wound repair in COPD is associated with airflow obstruction severity. *Respir Res.* 2014;15:151.
29. Tilley AE, Harvey B-G, Heguy A, Hackett NR, Wang R, O’Connor TP, et al. Down-regulation of the Notch Pathway in Human Airway Epithelium in Association with Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Mar 15;179(6):457–66.
30. Staudt MR, Buro-Auriemma LJ, Walters MS, Salit J, Vincent T, Shaykhiev R, et al. Airway Basal Stem/Progenitor Cells Have Diminished Capacity to Regenerate Airway Epithelium in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Oct 15;190(8):955–8.

31. Rigden HM, Alias A, Havelock T, O'Donnell R, Djukanovic R, Davies DE, et al. Squamous Metaplasia Is Increased in the Bronchial Epithelium of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. PLoS ONE [Internet]. 2016 May 26 [cited 2016 Jul 5];11(5).
32. Araya J, Cambier S, Markovics JA, Wolters P, Jablons D, Hill A, et al. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. J Clin Invest. 2007 Nov 1;117(11):3551–62.
33. Heijink IH, Bruin HG de, Dennebos R, Jonker MR, Noordhoek JA, Brandsma C-A, et al. Cigarette smoke-induced epithelial expression of WNT-5B: implications for COPD. Eur Respir J. 2016 Apr 28;ERJ-01541-2015.
34. Jeffery PK. Comparison of the structural and inflammatory features of copd and asthma* giles f. filley lecture. Chest. 2000 May 1;117(5_suppl_1):251S–260S.
35. Lapperre TS, Sont JK, van Schadewijk A, Gosman MM, Postma DS, Bajema IM, et al. Smoking cessation and bronchial epithelial remodelling in COPD: a cross-sectional study. Respir Res. 2007;8:85.
36. Ballarin A, Bazzan E, Zenteno RH, Turato G, Baraldo S, Zanovello D, et al. Mast Cell Infiltration Discriminates between Histopathological Phenotypes of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med. 2012 Aug 1;186(3):233–9.
37. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet P-O, Ghosh D, et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. J Exp Med. 2007 Dec 24;204(13):3173–81.
38. Hiroshima K, Iyoda A, Shibuya K, Hoshino H, Haga Y, Toyozaki T, et al. Evidence of neoangiogenesis and an increase in the number of proliferating cells within the bronchial epithelium of smokers. Cancer. 2002 Oct 1;95(7):1539–45.
39. Soltani A, Reid DW, Sohal SS, Wood-Baker R, Weston S, Muller HK, et al. Basement membrane and vascular remodelling in smokers and chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study. Respir Res. 2010;11:105.
40. Mahmood M, Sohal SS, Shukla SD, Hardikar A, Noor WD, Muller HK, et al. Epithelial mesenchymal transition in smokers: large versus small airways and relation to airflow obstruction. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2015 Aug;1515.
41. Sakao S, Voelkel NF, Tatsumi K. The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations. Eur Respir Rev. 2014 Sep 1;23(133):350–5.
42. Soltani A, Sohal SS, Reid D, Weston S, Wood-Baker R, Walters EH. Vessel-Associated Transforming Growth Factor-Beta1 (TGF- β 1) Is Increased in the Bronchial Reticular Basement Membrane in COPD and Normal Smokers. PLOS ONE. 2012 Jun 29;7(6):e39736.
43. Reimann S, Fink L, Wilhelm J, Hoffmann J, Bednorz M, Seimetz M, et al. Increased S100A4 expression in the vasculature of human COPD lungs and murine model of smoke-induced emphysema. Respir Res. 2015;16:127.
44. Sohal SS. Endothelial to mesenchymal transition (EndMT): an active process in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)? Respir Res. 2016;17:20.

45. Soltani A, Ewe YP, Lim ZS, Sohal SS, Reid D, Weston S, et al. Mast cells in COPD airways: relationship to bronchodilator responsiveness and angiogenesis. *Eur Respir J*. 2012 Jun 1;39(6):1361–7.
46. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar;8:183–92.
47. Broekhuizen R, Wouters EFM, Creutzberg EC, Schols AMWJ. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax*. 2006 Jan 1;61(1):17–22.
48. Harmful and Potentially Harmful Constituents in Tobacco Products and Tobacco Smoke: Established List [Internet]. [cited 2016 Jul 4]. Available from: <http://www.fda.gov/TobaccoProducts/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm297786.htm>
49. Mortaz E, Henricks PAJ, Kraneveld AD, Givi ME, 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 Sep;1812(9):1104–10.
50. Foronjy R, Salathe M, Dabo AJ, Baumlin N, Cummins N, Eden E, et al. TLR9 expression is required for the development of cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2016 Jun 10;ajplung.00073.2016.
51. Liu M-H, Lin A-H, Lu S-H, Peng R-Y, Lee T-S, Kou YR. Eicosapentaenoic acid attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting ROS-sensitive inflammatory signaling. *Front Physiol* [Internet]. 2014 Nov 14 [cited 2016 Jul 4];5.
52. Ma W-J, Sun Y-H, Jiang J-X, Dong X-W, Zhou J-Y, Xie Q-M. Epoxyeicosatrienoic acids attenuate cigarette smoke extract-induced interleukin-8 production in bronchial epithelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2014 Nov 4;
53. Moretto N, Bertolini S, Iadicicco C, Marchini G, Kaur M, Volpi G, et al. Cigarette smoke and its component acrolein augment IL-8/CXCL8 mRNA stability via p38 MAPK/MK2 signaling in human pulmonary cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2012 Nov 15;303(10):L929–38.
54. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2011 Sep 10;378(9795):1015–26.
55. Rusznak C, Mills PR, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Lozewicz S. Effect of Cigarette Smoke on the Permeability and IL-1 β and sICAM-1 Release from Cultured Human Bronchial Epithelial Cells of Never-Smokers, Smokers, and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Oct;23(4):530–6.
56. Heijink IH, Brandenburg SM, Postma DS, van Oosterhout AJM. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *Eur Respir J*. 2012 Feb;39(2):419–28.
57. Heijink IH, Pouwels SD, Leijendekker C, de Bruin HG, Zijlstra GJ, van der Vaart H, et al. Cigarette Smoke-Induced Damage-Associated Molecular Pattern Release from Necrotic Neutrophils Triggers Proinflammatory Mediator Release. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Sep 5;52(5):554–62.

58. Yin Y, Hou G, Li E, Wang Q, Kang J. Regulation of cigarette smoke-induced toll-like receptor 4 expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in bronchial epithelial cells. *Respirology*. 2013 Nov 1;18:30–9.
59. Barnes PJ. Alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr*. 2004;50 Online Pub:OL627-637.
60. Murugan V, Peck MJ. Signal transduction pathways linking the activation of alveolar macrophages with the recruitment of neutrophils to lungs in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res*. 2009 Aug;35(6):439–85.
61. Metcalfe HJ, Lea S, Hughes D, Khalaf R, Abbott-Banner K, Singh D. Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2014 Jun 1;176(3):461–72.
62. Sarir H, Mortaz E, Karimi K, Kraneveld AD, Rahman I, Caldenhoven E, et al. Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human macrophages. *J Inflamm*. 2009;6:12.
63. Gaffey K, Reynolds S, Plumb J, Kaur M, Singh D. Increased phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase in COPD lungs. *Eur Respir J*. 2013 Jul 1;42(1):28–41.
64. Moretto N, Facchinetti F, Southworth T, Civelli M, Singh D, Patacchini R. α,β -Unsaturated aldehydes contained in cigarette smoke elicit IL-8 release in pulmonary cells through mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2009 May 1;296(5):L839–48.
65. Chana KK, Fenwick PS, Nicholson AG, Barnes PJ, Donnelly LE. Identification of a distinct glucocorticosteroid-insensitive pulmonary macrophage phenotype in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jan;133(1):207-216-11.
66. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, De Matos C, Russell REK, Donnelly LE, et al. Impaired Inhibition by Dexamethasone of Cytokine Release by Alveolar Macrophages from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jan 1;167(1):24–31.
67. Russell REK, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, et al. Release and Activity of Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 by Alveolar Macrophages from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 May 1;26(5):602–9.
68. Churg A, Zhou S, Wright JL. Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur Respir J*. 2012 Jan 1;39(1):197–209.
69. Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas CMR, Tudhope SJ, Wedzicha JA, et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J*. 2010 May 1;35(5):1039–47.
70. Phipps JC, Aronoff DM, Curtis JL, Goel D, O'Brien E, Mancuso P. Cigarette Smoke Exposure Impairs Pulmonary Bacterial Clearance and Alveolar Macrophage Complement-Mediated Phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2010 Mar 1;78(3):1214–20.

71. Hodge S, Hodge G, Ahern J, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Smoking Alters Alveolar Macrophage Recognition and Phagocytic Ability. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Dec 1;37(6):748–55.
72. Oliver BGG, Lim S, Wark P, Laza-Stanca V, King N, Black JL, et al. Rhinovirus exposure impairs immune responses to bacterial products in human alveolar macrophages. *Thorax*. 2008 Jun 1;63(6):519–25.
73. Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, et al. Down-Regulated NF-E2-Related Factor 2 in Pulmonary Macrophages of Aged Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Dec 1;39(6):673–82.
74. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Sethi S, Kong X, Yarmus L, Brown RH, et al. Targeting Nrf2 signaling improves bacterial clearance by alveolar macrophages in patients with COPD and in a mouse model. *Sci Transl Med*. 2011 Apr 13;3(78):78ra32.
75. Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol*. 2003 Aug;81(4):289–96.
76. Hiemstra PS. Altered Macrophage Function in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2013 Dec 1;10(Supplement):S180–5.
77. Hodge S, Hodge G, Jersmann H, Matthews G, Ahern J, Holmes M, et al. Azithromycin Improves Macrophage Phagocytic Function and Expression of Mannose Receptor in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jul 15;178(2):139–48.
78. Hodge S, Reynolds PN. Low-dose azithromycin improves phagocytosis of bacteria by both alveolar and monocyte-derived macrophages in chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Respirol Carlton Vic*. 2012 Jul;17(5):802–7.
79. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Feb 1;153(2):530–4.
80. Kaur M, Singh D. Neutrophil Chemotaxis Caused by Chronic Obstructive Pulmonary Disease Alveolar Macrophages: The Role of CXCL8 and the Receptors CXCR1/CXCR2. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013 Oct 1;347(1):173–80.
81. Thatcher TH, McHugh NA, Egan RW, Chapman RW, Hey JA, Turner CK, et al. Role of CXCR2 in cigarette smoke-induced lung inflammation. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Aug 1;289(2):L322–8.
82. Sapey E, Stockley JA, Greenwood H, Ahmad A, Bayley D, Lord JM, et al. Behavioral and Structural Differences in Migrating Peripheral Neutrophils from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 May 1;183(9):1176–86.
83. Tsai Y-F, Hwang T-L. Neutrophil elastase inhibitors: a patent review and potential applications for inflammatory lung diseases (2010 - 2014). *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(10):1145–58.

84. Pilette C, Colinet B, Kiss R, André S, Kaltner H, Gabius H-J, et al. Increased galectin-3 expression and intra-epithelial neutrophils in small airways in severe COPD. *Eur Respir J*. 2007 May 1;29(5):914–22.
85. Hoenderdos K, Condliffe A. The Neutrophil in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Too Little, Too Late or Too Much, Too Soon? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Jan 17;48(5):531–9.
86. Pichavant M, Rémy G, Bekaert S, Le Rouzic O, Kervoaze G, Vilain E, et al. Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunol*. 2014 May;7(3):568–78.
87. Tang Y, Li X, Wang M, Zou Q, Zhao S, Sun B, et al. Increased Numbers of NK Cells, NKT-Like Cells, and NK Inhibitory Receptors in Peripheral Blood of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Dev Immunol [Internet]*. 2013 [cited 2016 Jul 4];2013.
88. Wang J, Urbanowicz RA, Tighe PJ, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Differential Activation of Killer Cells in the Circulation and the Lung: A Study of Current Smoking Status and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *PLoS ONE [Internet]*. 2013 Mar 11 [cited 2016 Jul 4];8(3).
89. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*. 2013 Feb;13(2):88–100.
90. Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg H-H, Kabelitz D. Innate immune functions of human $\gamma\delta$ T cells. *Immunobiology*. 2008 May 14;213(3–4):173–82.
91. Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL. $\gamma\delta$ T cells: an important source of IL-17. *Lymph Act Lymph Eff Funct*. 2008 Jun;20(3):353–7.
92. Nakasone C, Yamamoto N, Nakamatsu M, Kinjo T, Miyagi K, Uezu K, et al. Accumulation of gamma/delta T cells in the lungs and their roles in neutrophil-mediated host defense against pneumococcal infection. *Microbes Infect Inst Pasteur*. 2007 Mar;9(3):251–8.
93. Fleige H, Ravens S, Moschovakis GL, Bölter J, Willenzon S, Sutter G, et al. IL-17–induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. *J Exp Med*. 2014 Apr 7;211(4):643–51.
94. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med*. 2015 Jul;21(7):698–708.
95. Bal SM, Bernink JH, Nagasawa M, Groot J, Shikhagaie MM, Golebski K, et al. IL-1 β , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat Immunol [Internet]*. 2016 avril [cited 2016 Apr 26];advance online publication.
96. De Grove KC, Provoost S, Verhamme FM, Bracke KR, Joos GF, Maes T, et al. Characterization and Quantification of Innate Lymphoid Cell Subsets in Human Lung. *PLoS ONE [Internet]*. 2016 Jan 4 [cited 2016 Jul 4];11(1).

97. Silver JS, Kearley J, Copenhaver AM, Sanden C, Mori M, Yu L, et al. Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat Immunol* [Internet]. 2016 avril [cited 2016 Apr 26];advance online publication.
98. Kearley J, Silver JS, Sanden C, Liu Z, Berlin AA, White N, et al. Cigarette Smoke Silences Innate Lymphoid Cell Function and Facilitates an Exacerbated Type I Interleukin-33-Dependent Response to Infection. *Immunity*. 2015 Mar 17;42(3):566–79.
99. Holt PG. Regulation of antigen-presenting cell function(s) in lung and airway tissues. *Eur Respir J*. 1993 Jan 1;6(1):120–9.
100. Lambrecht BN, Hammad H. Lung Dendritic Cells in Respiratory Viral Infection and Asthma: From Protection to Immunopathology. *Annu Rev Immunol*. 2012;30(1):243–70.
101. Desch AN, Gibbings SL, Goyal R, Kolde R, Bednarek J, Bruno T, et al. Flow Cytometric Analysis of Mononuclear Phagocytes in Nondiseased Human Lung and Lung-Draining Lymph Nodes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Nov 9;193(6):614–26.
102. Baharom F, Thomas S, Rankin G, Lepzien R, Pourazar J, Behndig AF, et al. Dendritic Cells and Monocytes with Distinct Inflammatory Responses Reside in Lung Mucosa of Healthy Humans. *J Immunol*. 2016 May 2;1600071.
103. Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, Testelmans D, Verleden GM, Vermassen FE, et al. 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 May 15;175(10):998–1005.
104. Su Y, Xu Y, Liu X. Quantitative differentiation of dendritic cells in lung tissues of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Jun;123(12):1500–4.
105. Van Pottelberge GR, Bracke KR, Demedts IK, De Rijck K, Reinartz SM, van Drunen CM, et al. Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD. *Respir Res*. 2010;11:35.
106. Freeman CM, Martinez FJ, Han MK, Ames TM, Chensue SW, Todt JC, et al. Lung Dendritic Cell Expression of Maturation Molecules Increases with Worsening Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:1179–88.
107. Stoll P, Heinz A-S, Bratke K, Bier A, Garbe K, Kuepper M, et al. Impact of smoking on dendritic cell phenotypes in the airway lumen of patients with COPD. *Respir Res*. 2014;15:48.
108. Vassallo R, Walters PR, Lamont J, Kottom TJ, Yi ES, Limper AH. Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a Lung Tissue Research Consortium study. *Respir Res*. 2010;11(1):45.
109. Liao S-X, Ding T, Rao X-M, Sun D-S, Sun P-P, Wang Y-J, et al. Cigarette smoke affects dendritic cell maturation in the small airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mol Med Rep*. 2015 Jan;11(1):219–25.

110. Rogers AV, Ädelroth E, Hattotuwa K, Dewar A, Jeffery PK. Bronchial mucosal dendritic cells in smokers and ex-smokers with COPD: an electron microscopic study. *Thorax*. 2008 Feb 1;63(2):108–14.
111. Tsoumakidou M, Koutsopoulos AV, Tzanakis N, Dambaki K, Tzortzaki E, Zakyntinos S, et al. Decreased small airway and alveolar cd83+ dendritic cells in copd. *Chest*. 2009 Sep 1;136(3):726–33.
112. Zanini A, Spanevello A, Baraldo S, Majori M, Della Patrona S, Gumiero F, et al. Decreased Maturation of Dendritic Cells in the Central Airways of COPD Patients Is Associated with VEGF, TGF- β and Vascularity. *Respiration*. 2014;87(3):234–42.
113. Mori M, Andersson CK, Svedberg KA, Glader P, Bergqvist A, Shikhagaie M, et al. Appearance of remodelled and dendritic cell-rich alveolar-lymphoid interfaces provides a structural basis for increased alveolar antigen uptake in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2013 Jun 1;68(6):521–31.
114. Roghanian A, Drost EM, MacNee W, Howie SEM, Sallenave J-M. Inflammatory Lung Secretions Inhibit Dendritic Cell Maturation and Function via Neutrophil Elastase. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Dec 1;174(11):1189–98.
115. Vassallo R, Tamada K, Lau JS, Kroening PR, Chen L. Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Aug 15;175(4):2684–91.
116. Kroening PR, Barnes TW, Pease L, Limper A, Kita H, Vassallo R. Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Jul 15;181(2):1536–47.
117. Larsen JM, Steen-Jensen DB, Laursen JM, Søndergaard JN, Musavian HS, Butt TM, et al. Divergent Pro-Inflammatory Profile of Human Dendritic Cells in Response to Commensal and Pathogenic Bacteria Associated with the Airway Microbiota. *PLoS ONE [Internet]*. 2012 Feb 21 [cited 2016 Jul 5];7(2).
118. Cerboni S, Gentili M, Manel N. Diversity of pathogen sensors in dendritic cells. *Adv Immunol*. 2013;120:211–37.
119. Guilliams M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(2):94–108.
120. Wang D, Sun B, Feng M, Feng H, Gong W, Liu Q, et al. Role of scavenger receptors in dendritic cell function. *Hum Immunol*. 2015 Jun;76(6):442–6.
121. Blank F, Wehrli M, Lehmann A, Baum O, Gehr P, von Garnier C, et al. Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall. *Immunobiology*. 2011 Feb;216(1–2):86–95.
122. Segura E, Villadangos JA. A Modular and Combinatorial View of the Antigen Cross-Presentation Pathway in Dendritic Cells. *Traffic*. 2011 Dec 1;12(12):1677–85.
123. Joffre O, Nolte MA, Spörri R, Sousa CR e. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2009 Jan 1;227(1):234–47.
124. Eberl G, Colonna M, Santo JPD, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science*. 2015 May 22;348(6237):aaa6566.

125. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 [cited 2015 Apr 8];
126. D'hulst AI, Maes T, Bracke KR, Demedts IK, Tournoy KG, Joos GF, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in scid-mice. Is the acquired immune system required? *Respir Res*. 2005;6:147.
127. Glader P, Wachenfeldt K von, Löfdahl C-G. Systemic CD4+ T-cell activation is correlated with FEV1 in smokers. *Respir Med*. 2006 Jun 1;100(6):1088–93.
128. Vargas-Rojas MI, Ramírez-Venegas A, Limón-Camacho L, Ochoa L, Hernández-Zenteno R, Sansores RH. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2011 Nov;105(11):1648–54.
129. Wang H, Ying H, Wang S, Gu X, Weng Y, Peng W, et al. Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Respir J*. 2014 juin;n/a-n/a.
130. 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(8):909–16.
131. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2003 May 1;3(5):361–70.
132. Zhou H, Hua W, Jin Y, Zhang C, Che L, Xia L, et al. Tc17 cells are associated with cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema. *Respirology*. 2015 avril;20(3):426–33.
133. Freeman CM, Han MK, Martinez FJ, Murray S, Liu LX, Chensue SW, et al. Cytotoxic Potential of Lung CD8+ T Cells Increases with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severity and with In Vitro Stimulation by IL-18 or IL-15. *J Immunol*. 2010 Jun 1;184(11):6504–13.
134. Freeman CM, Martinez FJ, Han MK, Washko, GR, McCubbrey AL, Chensue SW, et al. Lung CD8+ T cells in COPD have increased expression of bacterial TLRs. *Respir Res*. 2013;14(1):13.
135. Bosken CH, Hards J, Gatter K, Hogg JC. Characterization of the Inflammatory Reaction in the Peripheral Airways of Cigarette Smokers Using Immunocytochemistry. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Apr 1;145(4_pt_1):911–7.
136. Eustace A, Smyth LJC, Mitchell L, Williamson K, Plumb J, Singh D. Identification of cells expressing IL-17A and IL-17F in the lungs of patients with COPD. *Chest*. 2011 May;139(5):1089–100.
137. Roos AB, Sandén C, Mori M, Bjermer L, Stampfli MR, Erjefält JS. IL-17A Is Elevated in End-Stage Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Contributes to Cigarette Smoke-induced Lymphoid Neogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Apr 6;191(11):1232–41.
138. van der Strate BWA, Postma DS, Brandsma C-A, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, et al. Cigarette Smoke-induced Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Apr 1;173(7):751–8.

139. Polverino F, Cosio BG, Pons J, Laucho-Contreras M, Tejera P, Iglesias A, et al. B Cell–Activating Factor. An Orchestrator of Lymphoid Follicles in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Jun 13;192(6):695–705.
140. Bagdonas E, Raudoniute J, Bruzauskaite I, Aldonyte. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015 Jun;995.
141. Enelow RI, Mohammed AZ, Stoler MH, Liu AN, Young JS, Lou YH, et al. Structural and functional consequences of alveolar cell recognition by CD8(+) T lymphocytes in experimental lung disease. *J Clin Invest*. 1998 Nov 1;102(9):1653–61.
142. Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LE, Pilewski JM, Stoner MW, Csizmadia E, et al. Autoantibodies in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jan 15;177(2):156–63.
143. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol*. 2016;78(1):481–504.
144. Han MK, Huang YJ, LiPuma JJ, Boushey HA, Boucher RC, Cookson WO, et al. Significance of the microbiome in obstructive lung disease. *Thorax*. 2012 May;67(5):456–63.
145. Aguirre E, Galiana A, Mira A, Guardiola R, Sánchez-Guillén L, Garcia-Pachon E, et al. Analysis of microbiota in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2015 May;123(5):427–32.
146. Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink JV, et al. The Lung Tissue Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 May 15;185(10):1073–80.
147. Hogan DA, Willger SD, Dolben EL, Hampton TH, Stanton BA, Morrison HG, et al. Analysis of Lung Microbiota in Bronchoalveolar Lavage, Protected Brush and Sputum Samples from Subjects with Mild-To-Moderate Cystic Fibrosis Lung Disease. *PLOS ONE*. 2016 Mar 4;11(3):e0149998.
148. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, et al. Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann Am Thorac Soc*. 2015 Jun;12(6):821–30.
149. Cabrera-Rubio R, Garcia-Núñez M, Setó L, Antó JM, Moya A, Monsó E, et al. Microbiome Diversity in the Bronchial Tracts of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Clin Microbiol*. 2012 Nov;50(11):3562–8.
150. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, et al. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PloS One*. 2011;6(2):e16384.
151. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways. Neyrolles O, editor. *PLoS ONE*. 2010 Jan 5;5(1):e8578.
152. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical Continuity of Bacterial Populations in the Healthy Human Respiratory Tract. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Oct 15;184(8):957–63.

153. Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, et al. Comparison of the Respiratory Microbiome in Healthy Nonsmokers and Smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 May 15;187(10):1067–75.
154. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. *mBio* [Internet]. 2015 Mar 3 [cited 2016 Jul 6];6(2).
155. Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, et al. The Airway Microbiota in Cystic Fibrosis: A Complex Fungal and Bacterial Community—Implications for Therapeutic Management. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 Apr 27 [cited 2016 Jul 6];7(4).
156. Bauer H, Horowitz RE, Levenson SM, Popper H. The Response of the Lymphatic Tissue to the Microbial Flora. *Studies on Germfree Mice*. *Am J Pathol*. 1963 Apr;42(4):471–83.
157. Gollwitzer ES, Saglani S, Trompette A, Yadava K, Sherburn R, McCoy KD, et al. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med*. 2014;20(6):642–7.
158. Biesbroek G, Tsvitvadze E, Sanders EAM, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJB, et al. Early Respiratory Microbiota Composition Determines Bacterial Succession Patterns and Respiratory Health in Children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Oct 20;190(11):1283–92.
159. Laufer AS, Metlay JP, Gent JF, Fennie KP, Kong Y, Pettigrew MM. Microbial communities of the upper respiratory tract and otitis media in children. *mBio*. 2011;2(1):e00245-210.
160. Cheng M, Qian L, Shen G, Bian G, Xu T, Xu W, et al. Microbiota Modulate Tumoral Immune Surveillance in Lung through a $\gamma\delta$ T17 Immune Cell-Dependent Mechanism. *Cancer Res*. 2014 Aug 1;74(15):4030–41.
161. van Woerden HC, Gregory C, Brown R, Marchesi JR, Hoogendoorn B, Matthews IP. Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infect Dis*. 2013 Feb 5;13:69.
162. Young JC, Chehoud C, Bittinger K, Bailey A, Diamond JM, Cantu E, et al. Viral metagenomics reveal blooms of anelloviruses in the respiratory tract of lung transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2015 Jan;15(1):200–9.
163. Sethi S, Murphy TF. Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in 2000: a State-of-the-Art Review. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr;14(2):336–63.
164. Pragman AA, Kim HB, Reilly CS, Wendt C, Isaacson RE. The Lung Microbiome in Moderate and Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 Oct 11 [cited 2016 Jul 5];7(10).
165. Garcia-Nuñez M, Millares L, Pomares X, Ferrari R, Pérez-Brocal V, Gallego M, et al. Severity-Related Changes of Bronchial Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Clin Microbiol*. 2014 Dec;52(12):4217–23.
166. Segal LN, Alekseyenko AV, Clemente JC, Kulkarni R, Wu B, Chen H, et al. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome*. 2013 Jul 1;1:19.

167. Yadava K, Pattaroni C, Sichelstiel AK, Trompette A, Gollwitzer ES, Salami O, et al. Microbiota Promotes Chronic Pulmonary Inflammation by Enhancing IL-17A and Autoantibodies. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Dec 2;193(9):975–87.
168. Cui L, Lucht L, Tipton L, Rogers MB, Fitch A, Kessinger C, et al. Topographic Diversity of the Respiratory Tract Mycobioome and Alteration in HIV and Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Apr 15;191(8):932–42.
169. Morris A, Sciruba FC, Lebedeva IP, Githaiga A, Elliott WM, Hogg JC, et al. Association of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severity and Pneumocystis Colonization. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Aug 15;170(4):408–13.
170. Christensen PJ, Preston AM, Ling T, Du M, Fields WB, Curtis JL, et al. Pneumocystis murina Infection and Cigarette Smoke Exposure Interact To Cause Increased Organism Burden, Development of Airspace Enlargement, and Pulmonary Inflammation in Mice. *Infect Immun*. 2008 Aug;76(8):3481–90.
171. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, et al. Respiratory Viruses, Symptoms, and Inflammatory Markers in Acute Exacerbations and Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 1;164(9):1618–23.
172. Matsuse T, Hayashi S, Kuwano K, Keunecke H, Jefferies WA, Hogg JC. Latent Adenoviral Infection in the Pathogenesis of Chronic Airways Obstruction. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Jul 1;146(1):177–84.
173. Vitalis TZ, Kern I, Croome A, Behzad H, Hayashi S, Hogg JC. The effect of latent adenovirus 5 infection on cigarette smoke-induced lung inflammation. *Eur Respir J*. 1998 Mar 1;11(3):664–9.
174. Rangelov K, Sethi S. Role of infections. *Clin Chest Med*. 2014 Mar;35(1):87–100.
175. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. Airway Inflammation and Bronchial Bacterial Colonization in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 May 1;173(9):991–8.
176. Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med*. 2000 Sep;109(4):288–95.
177. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2008 Nov 27;359(22):2355–65.
178. Sethi S, Wrona C, Eschberger K, Lobbins P, Cai X, Murphy TF. Inflammatory profile of new bacterial strain exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Mar 1;177(5):491–7.
179. Bresser P, Out TA, van ALPHEN L, Jansen HM, Lutter R. Airway Inflammation in Nonobstructive and Obstructive Chronic Bronchitis with Chronic Haemophilus influenzae Airway Infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Sep 1;162(3):947–52.

180. Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu X-X, et al. Activation of NF- κ B by nontypeable *Haemophilus influenzae* is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK- $\text{IKK}\alpha/\beta$ - $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8774-9.
181. Wang B, Cleary PP, Xu H, Li J-D. Up-Regulation of Interleukin-8 by Novel Small Cytoplasmic Molecules of Nontypeable *Haemophilus influenzae* via p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways. *Infect Immun*. 2003 Oct;71(10):5523-30.
182. Swords WE, Ketterer MR, Shao J, Campbell CA, Weiser JN, Apicella MA. Binding of the non-typeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling. *Cell Microbiol*. 2001 Aug;3(8):525-36.
183. N'Guessan PD, Temmesfeld-Wollbrück B, Zahlten J, Eitel J, Zabel S, Schmeck B, et al. *Moraxella catarrhalis* induces ERK- and NF- κ B-dependent COX-2 and prostaglandin E2 in lung epithelium. *Eur Respir J*. 2007 Sep 1;30(3):443-51.
184. Parameswaran GI, Wrona CT, Murphy TF, Sethi S. *Moraxella catarrhalis* acquisition, airway inflammation and protease-antiprotease balance in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Infect Dis*. 2009;9:178.
185. DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*. 1998 Jun 1;101(11):2598-605.
186. Patel I, Seemungal T, Wilks M, Lloyd-Owen S, Donaldson G, Wedzicha J. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax*. 2002 Sep;57(9):759-64.
187. Laan M, Bozinovski S, Anderson GP. Cigarette Smoke Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Production of Inflammatory Cytokines by Suppressing the Activation of Activator Protein-1 in Bronchial Epithelial Cells. *J Immunol*. 2004 Sep 15;173(6):4164-70.
188. Hristova M, Spiess PC, Kasahara DI, Randall MJ, Deng B, van der Vliet A. The Tobacco Smoke Component, Acrolein, Suppresses Innate Macrophage Responses by Direct Alkylation of c-Jun N-Terminal Kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Jan;46(1):23-33.
189. Sethi S. Molecular Diagnosis of Respiratory Tract Infection in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Infect Dis*. 2011 Apr 1;52(Supplement 4):S290-5.
190. Sint T, Donohue JF, Ghio AJ. Ambient air pollution particles and the acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Inhal Toxicol*. 2008 Jan;20(1):25-9.
191. Faustini A, Stafoggia M, Colais P, Berti G, Bisanti L, Cadum E, et al. Air pollution and multiple acute respiratory outcomes. *Eur Respir J*. 2013 Aug 1;42(2):304-13.
192. Hurst JR, Perera WR, Wilkinson TMA, Donaldson GC, Wedzicha JA. Systemic and Upper and Lower Airway Inflammation at Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Jan 1;173(1):71-8.
193. Crooks SW, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Bronchial inflammation in acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis: the role of leukotriene B4. *Eur Respir J*. 2000 Feb 1;15(2):274-80.

194. Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, et al. Granulocyte Inflammatory Markers and Airway Infection during Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Feb 1;163(2):349–55.
195. Biernacki W, Kharitonov S, Barnes P. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax*. 2003 Apr;58(4):294–8.
196. Bathoorn E, Liesker JJW, Postma DS, Koëter GH, van der Toorn M, van der Heide S, et al. Change in inflammation in out-patient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2009;4:101–9.
197. Footitt J, Mallia P, Durham AL, Ho WE, Trujillo-Torralbo M-B, Telcian AG, et al. Oxidative and Nitrosative Stress and Histone Deacetylase-2 Activity in Exacerbations of COPD. *Chest*. 2016 Jan;149(1):62–73.
198. Watanabe T, Jono H, Han J, Lim DJ, Li J-D. Synergistic activation of NF- κ B by nontypeable *Haemophilus influenzae* and tumor necrosis factor α . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 9;101(10):3563–8.
199. Nikota JK, Shen P, Morissette MC, Fernandes K, Roos A, Chu DK, et al. Cigarette Smoke Primes the Pulmonary Environment to IL-1 α /CXCR-2-Dependent Nontypeable *Haemophilus influenzae*-Exacerbated Neutrophilia in Mice. *J Immunol*. 2014 Sep 15;193(6):3134–45.
200. Pascoe S, Locantore N, Dransfield MT, Barnes NC, Pavord ID. Blood eosinophil counts, exacerbations, and response to the addition of inhaled fluticasone furoate to vilanterol in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a secondary analysis of data from two parallel randomised controlled trials. *Lancet Respir Med*. 2015 juin;3(6):435–42.
201. Bafadhel M, Davies L, Calverley PMA, Aaron SD, Brightling CE, Pavord ID. Blood eosinophil guided prednisolone therapy for exacerbations of COPD: a further analysis. *Eur Respir J*. 2014 Sep 1;44(3):789–91.
202. Caramori G, Romagnoli M, Casolari P, Bellettato C, Casoni G, Boschetto P, et al. Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. *Thorax*. 2003 Apr;58(4):348–51.
203. Lin J-L, Thomas PS. Current perspectives of oxidative stress and its measurement in chronic obstructive pulmonary disease. *Copd*. 2010 Aug;7(4):291–306.
204. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, et al. Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Identification of Biologic Clusters and Their Biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Sep 15;184(6):662–71.
205. Damera G, Pham T-H, Zhang J, Ward CK, Newbold P, Ranade K, et al. A Sputum Proteomic Signature That Associates with Increased IL-1 β Levels and Bacterial Exacerbations of COPD. *Lung*. 2016 Apr 15;194(3):363–9.
206. Aaron SD, Vandemheen KL, Maltais F, Field SK, Sin DD, Bourbeau J, et al. TNF α antagonists for acute exacerbations of COPD: a randomised double-blind controlled trial. *Thorax*. 2013 Feb 1;68(2):142–8.

207. Fredericks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev.* 1996 Jan;9(1):18–33.
208. Zwaans W a. R, Mallia P, van Winden MEC, Rohde GGU. The relevance of respiratory viral infections in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease—a systematic review. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2014 Oct;61(2):181–8.
209. Mallia P, Message SD, Gielen V, Contoli M, Gray K, Keadze T, et al. Experimental Rhinovirus Infection as a Human Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Mar 15;183(6):734–42.
210. George SN, Garcha DS, Mackay AJ, Patel ARC, Singh R, Sapsford RJ, et al. Human rhinovirus infection during naturally occurring COPD exacerbations. *Eur Respir J.* 2014 Jul 1;44(1):87–96.
211. Ritchie AI, Farne HA, Singanayagam A, Jackson DJ, Mallia P, Johnston SL. Pathogenesis of Viral Infection in Exacerbations of Airway Disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2015 Nov 1;12(Supplement 2):S115–32.
212. Schneider D, Ganesan S, Comstock AT, Meldrum CA, Mahidhara R, Goldsmith AM, et al. Increased Cytokine Response of Rhinovirus-infected Airway Epithelial Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Aug 1;182(3):332–40.
213. Blaas D, Fuchs R. Mechanism of human rhinovirus infections. *Mol Cell Pediatr [Internet].* 2016 Jun 1 [cited 2016 Jul 9];3.
214. Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, Turato G, Calabro S, Potena A, et al. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Mar 1;149(3):803–10.
215. Papi A, Contoli M, Adcock IM, Bellettato C, Padovani A, Casolari P, et al. Rhinovirus infection causes steroid resistance in airway epithelium through nuclear factor κ B and c-Jun N-terminal kinase activation. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Nov;132(5):1075–1085.e6.
216. Koarai A, Yanagisawa S, Sugiura H, Ichikawa T, Akamatsu K, Hirano T, et al. Cigarette smoke augments the expression and responses of toll-like receptor 3 in human macrophages. *Respirology.* 2012 Aug 1;17(6):1018–25.
217. Hudy MH, Proud D. Cigarette smoke enhances human rhinovirus-induced CXCL8 production via HuR-mediated mRNA stabilization in human airway epithelial cells. *Respir Res.* 2013;14:88.
218. Hudy MH, Traves SL, Wiehler S, Proud D. Cigarette smoke modulates rhinovirus-induced airway epithelial cell chemokine production. *Eur Respir J.* 2010 Jun;35(6):1256–63.
219. Sethi S, Sethi R, Eschberger K, Lobbins P, Cai X, Grant BJB, et al. Airway Bacterial Concentrations and Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 août;176(4):356–61.
220. Sethi S, Evans N, Grant BJB, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2002 Aug 15;347(7):465–71.
221. Lee H-Y, Andalibi A, Webster P, Moon S-K, Teufert K, Kang S-H, et al. Antimicrobial activity of innate immune molecules against *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Infect Dis.* 2004 May 5;4(1):12.

222. Hiemstra PS, Amatngalim GD, van der Does AM, Taube C. Antimicrobial Peptides and Innate Lung Defenses: Role in Infectious and Noninfectious Lung Diseases and Therapeutic Applications. *Chest*. 2016 février;149(2):545–51.
223. Knobloch J, Schild K, Jungck D, Urban K, Müller K, Schweda EKH, et al. The T-Helper Cell Type 1 Immune Response to Gram-Negative Bacterial Infections Is Impaired in COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jan 15;183(2):204–14.
224. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, et al. Infections and Airway Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severe Exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 May 15;173(10):1114–21.
225. Hutchinson AF, Ghimire AK, Thompson MA, Black JF, Brand CA, Lowe AJ, et al. A community-based, time-matched, case-control study of respiratory viruses and exacerbations of COPD. *Respir Med*. 2007 Dec 1;101(12):2472–81.
226. Bozinovski S, Hutchinson A, Thompson M, MacGregor L, Black J, Giannakis E, et al. Serum Amyloid A Is a Biomarker of Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Feb 1;177(3):269–78.
227. De Serres G, Lampron N, La Forge J, Rouleau I, Bourbeau J, Weiss K, et al. Importance of viral and bacterial infections in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *J Clin Virol*. 2009 Oct;46(2):129–33.
228. Pant S, Walters EH, Griffiths A, Wood-Baker R, Johns DP, Reid DW. Airway inflammation and anti-protease defences rapidly improve during treatment of an acute exacerbation of COPD. *Respirol Carlton Vic*. 2009 May;14(4):495–503.
229. Kherad O, Kaiser L, Bridevaux P-O, Sarasin F, Thomas Y, Janssens J-P, et al. Upper-respiratory viral infection, biomarkers, and COPD exacerbations. *Chest*. 2010 Oct;138(4):896–904.
230. Dimopoulos G, Lerikou M, Tsiodras S, Chranioti A, Perros E, Anagnostopoulou U, et al. Viral epidemiology of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012 Feb;25(1):12–8.
231. Perotin J-M, Dury S, Renois F, Deslee G, Wolak A, Duval V, et al. Detection of multiple viral and bacterial infections in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a pilot prospective study. *J Med Virol*. 2013 May;85(5):866–73.
232. Mallia P, Footitt J, Sotero R, Jepson A, Contoli M, Trujillo-Torralbo M-B, et al. Rhinovirus Infection Induces Degradation of Antimicrobial Peptides and Secondary Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Dec 1;186(11):1117–24.
233. Molyneaux PL, Mallia P, Cox MJ, Footitt J, Willis-Owen SAG, Homola D, et al. Outgrowth of the Bacterial Airway Microbiome after Rhinovirus Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Nov 15;188(10):1224–31.
234. Bellinghausen C, Gulraiz F, Heinzmann ACA, Dentener MA, Savelkoul PHM, Wouters EF, et al. Exposure to common respiratory bacteria alters the airway epithelial response to subsequent viral infection. *Respir Res [Internet]*. 2016 [cited 2016 Jul 5];17.

235. Rathore JS, Wang Y. Protective role of Th17 cells in pulmonary infection. *Vaccine*. 2016 Mar 18;34(13):1504–14.
236. Pappu R, Rutz S, Ouyang W. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends Immunol*. 2012 Jul;33(7):343–9.
237. McAleer JP, Kolls JK. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunol Rev*. 2014 Jul 1;260(1):129–44.
238. Sabat R, Ouyang W, Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 Jan;13(1):21–38.
239. Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol Rev*. 2013 Mar 1;252(1):116–32.
240. Liang SC, Long AJ, Bennett F, Whitters MJ, Karim R, Collins M, et al. An IL-17F/A Heterodimer Protein Is Produced by Mouse Th17 Cells and Induces Airway Neutrophil Recruitment. *J Immunol*. 2007 Dec 1;179(11):7791–9.
241. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med*. 2008;14(3):275–81.
242. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med*. 2010 Jun 7;207(6):1293–305.
243. 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 Aug;10(4):459–65.
244. Maneechotesuwan K, Kasetsinsombat K, Wongkajornsilp A, Barnes PJ. Decreased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and IL-10/IL-17A ratio in patients with COPD. *Thorax*. 2013 Apr 1;68(4):330–7.
245. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, et al. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol*. 2009 Aug 1;157(2):316–24.
246. Chang Y, Nadigel J, Boulais N, Bourbeau J, Maltais F, Eidelman DH, et al. CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2011;12:43.
247. Zhang J, Chu S, Zhong X, Lao Q, He Z, Liang Y. Increased expression of CD4+IL-17+ cells in the lung tissue of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and smokers. *Int Immunopharmacol*. 2013 Jan;15(1):58–66.
248. Bozinovski S, Seow HJ, Chan SPJ, Anthony D, McQualter J, Hansen M, et al. Innate cellular sources of interleukin-17A regulate macrophage accumulation in cigarette- smoke-induced lung inflammation in mice. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2015 Nov 1;129(9):785–96.
249. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):485–517.

250. Kalathil SG, Lugade AA, Pradhan V, Miller A, Parameswaran GI, Sethi S, et al. T-Regulatory Cells and Programmed Death 1+ T Cells Contribute to Effector T-Cell Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 mai;190(1):40–50.
251. Kim HY, Lee HJ, Chang Y-J, Pichavant M, Shore SA, Fitzgerald KA, et al. IL-17 producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med*. 2014 Jan;20(1):54–61.
252. Pauwels NS, Bracke KR, Dupont LL, Pottelberge GRV, Provoost S, Berghe TV, et al. Role of IL-1 α and the Nlrp3/caspase-1/IL-1 β axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD. *Eur Respir J*. 2011 Nov 1;38(5):1019–28.
253. Pichavant M, Goya S, Meyer EH, Johnston RA, Kim HY, Matangkasombut P, et al. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med*. 2008 Feb 18;205(2):385–93.
254. Li J, Zhou W, Huang K, Jin Y, Gao J. Interleukin-22 exacerbates airway inflammation induced by short-term exposure to cigarette smoke in mice. *Acta Pharmacol Sin*. 2014 Nov;35(11):1393–401.
255. McGovern TK, Goldberger M, Allard B, Farahnak S, Hamamoto Y, O’Sullivan M, et al. Neutrophils Mediate Airway Hyperresponsiveness after Chlorine-Induced Airway Injury in the Mouse. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Sep 5;52(4):513–22.
256. Harrison OJ, Foley J, Bolognese BJ, Long E, Podolin PL, Walsh PT. Airway infiltration of CD4+ CCR6+ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement. *Immunol Lett*. 2008 Nov 16;121(1):13–21.
257. Bracke KR, D’hulst AI, Maes T, Moerloose KB, Demedts IK, Lebecque S, et al. Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation and Emphysema Are Attenuated in CCR6-Deficient Mice. *J Immunol*. 2006 Oct 1;177(7):4350–9.
258. Chen K, Pociask DA, McAleer JP, Chan YR, Alcorn JF, Kreindler JL, et al. IL-17RA Is Required for CCL2 Expression, Macrophage Recruitment, and Emphysema in Response to Cigarette Smoke. *PLOS ONE*. 2011 May 27;6(5):e20333.
259. Roos AB, Sethi S, Nikota J, Wrona CT, Dorrington MG, Sandén C, et al. IL-17A and the Promotion of Neutrophilia in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Jun 3;192(4):428–37.
260. Maher BM, Mulcahy ME, Murphy AG, Wilk M, O’Keefe KM, Geoghegan JA, et al. Nlrp-3-Driven Interleukin 17 Production by $\gamma\delta$ T Cells Controls Infection Outcomes during *Staphylococcus aureus* Surgical Site Infection. *Infect Immun*. 2013 Dec;81(12):4478–89.
261. Lu W, You R, Yuan X, Yang T, Samuel ELG, Marcano DC, et al. The microRNA miR-22 inhibits the histone deacetylase HDAC4 to promote TH17 cell-dependent emphysema. *Nat Immunol*. 2015;16(11):1185–94.
262. Kurimoto E, Miyahara N, Kanehiro A, Waseda K, Taniguchi A, Ikeda G, et al. IL-17A is essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice. *Respir Res*. 2013;14:5.

263. Overbeek SA, Braber S, Koelink PJ, Henricks PAJ, Mortaz E, Loi ATL, et al. Cigarette Smoke-Induced Collagen Destruction; Key to Chronic Neutrophilic Airway Inflammation? *PLOS ONE*. 2013 Jan 31;8(1):e55612.
264. Chang Y, Al-Alwan L, Audusseau S, Chouiali F, Carlevaro-Fita J, Iwakura Y, et al. Genetic deletion of IL-17A reduces cigarette smoke-induced inflammation and alveolar type II cell apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Jan;306(2):L132-143.
265. Zhou H, Kobzik L. Effect of concentrated ambient particles on macrophage phagocytosis and killing of *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Apr;36(4):460–5.
266. Andelid K, Tengvall S, Andersson A, Levänen B, Christensson K, Jirholt P, et al. Systemic cytokine signaling via IL-17 in smokers with obstructive pulmonary disease: a link to bacterial colonization? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015 Mar;689.
267. Zhang X, Zheng H, Zhang H, Ma W, Wang F, Liu C, et al. Increased interleukin (IL)-8 and decreased IL-17 production in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) provoked by cigarette smoke. *Cytokine*. 2011 Dec;56(3):717–25.
268. Sharan R, Perez-Cruz M, Kervoaze G, Gosset P, Weynants V, Godfroid F, et al. Interleukin-22 protects against non-typeable *Haemophilus influenzae* infection: alteration during chronic obstructive pulmonary disease. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2016 May 4 [cited 2016 Jun 8]
269. Ivanov S, Fontaine J, Paget C, Macho Fernandez E, Van Maele L, Renneson J, et al. Key Role for Respiratory CD103+ Dendritic Cells, IFN- γ , and IL-17 in Protection Against *Streptococcus pneumoniae* Infection in Response to α -Galactosylceramide. *J Infect Dis* [Internet]. 2012 Jul 20 [cited 2012 Jul 26]
270. Marqués JM, Rial A, Muñoz N, Pellay F-X, Van Maele L, Léger H, et al. Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN- γ -mediated immunity. *Immunobiology*. 2012 Apr;217(4):420–9.
271. Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman HA, et al. Interferon γ Induction of Pulmonary Emphysema in the Adult Murine Lung. *J Exp Med*. 2000 Dec 4;192(11):1587–600.
272. Dima E, Koltsida O, Katsaounou P, Vakali S, Koutsoukou A, Koulouris NG, et al. Implication of Interleukin (IL)-18 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cytokine*. 2015 Aug;74(2):313–7.
273. Ivanov S, Renneson J, Fontaine J, Barthelemy A, Paget C, Fernandez EM, et al. Interleukin-22 Reduces Lung Inflammation during Influenza A Virus Infection and Protects against Secondary Bacterial Infection. *J Virol*. 2013 Jun 15;87(12):6911–24.
274. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov D, Porte R, Deruy E, et al. Activation of Type 3 Innate Lymphoid Cells and Interleukin 22 Secretion in the Lungs During *Streptococcus pneumoniae* Infection. *J Infect Dis*. 2014 Mar 31
275. Wozniak KL, Hole CR, Yano J, Fidel PL, Wormley FL. Characterization of IL-22 and antimicrobial peptide production in mice protected against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Microbiology*. 2014 Jul;160(Pt 7):1440–52.

276. Fatykhova D, Rabes A, Machnik C, Guruprasad K, Pache F, Berg J, et al. Serotype 1 and 8 Pneumococci Evade Sensing by Inflammasomes in Human Lung Tissue. *PLOS ONE*. 2015 Aug 28;10(8):e0137108.
277. Koppel EA, Saeland E, de Cooker DJM, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. DC-SIGN specifically recognizes *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3 and 14. *Immunobiology*. 2005;210(2–4):203–10.
278. Domenech A, Ardanuy C, Calatayud L, Santos S, Tubau F, Grau I, et al. Serotypes and genotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing pneumonia and acute exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Mar 1;66(3):487–93.
279. Pérez-Trallero E, Marimón JM, Larruskain J, Alonso M, Ercibengoa M. Antimicrobial Susceptibilities and Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Elderly Patients with Pneumonia and Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jun 1;55(6):2729–34.
280. Domenech A, Ardanuy C, Pallares R, Grau I, Santos S, De la Campa AG, et al. Some Pneumococcal Serotypes Are More Frequently Associated with Relapses of Acute Exacerbations in COPD Patients. *PLoS ONE*. 2013 Mar 11;8(3):e59027.
281. Tardif V, Riquelme SA, Remy S, Carreño LJ, Cortés CM, Simon T, et al. Carbon monoxide decreases endosome-lysosome fusion and inhibits soluble antigen presentation by dendritic cells to T cells. *Eur J Immunol*. 2013 Nov;43(11):2832–44.
282. Gorvel L, Textoris J, Banchereau R, Ben Amara A, Tantibhedhyangkul W, von Bargen K, et al. Intracellular Bacteria Interfere with Dendritic Cell Functions: Role of the Type I Interferon Pathway. *PLoS ONE*. 2014 Jun 10;9(6):e99420.
283. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*. 2011 Apr 28;472(7344):476–80.
284. Karimi K, Sarir H, Mortaz E, Smit JJ, Hosseini H, De Kimpe SJ, et al. Toll-like receptor-4 mediates cigarette smoke-induced cytokine production by human macrophages. *Respir Res*. 2006;7:66.
285. Van Pottelberge GR, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. The Role of Dendritic Cells in the Pathogenesis of COPD: Liaison Officers in the Front Line. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2009 Jan 1;6(4):284–90.
286. Guillon A, Jouan Y, Brea D, Gueugnon F, Dalloneau E, Baranek T, et al. Neutrophil proteases alter the interleukin-22-receptor-dependent lung antimicrobial defence. *Eur Respir J*. 2015 Aug 6;ERJ-02151-2014.
287. Scharf S, Zahlten J, Szymanski K, Hippenstiel S, Suttorp N, N'Guessan PD. *Streptococcus pneumoniae* induces human β -defensin-2 and -3 in human lung epithelium. *Exp Lung Res*. 2012 Feb 1;38(2):100–10.
288. Pichavant M, Sharan R, Le Rouzic O, Olivier C, Hennegrave F, Rémy G, et al. IL-22 Defect During *Streptococcus pneumoniae* Infection Triggers Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *EBioMedicine*. 2015 Sep 26;2(11):1686–96.

289. Wiehler S, Proud D. Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Aug;293(2):L505-515.
290. van de Kerkhof PCM, Griffiths CEM, Reich K, Leonardi CL, Blauvelt A, Tsai T-F, et al. Secukinumab long-term safety experience: A pooled analysis of 10 phase II and III clinical studies in patients with moderate to severe plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Jul;75(1):83–98.e4.
291. Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Renneson J, Blanc F, Pichavant M, 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 Mar 16;287(12):8816–29.
292. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Songhet P, Dumoutier L, Ferrero I, et al. TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Jul 15;185(2):1177–85.
293. Taylor DN, Treanor JJ, Sheldon EA, Johnson C, Umlauf S, Song L, et al. Development of VAX128, a recombinant hemagglutinin (HA) influenza-flagellin fusion vaccine with improved safety and immune response. *Vaccine*. 2012 Aug 24;30(39):5761–9.

