

Thèse de Doctorat

Anissa BESBES

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Biologie, Médecine, Santé

Spécialité : Biologie des organismes

Unité de recherche : EA3826 « Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections »

Soutenue le : 02 Juillet 2018

Thèse N° :

Physiopathologie de la pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* : Implication des cellules épithéliales alvéolaires via l'IL-22 et rôle de l'échappement immunitaire

JURY

Président du jury : **Professeur Anne-Claire LUKASZEWICZ**

Rapporteurs : **Anne-Claire LUKASZEWICZ**, MD, PhD, PU-PH-Hospices Civils de Lyon
Vincent MINVILLE, MD, PhD, PU-PH, CHU de Toulouse

Directeur de Thèse : **Karim ASEHNOUNE**, MD, PhD, PU-PH, Université de Nantes EA 3826

Co-directeur de Thèse : **Frédéric ALTARE**, PhD INSERM UMR1232, Centre de recherche en Cancérologie, Nantes-Angers

Co-encadrant de Thèse : **Alexis BROQUET**, PhD, Université de Nantes EA3826

Physiopathologie de la pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa*:

Implication des cellules épithéliales alvéolaires

via l'IL-22 et rôle de l'échappement immunitaire.

Table des matières :

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction:

| | |
|---|----|
| I. Pneumonies nosocomiales : | 17 |
| II. Les pathogènes : | 19 |
| 1. <i>Staphylococcus aureus</i> : | 19 |
| 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : | 20 |
| A. Facteurs de virulence nécessitant un contact avec la cellule hôte : | 22 |
| B. Facteurs de virulence sans contact : | 23 |
| III. Structures pulmonaires et alvéolaires : | 24 |
| IV. Interaction Hôte/Pathogène : | 27 |
| 1. Les macrophages alvéolaires : | 29 |
| 2. Les neutrophiles : | 31 |
| 3. Les cellules Naturel Killer(NK) : | 34 |
| 4. Les cellules dendritiques : | 37 |
| 5. Rôle des cellules épithéliales dans la mise en place de la réponse innée : | 39 |
| A. Cellules épithéliales alvéolaires : | 39 |
| B. Interaction AECs/ cellules de l'immunité : | 41 |
| C. Interaction AECs / <i>P. aeruginosa</i> : | 43 |
| 6. Echappement immunitaire du <i>P. aeruginosa</i> : | 44 |
| V. Cytokines protectrices des épithéliums : | 46 |
| 1. Découverte de l'IL-22 : | 46 |
| 2. Sources de l'IL-22 : | 46 |
| 3. IL-22/IL-22RA signalisation et régulation : | 47 |
| 4. Effets de l'IL-22 : | 49 |
| 5. Les interférons IFN- λ : autres cytokines protectrices des épithéliums : | 51 |

Objectif n°1 :

| | | |
|------|--|----|
| I. | Matériels et méthodes de l'objectif n°1:..... | 57 |
| 1. | Souches bactériennes :..... | 57 |
| 2. | Culture cellulaire: | 57 |
| A. | Lignée cellulaire :..... | 57 |
| B. | Infection des cellules épithéliales: | 57 |
| C. | Traitement IL-22 : | 58 |
| 3. | Détermination de la charge bactérienne: | 58 |
| 4. | Analyse transcriptionnelle par RT-PCR :..... | 58 |
| 5. | Dégradation de l'IL-22 : | 59 |
| 6. | Dosage des cytokines produites par ELISA :..... | 59 |
| 7. | Western blot :..... | 59 |
| 8. | Marquage pour la microscopie Confocale : | 60 |
| 9. | Pneumonie in vivo et administration d'IL-28A : | 61 |
| 10. | Analyses statistiques : | 61 |
| II. | Résultats objectif n°1 (Article IL-22 soumis à l'European respiratory Journal 2018)..... | 62 |
| III. | Discussion objectif n°1 : | 69 |

Objectif n°2 :

| | | |
|------|---|-----|
| I. | Matériels et méthodes de l'objectif n°2 :..... | 99 |
| 1. | Echantillons de sang et isolation des PBMC :..... | 99 |
| 2. | Formation de granulomes <i>in vitro</i> :..... | 99 |
| 3. | Suivie de la prolifération lymphocytaire: | 99 |
| 4. | Analyse des granulomes par microscopie à haut débit :..... | 100 |
| 5. | Tri et activation des monocytes : | 100 |
| 6. | Différentiation des monocytes en cellules dendritiques immatures (iDC) et maturation des iDC en cellules dendritiques matures (mDC):..... | 100 |
| 7. | Immunofluorescence : Marquage cellulaire pour l'analyse en cytométrie en flux: | 101 |
| 8. | Analyses statistiques : | 101 |
| II. | Résultats objectif n°2 : Granulome à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 102 |
| III. | Discussion de l'objectif n°2..... | 112 |

Discussion générale:

| | | |
|----|--------------------|-----|
| I. | Bibliographie..... | 118 |
|----|--------------------|-----|

Résumé :

Pseudomonas aeruginosa (PA) est un pathogène opportuniste responsable de pneumonies nosocomiales chez les patients immunodéprimés. L'émergence des souches multirésistantes rend les traitements antibiotiques inefficaces nécessitant la mise en place de thérapeutiques alternatives.

Les cellules épithéliales alvéolaires (AEC) constituent la première barrière physique que rencontre PA et ces cellules jouent un rôle important dans la réponse innée suite à l'infection. L'interleukine(IL)-22 est une cytokine dont l'intérêt thérapeutique est prometteur de par son action de protection des épithéliums. Le renforcement de la barrière épithéliale par le traitement à l'IL-22 a montré des effets protecteurs contre l'infection à PA dans un modèle murin de pneumonie. Nous avons caractérisé l'action *in vitro* de l'IL-22 au cours de l'infection à PA en utilisant une lignée transformée d'AEC de type II et nous avons démontré que cette cytokine potentialise l'expression d'interférons lambda (IFN- λ) connus pour être bénéfiques au cours des infections virales. L'administration *in vivo* d'IFN- λ dans un modèle murin de pneumonie aiguë à PA montre une amélioration significative de la pathologie accompagnée d'une réduction du recrutement de polynucléaires neutrophiles.

PA est un pathogène capable d'échappement immunitaire lors de la mise en place de la réponse de l'hôte au cours de l'infection. En développant *ex vivo* un modèle de granulome à PA, nous avons observé une augmentation d'expression des molécules PD-L1 sur les monocytes. Ceci suggère une implication de la voie PD-1/PD-L1 dans l'épuisement lymphocytaire au cours de l'infection à PA.

Mot clefs:

Pseudomonas aeruginosa, pneumonie, Cellules épithéliales alvéolaires (AECs), Interleukine-22 (IL-22), Interféron lambda (IFN- λ), granulome, Programmed death-ligand 1(PD-L1)

Physiopathology of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia

Involvement of alveolar epithelial cells through IL-22 and role of the immune escape

Abstract:

Pseudomonas aeruginosa (PA) is an opportunistic pathogen, and a leading cause of nosocomial infections. Emergence of multidrug resistant strains alter antibiotic efficacy and requires the development of alternative therapeutics.

Alveolar epithelial cells (AEC) are the first line of defence against PA and play a crucial role in initiating immune response following infection. Interleukin (IL)-22 is a cytokine recently discovered acting specifically onto epithelial cells. IL-22 is a promising therapeutic when considering its epithelium protective action during infections. Reinforcement of epithelial barrier by IL-22 treatment showed protective effects against PA in a murine pneumonia model. We here characterized the *in vitro* IL-22 effects during PA infection by using transformed cell line of AEC type II and showed enhanced Interferons lambda (IFN- λ) production, which are known to be protective against viral infection. *In vivo* IFN- λ administration in a murine model of acute PA pneumonia showed significant pathology improvement and dampened neutrophil recruitment.

PA is a pathogen able to interfere and to escape the host response during infection. To study the mechanisms of immune escape and subversion of PA during host response, we developed an *in vitro* granuloma model following PA infection. We showed a significant induction of PD-L1 expression in monocytes suggesting a PD-1/PD-L1 involvement in T cells exhaustion during PA infection.

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa, pneumonia, Alveolar epithelial cells (AEC), Interleukine-22 (IL-22), Interferon lambda (IFN- λ), granuloma, Programmed death-ligand 1 (PD-L1)

Manuscripts:

Manuscrit1:

Interferon- λ dampen neutrophil recruitment through interleukin-22 in a pneumonia model

Manuscrit2:

Enhanced PD-L1 expression in monocytes in a granuloma model induced by *P. aeruginosa*.

Annexe :

Annexe1 :Broquet A, Jacqueline C, Davieau M, Besbes A, Roquilly A, Martin J, Caillon J, Dumoutier L, Renauld JC, Heslan M, JosienR, Asehnoune K. Interleukin-22 level is negatively correlated with neutrophil recruitment in the lungs in a Pseudomonas aeruginosa pneumonia model. Sci Rep. 2017 Sep 8;7(1):11010. doi: 10.1038/s41598-017-11518-0.

Abréviations :

A

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

ARN: Acide ribonucléique

AECs: Cellules épithéliales alvéolaires

B

BCC: Bouillon Cœur Cervele

BCG: Bacille de Calmette et Guérin

BGN: Bacille Gram Négatif

BPI: Bacterial permeability-increased protein

BSA: Bovine Serum Albumin

C

CD: Cluster de Differentiation

CFU: Colony Forming Unit

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CNF1: Cytotoxic necrotizing factor 1

CPA: Cellules présentatrices d'antigènes

CRD: Carbohydrate recognition domain

D

DAPI: 4', 6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride

DAMP: Damage-associated molecular pattern

DC: Dendritic cells

DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium

DPBS: Dulbecco Phosphate Buffered Saline

E

E. coli: *Escherichia coli*

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

Exo: Exoenzyme

F

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

G

GFP: Green Fluorescent Protein

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony Stimulatory Factor

H

hBD-2: human β -defensin 2

HLA-DR: Human Leucocytes Antigen- antigen D Related

HRP: Horse radish Peroxidase

I

IFN- λ : Interférent Lambda (IL-28A, IL-28B, IL-29)

IL: Interleukine

IL-10R β : Interleukin 10 Receptor 2

IL-22 BP: Interleukin 22 Binding Protein

IL-22RA: Interleukin 22 Receptor Alpha

ILCs: Innate Lymphoid Cells

IL-TIF: IL-10 T cell-derived inducible factor

InVS: Institut de Veille Sanitaire

ISGs: Interferon stimulated genes

K

KIR: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor

L

LB: Lymphocytes B

L DP: Lymphocytes Double Positif

LL-37: Cathélicidine

LPS: Lipopolysaccharides

LT: Lymphocytes T

LT DP8 α : Lymphocytes T double positif 8 alpha

LT $\gamma\delta$: Lymphocytes T gamma-delta

LT reg: Lymphocytes T régulateurs

M

MCP-1: Monocyte Chimioattractant Protein-1

M-CSF: Macrophage Colony Stimulatory Factor

MOI: Multiplicity of Infection

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

N

NK: Natural Killer

P

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns

PAVM: Pneumonie acquise sous ventilation mécanique

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS: Phosphate Buffered Saline

PD-L1: Programmed death ligand-1

PFA: Paraformaldehyde

PM: Poids Moléculaire

PRR: Pattern Recognition Receptors

PS: Penicilline Streptomycine

PCR: Polymerase Chain Reaction

R

REG1 α : Regenerating islet-derived protein 1 alpha

REG3 γ : Regenerating islet-derived protein 3 gamma

RIPA: Radio Immuno Precipitation Assay

RFI: Relative Fluorescence Intensity

ROS: Reactive Oxygen Species

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

S

S.aureus: *Staphylococcus aureus*

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SP-A: Surfactant Protein -A

SP-D: Surfactant Protein- D

SVF: S rum de Veau F etal

SST III: Syst me de s cr tion de type III

STAT-3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

T

TLR: Toll-Like Receptor

TNF- α : Facteur de N crose Tumorale alpha

V

VILI: Ventilator Induced Lung Injury

Liste des Figures :

| | |
|--|----|
| Figure 1: Distribution des principaux micro-organismes isolés des pneumonies..... | 17 |
| Figure 2: Génome circulaire de PAO1 | 20 |
| Figure 3: Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> | 21 |
| Figure 4: Effets des effecteurs du SSTIII de <i>P. aeruginosa</i> sur les cellules de l'hôte..... | 22 |
| Figure 5: Pneumonie..... | 24 |
| Figure 6: Structure d'une alvéole saine normale | 25 |
| Figure 7: Alvéole saine vs alvéole pendant la phase aiguë de l'infection..... | 27 |
| Figure 8: Les médiateurs de l'immunité innée et adaptative | 28 |
| Figure 9: Principaux phénotypes et fonctions des macrophages alvéolaires | 29 |
| Figure 10: Migration des neutrophiles circulants vers le site de l'infection | 31 |
| Figure 11: Afflux des neutrophiles au niveau des alvéoles..... | 32 |
| Figure 12: Réseau d'activation des NK suite à une infection bactérienne | 34 |
| Figure 13: Rôle des NK dans la surveillance immunitaire..... | 35 |
| Figure 14: Répartition des DC dans le poumon et dans les alvéoles | 37 |
| Figure 15: Rôle des cellules dendritiques dans la réponse immunitaire | 38 |
| Figure 16: Différentes jonctions cellulaires de l'épithélium | 39 |
| Figure 17: Fonctions des protéines du surfactant SP-A et SP-D | 40 |
| Figure 18: Reconnaissance du <i>P. aeruginosa</i> par les cellules épithéliales alvéolaires..... | 43 |
| Figure 19: Les différentes sources d'IL-22 | 46 |
| Figure 20: Signalisation IL-22/IL-22RA | 48 |
| Figure 21: Principaux effets de l'IL-22 | 49 |
| Figure 22: Signalisation des IFNs type III et de l'IL-22 | 51 |
| Figure 23: La neutralisation de l'IL-22 augmente la susceptibilité des souris à l'infection à <i>P. aeruginosa</i> | 55 |
| Figure 24: Schéma d'infection des AECs et traitement IL-22 <i>in vitro</i> | 63 |

| | |
|--|-----|
| Figure 25: Schéma d'infection <i>in vivo</i> et traitement à l'IL-28A | 63 |
| Figure 26: L'IL-22 booste l'expression de Reg1- α et de β -defensin 2 | 64 |
| Figure 27: Effet différentiel de l'IL-22 sur la production cytokinique | 65 |
| Figure 28: L'IL-22 stimule la production d'IFN- λ | 66 |
| Figure 29: <i>In vivo</i> l'IL-28A protège les souris contre la pneumonie à <i>P. aeruginosa</i> | 67 |
| Figure 30: Infection à <i>M.tuberculosis</i> et formation granulomateuse | 97 |
| Figure 31: Granulome à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 103 |
| Figure 32: Composition lymphocytaire du granulome à <i>P. aeruginosa</i> et à BCG | 105 |
| Figure 33: Prolifération spécifique des Lymphocytes T DP8 α | 106 |
| Figure 34: Activation des monocytes suite à l'infection à <i>P. aeruginosa</i> | 108 |
| Figure 35: Différenciation des monocytes en iDC après infection à <i>P. aeruginosa</i> | 109 |
| Figure 36: Effet de <i>P. aeruginosa</i> sur les cellules dendritiques..... | 110 |

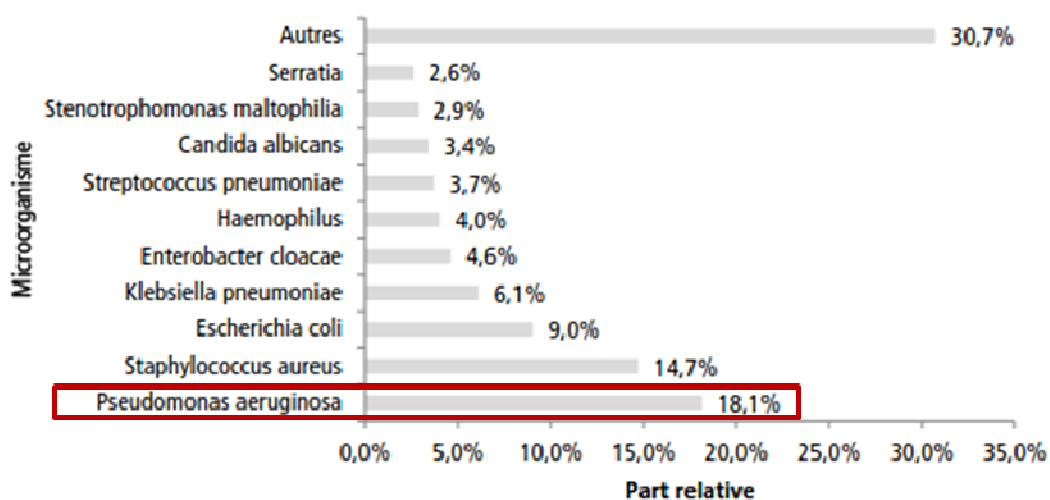
Liste des tableaux :

| | |
|---|----|
| Tableau 1: Répartition des infections nosocomiales à <i>S. aureus</i> | 19 |
| Tableau 2: Répartition des infections nosocomiales à <i>P. aeruginosa</i> | 21 |
| Tableau 3: Liste des souches bactériennes utilisées lors de cette étude..... | 57 |
| Tableau 4: Liste des amorces utilisées dans cette étude..... | 59 |

Introduction :

I. Pneumonies nosocomiales :

D'après l'Organisation mondiale de la santé, une pneumonie est une infection respiratoire aiguë affectant les poumons et plus particulièrement les alvéoles. Cette infection est causée par différents agents infectieux (virus, bactéries ou parasites). Dans notre étude nous nous intéressons plus particulièrement aux pneumonies nosocomiales dues à *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) pathogène opportuniste, et premier responsable des pneumonies nosocomiales [1].



Note : 1 653 (61,8%) des 2 675 pneumonies sans micro-organisme identifié

Figure 1: Distribution des principaux micro-organismes isolés des pneumonies

(Issue de l'Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé, France, mai-juin2012. InVS 2013)

Selon le rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) *P. aeruginosa* est la bactérie la plus fréquemment rencontrée lors des pneumonies avec 18.1% des cas, suivie de près par *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (14.7%) et par *Escherichia coli*. (*E. coli*) responsable de 9 % des pneumonies nosocomiales (Figure 1)[1].

Ces pneumonies concernent essentiellement les patients dont le système immunitaire est affaibli. Les infections pulmonaires dues à *P. aeruginosa* affectent également particulièrement les patients atteints de mucoviscidose, dont 80% développent des infections chroniques à *P. aeruginosa* [2, 3].

Les pneumonies augmentent considérablement la durée d'hospitalisation ainsi que la morbidité et la mortalité associées à ces infections. De ce fait, les pneumonies nosocomiales représentent un problème de santé public. Dans les services de réanimations, ces infections pulmonaires sont souvent associées à la ventilation mécaniquement assistée, en effet 40% des patients sous ventilation mécanique développent une pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) avec un taux de mortalité compris entre 34 et 48% pour les pneumonies dues à *P. aeruginosa* [4, 5].

II. Les pathogènes :

1. *Staphylococcus aureus* :

Staphylococcus aureus ou Staphylocoque doré est une bactérie Gram+. *S. aureus* est la souche de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et figure parmi le trio de tête des pathogènes opportunistes responsables de pneumonies nosocomiales [1] .

b. S. aureus

| Site infectieux | <i>S. aureus</i> | |
|------------------------------|------------------|--------------|
| | N | % |
| Infection du site opératoire | 630 | 31,5 |
| Bactériémie | 319 | 16,0 |
| Peau et tissus mous | 310 | 15,5 |
| Pneumonie | 186 | 9,3 |
| Infection urinaire | 168 | 8,4 |
| Autre | 384 | 19,2 |
| Total | 1 997 | 100,0 |

Tableau 1 : Répartition des infections nosocomiales à *S. aureus*

(Issu de l'Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé, France, mai-juin2012. InVS 2013)

Les infections nosocomiales à *S.aureus* affectent principalement les sites opératoires (31,5% des infections à *S. aureus*), *S. aureus* est également responsable de bactériémies (16%), d'infections de la peau et des tissus mous (15%) (Tableau 1). *S. aureus* est également en tête des bactéries responsables d'intoxications alimentaires.

2. *Pseudomonas aeruginosa* :

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram- (BGN), également connue sous le nom de bacille pyocyanique. Ce bacille mesure entre 1 à 5µm de long avec un diamètre compris entre 0.5 et 1µm. *P. aeruginosa* fait partie du genre *Pseudomonas*. Son génome est constitué de 6.3 millions paires de bases, il a été entièrement séquencé dans les années 2000 (Figure 2) [6].

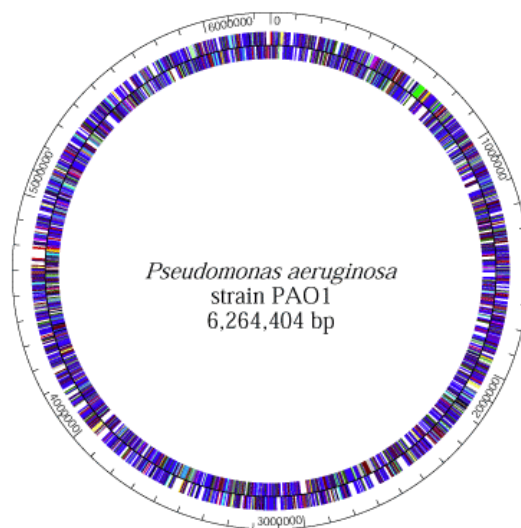


Figure 2: Génome circulaire de PAO1

(Issue du *Pseudomonas* genome Data base <http://v2.pseudomonas.com/>)

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable d'une grande partie des infections nosocomiales notamment chez les patients immunodéprimés (30%). Ces infections nosocomiales à *Pseudomonas* augmentent les taux de morbidité et de mortalité chez les patients de réanimation.

D'après le rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) 67% des infections nosocomiales à *P. aeruginosa* sont réparties entre les infections urinaires (31.1%), les pneumonies (21.7%) et les infections du site opératoire (14.2%) (Tableau 2).

c. P. aeruginosa

| Site infectieux | <i>P. aeruginosa</i> | |
|------------------------------|----------------------|--------------|
| | N | % |
| Infection urinaire | 328 | 31,1 |
| Pneumonie | 229 | 21,7 |
| Infection du site opératoire | 149 | 14,2 |
| Bactériémie | 101 | 9,6 |
| Peau et tissus mous | 83 | 7,9 |
| Autre | 163 | 15,5 |
| Total | 1 053 | 100,0 |

Tableau 2 : Répartition des infections nosocomiales à *P. aeruginosa*

(Issu de l'Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé, France, mai-juin 2012. InVS 2013)

P. aeruginosa possède de nombreux facteurs de virulence et une grande adaptabilité génétique qui lui confèrent une résistance croissante aux antibiotiques. 2 types de facteurs de virulence sont exprimés par *P. aeruginosa* ; ceux nécessitant un contact avec la cellule cible ; ceux agissant à distance par diffusion (Figure 3).

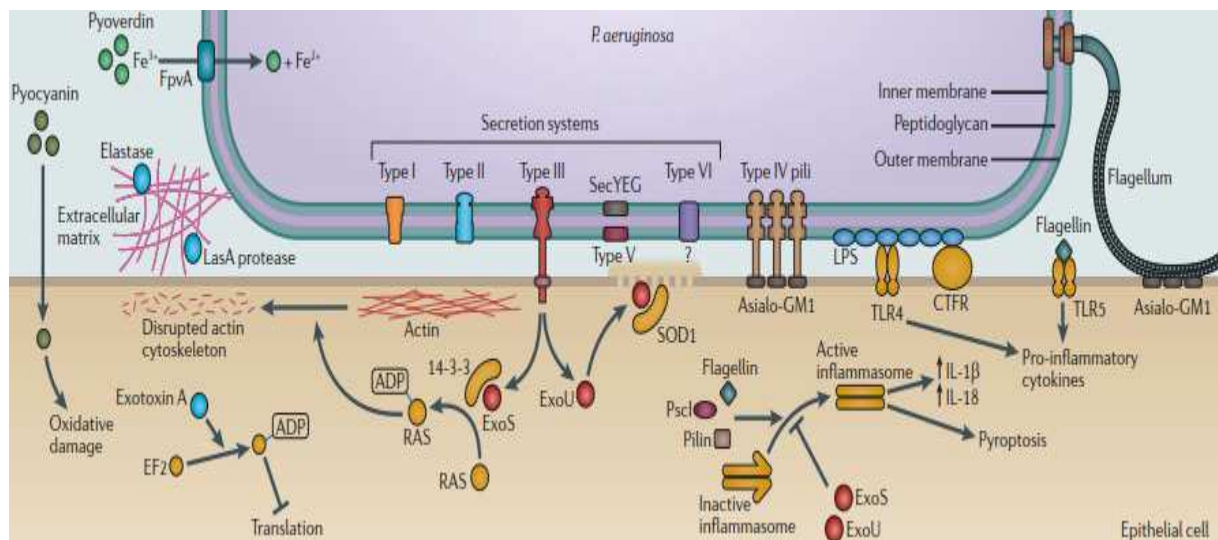


Figure 3: Facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

(Issue de Hauser A. et al. Nature reviews Microbiol Vol. 9 no. 3 March 2011)

A. Facteurs de virulence nécessitant un contact avec la cellule hôte :

Parmi les facteurs de virulence qui nécessitent un contact avec les cellules de l'hôte, on peut citer :

Le système de sécrétion de Type III (SSTIII) et ses effecteurs, qui constituent un redoutable facteur de virulence du *P. aeruginosa*. Le SSTIII permet la sécrétion des exoenzymes bactériennes directement dans le cytoplasme des cellules infectées (Figure 3). Ce système est un assemblage de macromolécules formant un injectisome, une sorte de seringue qui permet de faire le tunnel entre la membrane bactérienne et le cytoplasme de la cellule cible.

Les exoenzymes(Exo) sécrétées par le SSTIII sont au nombre de 4 : ExoS, T, Y et U. *P. aeruginosa* exprime soit Exo S, T et Y soit Exo U, T et Y. L'exo U est une phospholipase, les exo S et T sont deux protéines bi-fonctionnelles avec des activités GTPase et ADP-Ribosyl Transférase tandis que l'exo Y est une adénylatecyclase (Figure 4) [7].

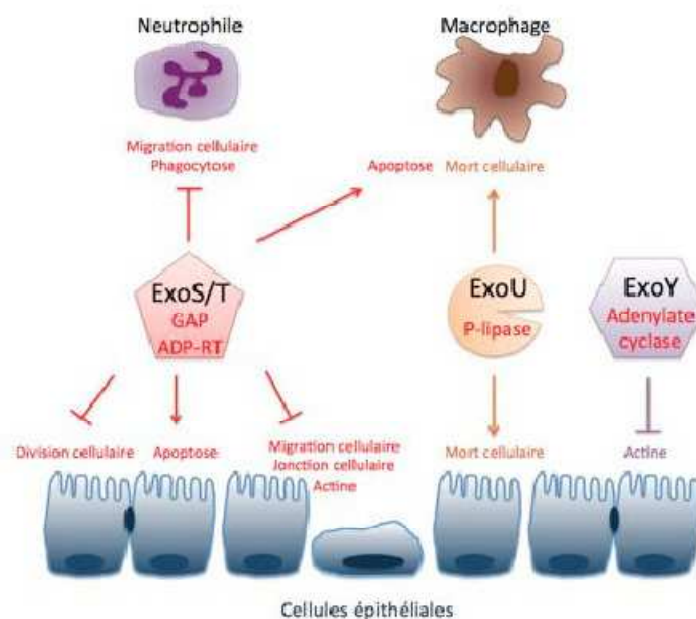


Figure 4: Effets des effecteurs du SSTIII de *P. aeruginosa* sur les cellules de l'hôte

(Issue de Engel J et al. Curr Opin Microbiol. 2009 Feb;12(1):61-6.)

Les souches les plus cytotoxiques de *P. aeruginosa* expriment l'ExoU qui induit la lyse rapide des cellules épithéliales et des macrophages. L'ExoS inhibe la phagocytose de la bactérie par les macrophages et les cellules épithéliales, entraîne la déstructuration du cytosquelette d'actine et induit l'apoptose des cellules infectées [8]. L'exoT empêche la cicatrisation cellulaire, induit

également la destruction du cytosquelette d'actine, bloque la migration et la division cellulaire et peut induire l'apoptose des cellules infectées [9]. Enfin l'exoY augmente la perméabilité cellulaire en créant des brèches inter-endothéliales et entraîne la formation d'œdèmes [10].

P. aeruginosa est également pourvu d'un flagelle polaire qui lui confère une mobilité favorisant la diffusion du pathogène. Le flagelle est nécessaire pour la mobilité bactérienne mais intervient également dans l'adhésion et la formation du biofilm [11].

Le Lipopolysaccharide (LPS) est considéré comme une endotoxine, localisée à la membrane externe de la bactérie, formant une barrière protectrice. Le LPS contribue à la stabilité membranaire et protège la bactérie du sérum. Le LPS intervient dans la stimulation des cellules épithéliales et peut entraîner des chocs septiques [12].

B. Facteurs de virulence sans contact :

Les facteurs de virulence ne nécessitant pas de contact avec la cellule hôte sont pour la plupart sécrétés par *P. aeruginosa* tels que les élastases, la pyocyanine et les protéases (Figure3).

Les élastases Las A et Las B sont sécrétées par *P. aeruginosa* via le système de sécrétion de type II (SSTII). Las A et Las B sont des enzymes protéolytiques, qui participent à la dégradation de la matrice extracellulaire en clivant l'élastine, le collagène et la fibrine [13].

Les SSTII sont au nombre de deux, Xcp et Hxc. Le SSTII permet la sécrétion des protéases, des lipases et des toxines au niveau extracellulaire [14]. L'exotoxine A est sécrétée via SSTII, avec son activité ADP-ribosyltransférase, elle bloque la synthèse protéique et induit la nécrose des cellules cibles [15, 16].

La pyocyanine est un pigment bleu qui diffuse dans le milieu extracellulaire et qui donne cette pigmentation bleue/verte du *P. aeruginosa*. Elle participe à la dégradation de l'épithélium, des cytokines et inhibe les mouvements microciliaires [17]. La pyoverdine est un sidérophore avec une grande affinité pour le fer ce qui permet de capter le fer nécessaire à la bactérie. De plus, la pyoverdine favorise sa propre production ainsi que la production d'exotoxine A et de protéase IV. La protéase IV est sécrétée par *P. aeruginosa*, cette lysine-protéase a la capacité de lyser les protéines du surfactant, de cliver les immunoglobulines ainsi que l'interleukine-22 [18, 19].

III. Structures pulmonaires et alvéolaires:

Le poumon constitue le principal organe du système respiratoire, c'est aussi la porte d'entrée des pathogènes et des microparticules véhiculés dans l'air. Pendant les premières étapes de l'infection pulmonaire, les pathogènes entrent en contact étroit avec les cellules épithéliales pulmonaires. L'épithélium pulmonaire (bronchique et alvéolaire) constitue la première barrière physique de défense de l'hôte contre les pathogènes [20].

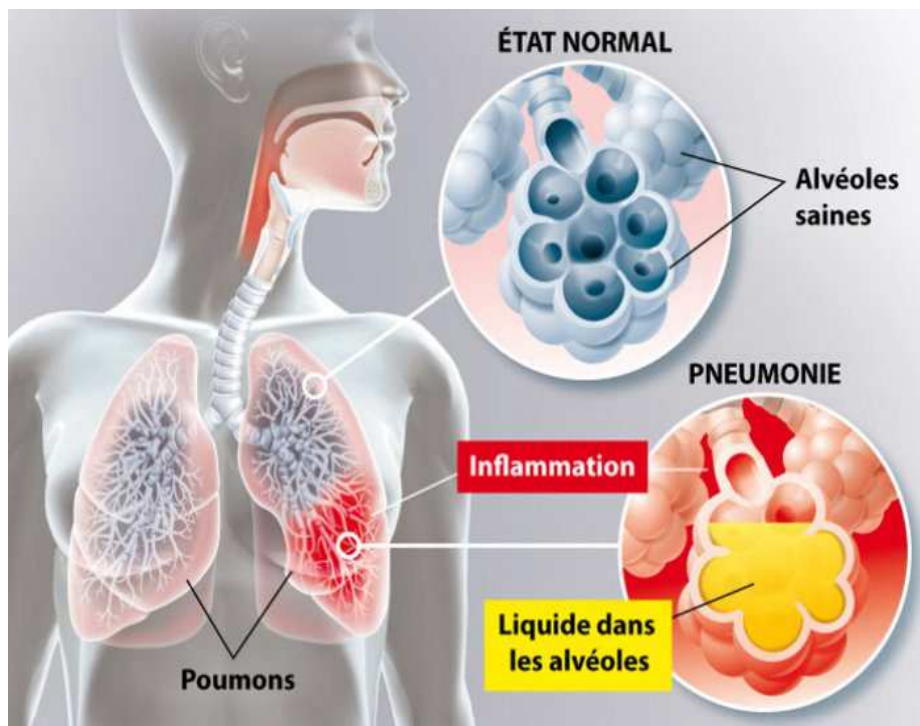


Figure 5: Pneumonie

(Issue de:<http://hopital-prive-jacques-cartier-massy.ramsaygds.fr /infection-pulmonaire>)

Les alvéoles sont des petites structures creuses, fines et aérées en forme de sac, présentes à l'extrémité des bronches et formant un prolongement des voies respiratoires, au niveau desquelles se font les échanges gazeux avec le réseau capillaire. Une alvéole saine normale est aérée, alors que pendant une pneumonie l'espace alvéolaire est envahi de condensé (exsudat et cellules inflammatoires) (Figure 5).

L'épithélium alvéolaire est constitué principalement de deux types de cellules épithéliales alvéolaires (Alveolar Epithelial cells ou AECs) ou pneumocytes : les AECs de Type I et les AECs de Type II (Figure 6).

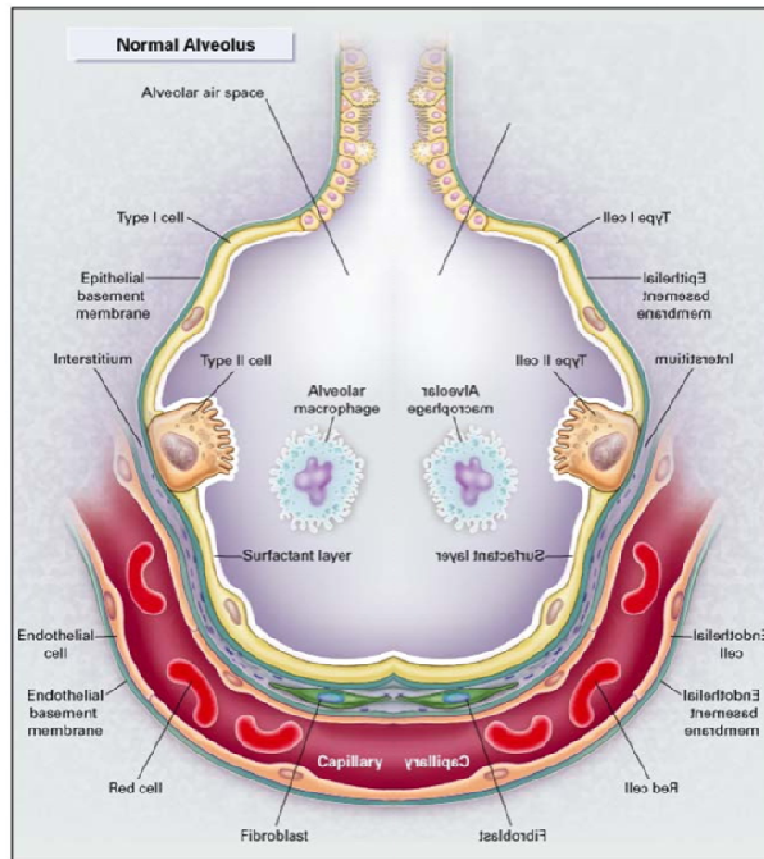


Figure 6: Structure d'une alvéole saine normale

(Issue de Magdalena Bakowitz et al. Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2012; 20: 54)

Les AECs de Type I sont des cellules plates qui occupent 95% de la surface alvéolaire bien qu'elles ne représentent que 40% des cellules épithéliales alvéolaires. La fonction principale des AECs de Type I est d'assurer les échanges gazeux entre l'espace alvéolaire et les capillaires veineux. En effet ces cellules sont étroitement accolées aux cellules endothéliales des vaisseaux formant un voile cytoplasmique très fin (0.2µm d'épaisseur) favorisant les échanges gazeux.

Les AECs de Type II sont des cellules cubiques, qui présentent des microvillosités au niveau apical. Ces cellules représentent 60% des pneumocytes alors qu'elles n'occupent que 5% de la surface alvéolaire [21]. Ces pneumocytes ont un cytoplasme riche en organites, signe d'un métabolisme actif.

Les pneumocytes de type II sont capables de se diviser, de se différencier et de se trans-différencier en pneumocytes de Type I en perdant leurs corps lamellaires et en s'aplatissant. Les AECs de Type II sécrètent du surfactant un tensio-actif, qui permet de réduire la tension superficielle et d'éviter la collapse de l'alvéole.

Parmi les cellules présentes dans l'espace alvéolaire, on retrouve des macrophages dit résidants qui assurent le rôle de sentinelles. Les cellules dendritiques (Dendritic cells: DC) sont également présentes dans les poumons, sous la membrane basale des cellules épithéliales. Ces cellules immunitaires résidentes envoient des dendrites dans l'espace alvéolaire pour échantillonner le milieu et ainsi assurer la surveillance immunitaire du poumon [22].

IV. Interaction Hôte/Pathogène :

L'interaction hôte/pathogène dans le cadre d'une pneumonie est initiée au niveau de l'épithélium alvéolaire, aboutissant à la mise en place de la réponse immunitaire.

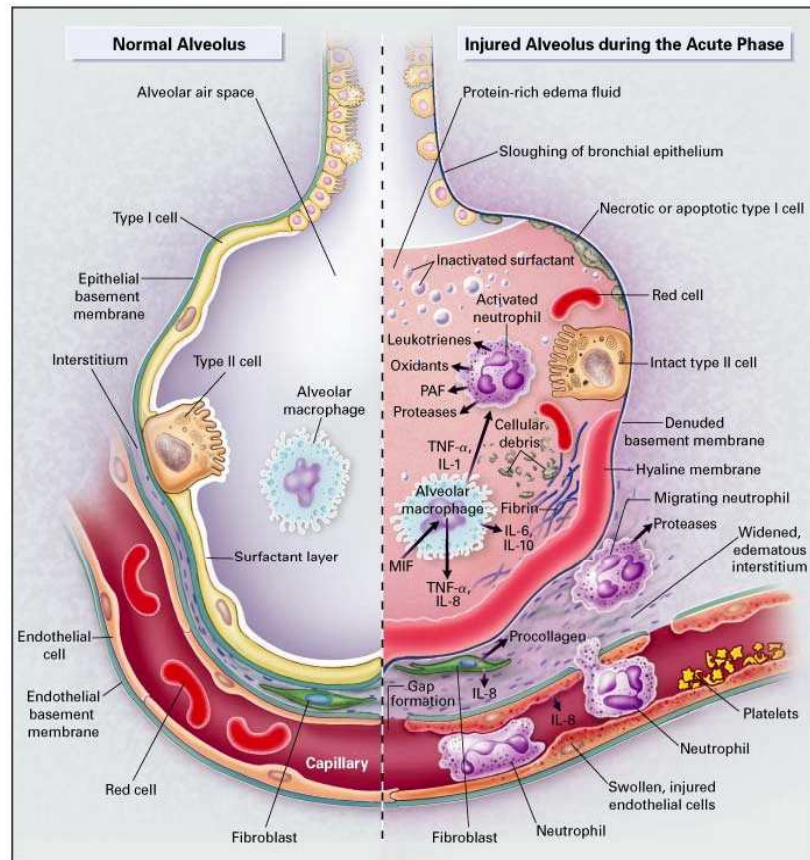


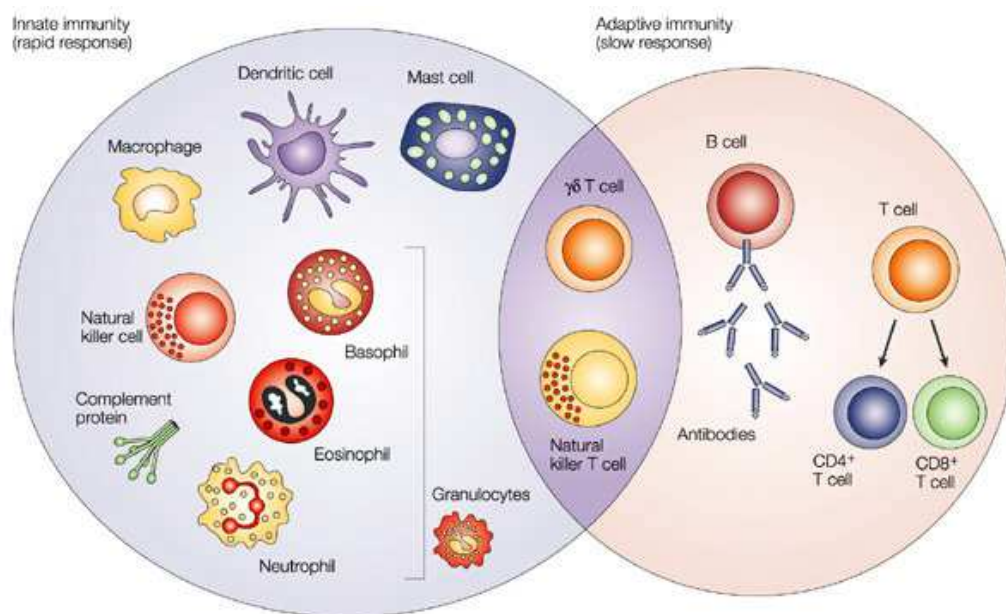
Figure 7: Alvéole saine vs alvéole pendant la phase aiguë de l'infection

(Issue de Magdalena Bakowitz et al.Scand J Trauma ResuscEmerg Med. 2012; 20: 54)

La partie gauche de l'image représente une alvéole saine normalement tapissée de cellules épithéliales alvéolaires les AECs de type I et de type II, avec la présence des macrophages alvéolaires résidents. Pendant la phase aiguë de l'inflammation (partie droite de l'image), l'alvéole est déstructurée (Figure 7). La barrière épithéliale est rompue, les jonctions serrées qui assuraient l'étanchéité membranaire ont été brisées et la plupart des AECs de type I sont nécrosées ou apoptotiques. La déstructuration de l'alvéole entraîne une déstabilisation de l'épithélium bronchique qui fait la jonction entre la cavité alvéolaire et les bronches. L'alvéole infectée est remplie d'œdème dans lequel baignent des débris cellulaires, du surfactant inactivé, des pathogènes, des globules

rouges ainsi que des cellules de l'immunité innée tel que les macrophages résidents activés et les neutrophiles (Figure 7).

L'immunité innée ou naturelle est la première réponse à se mettre en place. C'est une réponse rapide, immédiate car les cellules de l'immunité innée sont dotées de récepteurs membranaires leur permettant d'interagir directement avec les pathogènes. Alors que l'immunité adaptative est une réponse plus ciblée mais également plus lente à se mettre en place car elle nécessite une activation préalable médiée en partie par les cellules de la réponse immunitaire innée.



Nature Reviews | Cancer

Figure 8: Les médiateurs de l'immunité innée et adaptative

(Issue de Dranoff G NatRev Cancer. 2004 Jan;4(1):11-22.)

En plus des cellules épithéliales, l'immunité innée est médiée par des médiateurs solubles tels que les peptides antimicrobiens, les protéines du complément et par de nombreuses cellules immunitaires telles que les granulocytes, les mastocytes, les cellules Natural killer (NK), les macrophages et les cellules dendritiques. Les cellules T gamma delta (LT $\gamma\delta$) ainsi que les cellules NK T sont à l'intermédiaire entre l'immunité innée et adaptative, alors que les lymphocytes T (LT) et lymphocytes B (LB) sont les principaux médiateurs de l'immunité adaptative (Figure 8). Pour commencer nous allons nous intéresser aux médiateurs de l'immunité innée.

1. Les macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires diffèrent des macrophages circulants qui n'arrivent au niveau de l'alvéole que 2 à 3 jours après l'initiation de la réponse inflammatoire [23].

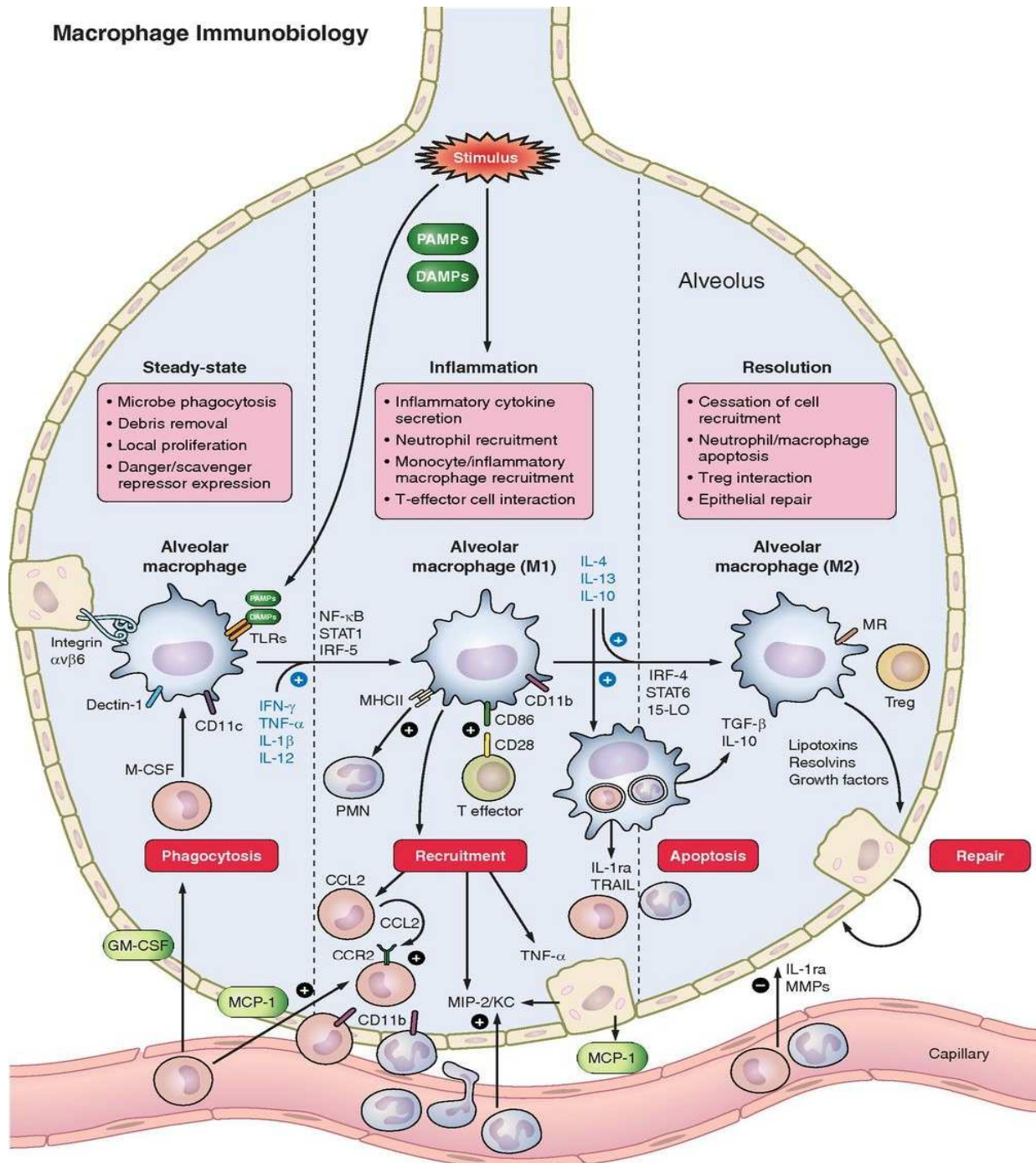


Figure 9: Principaux phénotypes et fonctions des macrophages alvéolaires

(Issue de Aggarwal NR et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.2014 Apr 15; 306(8):L709-25)

A l'état de quiescence, les macrophages alvéolaires sont présents dans l'espace alvéolaire et sont attachés aux cellules épithéliales via des intégrines (Figure 9). Ces macrophages sont les premières cellules immunitaires susceptibles de rencontrer les pathogènes. Ils expriment des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (Pattern recognition receptor : PRR) qui leur permettent de reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen-associated molecular pattern : PAMP) et les motifs moléculaires associés au danger (Damage-associated molecular pattern : DAMP), ainsi que le récepteur de piégeage Dectin-1. Le renouvellement des macrophages résidents est lent et principalement dû à la prolifération locale sous l'effet de M-CSF/GM-CSF, avec un recrutement minimal des monocytes circulants [23].

Lors de l'inflammation, de nombreux signaux de stimulation induisent l'activation des macrophages ; la reconnaissance des PAMP et DAMP couplée à l'effet des cytokines environnantes (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-12) entraînent l'induction de facteurs de transcription tels que NF- κ B, STAT-1, IRF-5. Cette activation transcriptionnelle entraîne les macrophages vers un phénotype d'activation de type M1.

Les macrophages alvéolaires ainsi activés sécrètent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 pour permettre le recrutement des neutrophiles ainsi que les monocytes/macrophages. Par ailleurs la sécrétion de TNF- α permet la stimulation des cellules épithéliales. Les cellules épithéliales peuvent également activer les macrophages alvéolaires via la sécrétion de la chimiokine MCP-1 [24, 25].

Les macrophages activés assurent également la fonction de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), en effet ils expriment les molécules de co-stimulation CD80/CD86 ainsi que les molécules du CMH-II permettant ainsi l'activation des Lymphocytes T par présentation antigénique.

Les macrophages alvéolaires sont les principales cellules phagocytaires du tractus respiratoire, en phagocytant les pathogènes, les cellules épithéliales infectées, les neutrophiles nécrosés, ils participent à la clairance bactérienne, à la résorption de l'inflammation et favorisent la réparation tissulaire [26].

Une fois l'infection contrôlée ; sous l'effet des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-13 et IL-10) les macrophages ayant phagocytés les cellules infectées entrent en apoptose alors que les macrophages de phénotype M2 font leur apparition suite à l'activation des facteurs transcriptionnels spécifiques que sont IRF-4, STAT6 et 15-LO [23]. Les macrophages M2 ont pour fonction de résoudre l'inflammation et de favoriser la réparation tissulaire, ils favorisent notamment la différenciation des AECs de type II en AECs de type I [23].

2. Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent 40 à 60% des leucocytes circulants (globules blancs). Les neutrophiles sont rapidement recrutés au niveau du site infectieux. L'afflux des neutrophiles est guidé par le gradient d'IL-8 environnant, ces cellules sont capables de traverser la membrane endothéliale grâce au phénomène de diapédèse [27].

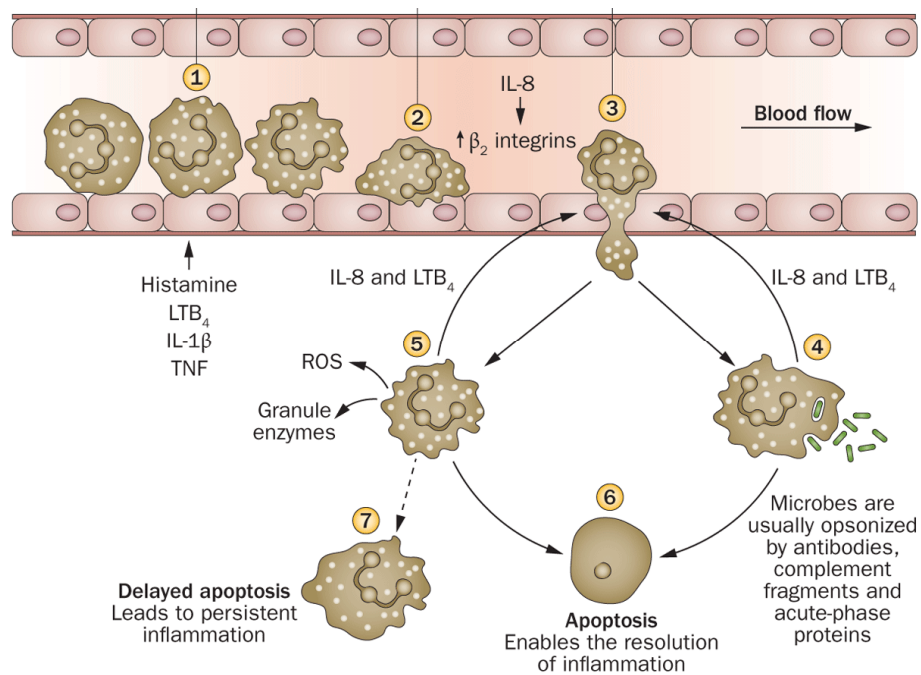


Figure 10: Migration des neutrophiles circulants vers le site de l'infection

(Issue de Wright HL et al. 2014 Oct;10(10):593-601)

La diapédèse est initiée par le roulement des neutrophiles le long de l'endothélium vasculaire impliquant des interactions transitoires entre les sélectines sur les cellules endothéliales et les neutrophiles. L'expression des sélectines sur les cellules endothéliales est régulée positivement par les médiateurs inflammatoires telles que les cytokines (TNF-α et IL-1) précédemment sécrétées par les AECs[27]. Les facteurs chimiotactiques favorisent l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales, médiées par l'expression accrue des intégrines β₂ et l'excrétion de la L-sélectine. La migration para-cellulaire des neutrophiles est médiée par la liaison aux protéines endothéliales qui conduisent les neutrophiles au niveau des jonctions intercellulaires et facilitent leur passage. La migration trans-cellulaire des neutrophiles est également possible (Figure 10). Une fois au niveau du site infectieux les neutrophiles exercent leur fonction de cellules phagocytaires qui reconnaissent les pathogènes et qui les internalisent par phagocytose avant de les neutraliser dans des vésicules

intracellulaires (les phagolysosomes). Les neutrophiles activés génèrent également des agents chimioattractifs tels que l'IL-8 et le TLB4 qui favorisent un recrutement plus important de neutrophiles et amplifient la réponse inflammatoire aiguë [28].

L'activation des neutrophiles par des complexes immuns solubles induit la libération d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species: ROS) et de granules enzymatiques. Les neutrophiles sécrètent des lactoferrines, du BPI (bacterial permeability-increased protein), des élastases et des lysozymes bactéricides [29]. Les lactoferrines ont la capacité de fixer le fer ce qui permet de neutraliser la prolifération bactérienne en privant les micro-organismes du fer nécessaire à leur croissance. Le BPI est une protéine cationique qui altère la membrane bactérienne externe puis interne perturbant ainsi le métabolisme et entraînant la lyse des bactéries Gram-[30]. Les lysozymes ont une action bactéricide, alors que l'élastase des neutrophiles est une sérine protéase qui joue un rôle important dans la défense contre les bactéries Gram- en réprimant la synthèse de la flagelline et en lysant les membranes bactériennes [31, 32].

Les neutrophiles activés communiquent avec les autres cellules de l'immunité via la sécrétion de cytokines et de chimiokines et via la présentation antigénique par l'intermédiaire des molécules du CMH-II [28].

Lors d'une pneumonie à *P. aeruginosa* chez la souris, un afflux massif de neutrophiles au niveau des poumons de souris infectée est rapidement mis en place. En effet 6h post-infection le contraste entre les poumons sains et les poumons infectés est flagrant (Figure 11).

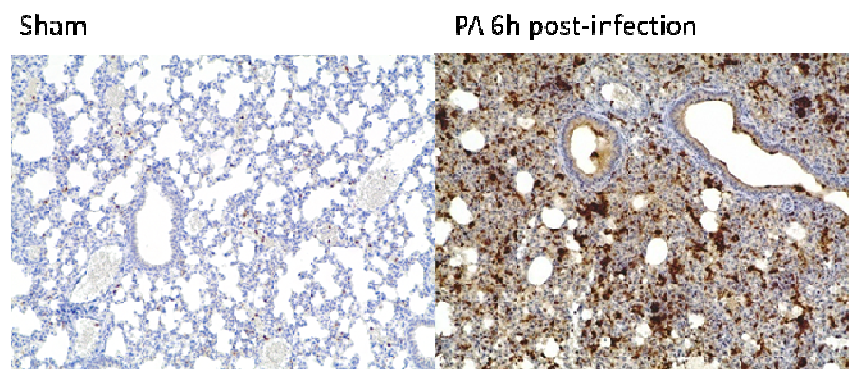


Figure 11: Afflux des neutrophiles au niveau des alvéoles

Immuno histochimie (Ly6-G) de coupes de poumons de souris Sham (non infectée) ou de souris PA (avec pneumonie à *P. aeruginosa*) reflétant l'afflux massif des neutrophiles 6h post-infection. (Issue des travaux de Broquet et al. [33]).

Enfin une apoptose efficace des neutrophiles est nécessaire pour la résolution de l'inflammation. Les neutrophiles apoptotiques sont non fonctionnels et expriment des molécules de surface uniques leur permettant d'être éliminés en toute sécurité par les macrophages et autres cellules phagocytaires. L'apoptose retardée entraîne une inflammation persistante et des lésions tissulaires, en raison de la libération continue de ROS, d'enzymes granulaires et de cytokines. Chez les patients atteints de mucoviscidose, la présence permanente de neutrophiles engendre de graves dégâts tissulaires, caractéristiques des infections chroniques développées par ces patients [3].

3. Les cellules Naturel Killer(NK) :

Les cellules NK représentent 10% des lymphocytes résidants dans les poumons. Ces cellules sont importantes pendant la phase précoce de l'infection. De par leur proximité les cellules NK sont rapidement recrutées au niveau du site infectieux [34].

Les cellules NK exercent de multiples fonctions telles que la production cytokinique, l'interaction cellulaire, la cytotoxicité naturelle et la cytotoxicité dépendante des anticorps (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity ou ADCC) qui les rendent indispensables à la défense contre les infections [35].

Les NK expriment des récepteurs membranaires PRR leur permettant de reconnaître les pathogènes et de s'activer, notamment le TLR2 qui lie l'OmpA de *Klebsiella pneumoniae* ou le TLR4 qui reconnaît le LPS d'*Escherichia coli*, et de *P. aeruginosa*. Les cellules NK expriment des récepteurs naturels cytotoxiques (Natural cytotoxic receptor ou NCR) dont le NKp44 qui interagit directement avec les bactéries, telles que *Mycobacterium bovis* ou *P. aeruginosa* ce qui induit la prolifération des cellules NK et la production d'IFN- γ [36].

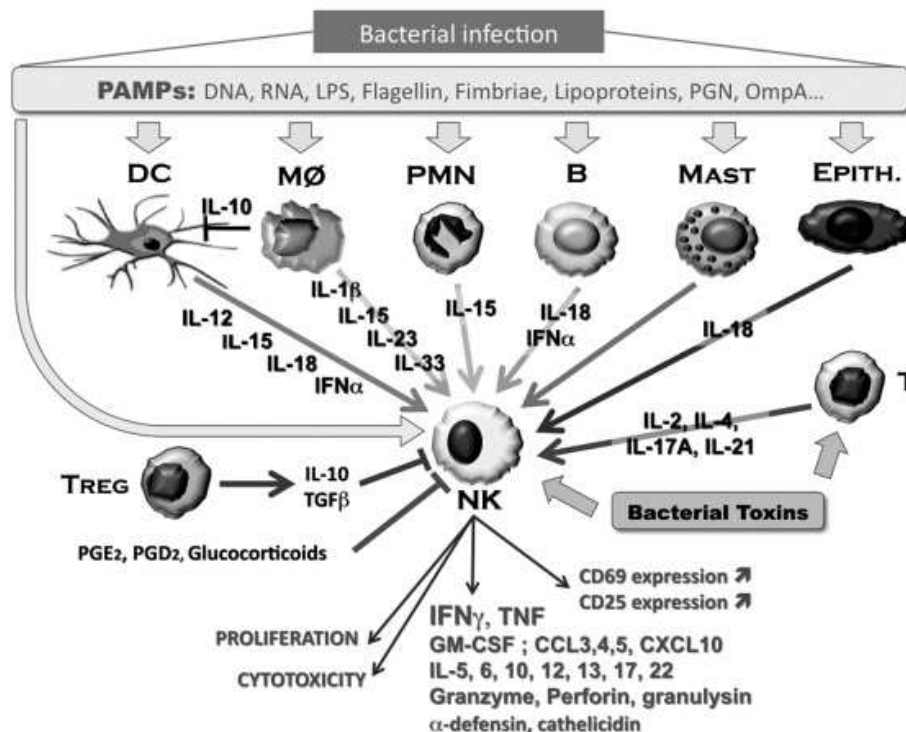


Figure 12: Réseau d'activation des NK suite à une infection bactérienne

(Issue de Horowitz et al. Front Immunol. 2011 doi: 10.3389)

Les cellules NK peuvent également être activées par de nombreuses cytokines telles que les interférons de type I, les interleukines 12, 15 et 18 sécrétées par les cellules épithéliales, les macrophages et les DC (Figure 12) [37]. Les NK activées sécrètent à leur tour des cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-5 et l'IL-13 pour mobiliser les médiateurs de l'immunité adaptative. De plus leur capacité d'interaction avec les cellules dendritique notamment pour promouvoir la maturation des DC participe à la mise en place de la réponse adaptative [35].

La cytotoxicité naturelle des NK consiste en la reconnaissance et en la lyse des cellules cibles cancéreuses ou infectées, par dégranulation ou par induction de l'apoptose via l'expression de Fas-L ou TRAIL. L'activation des cellules NK passe alors par un équilibre entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs. En effet les cellules NK expriment des récepteurs de type immunoglobuline des cellules tueuses (KIR) inhibiteurs et activateurs qui lient respectivement les molécules du CMH-I et les ligands activateurs (tels que NKG2D-L, MICA, MICB...)[38]. Les cellules saines en état d'homéostasie expriment les deux type de ligands activateurs et inhibiteurs ce qui annihile le signal alors que les cellules tumorale ou les cellules infectées perdent l'expression des molécules de CMH-I, n'expriment plus que le ligand activateur, ce qui a pour effet d'activer la cellule NK et d'induire la lyse de la cellule infectée (Figure 13).

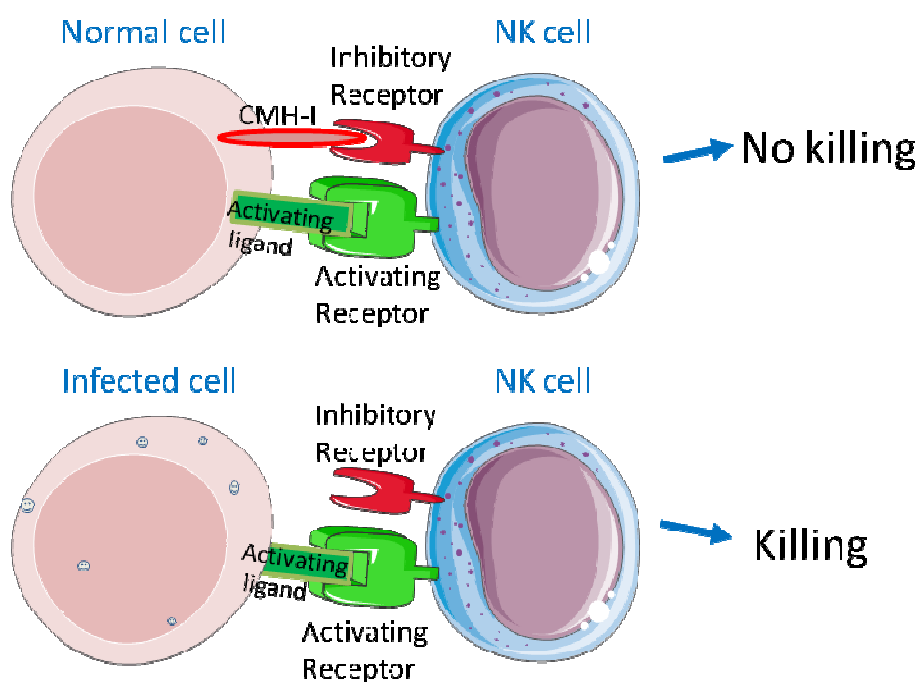


Figure 13: Rôle des NK dans la surveillance immunitaire

L'importance des cellules NK dans la défense antibactérienne a été mise en évidence dans des modèles murins de souris déplétées en cellules NK. En effet aussi bien dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* que de pneumonie à *S.aureus*, la déplétion en NK rendait les souris plus susceptibles à l'infection bactériennes [39, 40].

Les cellules NK participent notamment à la clairance bactérienne. Cette clairance nécessite une coopération entre les cellules épithéliales alvéolaires qui expriment le NKG2D-Ligand suite à l'infection à *P. aeruginosa*, et les cellules NK qui expriment le NKG2D récepteur [41, 42]. Lors de la phase tardive de l'infection, les cellules NK participent à la résolution de l'inflammation et au retour à l'état d'homéostasie par la sécrétion d'IL-10.

4. Les cellules dendritiques :

Les cellules dendritiques (DC) sont présentes dans les poumons, sous la membrane basale des cellules épithéliales. Ces cellules immunitaires résidentes envoient des dendrites dans l'espace alvéolaire pour échantillonner le milieu et ainsi assurer la surveillance immunitaire du poumon (Figure 14) [22].

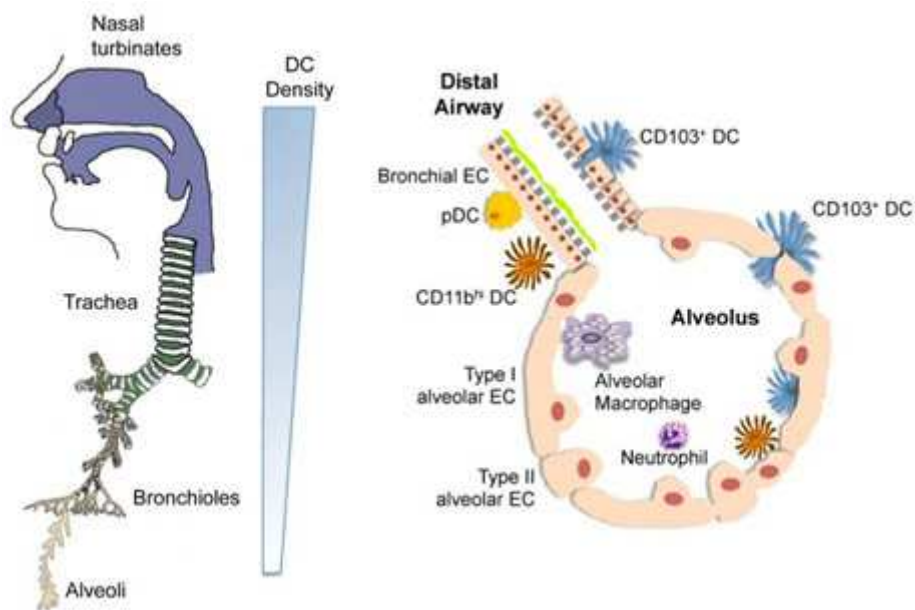


Figure 14: Répartition des DC dans le poumon et dans les alvéoles

(Issue de Condon TV et al. J LeukocBiol. 2011 Nov; 90(5):883-95)

CD103+ DC : cellules dendritiques intra-épithéliales, CD11b^{hi} DC: cellules dendritiques de la lamina propria et pDC : cellules dendritiques périphériques.

Les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigènes dites CPA professionnelle [43]. Par leur capacité à détecter les changements environnementaux, à communiquer et activer les cellules de l'immunité adaptative, les DC sont des cellules à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Les DC peuvent être directement activées par les PAMP ou indirectement par l'intermédiaire de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines produites par les cellules épithéliales ou les cellules immunitaires [44].

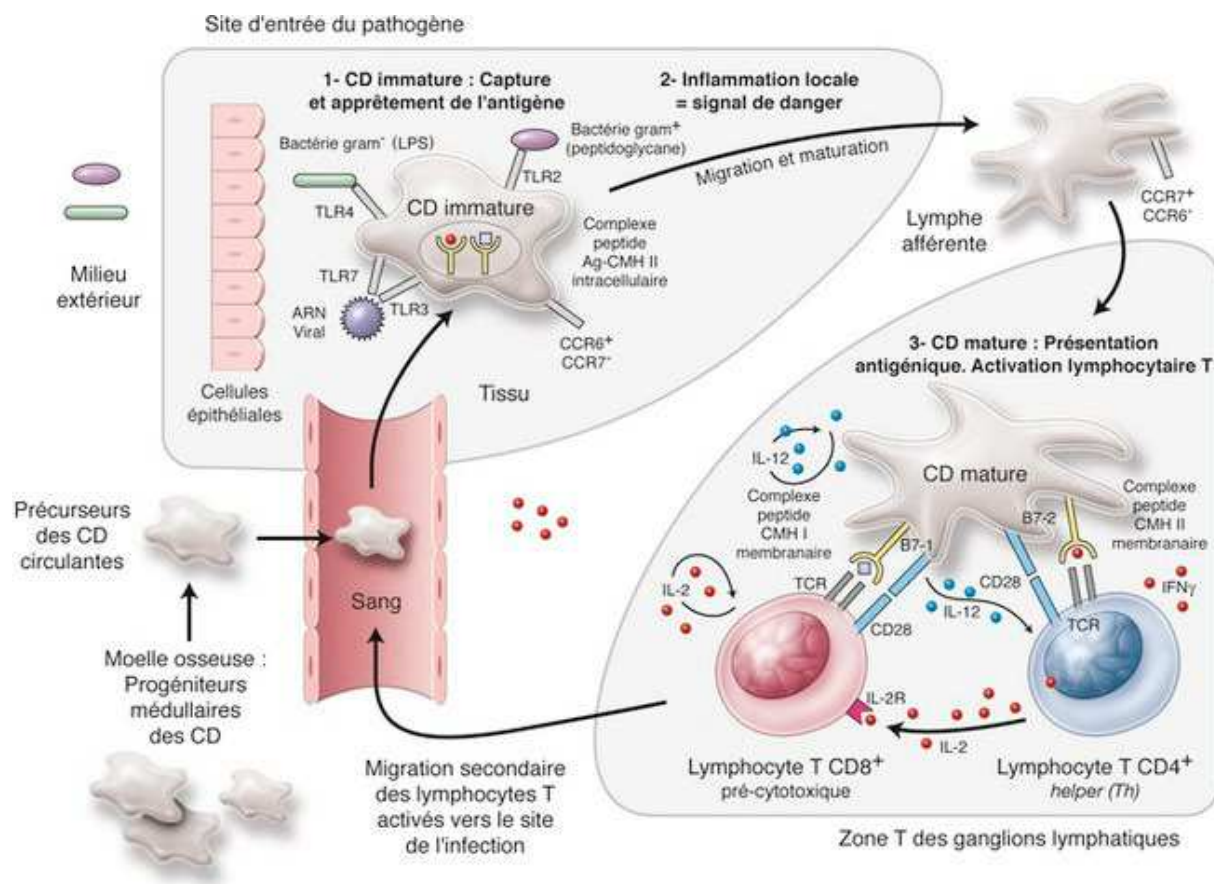


Figure 15: Rôle des cellules dendritiques dans la réponse immunitaire

(Issue de <https://clemedicine.com/1-immunologie-generale/>)

Les DC immatures expriment des TLRs qui leur permettent de reconnaître et de capturer les pathogènes. Les DC procèdent à la phagocytose et à l'apprêtement des antigènes sur les molécules du CMH-II intracellulaires. La maturation des DC immatures en DC matures a lieu au niveau du site infectieux (Figure 15).

Les DC matures CD103⁺, CD11b⁺ perdent leur capacité de phagocytose au profit des propriétés de migration et de présentation antigénique. Les DC matures expriment le récepteur de chimiokine CCR7 qui contrôle leur migration au niveau des organes lymphoïdes qui produisent les chimiokines CCL 19, CCL20 et CCL21 (qui lient le récepteur CCR7). Au niveau des organes lymphoïdes les DC matures vont présenter les antigènes aux lymphocytes T via les complexes peptidiques CMH membranaires et ainsi initier la réponse immunitaire adaptative.

Les DC jouent un rôle important dans la lutte contre l'infection bactérienne ; de par leur capacité à détecter les pathogènes et à stimuler les lymphocytes T, les DC font le pont entre l'immunité innée et adaptative [43].

5. Rôle des cellules épithéliales dans la mise en place de la réponse innée :

A. Cellules épithéliales alvéolaires :

L'épithélium alvéolaire est la première barrière physique que rencontre les pathogènes lors des infections pulmonaires. Les cellules épithéliales forment différents types de jonctions (jonctions serrées et jonctions communicantes) qui assurent à la fois la communication et les échanges entre les cellules voisines ainsi que l'étanchéité de la barrière épithéliale (Figure 16) [40].

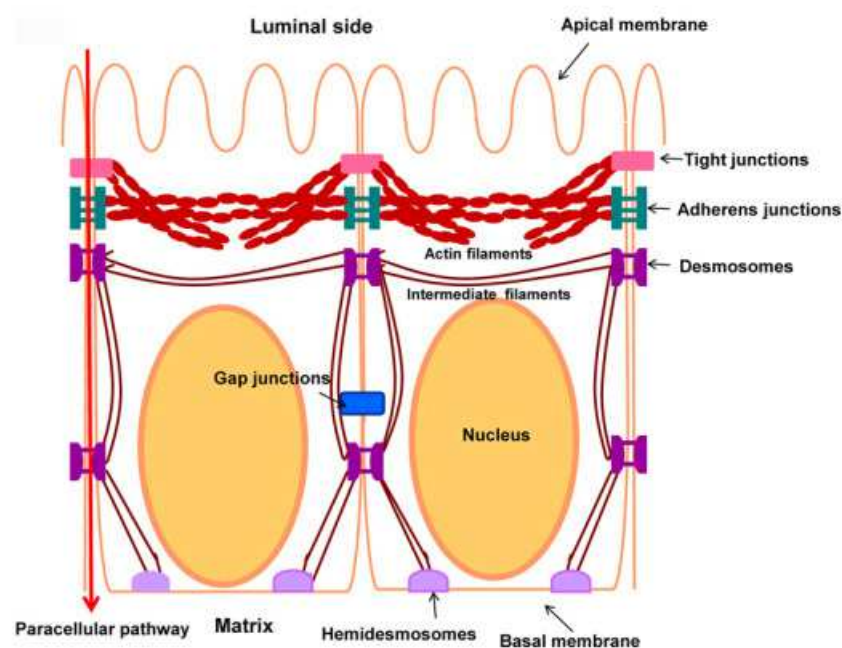


Figure 16: Différentes jonctions cellulaires de l'épithélium

(Issue de Groeger SE et al. Periodontol 2000. 2015 Oct;69(1):46-67.)

Les cellules épithéliales alvéolaires de type II sécrètent du surfactant, qui joue un rôle important dans la réponse immunitaire innée. La couche lipidique permet de capturer les microparticules présentes dans l'air que nous respirons. Le surfactant possède des propriétés antimicrobiennes via les protéines SP-A et SP-D (Figure 17).

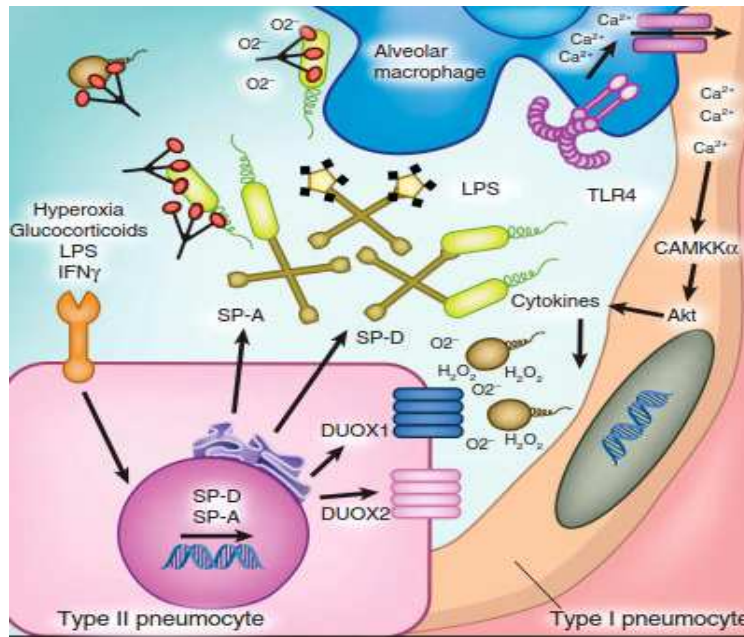


Figure 17: Fonctions des protéines du surfactant SP-A et SP-D

(Issue de Leiva-Juárez MM et al. Mucosal Immunol. 2018 Jan;11(1):21-34.)

Les protéines SP-A et SP-D du surfactant sont considérées comme des opsonines (récepteurs solubles reconnus par les cellules immunitaires) [45]. Ces protéines sont capables de reconnaître des motifs bactériens aussi bien chez les bactéries Gram- que chez les bactéries Gram+. SP-A et SP-D ont des motifs C-type lectin ou carbohydrate recognition domains (CRD) qui leur permettent notamment de reconnaître et de lier le LPS (Figure 17). L'opsonisation des bactéries par les protéines du surfactant favorise la phagocytose de ces derniers par les macrophages [46]. Le surfactant est par la suite majoritairement recyclé par les pneumocytes de Type II et partiellement éliminé (10%) par les macrophages alvéolaires.

Afin de se défendre contre les pathogènes, les cellules épithéliales alvéolaires sécrètent également des peptides antimicrobiens tels que la cathélicidine (LL-37), la β-défensine 2 (h-BD2), Reg1A, Reg3γ, qui ciblent directement les bactéries.

LL-37 est une cathélicidine initialement synthétisée sous forme de hCAP18 puis clivée en LL-37 active. Ce peptide cationique est un bactéricide qui permet de neutraliser les endotoxines bactériennes et de charger négativement les bactéries [47]. LL-37 est capable de se lier au LPS des bactéries et de prévenir la formation du biofilm [48].

Les β -défensines sont également des petits peptides cationiques qui ont une action bactéricide en formant des pores au niveau des membranes bactériennes[29]. Alors que Reg 1A et Reg3 γ sont des peptides antimicrobiens bactéricides avec un motif C-type lectine, Reg3 γ cible spécifiquement les bactéries Gram + en se liant à la couche de peptidoglycane) [49, 50].

Outre leur activité bactéricide, ces peptides ont des fonctions modulatrices, ils stimulent la production des cytokines (IL-1, IL-8, IL-6), ils permettent l'activation du complément en se liant à C1q et favorisent la réparation tissulaire [51]. Enfin les mouvements microciliaires des cellules épithéliales permettent l'évacuation des pathogènes emprisonnés au niveau du mucus pulmonaire et favorisent ainsi la clairance bactérienne [52, 53].

B. Interaction AECs/ cellules de l'immunité :

En plus de leur fonction de structure et de barrière physique, les cellules épithéliales alvéolaires étant les premières cellules à rencontrer les pathogènes, ce sont elles qui initient la réponse immunitaire innée, notamment par la sécrétion de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires. La sécrétion de la chimiokine IL-8 par les AECs de type II permet l'afflux des neutrophiles au niveau du site infectieux pour lutter efficacement contre l'infection. L'IL-6 agit sur les neutrophiles et les monocytes pour favoriser la production d'élastase par les neutrophiles et promouvoir la différenciation des monocytes en macrophages [54]. Le TNF- α et l'IL-1 β agissent sur les cellules endothéliales pour favoriser l'expression des molécules d'adhésion (sélectines E et P) et faciliter ainsi la traversée des neutrophiles et des monocytes vers l'espace alvéolaire [45].

Outre les facteurs solubles sécrétés, les cellules épithéliales alvéolaires sont capables d'établir des contacts étroits avec les cellules immunitaires. L'interaction des AECs avec les macrophages alvéolaires est importante dans le cadre de l'infection pulmonaire. Les AECs assurent la liaison des macrophages alvéolaires à l'épithélium et permettent leur activation durant la phase aiguë de l'infection. Réciproquement lors de la phase tardive les macrophages M2 participent à la résorption de l'inflammation et à la réparation tissulaire en stimulant la prolifération et la migration des cellules épithéliales alvéolaires [23, 55, 56].

Les cellules dendritiques sont également en contact étroit avec les cellules épithéliales alvéolaires, notamment les cellules dendritiques (CD103⁺) intra-épithéliales (Figure 14) qui envoient des interdigitations dans l'espace alvéolaire pour sonder le milieu. Cette communication permanente permet d'assurer la surveillance immunitaire et d'initier rapidement la réponse innée en cas d'intrusion [57]. Lors de la réaction inflammatoire différentes population de cellules dendritiques notamment les CD 11b+ entrent en contact avec les cellules épithéliales.

Lors de l'inflammation, les cellules épithéliales expriment des molécules de surface consécutivement au stress qu'elles rencontrent, c'est ainsi que l'expression de MICA/MICB est augmentée lors de l'infection [58]. L'expression de ces molécules permet aux AECs de communiquer avec les cellules NK, en effet MICA/MICB sont des ligands de NKG2D, ce qui permet d'une part la reconnaissance des cellules épithéliales par les cellules NK et d'autre part l'activation des NK. Cette interaction avec les cellules NK est importante, car elle conditionne le devenir des cellules épithéliales ; en fonction de la balance des signaux activateurs ou inhibiteurs la cellule NK va induire la lyse des cellules infectées. La lyse des cellules infectées participe à la clairance bactérienne et au renouvellement de l'épithélium pulmonaire [41, 42].

Les cellules épithéliales alvéolaires initient la réponse immunitaire par la production de cytokines et de chimiokines, permettant le recrutement de cellules immunitaire au niveau du site infectieux. Les AECs sont le chef d'orchestre de la réponse innée ; par la production de surfactant et de peptides antimicrobiens, elles participent à la défense antibactérienne, avec toutes les interactions qu'elles établissent avec les cellules immunes, les AECs permettent l'activation des cellules et la mise en place de la réponse innée. Les cellules épithéliales jouent également un rôle important dans la cicatrisation et la reconstruction tissulaire, en effet ces cellules ont la capacité de se diviser et de se différencier pour reconstruire l'épithélium pulmonaire.

C. Interaction AECs / *P. aeruginosa* :

Les cellules épithéliales expriment des PRR tels que les TLR et les NOD-like Receptors (NLR) qui leur permettent la reconnaissance des PAMP et l'initiation de la réponse immunitaire via la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires [59-61].

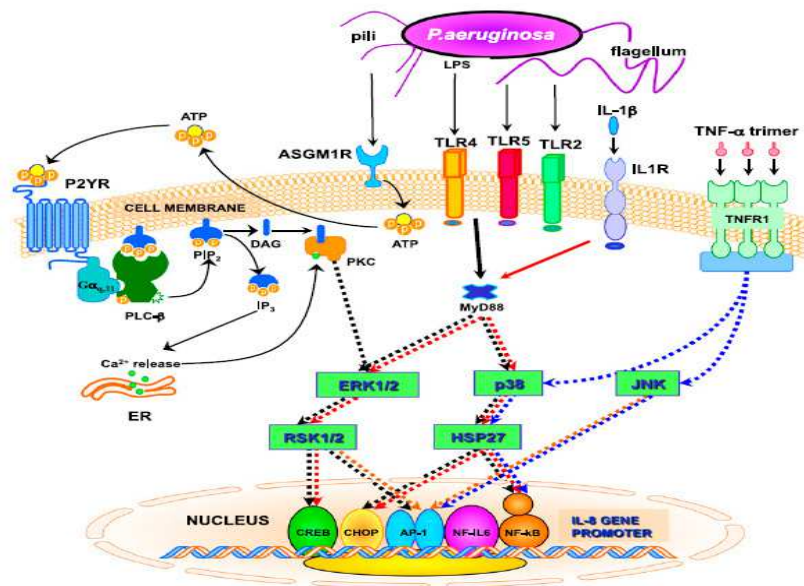


Figure 18: Reconnaissance du *P. aeruginosa* par les cellules épithéliales alvéolaires

(Issue de Valentino Bezzerri et al. J Immunol 2011;187:6069-6081)

De par sa structure *P. aeruginosa* est capable d'établir différents contacts avec les cellules épithéliales. En effet, le flagelle est le ligand du récepteur TLR5 et 2, le LPS lie le TLR4 et les pili lient ASGM1R (Figure 18). La reconnaissance du pathogène par les cellules épithéliales induit une cascade de signalisation qui permet l'activation de nombreux facteurs de transcriptions pour induire l'expression des cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) et des chimiokines (IL-8) pro-inflammatoires, ainsi que la production de peptides antimicrobiens [59, 62].

Par leur capacité d'interagir avec les pathogènes, leur fonction cytokinique, leur production de peptides antimicrobiens, les cellules épithéliales alvéolaires exercent un rôle primordial dans la mise en place de la réponse immunitaire innée. Ces cellules ont le rôle de chefs d'orchestre de la réponse immunitaire, ce sont les premières cellules qui rencontre et qui reconnaissent les pathogènes, leur fonction cytokinique permet de donner l'alerte et de recruter les cellules effectrices au niveau du site infectieux.

6. Echappement immunitaire du *P. aeruginosa*:

Malgré la réponse immunitaire de l'hôte pour combattre les pathogènes, *P. aeruginosa* est capable d'échapper au système immunitaire via le déploiement d'une stratégie d'échappement et de subversion de la réponse immune.

D'une part *P. aeruginosa* possède des pili de type IV et des pili de type fimbriae qui contribuent à la formation de biofilm. Le pilus de Type IV est une adhésine qui permet l'adhésion de la bactérie à l'épithélium respiratoire, alors que les pili de type fimbriae permettent l'adhérence aux surfaces abiotiques jouant ainsi un rôle dans la formation du biofilm [13]. Le système du quorum sensing est utilisé par *P. aeruginosa* pour moduler l'expression de certains facteurs de virulence ; ainsi *P. aeruginosa* est capable de s'adapter à son environnement, en délaissant les molécules immunogènes telles que le flagelle et les pili, favorisant ainsi la formation du biofilm [11]. Le biofilm constitue une niche bactérienne qui permet de mettre les bactéries à l'abri des peptides antimicrobiens, du complément et de la phagocytose ce qui assure l'échappement immunitaire du *P. aeruginosa* [63-65].

D'autre part *P. aeruginosa* est capable de subvertir la réponse immune, effectivement *P. aeruginosa* sécrète des Protéase notamment la Protéase IV qui dégrade l'Interleukine-22 ainsi que les protéines SP-A, SP-D et SP-B du surfactant [19, 66]. De même les élastases Las A et Las B sécrétées par le SSTII du *P. aeruginosa* sont capable de cliver aussi bien les protéines du surfactant que les immunoglobulines [13]. *P. aeruginosa* module également la réponse cellulaire, l'exoS inhibe la production de ROS par les neutrophiles, de plus la cytotoxicité envers les macrophages altère la phagocytose et favorise donc la dissémination bactérienne [67]. En plus des exoenzymes sécrétées, le SSTIII inhibe également la phagocytose du *P. aeruginosa* par les macrophages alvéolaires, alors que c'est un phénomène clef de l'immunité innée et de la clairance bactérienne. Une étude récente a montré que *P. aeruginosa* était capable d'activer le NLRC4 (Nods-Like Receptor family, CARD domain containing 4) de l'inflammasome, alors qu'il joue un rôle important dans la défense et la clairance des bactéries intracellulaires et qu'il est principalement activé par les pathogènes intracellulaires. L'activation de NLRC4 par *P. aeruginosa* diminue la clairance de ce pathogène extracellulaire. Cette subversion du système immunitaire passe par la production d'IL-18 qui va limiter les effets bénéfiques de l'IL-17 et entrainer un recrutement massif de neutrophiles dans les poumons augmentant ainsi les dommages tissulaires et favorisant la dissémination bactérienne [68].

C'est donc via un subtil équilibre orchestré par le système du quorum sensing pour moduler l'expression des facteurs de virulence et via la subversion du système immunitaire que *P. aeruginosa*

parvient à se disséminer et à persister chez l'hôte donnant lieu à des infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose.

En plus de ces facteurs de virulences et de l'échappement immunitaire *P. aeruginosa* dispose d'une grande adaptabilité génétique responsable de l'émergence de souches multirésistantes. Les traitements conventionnels sont mis à mal, d'où la nécessité de trouver de nouvelles alternatives telles que le renforcement des barrières épithéliales. Certaines cytokines tel que l'IL-17 et l'IL-22 jouent un rôle dans la défense antimicrobiennes, l'IL-17 favorise le recrutement des neutrophiles et la production de peptides antimicrobiens, alors que l'IL-22 est connue comme étant protectrice des épithéliums [69].

V. Cytokines protectrices des épithéliums :

1. Découverte de l'IL-22 :

L'Interleukine-22 (IL-22) est une cytokine découverte en 2000 par L. Dumoutier et initialement nommée "IL-10 T cell-derived inducible factor (IL-TIF)"[70]. Initialement décrite comme une nouvelle cytokine induite par l'IL-9 dans un lymphome murin (BW5147 murine T lymphoma cells), l'IL-22 fait partie de la famille de l'IL-10 avec 25% d'homologie de séquence avec l'IL-10, il existe également une forte homologie de séquence (80%) entre l'IL-22 humaine et murine [71].

La famille de l'IL-10 comprend de nombreuses cytokines : IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-28B, IL-29 (les trois dernières sont également connus tels que des IFN- λ), dont la plupart partagent la même sous unité IL-10R2 du récepteur à l'IL-10. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire produite et sécrétée par différents types cellulaires [72, 73].

2. Sources de l'IL-22 :

L'IL-22 est produite par différents types cellulaires, aussi bien par des cellules de l'immunité innée que des cellules de l'immunité adaptative. L'IL-22 est produite par les lymphocytes T (Th1, Th17, Th22), les NK, les NKT, les Innate Lymphoid Cells group 3 (ILC3), ainsi que par des cellules non lymphoïdes telles que les macrophages, les DC et les neutrophiles (Figure 19) [74].

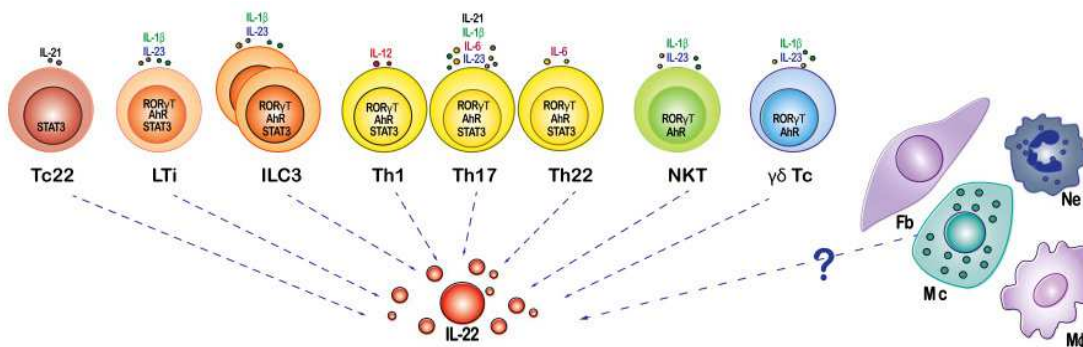


Figure 19: Les différentes sources d'IL-22

(Issue de Perusina Lanfranca M et al. J Mol Med (Berl).2016 May;94(5):523-34.)

L'expression de l'IL-22 a été détectée dans différents organes, aussi bien dans le foie que dans les poumons, les intestins, le colon, les reins, le cœur et la rate [75].

La sécrétion de l'IL-22 est modulée par l'expression de certaines cytokines telles que l'IL-23, l'IL-1 β , l'IL-7 et le TGF- β . L'IL-23 est une cytokine de la famille de l'IL-12, majoritairement sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques, l'IL-23 agit sur les lymphocytes T déjà activés, pour induire la sécrétion d'IL-22 [72]. L'IL-23 induit également la production d'IL-22 par les cellules dendritiques [76]. L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire produite par différents types cellulaires (macrophages, DC, LT, LB, cellules épithéliales et cellules endothéliales), et peut agir notamment sur les cellules NKT, ILC3 et Th17 pour induire la sécrétion d'IL-22 [73]. A l'inverse de l'IL-23 et de l'IL-1 β , le TGF- β réprime la sécrétion d'IL-22 par les cellules Th17 de manière c-Maf dépendante [77].

3. IL-22/IL-22RA signalisation et régulation :

Le récepteur à l'IL-22 est un hétérodimère IL-10R2/IL-22RA1 membranaire. La sous unité IL-10R2 est exprimée de manière ubiquitaire aussi bien par les cellules immunitaires que par les cellules non immunes et est commune à plusieurs cytokines de la famille de l'IL-10. La sous unité IL-22RA1 du récepteur est exprimée uniquement par les cellules non myéloïdes à savoir les hépatocytes, les cellules épithéliales de l'intestin, de la peau et des poumons (notamment les AECs de type II), l'IL-22RA1 est partagée avec l'IL-20 et l'IL-24 (également de la famille de l'IL-10)[78].

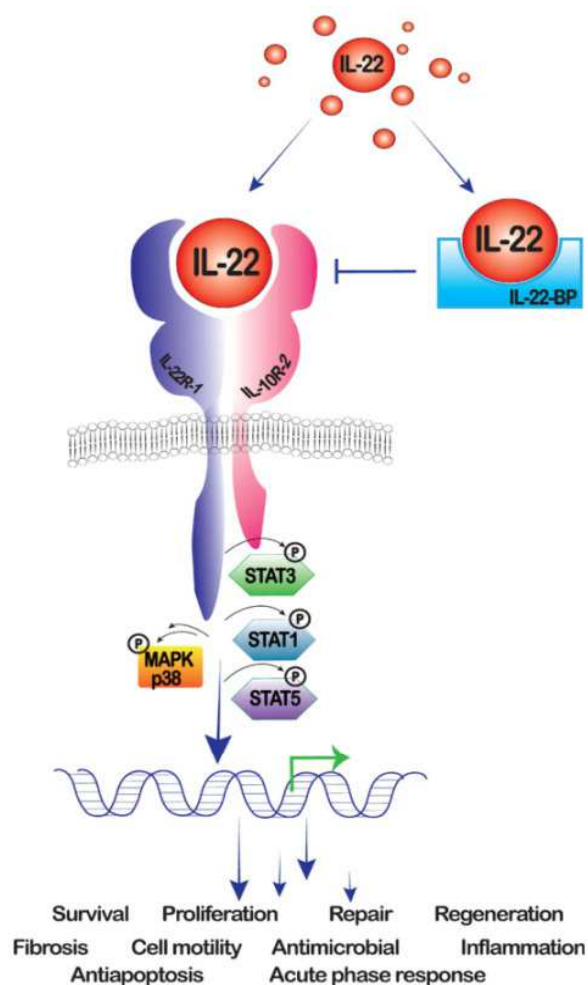


Figure 20: Signalisation IL-22/IL-22RA

(Issue de Perusina Lanfranca M et al. J Mol Med (Berl).2016 May;94(5):523-34.)

La reconnaissance et la fixation de l'IL-22 par la sous-unité IL-22RA1 entraîne une hétérodimérisation des récepteurs (IL-22RA1/IL-10R2), ce qui induit une cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation de STAT-1, STAT-3, STAT-5 ainsi qu'à l'activation des voies ERK, JNK et MAPK (Figure 20) [79, 80].

La signalisation IL-22-IL-22R aboutit à l'activation de certains facteurs transcriptionnels favorisant la survie des cellules épithéliales, la prolifération, l'inflammation (sécrétion cytokinique) et la production de peptides antimicrobiens [78, 81].

Il existe également un récepteur soluble l'IL-22BP ou IL-22RA2, qui est sécrété notamment par les cellules dendritiques. L'IL-22BP a une plus forte affinité pour l'IL-22 que le récepteur membranaire et constitue donc un inhibiteur naturel de la voie de signalisation IL-22/IL-22RA1. L'IL-22BP est exprimé au niveau des organes lymphoïdes secondaires, de la peau, du sein, des intestins et du poumon [82].

4. Effets de l'IL-22 :

L'IL-22 est une cytokine protectrice des épithéliums qui favorise les défenses antimicrobiennes et la régénération tissulaire.

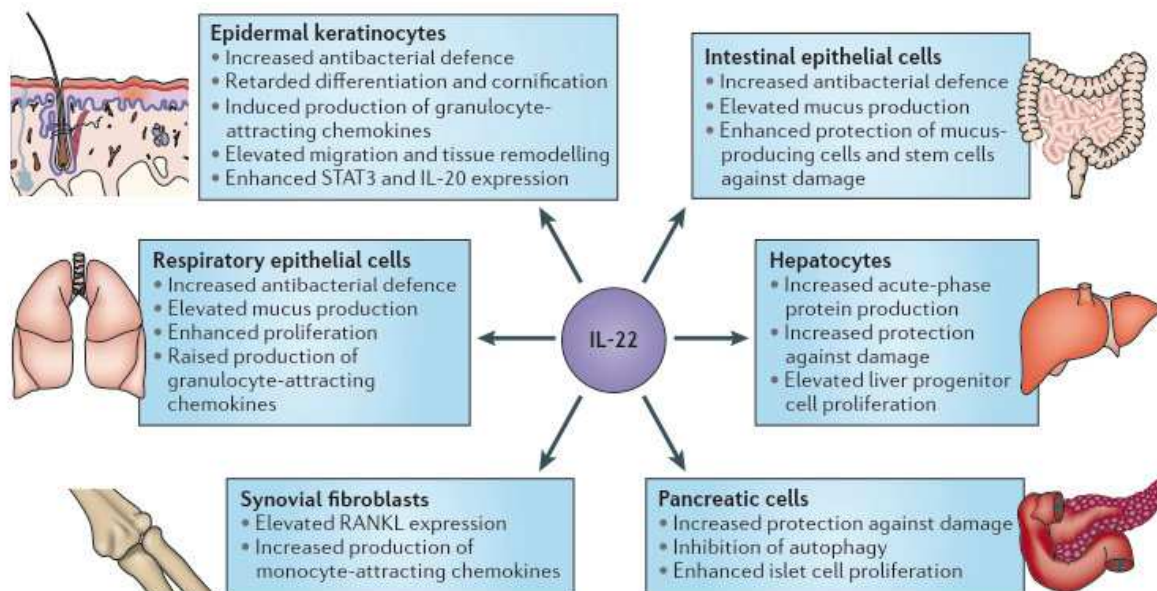


Figure 21: Principaux effets de l'IL-22

(Issue de Sabat R et al. Nat Rev Drug Discov. 2014 Jan;13(1):21-38.)

Au niveau des cellules hépatiques et des cellules pancréatiques, l'IL-22 favorise la réparation des dommages et la régénération tissulaire. Au niveau des épithéliums intestinaux et respiratoire, l'IL-22 favorise la sécrétion de mucus ainsi que la réponse antimicrobienne via la sécrétion de β -défensine 2 (hBD-2) et de Cathélicidine (LL-37) [69].

En effet d'après les travaux réalisés par Alexis Broquet au sein de notre laboratoire, la neutralisation de l'IL-22 chez les souris augmente leur susceptibilité à l'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* [33]. De même le traitement préventif par inhalation d'IL-22 protège les rats contre les dommages associés à la ventilation mécanique dans un modèle in vivo de VILI (ventilator induced lung injury) [83].

L'IL-22 a des effets bénéfiques et protecteurs contre les infections, mais dans certains cas, de dérèglement de signalisation, l'IL-22 est alors associée à des maladies inflammatoires telles que le psoriasis (maladie inflammatoire de la peau), polyarthrite rhumatoïde (maladie inflammatoire des articulations), des maladies intestinales, des hépatites ou des pancréatites. Un dérèglement de cette

signalisation peut également être mis en cause dans l'initiation du Cancer. En effet, certaines cellules sont capables d'exploiter la signalisation IL-22/IL-22RA1 pour proliférer et dégénérer en mélanome (c'est par ailleurs dans un modèle de lymphome murin que l'IL-22 a été initialement décrite) [79].

L'IL-22 peut agir en synergie avec d'autres cytokines telles que l'IL-17 ou les IFN- λ . Dans les conditions pro-inflammatoire la combinaison de l'IL-22 avec l'IL-17 favorise la production de peptides antimicrobiens et des cytokines pro-inflammatoires (G-CSF et IL-6) [84]. L'effet protecteur ou inflammatoire de l'IL-22 est conditionné par la présence ou l'absence d'IL-17 [85]. Une synergie d'action entre l'IL-22 et les IFN- λ a été décrite dans le cadre d'une infection murine à rotavirus [86]. De plus l'IL-22 favorise la production d'IFN- λ [87].

5. Les interférons IFN-λ : nouvelles cytokines protectrices des épithéliums

Les IFN de type III ou IFN-λ sont au nombre de 3 : IFN-λ1, IFN-λ2 et IFN-λ3 (respectivement IL-29, IL-28A et IL-28B) et font partie de la superfamille de l'IL-10, au même titre que l'IL-22 [88]. Les IFN-λ se fixent sur un hétérodimère IL-10Rβ/IL-28Rα, partageant ainsi la sous-unité IL-10Rβ avec l'IL-22 (Figure 22). Alors que l'expression de l'IL-22RA1 est restreinte aux cellules épithéliales, l'IL-28RA est également exprimé par les cellules épithéliales ainsi que par les cellules immunes (cellules dendritiques, cellules NK, neutrophiles, LT et LB) [89].

Les IFN-λ ont été découvert en 2003, initialement décrits dans le cadre des infections virales. Les IFN-λ, sont essentiellement induits suite aux infections virales, comme les IFN de type I ils participent à la réponse antivirale via l'induction des ISGs (Interferon-stimulated genes), pour inhiber la réplication virale [90, 91].

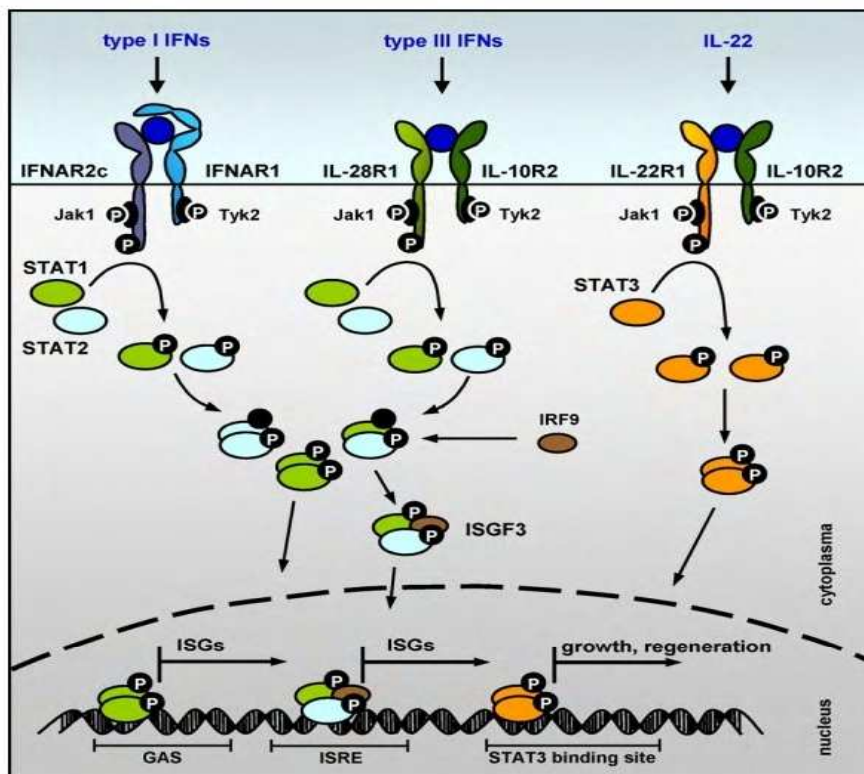


Figure 22: Signalisation des IFNs type III et de l'IL-22

(Issue de Witte K et al. Cytokine Growth Factor Rev. 2010 Aug;21(4):237-51.)

Les IFN- λ sont produits par différents types cellulaires, les cellules épithéliales, les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les monocytes [92, 93]. La production d'IFN- λ a récemment été mise en évidence dans le cadre de pneumonies bactériennes à *P. aeruginosa* et à *S. aureus* [94]. La production d'IFN- λ par les cellules épithéliales est induite par l'infection avec des bactéries intracellulaires Gram+ et quasiment pas par les bactéries intracellulaire Gram- [95, 96].

Les IFN- λ protègent contre les dommages tissulaires en limitant la migration des neutrophiles et en diminuant la dégranulation et la sécrétion de ROS en agissant directement sur les neutrophiles [97, 98]. Les IFN- λ agissent sur les cellules dendritiques pour orienter leur réponse vers un phénotype anti-inflammatoire, les DC vont alors promouvoir la prolifération des T reg et orienter la réponse vers une activation Th1 [97]. Les IFN- λ aident au maintien de l'épithélium et au renforcement de la barrière épithéliale [99].

Les objectifs du travail :

Les infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* constituent un problème de santé publique et la résistance croissante aux antibiotiques rend les traitements de moins en moins efficaces. Une meilleure compréhension des mécanismes mis en place lors de la réponse immunitaire face à l'infection à *P. aeruginosa* est indispensable.

Objectif n°1 : Rôle de l'interleukine-22 dans les pneumonies à *P. aeruginosa*

Aux vues de l'expression restrictive du récepteur à l'IL-22 par les cellules épithéliales, l'objectif n° 1 de ce travail a consisté à caractériser le rôle de l'IL-22 au cours de l'infection à *P. aeruginosa in vitro* dans les cellules épithéliales alvéolaires.

Objectif n°2 : Etude des mécanismes d'échappement de *P. aeruginosa* dans un modèle de granulome *in vitro*

Les infections chroniques à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose augmentent considérablement les risques de morbi-mortalité. En plus d'une prédisposition aux infections de ces patients, l'échappement immunitaire du *P. aeruginosa* lui confère un avantage dans la colonisation et l'évolution des infections chroniques. Afin d'étudier les mécanismes d'échappement immunitaire de *P. aeruginosa*, nous avons travaillé en collaboration avec l'unité de recherche du Dr. Frédéric Altare, pour mettre au point et utiliser un modèle de granulome à *P. aeruginosa in vitro*.

Objectif n°1 :

Objectif n°1 : Rôle de l'interleukine-22 dans les pneumonies à *P. aeruginosa*

Les travaux menés au sein de notre laboratoire, *in vivo* sur un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* ont montré une augmentation de la susceptibilité des souris à l'infection lorsque ces souris étaient traitées avec l'anticorps neutralisant anti-IL-22 (Figure 23), mettant ainsi en évidence le rôle bénéfique de l'IL-22 dans la réponse de l'hôte à l'infection.

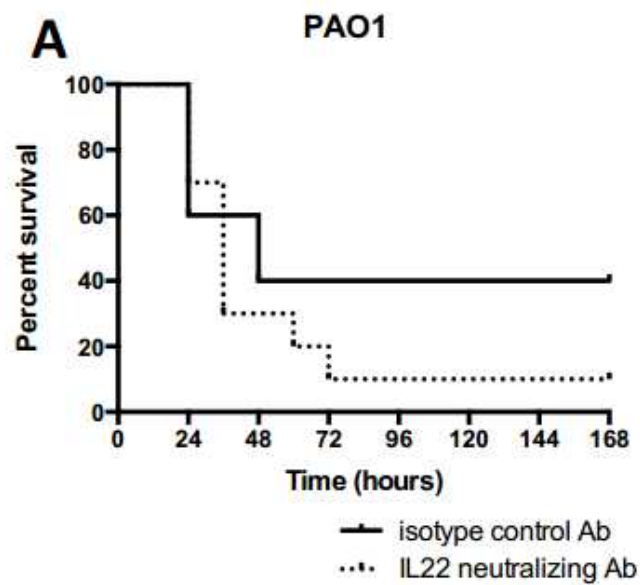


Figure 23: La neutralisation de l'IL-22 augmente la susceptibilité des souris à l'infection à *P. aeruginosa*

(Issue de Broquet et al. Sci Rep.2017 doi: 10.1038/s41598-017-11518-0.)

Aux vues de l'expression restreinte aux cellules épithéliales du récepteur à l'IL-22, l'objectif n° 1 de ce travail a consisté à caractériser le rôle de l'IL-22 au cours de l'infection à *P. aeruginosa in vitro* dans les cellules épithéliales alvéolaires.

Les questions formulées :

- 1) Quel est l'impact de l'administration d'IL-22 sur les cellules épithéliales alvéolaires lors de l'infection à *P. aeruginosa in vitro*?
- 2) Validation de nos hypothèses *in vivo* dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa*

I. Matériels et méthodes de l'objectif n°1:

1. Souches bactériennes :

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude et leurs caractéristiques sont répertoriées dans le tableau 3. Les souches de *P. aeruginosa* et d'*E.coli* ont été cultivées dans du milieu BCC à 37°C sous agitation pendant la nuit. Puis les bactéries ont été lavées 2 fois au PBS, ensuite une suspension bactérienne à 3 McFarland a été préparée. (3 McFarland (PA)= 10⁹ bactéries/ml).

| Souches | Caractéristiques | Origine |
|-------------------------------|---|------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | |
| PAO1 | Souche de référence (souche de laboratoire) | EA3826 |
| PAO1-GFP | PAO1 qui exprime la GFP | EA3826 |
| PAO1-3Δ | PAO1 muté pour les 3 exoenzymes (Δ Exo S, T et Y) | EA3826 |
| PAO1-ΔpscC | PAO1 muté pour le Système de sécrétion de type III (SSTIII) | EA3826 |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| <i>E.Coli</i> | Souche de laboratoire DH-5α | ATCC 35218 |

Tableau 3: Liste des souches bactériennes utilisées lors de cette étude.

2. Culture cellulaire:

A. Lignée cellulaire :

Les cellules épithéliales alvéolaires de Type II A549 ont été gracieusement fournies par le Pr Henri Vié. Les cellules A549 ont été testées par RT-PCR et sont dépourvues de mycoplasmes.

Les cellules A549 ont été maintenues en culture dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen) complété à 10% avec du sérum du veau fœtal (SVF) thermo-inactivé (Invitrogen), 100 U/ml de pénicilline / 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen) à 37°C, sous 5% CO₂. Arrivées à confluence (70-80%), les cellules ont été récoltées par la trypsine-EDTA (Invitrogen), puis disposées selon les expériences dans des plaques de 24 puits ou 12 puits à raison de 5.10⁵ cellules ou 10⁶ cellules/mL.

B. Infection des cellules épithéliales :

Les cellules épithéliales alvéolaires de Type II A549 ont été mises en plaque à une densité de 10⁶ cellules /mL. La veille de l'infection les cellules ont été privées de sérum. Le jour de l'infection les cellules épithéliales ont été lavées au PBS pour enlever les traces d'antibiotique, puis ont été infectées pendant 2h, 4h ou 24h (selon les expériences). Toutes les infections ont été réalisées en absence d'antibiotiques avec un ratio de bactéries: cellules de 1:1 ou de 10 :1 selon les expériences.

A 24h post-infection, les cellules A549 ont été lavées puis décollées par Trypsine-EDTA, lavées et marquées au Viability Dye eFluor 660 (eBioscience). Puis les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (Accuri C6), les data ont été analysées avec le logiciel FlowJo.

C. Traitement par IL-22 :

La veille de l'infection les cellules ont été privées de sérum. Lorsque c'est indiqué, les cellules épithéliales infectées ou pas à *Pseudomonas aeruginosa* ou à *Escherichia coli*, ont été co-traitées avec de l'IL-22 humaine recombinante à 10 ou 100ng/mL (Miltenyibiotec).

3. Détermination de la charge bactérienne :

Les cellules épithéliales A549 ont été infectées avec les différentes souches de *P. aeruginosa* et *d'E.coli*. Au bout de 2h, 4h ou 6h d'infection, les surnageants cellulaires ont été récupérés puis les cellules ont été lysées dans du tampon de lyse (PBS(Invitrogen), Triton X100 0.1%, Protease Inhibitor Cocktail 1%(Sigma) et Phosphatase Inhibitor Cocktail 1%(Sigma)). Cinquante µL de chaque milieu a été ensemencé sur gélose pour déterminer la charge bactérienne. Les géloses sont incubées à 37°C pendant la nuit avant le dénombrement des CFU ensemencées. La charge bactérienne est exprimée en Log₁₀ CFU/mL.

4. Analyse transcriptionnelle par RT-PCR :

Les ARN totaux ont été extraits à partir des cellules épithéliales A549, 2h post-infection. L'extraction a été réalisée en utilisant le kit High Pure RNA Tissue, en suivant les recommandations du fournisseur (Roche). La concentration en ARN a été dosée par Nanodrop.

Un microgramme de la préparation d'ARN a été porté à 65°C pendant 5 minutes puis placé à 4°C. Le mélange suivant a été ensuite rajouté dans un volume final de 13 µl: 1µL dNTP, 1µL Random Primer (Promega) 4µL de tampon 5X, 1µL DTT et 1µL de TAQ contenues dans le kit Transcriptase III (Invitrogen). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 5 min à 25°C puis 40 min à 50°C, et enfin 15 minutes à 70°C puis maintenu à 4°C.

Dans un volume final de 20 µl, 2 µl de l'ADNc dilué au ½ (obtenu précédemment) ont été soumis à une PCR en temps réel, en présence de 10µl de Pré-mix SYBRGreen (ThermoFisher), 0.4µL de chaque amorce (10µM) et 7.2µl d'eau distillée stérile. Les amorces utilisées pour la PCR sont répertoriées dans le tableau 4.

La PCR en temps réel a été réalisée dans le thermocycleur Bio-Rad CFX Manager pendant 45 cycles de : (92°C 30 s ; 55°C 30 s ; 72°C 30 s). Les produits de PCR ont été analysés sur gel d'agarose à 2 %. Après coloration au bromure d'éthidium(BET), le gel a été exposé aux UV.

| | Primers | Sequences | Size |
|----------|---------|--------------------------------|--------|
| Actine | Forward | 5'CCCAGCCATGTACGTTGTA'3 | 126 pb |
| | Reverse | 5'AGGGCATACCCCTCGTAGATG'3 | |
| IL-22RA1 | Forward | 5'CTGACACAGAGTTCCTTGG'3 | 406 pb |
| | Reverse | 5'CCTAAGTAGGTGATCTCGG'3 | |
| h-BD-2 | Forward | 5'GCCATGAGGGTCTTGTATCTC'3 | 236 pb |
| | Reverse | 5'TCTGAATCCGCATCAGCCAC'3 | |
| LL37 | Forward | 5'ATAGATGGCATCAACCAGCGGTCC'3 | 383 pb |
| | Reverse | 5'GACTCTGTCTGGGTACAAGATTCC'3 | |
| REG1A | Forward | 5'TGGAAGGATGTGCCTTGTGAAGACA'3 | 178 pb |
| | Reverse | 5'AGGCAAACCTCAGCAGAGAAGAGAGT'3 | |
| IL-6 | Forward | 5' TCCACCAAGCGCCTTCGGTCCAG 3' | 191 pb |
| | Reverse | 5' CTCAGGGCTGAGATGCCGTCG 3' | |
| IL-8 | Forward | 5'CTGGCCGTGGCTCTCTTGG'3 | 185 pb |
| | Reverse | 5' ATTTCTGTGTTGGCGCAGTGTG'3 | |
| IL-28A | Forward | 5'GACATGACTGGGGACTGCACGC'3 | 591pb |
| | Reverse | 5'GACACACAGGTCCCCACTGGC'3 | |
| IL-28B | Forward | 5'GACATGACCGGGGACTGCATG'3 | 589pb |
| | Reverse | 5'GACACACAGGTCCCCGCTGG'3 | |
| IL-29 | Forward | 5'GCCATGGCTGCAGCTTGGAC'3 | 602pb |
| | Reverse | 5'GGTGGACTCAGGGTGGGTTGAC'3 | |

Tableau 4: Liste des amorces utilisées dans cette étude.

5. Dégradation de l'IL-22 :

Les plaques de culture (12 puits) ont été pré-coatées avec du PBS/BSA 5% à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, 100 ng d'IL-22 recombinante ont été incubées à 37°C sous 5% CO₂, pendant 4h ou 24h avec les différentes souches bactériennes (10⁷ bactérie/mL). Le surnageant de culture a été récolté, centrifugé et conservé à -80°C en vue du dosage de l'IL-22 restante (non dégradée).

6. Dosage des cytokines produites par ELISA :

L'ELISA anti-IL-22 (Invitrogen) a été réalisée sur les échantillons provenant de l'essai de dégradation de l'IL-22 par les bactéries.

24h post-infection, le surnageant des cellules épithéliales infectées ou pas a été récolté, centrifugé à 4°C pendant 10 min à 2500 rpm, puis aliquoté dans des tubes de transfert et conservé à -80°C en attendant le dosage des cytokines. Les niveaux de production de la chimiokine IL-8 et des cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNF- α , IL-28A ainsi que la β -défensine 2 des cellules épithéliales pulmonaires infectées ou non ont été mesurés par ELISA (eBioscience).

7. Western blot :

Les cellules épithéliales ont été lavées deux fois au PBS froid avant d'être lysées dans 100 μ L de tampon RIPA : (RIPA (CellSignalling) 1x, PBS (Invitrogen), Protease Inhibitor Cocktail 1%(Sigma) et Phosphatase Inhibitor Cocktail 1%(Sigma)) 30 min à 4°C. Le lysat cellulaire ainsi obtenu est centrifugé à 10 000g pendant 2 min à 4°C, puis conservé à -20°C. Les concentrations protéiques des lysats

cellulaires ont été déterminées par dosage colorimétrique via la méthode de Bradford (Bleu de Coomassie).

Après préparation du Laemmli Sample Buffer 4X (100µL de β-ME (Sigma) pour 900µL de Laemmli 4X (Bio-rad)), 3 volumes d'échantillons ont été mélangés avec 1 volume de Laemmli/β-ME. Les protéines présentes dans les extraits cellulaires ont été dénaturées pendant 10 min à 100°C. Puis 40µg de protéines a été déposé sur un gel de polyacrylamide dénaturant (SDS- PAGE) à 10% (Bio-rad).

Après migration le gel a été transféré sur membrane de nitrocellulose. Le transfert a été réalisé en milieu liquide via le système Mini trans-blot cell (Bio-Rad) pendant 1h.

La membrane a été saturée pendant 1h à température ambiante dans une solution de Tris-Borate Sodium (TBS) (Sigma) additionnée de 5% de BSA(Sigma) et 0,1% tween-20 (Biosolve), puis a été hybridée, pendant 1 heure à 37°C (ou sur la nuit à 4°C) avec l'anticorps primaire (1 :1000), suivi de 3 lavages de 10 min avec du TBS Tween puis de 1h d'incubation avec l'anticorps secondaire fluorescent (1 :15000) ou l'anticorps secondaire anti-IgG conjugué à la peroxydase (1 :7500). Après 3 lavages de 10 min, le signal a été révélé par le kit ECL (Super Signal™ West Pico Chemiluminescent Substrate) (Thermo Scientific) pour les anticorps secondaires HRP. Pour les anticorps secondaires DyLight 680 ou 800 (KPL) les membranes ont été visualisés directement dans le lecteur azure biosystems C500 (ScienTech). Les images obtenues ont été analysées via le logiciel FIJI.

8. Marquage pour la microscopie Confocale :

Les cellules épithéliales A549 ont été mises en culture sur des lames Lab-Tek à raison de 5.10^5 cellules/mL. Les cellules ont été infectées pendant 4h avec *P. aeruginosa*-GFP (PAO1-GFP) à MOI 1 :1.

Au bout de 4h d'infection les cellules ont été lavées avec du DPBS froid (Ca^{2+} , Mg^{2+}) 1X (Sigma) puis fixées avec de la PFA 4% (Sigma) pendant 10 min. Après 2 lavages au DPBS, les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X-100 0,1% pendant 10 min à température ambiante. Après lavage au DPBS les cellules ont été marquées avec l'anticorps primaire mouse anti-IL-22RA1 au (1 :100) (Thermo Fisher) pendant 1h à 37°C. 2 lavages après, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire Donkey anti-mouse alexafluor647 (1 :200) (Life Tech). Après lavages les filaments d'actine ont été marqués avec la Phalloidine Alexa fluor 458 (Life Tech) 30 min à 37°C. Le noyau des cellules a été marqué au DAPI (1 :4000) (Sigma) 30 min à 37°C. Après 2 derniers lavages nous procédons au montage de lames, avec du Prolong fade reagent (Life Tech).

Les lames sont mises à sécher à l'abri de la lumière au minimum 48h à température ambiante avant le passage au microscope confocale. Les lames ont été observées grâce au microscope Confocale (ref machine Canon ou ZEISS). Les images obtenues ont été analysées par le logiciel Fiji.

9. Pneumonie *in vivo* et administration d'IL-28A :

La pneumonie à *P. aeruginosa* a été réalisée par instillation endotrachéale de l'inoculum sur des souris Swiss femelles de 27-30gr [39]. 1 µg d'IL-28A recombinante (Biotechne) diluée dans du PBS-BSA 0.1% a été administré par voie intra-trachéale au moment de l'infection ainsi que 8h post-infection. Deux groupes de souris ont été constitués l'un traité à l'IL-28A l'autre avec du PBS-BSA 0.1%. 24h post-infection les souris ont été euthanasiées, les poumons et les rates ont été prélevés pour les analyses histologiques ou pour réaliser les dénombrements bactériens ainsi que les dosages cytokiniques par ELISA.

10. Analyses statistiques :

Les graphiques ainsi que les analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPadPrism 4, en utilisant le t-test non paramétrique Mann and Whitney test. $P < 0.05$ est considéré statistiquement significatif.

II. Résultats objectif n°1 (Article IL-22 soumis à l'European Respiratory Journal 2018)

Title:

Interferon- λ dampen neutrophil recruitment through interleukin-22 in a pneumonia model

Titre de l'article : Les interférons- λ limitent le recrutement des neutrophiles via l'IL-22 dans un modèle murin de pneumonie

- 1) Quel est l'impact de l'administration d'IL-22 sur les cellules épithéliales alvéolaires lors de l'infection à *P. aeruginosa in vitro*?
- 2) Validation de nos hypothèses *in vivo* dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa*

In vitro :

La partie *in vitro* de l'étude a été réalisée sur une lignée humaine d'adénocarcinome A549 (cellules épithéliales de type II). L'IL-22 a été administré en même temps que l'infection. 2 heures post-infection, le surnageant de culture a été remplacé par du milieu contenant de la gentamycine. Au bout de 6 ou 24 heures post-infection, les cellules ainsi que le surnageant de culture ont été récoltés afin de réaliser les différentes analyses (cytotoxicité, ELISA, cytométrie...) (Figure 24).

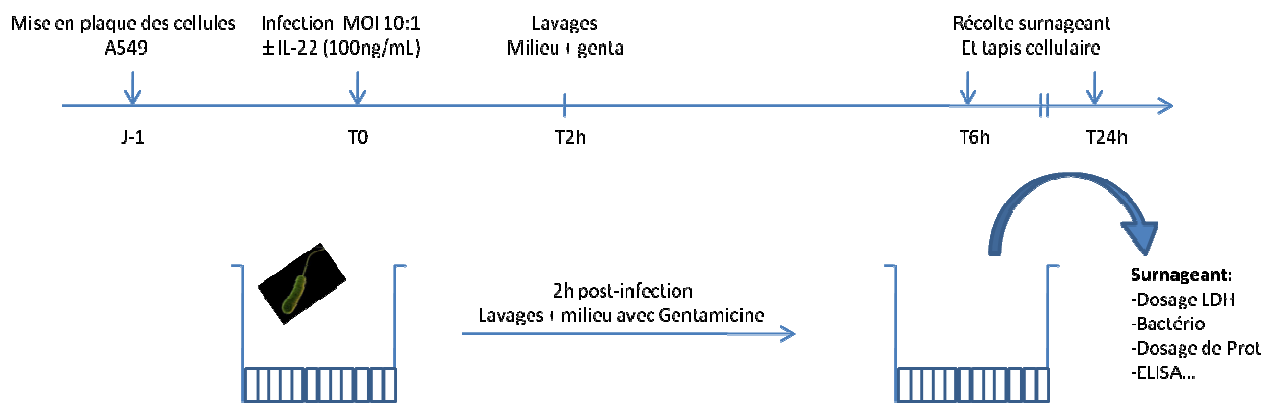


Figure 24: Schéma d'infection des AECs et traitement IL-22 *in vitro*

In vivo :

La partie *in vivo* a été réalisée sur des souris Swiss femelles. Après induction d'une pneumonie à PAO1, l'IL-28A a été administrée en intra-trachéal à deux reprises t0 et t6h post-infection. Les analyses histologiques et cytokiniques ont été réalisées 24h post-infection (Figure 25).

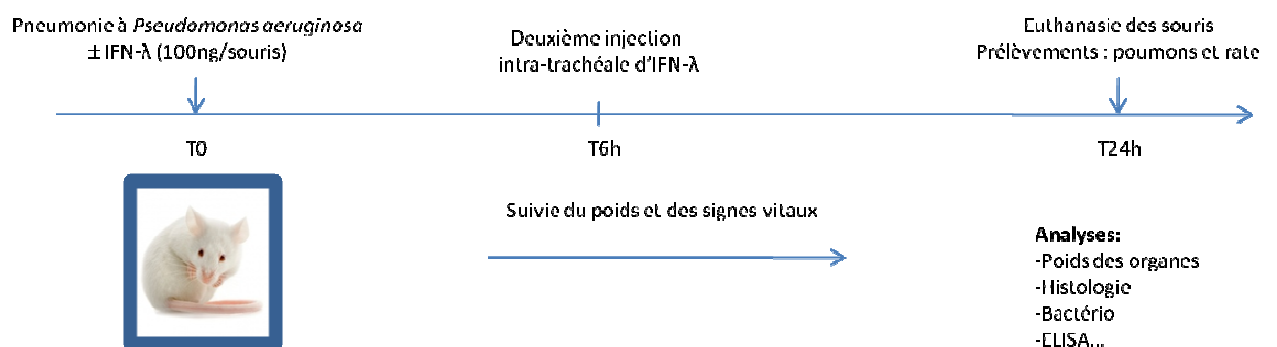


Figure 25: Schéma d'infection *in vivo* et traitement à l'IL-28A

Résultats :

- 1) a) Une analyse par cytométrie en flux des pneumocytes montre clairement que seules les AECs de type II expriment le récepteur membranaire à l'IL-22, IL-22RA1. Après avoir vérifié l'expression du récepteur IL-22RA1 par les cellules épithéliales alvéolaires A549 par microscopie confocale et par RT-PCR, nous avons également validé la fonctionnalité de la signalisation IL-22/IL-22RA en suivant la phosphorylation de Stat-3. Nous avons confirmé dans notre modèle que l'IL-22 était capable d'induire la production de peptides antimicrobiens tels que Reg 1 α et h-BD-2 (Figure 26).

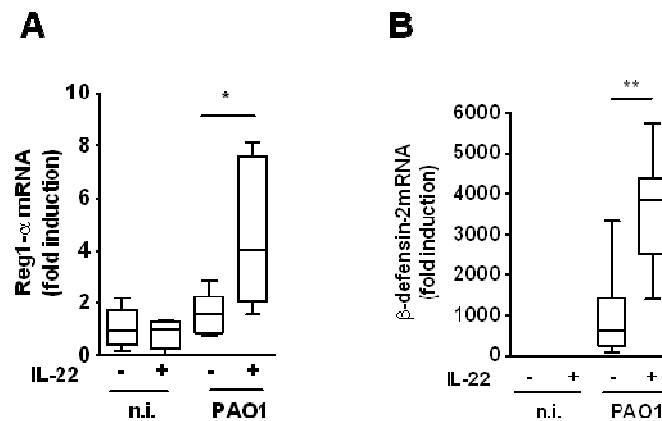


Figure 26: L'IL-22 booste l'expression de Reg1- α et de β -defensin 2

Expression relative de [A] Reg1- α mRNA et [B] h-BD-2 par RT-PCR 2h post-infection.

b) Nous nous sommes intéressés par la suite à la réponse des cellules à l'infection notamment la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Le traitement des cellules *in vitro* à l'IL-22 réduit significativement la production de chimiokine IL-8 (Figure 27) Et est corrélé *in vivo* par un moindre afflux des neutrophiles dans un modèle murin de pneumonie aiguë (Broquet et al. 2017, article en Annexe).

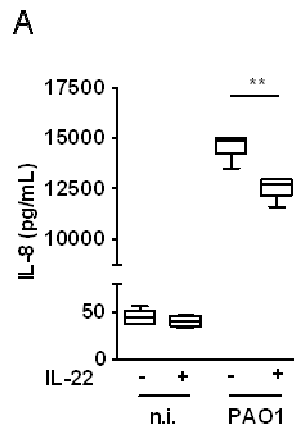


Figure 27: L'IL-22 réduit la production d'IL-8

[A] Quantification de l'IL-8 par ELISA dans le surnageant de culture de cellules A549 infectées 24 heures et traitées par IL-22.

c) Les IFN- λ ont récemment été décrit pour leur rôle de renforcement de la barrière épithéliale lors des infections [99]. Cohen et al. ont montré une production d'IFN- λ dans le liquide broncho-alvéolaire de souris infectées à *P. aeruginosa* (souche PAK) [94]. Dans notre modèle, nous avons montré que l'IL-22 augmente significativement la production d'IFN- λ 2 dans les cellules infectées à *P. aeruginosa* (Figure 28). Nous avons donc émis l'hypothèse que les effets bénéfiques de l'IL-22 pourraient être médiés en partie par sa capacité à induire l'expression des IFN- λ au cours de l'infection.

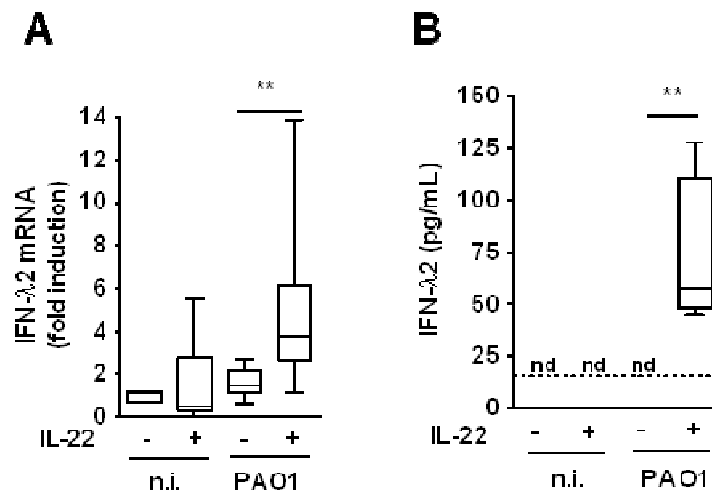


Figure 28: L'IL-22 stimule la production d'IFN- λ

[A] Expression relative d'IFN- λ 2 mRNA 2h post-infection. [B] Quantification d'IFN- λ 2 24h post-infection par ELISA (nd : non détecté, limite de détection : 15.6pg/mL).

2) De façon à valider l'hypothèse émise au paragraphe 1c, nous avons administré de l'IL-28A (homologue murin de l'IFN- λ 2 humain) en intra-trachéal à des souris au cours d'une pneumonie à PAO1. L'administration *in vivo* d'IL-28A améliore considérablement le score clinique des souris bien que la charge bactérienne soit inchangée. De plus les analyses histologiques des poumons des souris montrent une augmentation de l'espace alvéolaire (alvéoles aérées) sous l'effet de l'IL-28A. Le marquage Ly6-G montre une diminution significative de l'afflux des neutrophiles dans les poumons des souris traitées à l'IL-28A vs PBS, qui s'accompagne par ailleurs par une diminution de la production d'IL-1 β (Figure 29).

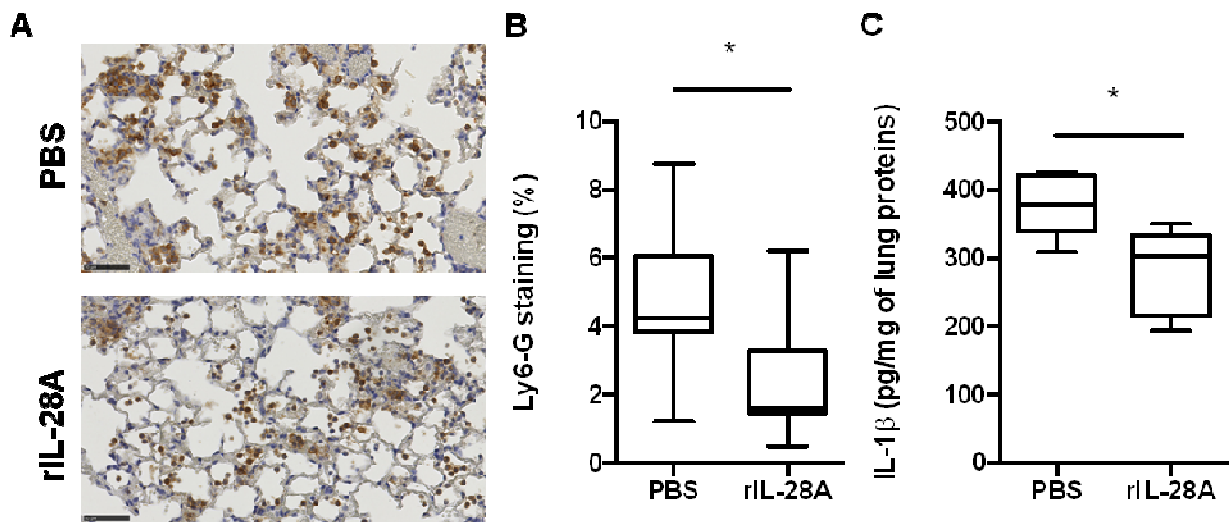


Figure 29: *In vivo* l'IL-28A protège les souris contre la pneumonie à *P. aeruginosa*

[A] Immuno histochimie (Ly6-G) de coupes de poumons de souris 24h post-infection traitées ou non à l'IL-28A. [B] Quantification par SIOX du marquage Ly6-G des images en A. [C] Quantification de l'IL-1 β dans les homogénats de poumons 24h post-infection.

Conclusion :

En conclusion de ce travail, nous avons montré que l'administration *in vitro* de l'IL-22 influait sur la réponse des cellules épithéliales à l'infection. Le traitement à l'IL-22 augmente la production de peptides antimicrobiens, diminue la production de la chimiokine IL-8 et augmente la production des IFN- λ . Nous avons en outre montré que l'administration d'IL-28A (IFN- λ 2) dans les poumons des souris infectées à *P. aeruginosa* améliorait leur devenir notamment en diminuant l'afflux excessif de neutrophiles. La même diminution d'afflux de neutrophiles au cours de l'infection et retrouvée dans les souris traitées par IL-28A ou IL-22 suggérant fortement que l'effet protecteur de l'IL-22 précédemment observé par Broquet et al. (article en annexe) pourrait être médié par l'IL-28A.

III. Discussion objectif n°1 :

Les pneumonies nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* constituent un problème de santé public. Ces infections pulmonaires occasionnent des dégâts irréversibles au niveau de l'épithélium respiratoire et mènent souvent au décès des patients immunodéprimés. L'IL-22 est la cytokine protectrice des épithéliums, *in vivo* la neutralisation de l'IL-22 augmente la susceptibilité des souris à l'infection alors que l'administration d'IL-22 recombinante réduit l'inflammation [33].

L'objectif de ce travail a été d'explorer les bienfaits de l'IL-22 *in vitro*. Nous avons dans un premier temps montré que parmi les pneumocytes, seules les AEC de type II expriment le récepteur IL-22RA1. Afin d'analyser les effets de l'IL-22 et de comprendre les mécanismes sous-jacents de cette signalisation, nous avons utilisé la lignée A549 pour évaluer l'effet de l'IL-22 *in vitro*, ce qui a permis de mettre en évidence l'induction de peptides antimicrobiens et surtout des IFN- λ . Ceci suggère que l'effet bénéfique de l'IL-22 est médié par l'induction des IFN- λ connus pour leur rôle dans les défenses antivirales.

Afin de valider cette hypothèse *in vivo*, nous avons utilisé le modèle de pneumonie à *P. aeruginosa* utilisé en routine au sein du laboratoire. L'administration d'IFN- λ 2 par voie intra-trachéale chez les souris infectées montre une amélioration de la physiopathologie associée à une diminution de l'inflammation (moins de neutrophiles et moins d'IL-1 β). En accord avec les travaux de Blazek et al. qui montrait un effet anti-inflammatoire de l'IFN- λ 1.

Bien que les IFN- λ soient principalement décrit dans le cadre des infections virales, Cohen et al. avait montré l'expression d'IFN- λ dans les poumons de souris infectées à *P. aeruginosa*. De façon intéressante, Hernández et al. avait décrit une synergie d'action entre l'IL-22 et les IFN- λ dans un modèle murin d'infection à rotavirus.

Nos travaux ont montré un effet protecteur de l'IL-22 (article en Annexe) et de l'IFN- λ 2 (article à la suite). L'ensemble de ces résultats suggère une synergie d'action entre l'IL-22 et les IFN- λ pour diminuer l'afflux des neutrophiles, atténuer l'inflammation et limiter ainsi les dommages tissulaire dus l'infection à *P. aeruginosa*.

Interferon- λ dampen neutrophil recruitment through interleukin-22 in a pneumonia model

Alexis Broquet (1)*, Anissa Besbes (1)*, Jérôme Martin (3, 4, 5), Cédric Jacqueline (1), Mickaël Vourc'h (1, 2), Antoine Roquilly (1, 2), Jocelyne Caillon (1), Régis Josien (3, 4, 5), Karim Asehnoune[§](1, 2)

Affiliations

- (1) Laboratoire UPRES EA3826 « Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections », IRS2 – Nantes Biotech, Université de Nantes, Nantes, France
- (2) CHU Nantes, Pôle anesthésie réanimations, Service d'anesthésie réanimation chirurgicale, Hôtel Dieu, Nantes, F-44093, France
- (3) Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France
- (4) Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France
- (5) Laboratoire d'Immunologie, CHU Nantes, Nantes, France

§: corresponding author: Karim Asehnoune, MD, PhD. Laboratoire EA3826. IRS2 – Nantes Biotech. 22 Bd Benoni Goullin 44200 Nantes, France. karim.asehnoune@univ-nantes.fr - +33 (0)2 40 08 30 05.

Conflict of interest: none to declare

*: Both authors contributed equally.

Funding statement: This work was supported only by institutional funds.

Author contributions conceived and designed the experiments: AB, AB and KA. Performed the experiments: AB, AB, CJ, MV. Analysed the data: AB, AB and KA. Contributed reagents/materials/analysis tools: JM, JC RJ. Wrote the paper: AB, AB. Edited the paper: JM, CJ, MV, JC, AR, RJ and KA Statistical analysis: AB, AB.

Title page: IFN-lambda dampens inflammation in a *P. aeruginosa* pneumonia

Abbreviations: AMP: antimicrobial peptides; CFU: colony forming units; IL-1 β : interleukin-1 β ; IFN- λ : interferon lambda; interleukin-6; IL-22: interleukin-22; moi: multiplicity of infection; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; SIOX: Single Integrative Object eXtraction.

Abstract

Interleukin (IL)-22 is a cytokine involved in tissue protection and repair following aggression in the lungs. Interferon (IFN)- λ cytokines displayed similar properties during viral infection and a synergy of action between these two players has been documented in the intestine. We hypothesize that during *Pseudomonas aeruginosa* (PA) challenge, IL-22 up-regulates IFN- λ and that IFN- λ exhibits protective functions during infection.

Using an in vitro human alveolar epithelial cell line A549, we assessed the ability of IL-22 to enhance IFN- λ expression during PA infection. IFN- λ protective function was evaluated in an acute mouse pneumonia model.

We first demonstrated that only type-II alveolar cells (ATII) express IL-22 receptor and that IL-22 treatment of an in vitro ATII cell line up-regulates IFN- λ expression. In vivo administration of IFN- λ during PA pneumonia improves mice outcome by dampening neutrophil recruitment and decreasing epithelium damages.

We show here that IL-22 beneficial action could be mediated through IFN- λ up-regulation during bacterial pneumonia.

Introduction:

Pseudomonas aeruginosa (PA) is one of the leading bacteria involved in nosocomial pneumonia infections in immunosuppressed patients and is the main cause of chronic respiratory infection in Cystic fibrosis patients [1]. Due to increasing resistance to antibiotics with emergence of multidrug resistant bacteria strains, it is imperious to find out an alternative to antibiotics to treat bacterial infections.

Alveolar epithelial cells are the key players in the defense against pathogens [2]. Not only epithelial cells constitute a physical barrier against bacteria, but they also sense pathogens via their Pathogens Recognizing Receptors and secrete chemokines, cytokines and anti-microbial peptides (AMPs) to initiate immune response [3].

Interleukin (IL)-22 belongs to the IL-10 family and acts primarily on epithelial cells as they are the only cell type to express the IL-22R subunit IL-22RA1 [4]. IL-22 restricted action on epithelial cells places this cytokine at the bridge between the immune system and epithelial surfaces [5, 6]. IL-22 action is dependent of the host inflammatory status as it may be either deleterious, i.e. in psoriasis [7-9], or beneficial against pathogens [10]. In the lungs, IL-22 was originally described to enhance the production of antimicrobial peptides (AMPs) such as β -defensin-2 (BD-2) [11] and had been shown to be protective against *S. pneumonia* infection [12], *K. pneumonia* [13] by limiting bacterial dissemination. IL-22, by itself or in synergy with other cytokines such as IL-17, was also shown to induce the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines [11].

Type-III interferons, also named IFN- λ 1-4 in humans or IL-28/IL-29 in mice, are cytokines belonging to the same IL-10 cytokine family than IL-22 and have been discovered and extensively described for their specialized antiviral activity [14-16]. In respiratory tract, human myeloid and epithelial cells produce IFN- λ upon stimulation [17]. IFN- λ members and IL-22 cytokines share the same IL-10R β chain of their heterodimeric receptor [18]. Protective functions of IFN- λ members have extensively been documented during antiviral host response [17] and role of this cytokine family emerged during bacterial infection [14]. Recent works highlighted the role of IFN- λ during bacterial infection in

epithelial defense by promoting epithelial integrity and preventing bacterial spread [19]. In the context of PA pneumonia, Cohen et al. previously showed an IFN- λ induction in the broncho-alveolar fluid of infected mice [20]. We previously demonstrated a beneficial role of the IL-22 during a PA acute pneumonia model in mice [21] as we highlighted a negative correlation between IL-22 expression and neutrophil recruitment in the lungs of infected mice. In the present work using the same model, we hypothesized that IL-22 may exert its protective effects through induction of IFN- λ .

We showed that IL-22 administration in vitro during PA infection enhanced IFN- λ expression. To address the beneficial role of IFN- λ , IFN- λ 2 was administered in vivo during a PA acute pneumonia model. IFN- λ 2 administration resulted in a significant improvement of mouse clinical score and lung histology associated with a dampening of the neutrophil recruitment on the site of infection.

Materials and Methods:

Bacterial strains, cell line and mice

Pseudomonas aeruginosa (PA) PAO1 and PAO1-GFP were grown in Brain Heart Infusion broth overnight at 37°C under agitation. Immediately before use, the bacterial pellet was washed twice with PBS and the inoculum was calibrated by nephelometry at 10⁹ colony-forming unit (CFU)/mL. Human alveolar epithelial cell line A549 (mycoplasma free) were obtained from Dr Vié (Nantes, France) and maintained in RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific) complemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100µg/mL) and 1% L-Glutamine. Cells were maintained at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Depending on experiments, cells were seeded in culture 12 wells or 24 wells plate at a density of 10⁶ cells/mL and 5.10⁵ cells/mL respectively. Eight-to-ten-week-old pathogen-free RjOrl:SWISS mice (weight, 29–32g) were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest Saint Isle, France). Mice were maintained on a 12-hour light/dark cycle with access to food and water ad libitum. The animals were treated in accordance with institutional policies and the guidelines stipulated by the animal welfare committee. Experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Pays de le Loire (APAFIS authorization #9124-2017022317236247-v2).

Cells treatment and Infection:

Cells were starved overnight before infection. All infections were performed in antibiotic-free medium at a multiplicity of infection (MOI) 1:1 or 10:1. Cells were stimulated with human recombinant IL-22 at 100 ng/mL (Miltenyi Biotec, Paris, France). Cells were infected during 2h with IL-22 co-treatment then supernatant was removed and replaced by new media containing 200µg/mL of gentamicin until 24h post-infection.

Bacterial load:

For bacterial load assessment, serial dilutions of supernatants were performed and incubated at 37°C. After 24 h of incubation, viable counts were expressed as the mean±SD log₁₀ CFU/mL.

Cells lysis and Immunoblotting:

Cells were washed twice with cold PBS then lysed in RIPA buffer (Cell Signaling Technology, The Netherlands), with phosphatase and Protease inhibitors cocktails (Sigma, St Quentin Fallavier). Proteins were quantified by Bradford protein concentration assay (ThermoFisher Scientific). Proteins (40 µg per lane) were separated in SDS-acrylamide gel (10% TGX Precast Gel, Bio-Rad), and transferred to nitrocellulose membrane before 1 hour saturation at room temperature under agitation in TBS, BSA 5%, 0.1% Tween 20 (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Membranes were incubated with primary monoclonal rabbit anti-phospho-Stat-3 antibody (Ab) (1:2000, Cell Signaling Technology) or monoclonal mouse anti-β-Actin (1:10000, Sigma). Membranes were then incubated with secondary anti-rabbit Dylight 680 antibody (1:15 000 KPL, Milford, MA, USA) or anti-mouse Dylight 800 antibody (1:15 000 KPL) for 1h at RT. Immunoreactive bands were visualized with the Azure c500 instrument (Azure Biosystems). Optical density of immunoreactive bands were analyzed with Fiji software (www.fiji.sc) and normalized to actin signal.

Human cytokines quantification by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA):

All human ELISA kits were from ThermoFisher Scientific unless otherwise indicated. Harvested supernatants were centrifuged 20 min at 4°C at 12000g and stored at -80°C before, IL-8, IL-22, IFN-λ2 quantification by ELISA according to the manufacturer's instructions.

RNA extraction and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR):

2h post-infection cells were washed twice with cold PBS then harvested and total RNA was extracted with High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostic) according to manufacturer's recommendations. 1µg of RNA was used for Reverse Transcription in cDNA using Transcriptase III kit (Invitrogen, Villebon Sur Yvette, France). Quantitative real time PCR was performed with Maxima SYBR Green/ROX qPCR kit (ThermoFisher Scientific). Relative mRNA expression levels were quantified using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with normalization to actin gene expression. Primer sequences (Sigma) are listed in **Table 1**. PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel and stained with Texas-Red.

Table 1: Sequences of primers used for RT-PCR.

| Primers | | Sequences | Size |
|------------------|---------|--------------------------------|-------|
| β -actin | Forward | 5'CCCAGCCATGTACGTTGTA'3 | 126pb |
| | Reverse | 5'AGGGCATACCCCTCGTAGATG'3 | |
| IL-22RA1 | Forward | 5'CTGACACAGAGTTCCTTGG'3 | 406pb |
| | Reverse | 5'CCTAAGTAGGTGATCTCGG'3 | |
| BD-2 | Forward | 5'GCCATGAGGGTCTTGTATCTC'3 | 236pb |
| | Reverse | 5'TCTGAATCCGCATCAGCCAC'3 | |
| REG1 α | Forward | 5'TGGAAGGATGTGCCTTGTGAAGACA'3 | 178pb |
| | Reverse | 5'AGGCAAACCTCAGCAGAGAAGAGAGT'3 | |
| IL-8 | Forward | 5'CTGGCCGTGGCTCTCTTGG'3 | 185pb |
| | Reverse | 5'ATTCTGTGTTGGCGCAGTGTG'3 | |
| IFN- λ 2 | Forward | 5'GACATGACTGGGGACTGCACGC'3 | 591pb |
| | Reverse | 5'GACACACAGGTCCCCACTGGC'3 | |
| IFN- λ 3 | Forward | 5'GACATGACCGGGACTGCATG'3 | 589pb |
| | Reverse | 5'GACACACAGGTCCCCGCTGG'3 | |
| IFN- λ 1 | Forward | 5'GCCATGGCTGCAGCTTGGAC'3 | 602pb |
| | Reverse | 5'GGTGGACTCAGGGTGGGTTGAC'3 | |

Confocal Microscopy:

A549 cells were seeded in Lab-Tek chambers (ThermoFisher Scientific) at a density of 5.10^5 cells/mL/well and infected with PAO1-GFP strain. Following 4h of infection, cells were washed twice with cold DPBS, fixed 10 min with PFA 4% (Sigma) and permeabilized with 0.1% Triton X100 (Sigma) for 10 min. Cells were stained with a mouse anti-IL-22RA (ThermoFisher Scientific) primary antibody overnight at 4°C following AlexaFluor647 conjugated anti-mouse secondary antibody (ThermoFisher Scientific). β -actin and nuclei were respectively stained with AlexaFluor 568 phalloidin (ThermoFisher Scientific) 30 min at room temperature and DAPI (ThermoFisher Scientific) 10 min. Prolong fade (ThermoFisher Scientific) mounted slides were monitored by

confocal microscopy (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Captured images were analyzed with Fiji software.

Murine AEC flow cytometry

Lungs were removed and digested 45' at 37°C in RPMI-BSA 0,1% containing 0,7% type-3 collagenase (Worthington, Freehold, USA) and 0,1% DNase I (Sigma Aldrich). After red blood cell lysis (BioLegend), cells were incubated 40' with the following antibodies: CD45-FITC (clone 30-F11. BD Bioscience), CD31-brilliant violet 605 (clone 390.BD Bioscience), T1- α -APC (clone 8.1.1. BioLegend) and Ep-Cam (CD326)-PeCy7 (clone G8.8. BioLegend), IL-22RA1-PE (clone 496514, Bio-Techne) and rat IgG2a,k-PE isotype control (clone eBR2a . ThermoFisher Scientific). Samples were acquired on LSR-II (BD Bioscience) and analyzed using Flowjo Software (TreeStar Inc). Single lived cells were gated as CD45^{neg} CD31^{neg} Ep-Cam^{pos} T1- α ^{pos} type-I AECs (ATI), CD45^{neg} CD31^{neg} Ep-Cam^{pos} T1- α ^{neg} type-II AECs (ATII) and CD45^{neg} CD31^{neg} Ep-Cam^{neg} (non AECs).

Mouse pneumonia and IFN- λ 2 administration

Pneumonia was induced as previously described [22]. 1 μ g of rIL-28A (referred in the text as IFN- λ 2. Biotechne, diluted in PBS-BSA 0,1%) or PBS-BSA 0,1% was administered intra-tracheally at the time infection and 8 hours post infection (rIL-28A and PBS group respectively). Mouse body weight was evaluated daily and lungs were collected at 24 hours post infection for subsequent analysis. For histology, lungs were inflated with 1mL of 4% formalin and processed for H&E and neutrophil (Ly6-G) staining as previously described [21]. Bacteria loads and IL-1 β level quantification in the lungs were performed as previously described [21].

Statistical analysis:

Data were analyzed by Kruskal-Wallis test for multiple group comparisons using the GraphPad Prism software (La Jolla, CA. United States). Dunn's multiple comparison test was used as post hoc test for intergroup comparisons. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

IL-22 signaling is functional in A549 cells during PAO1 infection.

It is believed that non-immune cells such as epithelial cells are the only cell-type to express IL-22RA1 chain. Using flow cytometry, we demonstrated that IL-22RA1 expression is restricted to type-II AECs (ATII) in murine lungs of non-infected (figure 1a) and PAO1-infected mice (data not shown). Using a human ATII cell line in vitro (A549 cells), both uninfected and PAO1-infected cells express IL22RA1 as shown by confocal microscopy (suppl figure 1a) and PAO1-infection does not modify IL22RA1 mRNA expression (figure 1b and suppl figure 1b). A549 cells incubation with rIL-22 showed a rapid and transient Stat-3 phosphorylation in uninfected A549 cells (figure 1c and 1d) similar to what observed by Whittington et al. [23], demonstrating the functionality of the IL22RA1 signaling pathway in A549 cell line. Interestingly, PA infection does not interfere with IL-22RA1 signaling as a similar Stat-3 phosphorylation kinetic is observed in infected cells compared to uninfected-cells during IL-22 treatment (figure 1c and 1d).

IL-22 incubation modulates cell response to infection.

IL-22 is known to drive the expression of antimicrobial peptides [24][25]. IL-22 incubation during infection enhanced Reg1- α and β -defensin-2 compared to infection alone (figure 2a and 2b respectively) without decreasing bacterial load in vitro (figure 2c). AECs are the first line of defense against respiratory infection and produce chemokines and cytokines upon infection. We previously demonstrated that IL-22 levels are negatively correlated to IL-8 expression in A549 cells and during a mouse pneumonia model [21]. Consistent with our previous findings, IL-22 treatment during infection decreased IL-8 production during PAO1 infection at the mRNA and protein levels (figure 2d, left and right panel respectively).

IL-22 incubation enhances IFN- λ family expression during infection

Member of the IFN- λ family (IFN- λ 1-3) are suggested to play a role in the reinforcement of epithelial barrier during infection[19] and IL-22 administration enhanced IFN- λ expression in intestinal viral

infection[26].rIL-22 significantly induces all IFN λ member mRNA expression in PAO1-infected A549 cells (figure 3a-c). IFN- λ 2 increased was confirmed by ELISA in which rIL-22 administration led to detectable IFN- λ 2 protein level only in PA-infected A549 cells (figure 3d). These data suggest that IL-22 protection of epithelial barrier could be mediated through IFN- λ expression.

In vivo IFN- λ administration dampens lungs inflammation during bacterial pneumonia

To confirm the IFN- λ protective functions during PA infection, we evaluated the impact of rIL-28A (IFN- λ 2 homolog in mice) treatment in mice during a PAO1 pneumonia model. IFN- λ 2 or vehicle (PBS BSA 0,1%) were administrated intra-tracheally at t=0 and t=8h of infection. Mice body weight changes were evaluated over 7 days of infection and lungs were analyzed at 24 hours of infection. IFN- λ 2 administration significantly reduced body weight loss (figure 4a) and improved mouse clinical score (figure 4b) without bacterial load reduction in the lungs (suppl figure 2) one day post-infection. Mouse clinical signs were associated with an increased of the alveolar spaces compared to vehicle-treated infected mice (figure 4c and 4d). This improvement is correlated to a decrease of neutrophil recruitment in the lungs (figure 5a and 5b) and IL1- β levels during infection (figure 5c). Altogether, these results demonstrated a beneficial role of IFN- λ 2 administration during *P. aeruginosa* pneumonia by dampening lung inflammation and enhancement of alveolar space in mice.

Discussion

In this study, we showed that IL-22 administration increases the expression of IFN- λ by AECs upon infection and demonstrated the protective functions of IL-28A in a mouse model of *P. aeruginosa* pneumonia.

Only epithelial cells can respond to IL-22 due to IL-22RA1 restriction of expression. In this study we demonstrated for the first time that among AECs which are known to express IL-22RA1 chain in the lungs, type-II AEC (ATII) and not type-I AECs in the lungs of mice are the only responsive cells to IL-22 stimulus. IL-22 stimulation modulates host immunity by increasing the production of AMPs and dampening host damages. In this study, we confirm our previous findings that IL-22 decrease the production of neutrophil-chemoattractant IL-8 in vitro, correlated with a decrease of neutrophil recruitment on the site of infection [21].

Our results clearly demonstrated a beneficial role of intra-tracheal IFN- λ 2 administration during a PA pneumonia infection model by dampening neutrophil recruitment. This is consistent with previous studies showing similar effect of IFN- λ in allergic asthma [27] and collagen-induced arthritis [28] models. Blazek et al showed anti-inflammatory effect of IFN- λ 1 by reducing the recruitment of IL-1 β expressing neutrophils. We previously showed that epithelium protection mediated by IL-22 in the lungs is correlated to a diminution of neutrophil recruitment [21]. During PA challenge, Cohen et al showed a transient expression of IFN- λ in the lungs of infected mice [20]. Interestingly, Hernández et al. described a beneficial and synergistic effect of IL-22 and IFN- λ administration in a mouse rotavirus infection model. In their study, IL-22 protection was dependent on IFN- λ expression, and combined IL-22 and IFN- λ administration act to enhance expression of Interferon-stimulated genes (ISGs) and protect epithelial cells against viral replication [29]. In the present, we show that without IL-22 treatment, AEC are unable to produce IFN- λ suggesting a synergistic action of both IL-22 and IFN- λ 2 during PA pneumonia challenge as observed by Hernandez et al during rotavirus infection [29]. Altogether, these data allow us to hypothesize that during PA challenge, IL-22 and IFN- λ act synergistically to dampen neutrophil recruitment and IL-1- β production and so, protect the lungs from

an excessive host response. Exact contribution of IFN- λ during bacterial pneumonia remains unclear as cells producing this cytokine are still in debate. In one hand, AEC [30], macrophages [31] and neutrophils [28] have been found to be responsive to IFN- λ . In the other hand, AECs and monodendritic cells have been described as source of IFN- λ in vitro [15].

Last, PA is able to degrade IL-22 through a type-IV protease process [32]. Interfering with IL-22 signaling, PA may counteract the synergy of action existing between IL-22 and IFN- λ during pulmonary host response ultimately leading to an increase of lung damages.

Acknowledgements

We thank the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for assistance in histological sample preparation and analysis. We thank the Cytometry Core (CytoCell) for the technical assistance.

Legends of figures:

Figure 1: IL-22 signaling is not altered during PAO1 infection

[a] IL-22RA1 expression on single lived cells in the lungs by flow cytometry. ATI: Type-I Alveolar epithelial cells gated as CD45^{neg} CD31^{neg} Ep-Cam^{pos} T1- α ^{pos}. ATII: Type-II Alveolar epithelial cells gated as CD45^{neg} CD31^{neg} Ep-Cam^{pos} T1- α ^{neg}. Non AECs gated as CD45^{neg} CD31^{neg} Ep-Cam^{neg}. Black line: IL-22RA1 Ab. Dashed line: isotype control Ab. [b] IL-22RA1 mRNA expression by real-time PCR from PAO1-infected A549 cells treated or not with IL-22. Boxes represent median (interquartile range). [c] Western blot of phospho-Stat-3 expression from non-infected and PAO1-infected A549 cells treated or not with IL-22. [d] Optical density (OD) ratio of pStat-3/ β -actin ratio from non-infected and infected A549 cells treated with IL-22. Boxes represent median (interquartile range). Data are representative of two independent experiments. n.s.: not significant.

Figure 2: IL-22 incubation modulates cell response to infection

Reg1- α [a] and β -defensin-2 [b] mRNA expression by real-time PCR from 2h PAO1-infected A549 cells treated or not with IL-22. Boxes represent median (interquartile range). [c] Bacterial load in supernatant from 24h PAO1-infected A549 cells treated or not with IL-22. Boxes represent median (interquartile range). Dashed bar: detection threshold [d] IL-8 mRNA relative expression from 2h PAO1-infected A549 cells treated or not with IL-22 (left panel) and IL-8 protein levels by ELISA from 24h PAO1-infected A549 cells treated or not with IL-22 (right panel. sensitivity limit: 2pg/mL). Boxes represent median (interquartile range). Data are representative of two independent experiments. *: p<0.05 **: p<0.001.

Figure 3: IL-22 enhanced IFN- λ expression in PAO1 infected cells

[a-c] IFN- λ 1, IFN- λ 2 and IFN- λ 3 mRNA relative expression from 2h PAO1-infected A549 cells treated or not with IL-22. Boxes represent median (interquartile range). [d] IFN- λ 2 protein levels from 24h PAO1-infected A549 cells treated or not with IL-22 (dashed line: sensitivity limit 15,6pg/mL). Boxes represent median (interquartile range). n.d. : not detected. Data are representatives of two independent experiments. .*: p<0.05 **: p<0.001.

Figure 4: In vivo IFN- λ 2 administration improves mice outcome.

[a] Daily body weight evaluation of infected mice vehicle- or IFN- λ 2-treated. [b] Mouse clinical score of 24h-infected mice vehicle- or IFN- λ 2-treated. Boxes represent median (interquartile range). [c] Lung histological analysis from PAO1 infected mice 24h vehicle-treated (upper panel) or IFN- λ 2-treated (lower panel). Magnification x40. Bar = 25 μ m. [d] Alveolar space quantification by SIOX analysis of histology slides presented in c (3 mice per group. 4 fields per slide). Boxes represent median (interquartile range). Data are representative of two independent experiments (a-b: n=5 per group. c-d: n=3 per group).

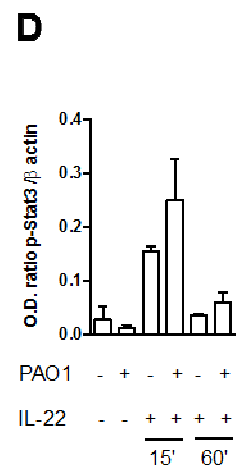
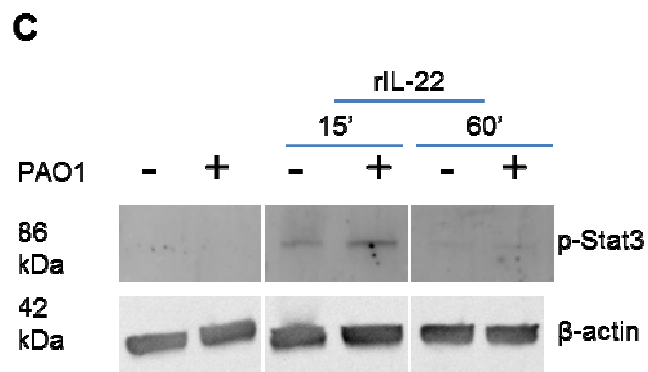
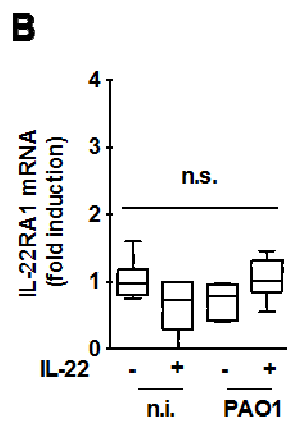
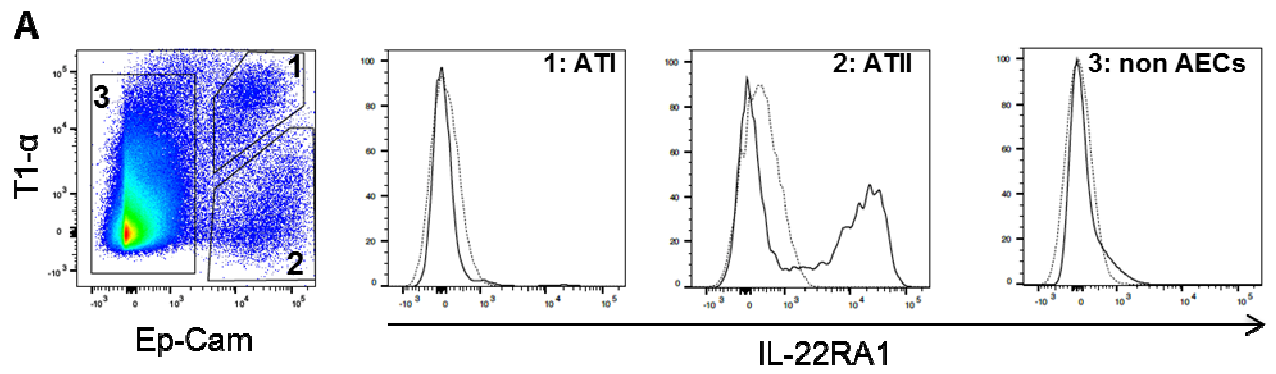
Figure 5: In vivo IFN- λ administration dampens neutrophil recruitment during infection.

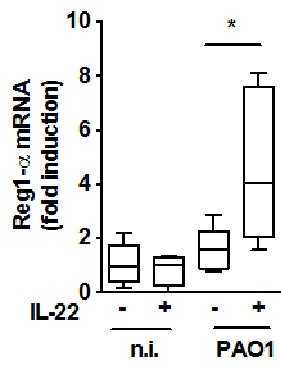
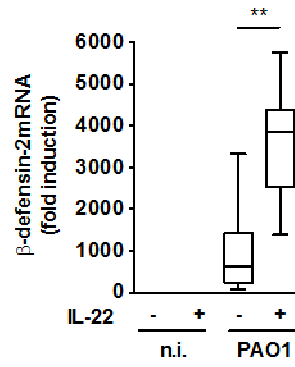
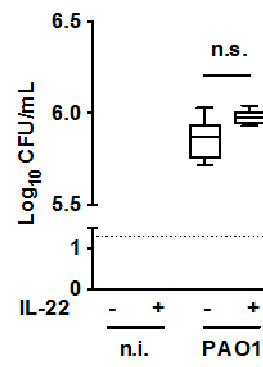
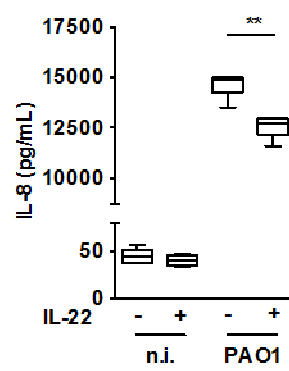
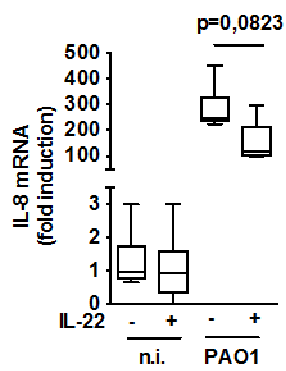
[a] Ly6-G IHC of lung section from 24h-infected PAO1 mice vehicle-treated (upperpanel) or IFN- λ 2-treated (lower panel). Magnification x40. Bar = 25 μ m. [b] Quantification of Ly6-G positive pixels surface area by SIOX analysis of the slides presented in a. (3 mice per group. 4 fields per slide). Boxes represent median (interquartile range). [c] IL-1 β concentration assessment by ELISA in lung homogenates of 24h infected mice vehicle-treated or IFN- λ 2-treated (sensitivity limit: 0,1pg/mg of proteins). Boxes represent median (interquartile range). Data are representative of two independent experiments (a-b: n=3 per group, c: n=5 per group). .*: p<0.05 **: p<0.001.

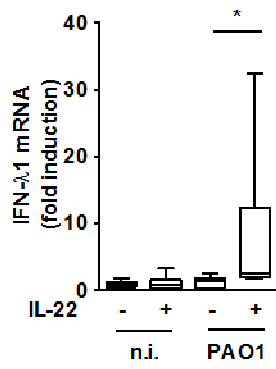
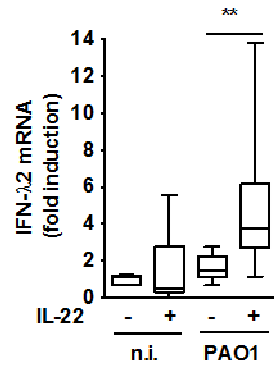
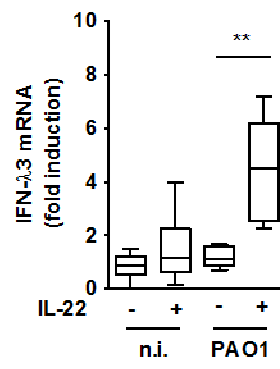
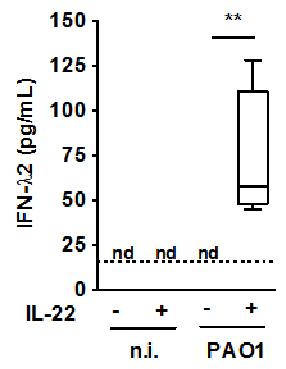
1. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin.Microbiol.Rev.* 2002; 15: 194–222.
2. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir.Res.* 2001; 2: 33–46.
3. Thorley AJ, Grandolfo D, Lim E, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung--role of alveolar epithelial TLR expression and signalling. *PLoS ONE* Public Library of Science; 2011; 6: e21827.
4. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J. Immunol.* American Association of Immunologists; 2002; 168: 5397–5402.
5. Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K. 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.* 2010; 21: 365–379.
6. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *Int. Immunol.* 2011; 23: 159–163.
7. Martin JC, Wolk K, Bériou G, Abidi A, Witte-Händel E, Louvet C, Kokolakis G, Drujont L, Dumoutier L, Renaud J-C, Sabat R, Josien R. Limited Presence of IL-22 Binding Protein, a Natural IL-22 Inhibitor, Strengthens Psoriatic Skin Inflammation. *J. Immunol.* American Association of Immunologists; 2017; 198: 3671–3678.
8. Sabat R, Ouyang W, Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22–IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 13: 21–38.
9. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* Nature Publishing Group; 2007; 445: 648–651.
10. Eidenschenk C, Rutz S, Liesenfeld O, Ouyang W. Role of IL-22 in microbial host defense. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014; 380: 213–236.
11. Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke W-D, Kunz S, Asadullah K, Volk H-D, Sterry W, Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* Wiley-Blackwell; 2006; 36: 1309–1323.

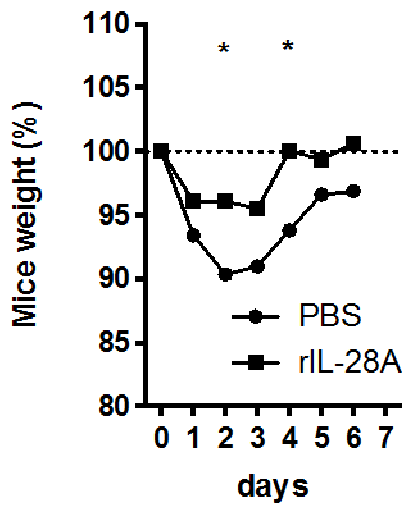
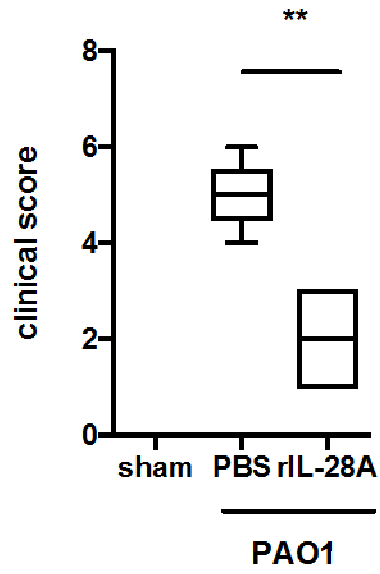
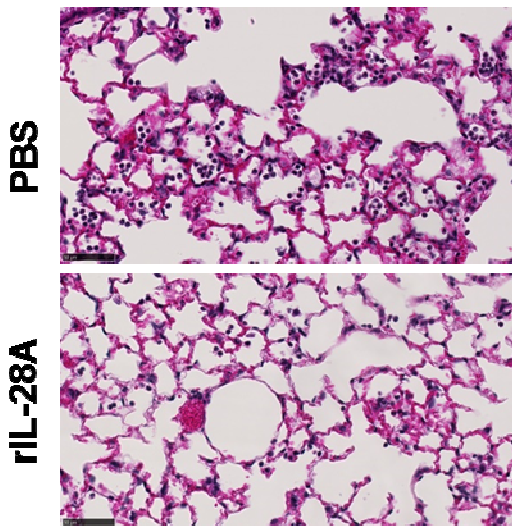
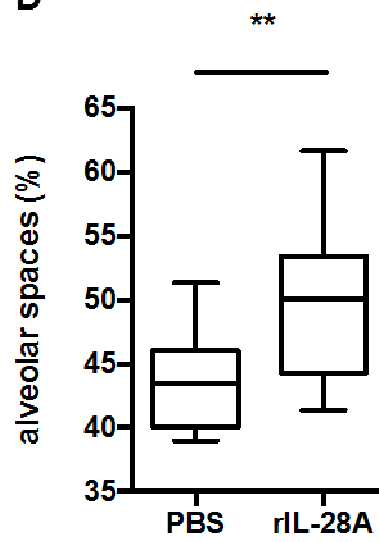
12. Trevejo-Nunez G, Elsegeiny W, Conboy P, Chen K, Kolls JK. Critical Role of IL-22/IL22-RA1 Signaling in Pneumococcal Pneumonia. *J. Immunol.* 2016.
13. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler JL, Dubin PJ, Pilewski JM, Myerburg MM, Mason CA, Iwakura Y, Kolls JK. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine* Nature Publishing Group; 2008; 14: 275–281.
14. Syedbasha M, Egli A. Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Front Immunol* 2017; 8: 119.
15. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 2003; 4: 69–77.
16. Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon Cytokine Res.* 2010; 30: 555–564.
17. Lazear HM, Nice TJ, Diamond MS. Interferon- λ : Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. *Immunity* 2015; 43: 15–28.
18. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group; 2003; 4: 63–68.
19. Odendall C, Voak AA, Kagan JC. Type III IFNs Are Commonly Induced by Bacteria-Sensing TLRs and Reinforce Epithelial Barriers during Infection. *J. Immunol.* 2017; 199: 3270–3279.
20. Cohen TS, Prince AS. Bacterial pathogens activate a common inflammatory pathway through IFN λ regulation of PDCD4. Cheung A, editor. *PLoS Pathog.* 2013; 9: e1003682.
21. Broquet A, Jacqueline C, Davieau M, Besbes A, Roquilly A, Martin J, Caillon J, Dumoutier L, Renauld J-C, Heslan M, Josien R, Asehnoune K. Interleukin-22 level is negatively correlated with neutrophil recruitment in the lungs in a *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model. *Sci Rep* Nature Publishing Group; 2017; 7: 11010.
22. Broquet A, Roquilly A, Jacqueline C, Potel G. Depletion of natural killer cells increases mice susceptibility in a *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model. *Critical care ...* 2014.

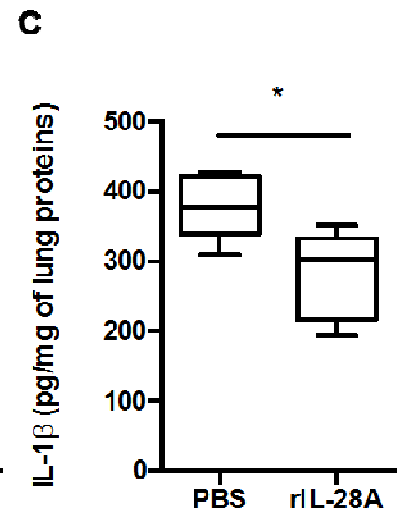
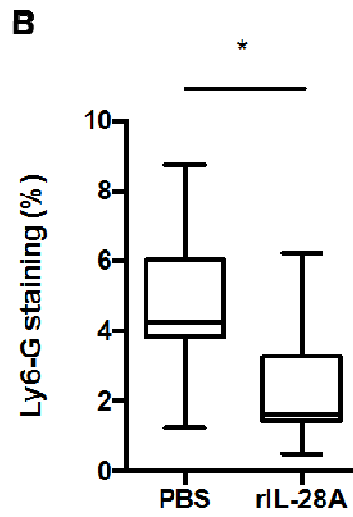
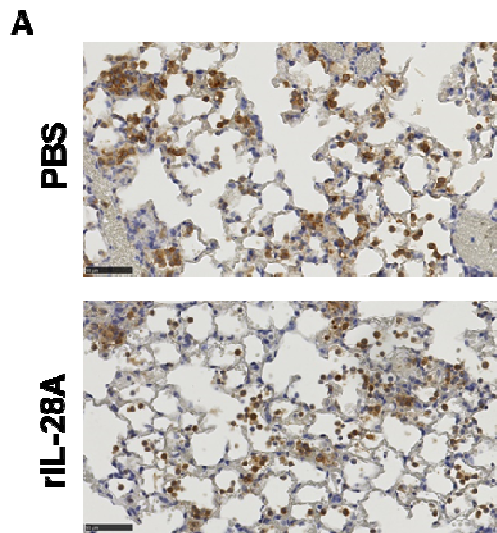
23. Whittington HA, Armstrong L, Uppington KM, Millar AB. Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society; 2004; 31: 220–226.
24. Li A, Gan Y, Wang R, Liu Y, Ma T, Huang M, Cui X. IL-22 Up-Regulates β -Defensin-2 Expression in Human Alveolar Epithelium via STAT3 but Not NF- κ B Signaling Pathway. *Inflammation* Springer US; 2015; 38: 1191–1200.
25. Moyat M, Bouzourene H, Ouyang W, Iovanna J, Renauld JC, Velin D. IL-22-induced antimicrobial peptides are key determinants of mucosal vaccine-induced protection against *H. pylori* in mice. *Mucosal Immunol* Nature Publishing Group; 2017; 10: 271–281.
26. Xue M, Zhao J, Ying L, Fu F, Li L, Ma Y, Shi H, Zhang J, Feng L, Liu P. IL-22 suppresses the infection of porcine enteric coronaviruses and rotavirus by activating STAT3 signal pathway. *Antiviral Res.* 2017; 142: 68–75.
27. Yan B, Chen F, Xu L, Wang Y, Wang X. Interleukin-28B dampens airway inflammation through up-regulation of natural killer cell-derived IFN- γ . *Sci Rep* 2017; 7: 3556.
28. Blazek K, Eames HL, Weiss M, Byrne AJ, Perocheau D, Pease JE, Doyle S, McCann F, Williams RO, Udalova IA. IFN- λ resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1 β production. *J. Exp. Med.* 2015; 212: 845–853.
29. Hernández PP, Mahlaköiv T, Yang I, Schwierzeck V, Nguyen N, Guendel F, Gronke K, Ryffel B, Hölscher C, Dumoutier L, Renauld J-C, Suerbaum S, Staeheli P, Diefenbach A. Interferon- λ and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nat. Immunol.* 2015; 16: 698–707.
30. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. Buchmeier MJ, editor. *PLoS Pathog.* 2008; 4: e1000017.
31. Wolk K, Witte K, Witte E, Proesch S, Schulze-Tanzil G, Nasilowska K, Thilo J, Asadullah K, Sterry W, Volk H-D, Sabat R. Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J Leukoc Biol* Wiley-Blackwell; 2008; 83: 1181–1193.
32. Guillon A, Brea D, Morello E, Tang A, Jouan Y, Ramphal R, Korkmaz B, Perez-Cruz M, Trottein F, O'Callaghan RJ, Gosset P, Si-Tahar M. *Pseudomonas aeruginosa* proteolytically alters the interleukin 22-dependent lung mucosal defense. *Virulence* 2016; 8: 1–11.



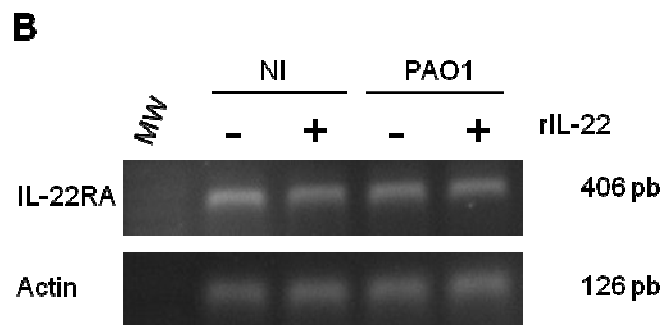
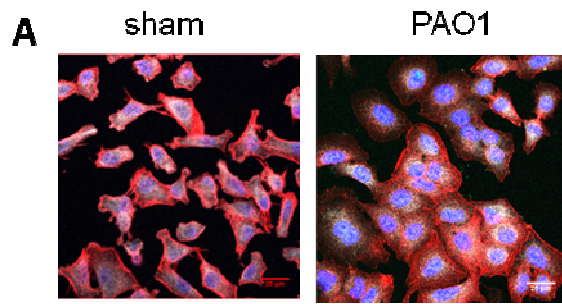
A**B****C****D**

A**B****C****D**

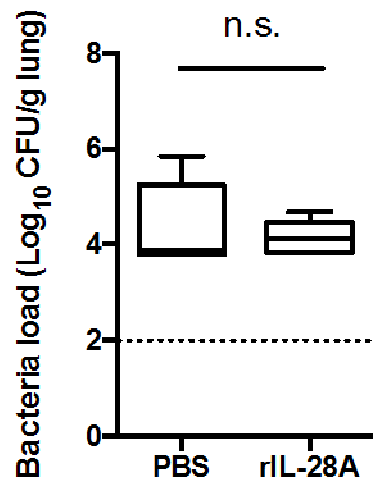
A**B****C****D**



Suppl figure 1



Suppl figure 2



Objectif n°2 :

Objectif n°2 : Etude des mécanismes d'échappement de *P. aeruginosa* dans un modèle de granulome *in vitro*

Les infections chroniques à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose augmentent considérablement les risques de morbi-mortalité. En plus d'une prédisposition aux infections de ces patients, l'échappement immunitaire du *P. aeruginosa* lui confère un avantage dans la colonisation et l'évolution des infections chroniques. Afin d'étudier les mécanismes d'échappement immunitaire de *P. aeruginosa*, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe UMR_S 1232 du Dr. Frédéric Altare, pour mettre au point et utiliser un modèle de granulome à *P. aeruginosa in vitro*.

Les formations granulomateuses sont spécifiques des infections pulmonaires à *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Le granulome est une structure organisée qui consiste en un recrutement de cellules immunitaires hautement différenciées autour des macrophages infectés [100]. La fonction principale du granulome consiste à contenir l'infection. L'infection est initiée par l'inhalation et l'entrée des pathogènes au niveau des voies respiratoires, une fois dans les alvéoles, ces bactéries sont prises en charges par les cellules phagocytaires telles que les macrophages résidents, les cellules dendritiques et les monocytes. Si cette première ligne de défense est défaillante, *M.tuberculosis* parvient alors à se propager dans le parenchyme pulmonaire soit en lisant les cellules épithéliales alvéolaires soit en étant transportées par les macrophages infectées. Parallèlement, certains monocytes et DC activés migrent vers les ganglions lymphatiques pulmonaires pour y activer les lymphocytes T et amorcer la réponse adaptative. C'est alors qu'une structure immunitaire (composée de LT, LB, cellules NK, macrophages, monocytes et cellules dendritiques) s'organise autour des macrophages infectés donnant naissance au granulome (Figure 30) [101].

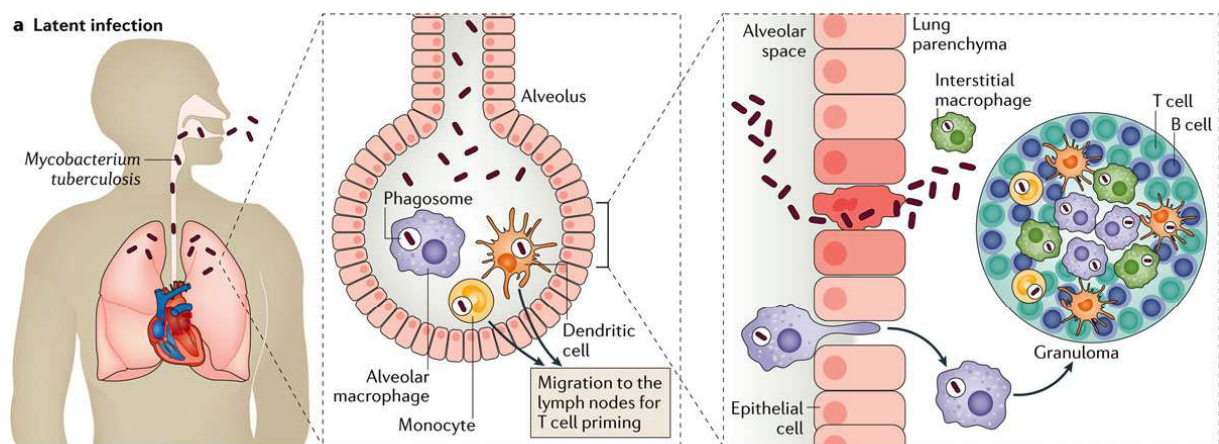


Figure 30: Infection à *M.tuberculosis* et formation granulomateuse

(Issue de Pai M et al. Nat RevDis Primers.2016 Oct 27;2:16076.)

L'équipe du Dr. Altare a développé un outil permettant la formation de granulome *in vitro* lors de l'infection à *M. tuberculosis* afin de pouvoir étudier les différentes étapes de l'organisation de ce dernier. Ce modèle a été transposé avec succès à d'autres modèles tels que l'infection à *Candida albicans* (*C.albicans*) [102]. Le modèle de granulome à *M. tuberculosis* a également été utilisé pour étudier les altérations immunitaires après un traumatisme crânien [103]. Nous avons donc voulu utiliser ce modèle afin d'étudier l'impact de *P. aeruginosa* sur la formation du granulome *in vitro* comme indicateur de l'échappement immunitaire procuré par *P. aeruginosa*.

Questions formulées lors de cette étude :

- 1) Est-il possible d'induire la formation du granulome au cours d'une infection à *P. aeruginosa* ?
- 2) Les granulomes obtenus sont-ils identiques à ceux obtenus avec *M. tuberculosis* et quelle est la nature cellulaire de l'échappement immunitaire procuré par *P. aeruginosa* ?

I. Matériels et méthodes de l'objectif n°2 :

1. Echantillons de sang et isolation des PBMC :

Les échantillons de sang humain ont été collectés à l'établissement français du sang (EFS) de Nantes. Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées du sang par centrifugation différentielle sur un gradient de Ficoll.

Les PBMC ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Invitrogen) supplémenté avec 10% de SVF (Invitrogen), 1% de L-Glutamine (Invitrogen), 1% d'herpes buffer (Invitrogen) et 1% d'acides aminés non essentiels (Invitrogen). Pour les monocytes et les cellules dendritiques le milieu utilisé est du RPMI complet, RPMI-1640 (Invitrogen) complémenté avec 10% de SVF (Invitrogen), 1% L-Glutamine (Invitrogen) et 1 % Pénicilline/Streptomycine (Invitrogen).

2. Formation de granulomes *in vitro* :

Les souches de Bacille de Calmette et Guérin (BCG) ont été cultivées en milieu liquide Middelbrook7H9(BD) puis conservées en cryotubes à -80°C. Après décongélation une sonication de 180s a été réalisée.

Les PBMC ont été infectés avec une MOI de 10^2 bactéries pour 10^6 cellules pour les granulomes à *P. aeruginosa*, et à un ratio de 1 bactérie pour 150 PBMC pour les granulomes à BCG. Après 1h d'incubation à 37°C sous agitation à 80 rpm, les cellules ont été lavées pour retirer les bactéries extracellulaires non phagocytées. Les PBMC infectés ont été mis en plaque 24 puits (10^6 cellules/mL) et maintenus à 37°C sous 5% CO₂ pendant 7 jours. La formation des granulomes a été suivie tous les jours par microscopie, les granulomes matures obtenus après 7 jours d'incubation ont été collectés afin d'analyser leur composition lymphocytaire.

3. Suivre de la prolifération lymphocytaire:

Afin de suivre la prolifération lymphocytaire au sein d'un granulome, un marquage des PBMC au Violet Proliferation Dye 450(VPD) (BD Pharmingen) a été réalisé au préalable. Ce colorant diffuse passivement à travers la membrane des cellules vivantes pour se répartir uniformément entre les cellules filles lors de la division cellulaire, permettant ainsi le suivi de la prolifération cellulaire par diminution de la fluorescence. Les PBMC ont été mis en culture à une concentration de 10^6 cellules/mL et le VPD a été ajouté à une concentration finale de 1μM et incubés à 37°C pendant 15 min. Après deux lavages au PBS les cellules ont été resuspendues dans du milieu RPMI complet puis mises en plaque pour la formation des granulomes *in vitro*.

4. Analyse des granulomes par microscopie à haut débit :

Pour l'analyse des granulomes par microscopie à haut débit, le protocole a été identique à celui précédemment décrit, sauf que l'infection a été réalisée avec une souche bactérienne fluorescente (PAO1-GFP). Après l'infection les PBMC ont été déposés en plaque 384 puits à raison de 40 000 cellules/puits et incubés à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 7 jours. Les cellules des granulomes ont été fixées avec de la PFA 4% (Sigma) pendant 30 min, lavées au PBS puis colorées 30 min à l'Hoechst (Sigma). Après lavages au PBS, les puits ont été observés au microscope à haut débit : Cell Insight Arrayscan (Thermo Fisher Scientific). L'acquisition des images de microscopie se fait comme décrit par Silva-Miranda et al, chaque champ est représenté par deux images : le noyau des cellules en bleu et les bactéries en vert. L'analyse des images a été réalisée à l'aide du logiciel interne du microscope : Cellomics Arrayscan Compartmental Analysis (v.3), qui est paramétré pour prendre en compte les granulomes d'indice allant de 2 à 4 comme décrit par Deknuydt F et al.[103].

5. Tri et activation des monocytes :

Les monocytes ont été triés selon le marqueur cellulaire de surface CD14 qui les caractérise. Le tri a été réalisé sur colonne à partir des PBMC, il s'agit d'un trie positif réalisé avec les billes CD14 (MicroBeads Human CD14 QuadroMACS™, MiltenyiBiotech).

Les monocytes fraîchement triés ont été repris dans du milieu RPMI complet à une concentration de 10⁶ monocytes/mL. Les monocytes ont été infectés selon le même modèle que le granulome. Au bout de 24h ou 48h d'incubation à 5% de CO₂ à 37°C, les surnageants cellulaires ont été récupérés pour les dosages en ELISA alors que les cellules ont été décollées à l'aide de la trypsine EDTA (Invitrogen) puis lavées et resuspendues dans du PBS 0.1%BSA (Sigma) pour les analyses en cytométrie.

6. Différentiation des monocytes en cellules dendritiques immatures (iDC) et maturation des iDC en cellules dendritiques matures (mDC):

Les monocytes fraîchement triés ont été repris dans du milieu RPMI complet à une concentration de 10⁶ monocytes/mL. Les monocytes ont été infectés selon le même modèle que le granulome. Deux facteurs indispensables à la différenciation des monocytes en iDC et à la croissance des granulocytes et des macrophages respectivement : 300U/mL d'IL-4 (Cellgenix) et 1000U/mL de GM-CSF (Cellgenix) ont été ajoutés au milieu. Les cellules ont été incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 5 jours, avant d'être récupérées pour les analyses cytométriques.

Au bout de 5 ou 6 jours de différenciation des monocytes, les iDC ont été récupérées (cellules non adhérentes) et mises à une concentration de 10⁶iDC/mL de milieu complet. Les iDC ont été infectées suivant le même protocole que le modèle de granulome. 100ng/mL de LPS (Sigma) facteur de

maturation des iDC en mDC a été ajouté. Après 48h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, les surnageants cellulaires ont été récupérés et conservés à -20°C (pour les dosages en ELISA) alors que les mDC (cellules adhérentes) ont été récupérées à l'aide de la trypsine-EDTA (Invitrogen) puis lavées au PBS 0.1% BSA pour les analyses cytométriques.

7. Immunofluorescence : Marquage cellulaire pour l'analyse en cytométrie en flux:

Cocktail d'anticorps pour le marquage lymphocytaire constitué de: CD3-PerCP (1/20), CD4-FITC (1/20), CD8-APC (1/20), $\gamma\delta$ -PE (1/20), NK-PC7 (1/100) (IgG1-APc et IgG1-PC7 isotype contrôle humain)

Cocktail d'anticorps pour le marquage des CPA: CD14-APC (1/100), CD86-FITC (1/20), IgG1-FITC (1/20), CD80-PE (1/20), PD-L1-PE (1/20), PD-L-2PE (1/20), IgG1-PE (1/20), HLA-DR-APC (1/20), IgG2a-APC (1/20), CD83-BV (1/100) et IgG1-BV (1/100).

Les cellules ainsi marquées ont été analysées par cytométrie en flux (LSR II), les data ont été analysées avec le logiciel FlowJo.

8. Analyses statistiques:

Les graphiques ainsi que les analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPadPrism 4, en utilisant le t-test non paramétrique Mann and Whitney test ou Kruskal-Wallis test. P<0.05 est considéré significatif.

II. Résultats objectif n°2 :

Title:

Enhanced PD-L1 expression in monocytes in a granuloma model induced by *P. aeruginosa*.

Grace Ada Da Silva (1), Anissa Besbes (2), Alexis Broquet (2), Frédéric Altare (1), Karim Asehnoune[§] (2, 3)

Affiliations

- (1) UMR_S 1232 CRCINA, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France.
- (2) Laboratoire UPRES EA3826 « Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections », IRS2 – Nantes Biotech, Université de Nantes, Nantes, France
- (3) CHU Nantes, Pôle anesthésie réanimations, Service d'anesthésie réanimation chirurgicale, Hôtel Dieu, Nantes, F-44093, France

§: corresponding author: Karim Asehnoune, MD, PhD. Laboratoire EA3826. IRS2 – Nantes Biotech. 22 Bd Benoni Goullin 44200 Nantes, France. karim.asehnoune@univ-nantes.fr - +33 (0)2 40 08 30 05.

Manuscrit en préparation

Questions formulées lors de cette étude :

- 1) Est-il possible d'induire la formation du granulome au cours d'une infection à *P. aeruginosa* ?
- 2) Les granulomes obtenus sont-ils identiques à ceux obtenus avec *M. tuberculosis* et quelle est la nature cellulaire de l'échappement immunitaire procuré par *P. aeruginosa* ?

1) a) Nous avons tout d'abord testé la formation du granulome avec la souche de laboratoire PAO1. A la même MOI que BCG, PAO1 prolifère trop rapidement et les puits sont envahis de bactéries rendant la formation du granulome impossible. Nous avons testé différentes MOI plus faibles et c'est à 1 bactérie pour 10^6 PBMC que nous observons des granulomes bien définis. L'infection des PBMCs avec *P. aeruginosa* induit bien une réponse granulomateuse. En effet dès le premier jour de l'infection, on observe la formation d'un agrégat cellulaire, cette formation devient de plus en plus compact et s'organise en plusieurs couches dès le 5^{ème} jour et c'est au bout du 7^{ème} jour que nous observons des granulomes sphériques (Figure 31A). La présence de la bactérie au sein des granulomes à *P. aeruginosa* est confirmée par microscopie à haut débit (Figure 31B), validant ainsi notre modèle.

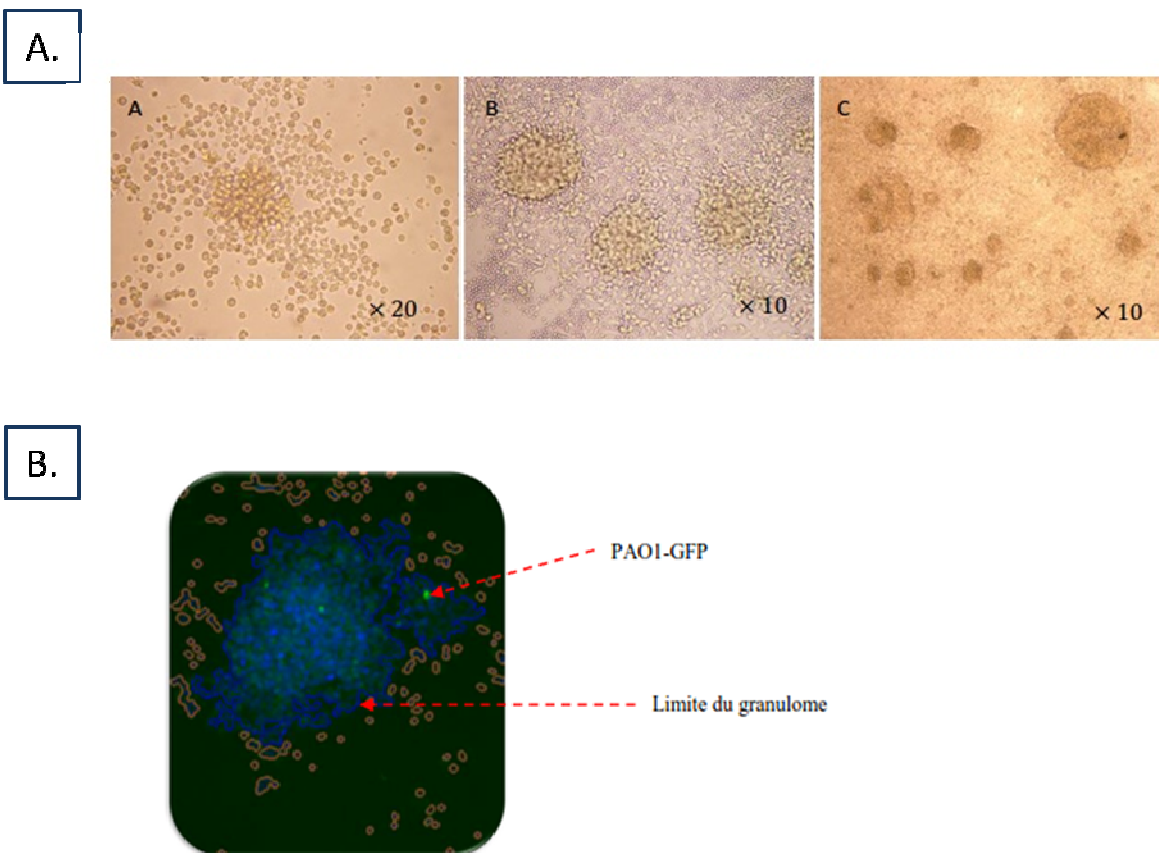


Figure 31: Granulome à *Pseudomonas aeruginosa*

Les PBMCs humains ont été infectés à PAO1 et les formations granulomateuses ont été observées [A] Images de granulomes à J1(A), J5 (B) et J7 (C) post-infection. [B] Automated Cell Insight Thermo Array Scan image prise 5 jours post-infection, orange: cellules isolées, vert : PAO1-GFP et en bleu: contour du granulome.

2) a) Afin d'analyser la composition cellulaire des granulomes nous avons dans un premier temps regardé le phénotype des populations lymphocytaires recrutées au tour des monocytes formant le cœur du granulome. Nous avons donc regardé les lymphocytes T CD4, CD8, les lymphocytes double positif $\delta\alpha$ (L T DP $\delta\alpha$), les lymphocytes gamma delta (L T $\gamma\delta$) ainsi que les cellules NK, puisque ces populations sont importantes dans la réponse immunitaire de l'hôte aussi bien pour la réponse innée (LT $\gamma\delta$ et NK) que pour la réponse adaptative (CD4 et CD8). La population de lymphocytes DP $\delta\alpha$ a récemment été décrite comme étant capable d'inhiber la maturation des cellules dendritiques (autre médiateur important de l'immunité) ainsi que la prolifération des lymphocytes CD4 [104]. La composition lymphocytaire des granulomes à *P. aeruginosa* a été analysée à J7 post-infection. PAO1 ne modifie pas le recrutement des LT CD4, CD8, LT $\gamma\delta$ et NK au sein du granulome. De façon intéressante, nous avons noté une diminution de la fréquence des cellules T DP $\delta\alpha$ dans le granulome induit par *P. aeruginosa* (Figure 33D). Bien que le STIII soit connu pour induire l'apoptose des cellules cibles, une absence du SSTIII ne modifie pas la composition cellulaire du granulome.

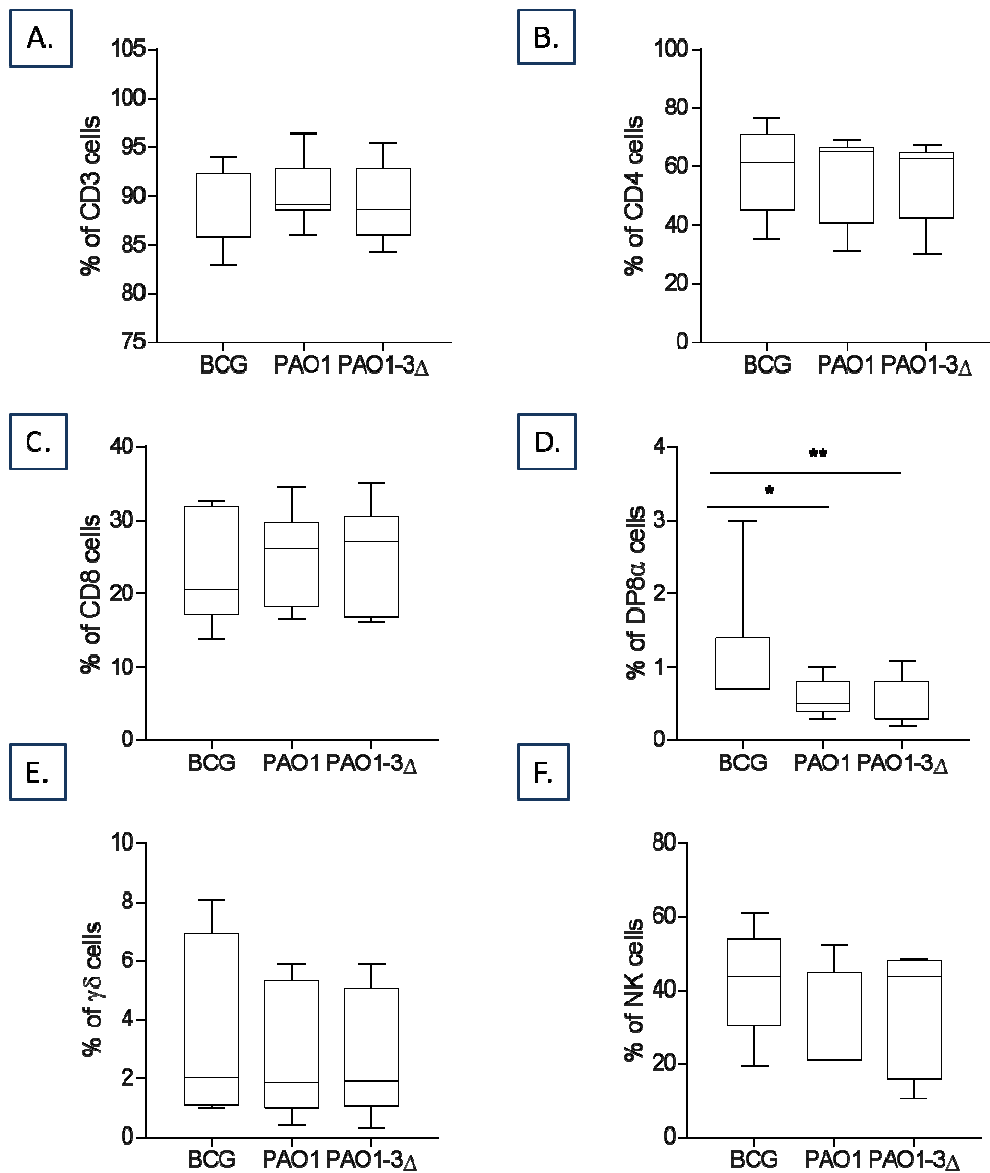


Figure 32: Composition lymphocytaire du granulome à *P. aeruginosa* et à BCG

Pourcentage des lymphocytes [A] CD3, [B] CD4, [C] CD8, [D] DP8α, [E] γδ, [F] NK, recrutés au sein des granulomes à BCG, à PAO1 ou à PAO1-3Δ chez les donneurs sains à J7 post-infection. (n=7). Friedman test *:p<0.05. **:p<0.001.

De façon à expliquer la baisse de fréquence des LT DP8 α , nous avons évalué leur prolifération spécifique au cours de l'infection à *P. aeruginosa*. Aucune différence significative n'a été observée dans la prolifération de ces cellules après infection par *P. aeruginosa* ou BCG suggérant un défaut de recrutement de ces cellules au cours de la formation du granulome plutôt qu'une survie altérée (Figure 33). De plus, une diminution de prolifération est observée dans ces cellules après infection par la souche déficiente en SSTIII suggérant un rôle de ce dernier dans l'activation de la prolifération des LT DP8 α .

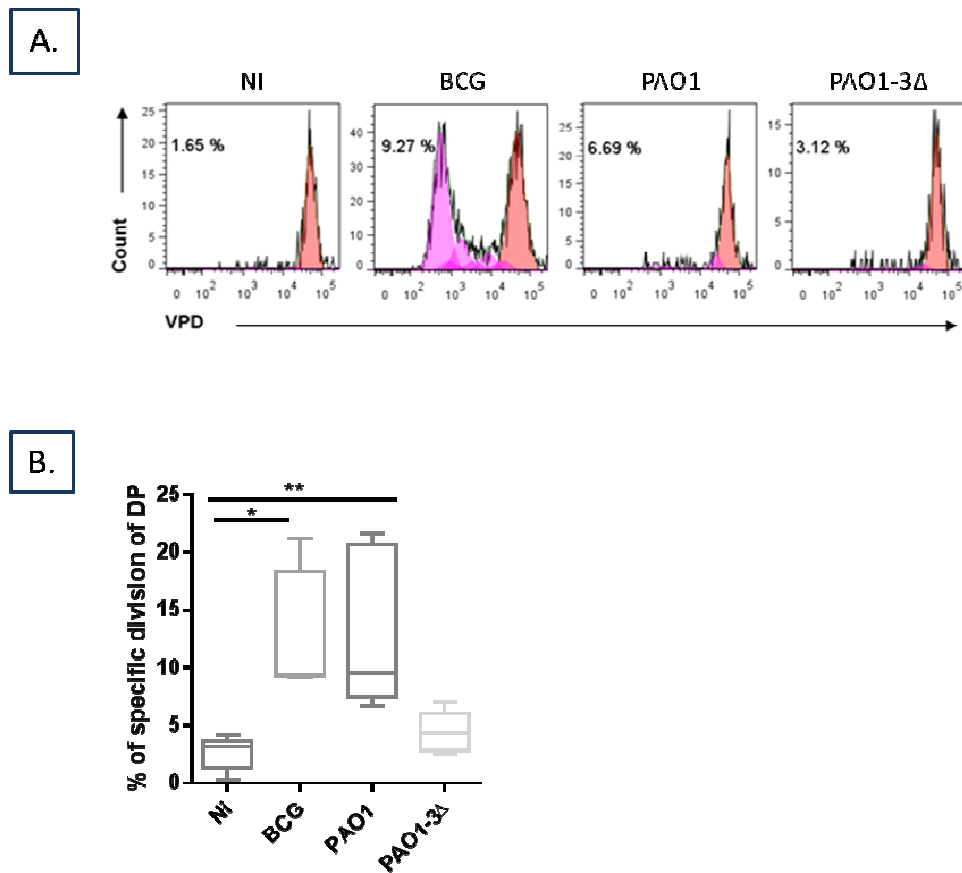


Figure 33: Prolifération spécifique des Lymphocytes T DP8 α

Pourcentage de division spécifique des Lymphocytes T DP8 α à J7 post-infection [A] Histogramme (division du signal VPD), [B] Pourcentage de division spécifique des LT DP8 α . Kruskal-Wallis test, *:p<0.05. **:p<0.001.

b) Les cellules présentatrices d'antigènes (APC), telles que les monocytes et les cellules dendritiques jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse adaptative et l'initiation de la formation granulomateuse. L'activation des monocytes a été analysée via l'expression des marqueurs d'activation CD80 et CD86 (molécules de co-stimulation), HLA-DR protéines de présentation antigénique et PD-L1 qui est un marqueur d'activation mais également un inducteur d'apoptose. L'expression de la molécule de co-stimulation CD80 par les monocytes est significativement induite 24h post-infection avec PAO1 (Figure 34B), mais pas avec le mutant SSTIII (PAO1-3Δ est muté pour les exoenzymes sécrétées par le système de sécrétion de type III). Par contre une augmentation significative de l'expression de PD-L1 est observée 24h post-infection en comparaison avec les monocytes non infectés (Figure 34 D). De plus le ratio PD-L1/CD80 et PD-L1/CD86 est augmenté en faveur de l'expression de PDL-L1 (Figure 34 G et 34H). L'expression de ces récepteurs membranaires semble indiquer une altération de la fonction des monocytes suite à l'infection à *P. aeruginosa*. En effet, cette infection empêche la surexpression d'une des molécules de co-stimulation CD86 ainsi que les molécules de présentation antigénique HLA-DR. L'augmentation de l'expression du marqueur PD-L1, pourrait suggérer un mécanisme d'inhibition mettant en jeu l'apoptose cellulaire, d'autant plus qu'il semblerait que le SSTIII soit impliqué dans cette altération. L'augmentation de PD-L1 est un mécanisme mis en place par *P. aeruginosa* pour empêcher l'activation et la prolifération lymphocytaire. Ce mécanisme de subversion favorise la tolérance immunitaire.

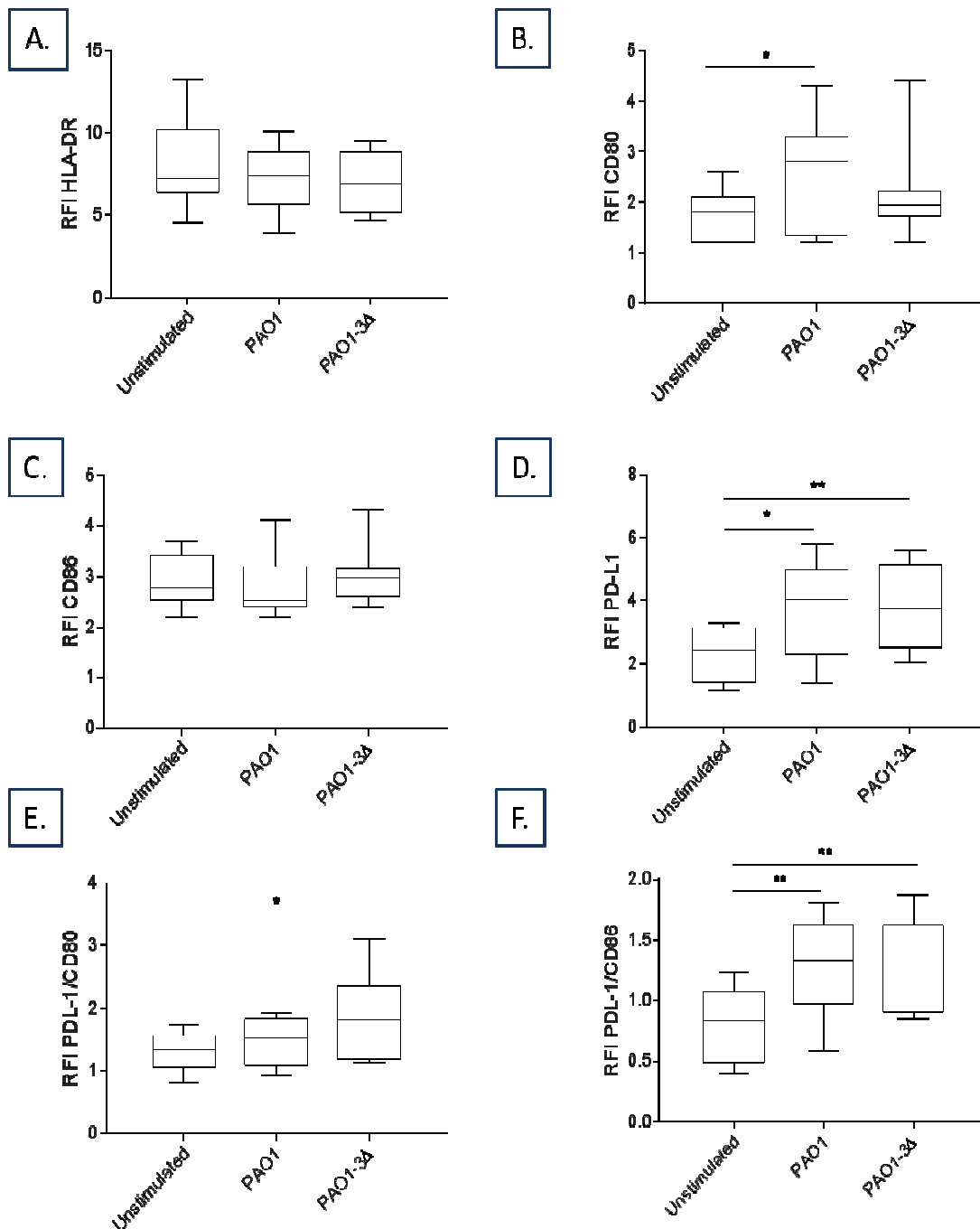


Figure 34: Activation des monocytes suite à l'infection à *P. aeruginosa*

RFI de l'expression des récepteurs de surface [A] HLA-DR, [B] CD80, [C]CD86, [D] PD-L1 et le ratio [E] PD-L1/CD80 et [F]PD-L1/CD86, 24h post-infection des monocytes. Friedman test (CD80 $p= 0,0289$, PD-L1 $p= 0.0012$) ($n=7$) (RFI : relative fluorescence intensity)*: $p<0.05$. ** $p<0.001$.

P. aeruginosa semble interférer avec l'activation des monocytes. Les cellules dendritiques dérivant des monocytes forment l'autre population de CPA dans le granulome. Afin d'analyser l'impact de l'infection à *P. aeruginosa* sur ces cellules, la différenciation des monocytes en iDC dites conventionnelles (iDCconv) a été induite par le traitement des monocytes avec du GM-CSF et à l'IL-4 pendant 5 jours. Les monocytes ont été infectés au préalable de la stimulation IL-4 et GM-CSF, puis l'expression des marqueurs CD80, CD86, CD83, HLA-DR et PD-L1 a été évaluée à J5 post-infection. *P. aeruginosa* n'interfère pas avec la différenciation des monocytes en iDCconv (Figure 35).

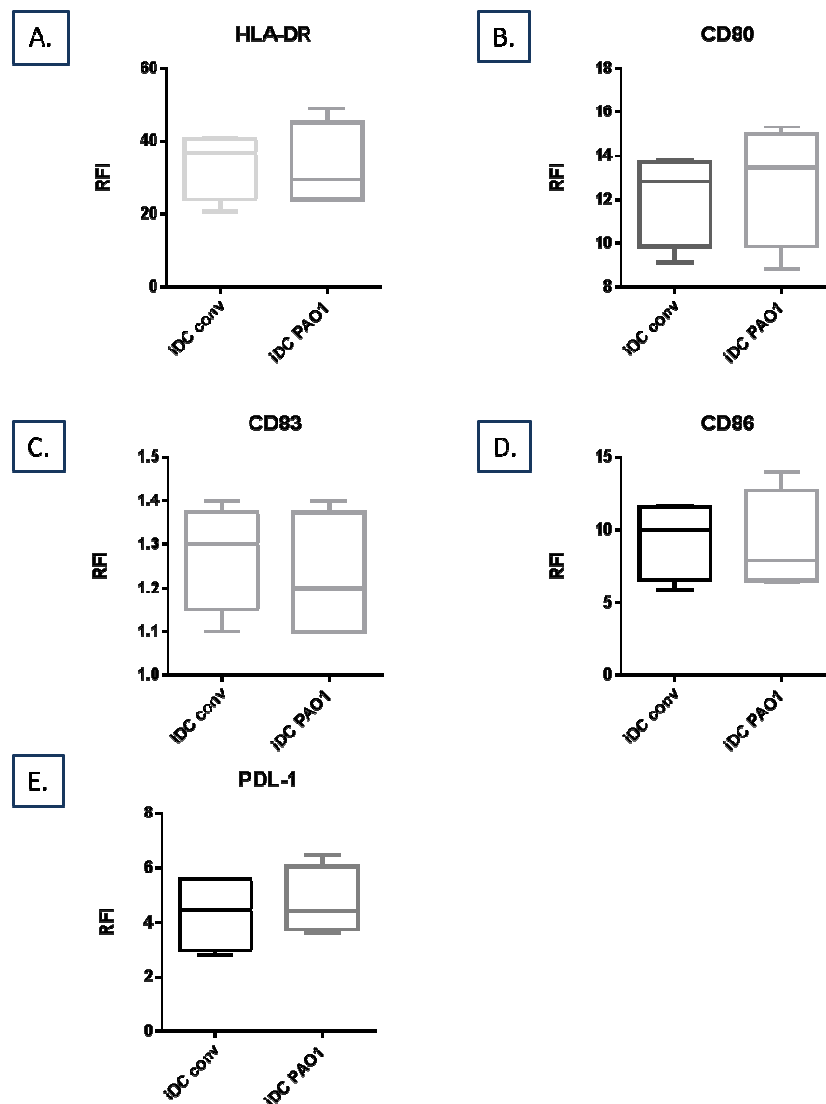


Figure 35: Différenciation des monocytes en iDC après infection à *P. aeruginosa*

RFI de l'expression des marqueurs de surface [A] HLA-DR, [B] CD 80, [C] CD 83, [D] CD 86 et [E] PD-L1 sur les cellules dendritiques immatures (iDC) à J5 après infection des monocytes par PAO1 et stimulation avec du GM-CSF et d'IL-4. iDCconv : témoin négatif non infecté.

Bien que *P. aeruginosa* n'interfère pas avec la différenciation des monocytes en iDCconv, il semble néanmoins empêcher la maturation correcte de ces cellules. En effet, PAO1 induit une diminution significative de l'expression de CD86 et de PD-L1 (Figure 36D et 36E), de même qu'une tendance à la baisse pour l'expression de PD-L2 (Figure 36 F). La signalisation PD-1/PD-L1 est donc modulée par *P. aeruginosa* aussi bien sur les monocytes que sur les cellules dendritiques.

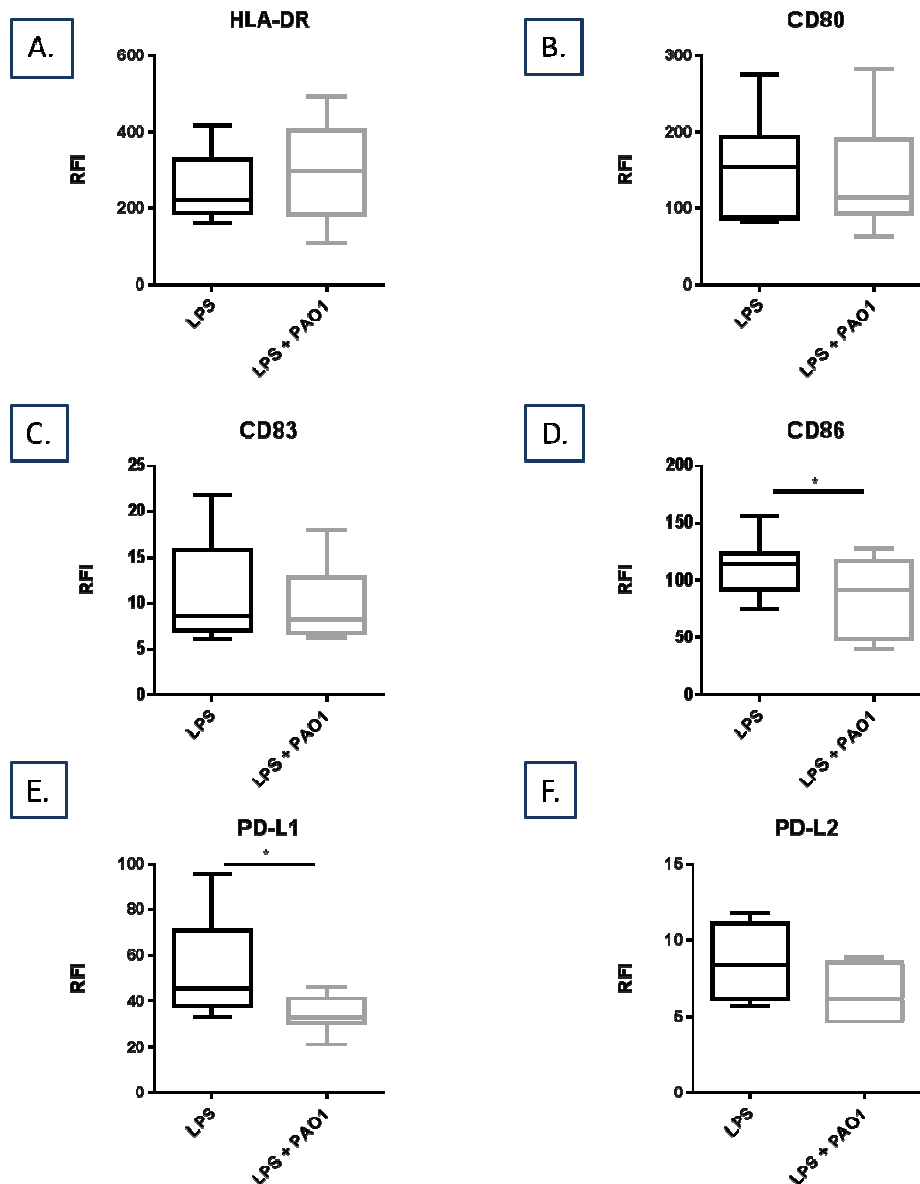


Figure 36: Effet de *P. aeruginosa* sur les cellules dendritiques

RFI de l'expression des marqueurs de surface [A] HLA-DR , [B] CD 80, [C] CD 83, [D] CD86,[E] PD-L1 et [F] PD-L2, sur les cellules dendritiques infectées ou pas à PAO1, 48h après stimulation au LPS (100ng/mL). Wilcoxon test * :p<0.05.

Conclusion:

Lors de ce travail nous avons mis en place un modèle *in vitro* de granulome à *P. aeruginosa*. Ce modèle est plus pertinent dans l'étude des infections nosocomiales plutôt que le granulome à BCG ; qui reste néanmoins le modèle de référence pour l'étude des granulomes.

P. aeruginosa est capable d'induire une réponse granulomateuse comparable à celle de BCG. Par contre le recrutement de LT DP8 α au sein du granulome à *P. aeruginosa* est altéré. Pour expliquer ce défaut de recrutement nous nous sommes intéressés aux cellules initiateuses de la réponse granulomateuse tels que les monocytes et les cellules dendritiques. *In vitro* nous avons analysé l'activation et la maturation de ces cellules suite à l'infection à *P. aeruginosa*. En effet, *P. aeruginosa* semble interférer avec l'activation des CPA via l'expression de PD-L1. PD-1/PD-L1 est une voie d'intérêt actuel impliquée notamment dans les mécanismes l'épuisement lymphocytaire. Le profil cytokinique des lymphocytes recrutés au sein du granulome ainsi que l'expression de PD-L1 restent à faire. Tester le blocage de la voie PD-1/PD-L1 pour restaurer le recrutement et l'activation lymphocytaire.

Nous avons mis en évidence un subtil mécanisme de subversion déployé par *P. aeruginosa* qui n'affecte pas directement le compartiment lymphocytaire mais seulement les cellules présentatrices d'antigènes. Ces cellules sont à la base de la réponse immunitaire ce qui permet au pathogène de limiter la réponse de l'hôte et favoriser son échappement immunitaire.

III. Discussion de l'objectif n°2

P. aeruginosa est le premier responsable des pneumonies nosocomiales et des infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose. Il nous a paru intéressant de développer un modèle de granulome pour étudier les mécanismes sous-jacents à ces infections. Ce travail a donc permis la mise en place d'un nouveau modèle *in vitro* de granulome à *P. aeruginosa*. Par ailleurs différents modèles de granulome *in vitro* ont été mis en place afin d'étudier la réponse immunitaire et comprendre les mécanismes d'échappement des pathogènes. C'est ainsi que des modèles de granulomes bactériens à *E.coli*, à *C.acnes* ou des granulomes fongiques à *C.albicans* ont récemment été mis en place [102, 105, 106].

Les infections chroniques sont dues à une clairance bactérienne insuffisante associée à la formation de biofilm. La clairance de *P. aeruginosa* du système respiratoire nécessite autant l'action de l'immunité innée que celle de l'immunité adaptative [107]. Les interactions entre le système immunitaire inné et adaptatif constituent une étape primordiale dans le contrôle des infections bactériennes, cette coopération est parfaitement illustrée dans les structures granulomateuses. Lors de la formation granulomateuse, les macrophages et les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices d'antigènes pour activer les lymphocytes T recrutés. Cette activation met en jeu différents signaux activateurs ou inhibiteurs véhiculés par les molécules de co-stimulation telles que CD80, CD86 et PD-L1 dont les ligands sont exprimés par les lymphocytes T.

Les monocytes infectés à *P. aeruginosa* ne surexpriment pas la molécule CD86 par rapport aux monocytes non infectés, par contre il y a bien induction de CD80 et de PD-L1. Néanmoins le rapport PD-L1/CD80 ou PD-L1/CD86 est en faveur de PD-L1. PD1/PD-L1 est une voie d'intérêt actuel car impliquée dans l'échappement immunitaire. Ainsi *P. aeruginosa* interfère indirectement avec l'activation des lymphocytes via une immunosubversion sur les monocytes qui n'activent plus les lymphocytes T. Ceci permet l'échappement immunitaire du *P. aeruginosa*.

Le compartiment lymphocytaire regroupe différentes populations lymphocytaires que sont les LT CD4, LT CD8, LT $\gamma\delta$, LT DP8 α et les cellules NK. Certaines de ces populations bien que minoritaires, jouent un rôle important dans la défense antibactérienne. Les LT $\gamma\delta$ représentent 5% des lymphocytes circulants, ils sont localisés préférentiellement dans les épithéliums et au niveau des muqueuses. Les LT $\gamma\delta$ participent à la réponse inflammatoire lors des infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose et produisent notamment du TNF- α et de l'IFN- γ en réponse à l'infection à *P. aeruginosa* [108, 109]. Les lymphocytes double positif (LT DP8 α) présentent le même phénotype et

les mêmes fonctions que les LT reg, ils sécrètent notamment de l'IL-10 [104]. Le rôle des cellules NK dans la lutte contre les infections bactériennes n'est plus à démontrer.

Afin d'analyser l'impact de la signalisation PD-1/PD-L1 sur l'activation du compartiment lymphocytaire nous allons dans un premier temps doser les cytokines au niveau des granulomes. Dans un deuxième temps, nous allons bloquer cette signalisation et étudier son effet sur le profil cytokinique des lymphocytes. La signalisation PD-1/PD-L1 joue sur l'épuisement lymphocytaire ce qui assure l'échappement immunitaire du *P. aeruginosa*.

Discussion :

Discussion générale :

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence les rôles bénéfiques de l'IL-22 et des IFN- λ dans la protection contre les pneumonies à *P. aeruginosa*. Nous avons montré pour la première fois un effet protecteur de l'administration d'IFN- λ chez les souris lors d'une pneumopathie bactérienne.

Le renforcement de la barrière épithéliale constitue un bon traitement alternatif contre l'infection bactérienne. En effet aussi bien l'IL-22 que les IFN- λ qui sont des cytokines protectrices des épithéliums, améliorent *in vivo* le devenir des souris infectées. L'effet protecteur de ces cytokines passe par l'induction des peptides antimicrobiens ainsi que par la modulation de la réponse cytokinique pour limiter l'inflammation et prévenir les dommages tissulaires. Par ailleurs Hoegl et al. ont montré que le traitement préventif par inhalation d'IL-22 *in vivo* chez le rat limitait les dommages causés par la ventilation mécanique (VILI ventilator induced lung injury). Le traitement par inhalation d'IL-22 et/ou d'IFN- λ peut être envisagé notamment chez les patients intubés car ils sont plus à risque de développer une PAVM. Ce traitement pourrait également bénéficier aux patients atteints de mucoviscidose qui souffrent de graves infections chroniques à *P. aeruginosa*. Bien évidemment ces cytokines seraient administrées en complément des traitements antibiotiques, car bien qu'elles améliorent l'état clinique des souris, elles n'agissent pas sur la charge bactérienne.

Le rôle de l'IL-22 et des IFN- λ dans le cadre de la mucoviscidose ou de l'immunosuppression n'est pas bien documenté. La production d'IL-22 dans un modèle *in vivo* de mucoviscidose à *P. aeruginosa* mimant la formation de biofilm chez le rat a été rapportée par Bielen et al. [2]. L'IL-22 est également détectée dans les expectorations et plus faiblement dans le plasma de patients atteints de mucoviscidose [110].

Par contre l'effet de l'IL-22 reste controversé, l'étude de Bayes et al. montre une perte de poids accentuée chez les souris IL-22 KO dans un modèle murin d'infection chronique à *P. aeruginosa* [111]. Les effets de l'IL-22 et des IFN- λ sur ces patients n'ont pas encore été complètement explorés. De plus *P. aeruginosa* s'est particulièrement adapté à la mucoviscidose [112].

En effet *P. aeruginosa* est capable d'échapper au système immunitaire et de subvertir la réponse de l'hôte. Afin d'étudier ces mécanismes d'échappement immunitaire, nous avons adapté le modèle de granulome *in vitro* à *P. aeruginosa*. Ce modèle de granulome nous a permis d'étudier aussi bien la réponse de l'hôte que l'interférence du pathogène avec la réponse immunitaire. Effectivement le granulome permet de contenir le pathogène et de confiner l'infection pour limiter la dissémination bactérienne. L'étude de la formation du granulome au contact de *P. aeruginosa* a permis notamment

de mettre en évidence une augmentation de l'expression des récepteurs PD-L1 impliqués dans les phénomènes d'épuisement lymphocytaire lors de leur interaction avec les récepteurs PD-1 exprimés par les lymphocytes. Permettant d'expliquer en partie la capacité d'échappement immunitaire de *P. aeruginosa*.

Le modèle de granulome constitue un bon outil pour l'étude de la réponse immunitaire à *P. aeruginosa*. Toutefois, pour modéliser la réponse de l'hôte au cours d'une pneumopathie, la composante épithéliale est actuellement manquante. En perspective de ce travail il serait intéressant de mettre au point le granulome dans une structure mimant l'alvéole à savoir des cellules épithéliales alvéolaires en culture au contact du granulome. Nous disposons au laboratoire de lignées cellulaires notamment les cellules Calu-3 qui sont capables d'établir des jonctions serrées et d'établir un épithélium différencié avec un pôle apical et un pôle basal (en condition air/liquide). Réaliser un modèle de co-culture AEC / granulome permettrait de mimer la structure alvéolaire. Ce modèle de culture permet par la suite l'étude des effets des cytokines IL-22 et IFN- λ sur la réponse granulomateuse.

Bibliographie :

I. Bibliographie

1. Réseau d'alerte, d.i.e.d.s.d.i.n.R., *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012*. 2013.
2. Bielen, K., et al., *Biofilm-Induced Type 2 Innate Immunity in a Cystic Fibrosis Model of Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. 7: p. 274.
3. Lyczak, J.B., C.L. Cannon, and G.B. Pier, *Lung infections associated with cystic fibrosis*. *Clin Microbiol Rev*, 2002. 15(2): p. 194-222.
4. Sadikot, R.T., et al., *Pathogen-host interactions in Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. 171(11): p. 1209-23.
5. Chenouard, A., et al., *Phenotype and functions of B cells in patients with acute brain injuries*. *Mol Immunol*, 2015. 68(2 Pt A): p. 350-6.
6. Stover, C.K., et al., *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. *Nature*, 2000. 406(6799): p. 959-64.
7. Sawa, T., *The molecular mechanism of acute lung injury caused by Pseudomonas aeruginosa: from bacterial pathogenesis to host response*. *J Intensive Care*, 2014. 2(1): p. 10.
8. Galle, M., I. Carpentier, and R. Beyaert, *Structure and function of the Type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci*, 2012. 13(8): p. 831-42.
9. Wood, S.J., et al., *Pseudomonas aeruginosa ExoT Induces Mitochondrial Apoptosis in Target Host Cells in a Manner That Depends on Its GTPase-activating Protein (GAP) Domain Activity*. *J Biol Chem*, 2015. 290(48): p. 29063-73.
10. Ochoa, C.D., et al., *Pseudomonas aeruginosa exotoxin Y is a promiscuous cyclase that increases endothelial tau phosphorylation and permeability*. *J Biol Chem*, 2012. 287(30): p. 25407-18.
11. Bucior, I., J.F. Pielage, and J.N. Engel, *Pseudomonas aeruginosa pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium*. *PLoS Pathog*, 2012. 8(4): p. e1002616.
12. King, J.D., et al., *Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun*, 2009. 15(5): p. 261-312.
13. Ben Haj Khalifa A, M.D., Vu Thien H, Khedher M., *Les facteurs de virulence de PA : mécanismes et modes de régulations* *Ann Biol Clin*, 2011. *Ann Biol Clin* 2011 ; 69(4) : 393-403 doi:10.1684/abc.2011.0589.

14. Lavoie, E.G., T. Wangdi, and B.I. Kazmierczak, *Innate immune responses to Pseudomonas aeruginosa infection*. *Microbes Infect*, 2011. 13(14-15): p. 1133-45.
15. Bleves, S., et al., *Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons*. *Int J Med Microbiol*, 2010. 300(8): p. 534-43.
16. Michalska, M. and P. Wolf, *Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing*. *Front Microbiol*, 2015. 6: p. 963.
17. Williams, B.J., J. Dehnbostel, and T.S. Blackwell, *Pseudomonas aeruginosa: host defence in lung diseases*. *Respirology*, 2010. 15(7): p. 1037-56.
18. Conibear, T.C., et al., *Characterization of protease IV expression in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates*. *J Med Microbiol*, 2012. 61(Pt 2): p. 180-90.
19. Guillon, A., et al., *Pseudomonas aeruginosa proteolytically alters the interleukin 22-dependent lung mucosal defense*. *Virulence*, 2017. 8(6): p. 810-820.
20. Mason, R.J., *Biology of alveolar type II cells*. *Respirology*, 2006. 11 Suppl: p. S12-5.
21. Fehrenbach, H., *Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited*. *Respir Res*, 2001. 2(1): p. 33-46.
22. Condon, T.V., et al., *Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface*. *J Leukoc Biol*, 2011. 90(5): p. 883-95.
23. Bhattacharya, J. and K. Westphalen, *Macrophage-epithelial interactions in pulmonary alveoli*. *Semin Immunopathol*, 2016. 38(4): p. 461-9.
24. Kannan, S., et al., *Alveolar epithelial type II cells activate alveolar macrophages and mitigate P. Aeruginosa infection*. *PLoS One*, 2009. 4(3): p. e4891.
25. Kolesar, L., et al., *Cytokine gene expression profile in monocytic cells after a co-culture with epithelial cells*. *Immunol Res*, 2012. 52(3): p. 269-75.
26. Herold, S., K. Mayer, and J. Lohmeyer, *Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair*. *Front Immunol*, 2011. 2: p. 65.
27. Wright, H.L., et al., *Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases*. *Rheumatology (Oxford)*, 2010. 49(9): p. 1618-31.
28. Wright, H.L., R.J. Moots, and S.W. Edwards, *The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2014. 10(10): p. 593-601.
29. Parker, D. and A. Prince, *Innate immunity in the respiratory epithelium*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. 45(2): p. 189-201.
30. Schultz, H. and J.P. Weiss, *The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease*. *Clin Chim Acta*, 2007. 384(1-2): p. 12-23.
31. Levy, O., *Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes*. *J Leukoc Biol*, 2004. 76(5): p. 909-25.

32. Sonawane, A., et al., *Neutrophil elastase, an innate immunity effector molecule, represses flagellin transcription in Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 2006. 74(12): p. 6682-9.
33. Broquet, A., et al., *Interleukin-22 level is negatively correlated with neutrophil recruitment in the lungs in a Pseudomonas aeruginosa pneumonia model*. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 11010.
34. Culley, F.J., *Natural killer cells in infection and inflammation of the lung*. Immunology, 2009. 128(2): p. 151-63.
35. Schleinitz, N., *Cellules Natural Killer : une cible thérapeutique potentielle au cours des maladies auto-immunes ? mise au point*, 2011. doi:10.1684/met.2011.0311.
36. Esin, S., et al., *Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria*. Infect Immun, 2008. 76(4): p. 1719-27.
37. Ivanova, D., et al., *NK cells in mucosal defense against infection*. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 413982.
38. Ugolini, E.V.a.S., *NK cells: receptors and functions*. Nature Reviews immunology, 2010.
39. Broquet, A., et al., *Depletion of natural killer cells increases mice susceptibility in a Pseudomonas aeruginosa pneumonia model*. Crit Care Med, 2014. 42(6): p. e441-50.
40. Small, C.L., et al., *NK cells play a critical protective role in host defense against acute extracellular Staphylococcus aureus bacterial infection in the lung*. J Immunol, 2008. 180(8): p. 5558-68.
41. Wesselkamper, S.C., et al., *NKG2D is critical for NK cell activation in host defense against Pseudomonas aeruginosa respiratory infection*. J Immunol, 2008. 181(8): p. 5481-9.
42. Borchers, M.T., et al., *The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 2006. 74(5): p. 2578-86.
43. Vega-Ramos, J., et al., *Modulation of dendritic cell antigen presentation by pathogens, tissue damage and secondary inflammatory signals*. Curr Opin Pharmacol, 2014. 17: p. 64-70.
44. van Tongeren, J., et al., *Interactions between epithelial cells and dendritic cells in airway immune responses: lessons from allergic airway disease*. Allergy, 2008. 63(9): p. 1124-35.
45. Wright, J.R., *Immunoregulatory functions of surfactant proteins*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(1): p. 58-68.
46. Nayak, A., et al., *An Insight into the Diverse Roles of Surfactant Proteins, SP-A and SP-D in Innate and Adaptive Immunity*. Front Immunol, 2012. 3: p. 131.
47. Byfield, F.J., et al., *Cathelicidin LL-37 increases lung epithelial cell stiffness, decreases transepithelial permeability, and prevents epithelial invasion by Pseudomonas aeruginosa*. J Immunol, 2011. 187(12): p. 6402-9.
48. Luo, Y., et al., *The Naturally Occurring Host Defense Peptide, LL-37, and Its Truncated Mimetics KE-18 and KR-12 Have Selected Biocidal and Antibiofilm Activities Against Candida*

- albicans, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli In vitro*. Front Microbiol, 2017. 8: p. 544.
49. Burger-van Paassen, N., et al., *Mucin Muc2 deficiency and weaning influences the expression of the innate defense genes Reg3beta, Reg3gamma and angiogenin-4*. PLoS One, 2012. 7(6): p. e38798.
 50. Wang, L., et al., *Intestinal REG3 Lectins Protect against Alcoholic Steatohepatitis by Reducing Mucosa-Associated Microbiota and Preventing Bacterial Translocation*. Cell Host Microbe, 2016. 19(2): p. 227-39.
 51. Mookherjee, N., et al., *Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37*. J Immunol, 2006. 176(4): p. 2455-64.
 52. Leiva-Juarez, M.M., J.K. Kolls, and S.E. Evans, *Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense*. Mucosal Immunol, 2018. 11(1): p. 21-34.
 53. Mayer, A.K. and A.H. Dalpke, *Regulation of local immunity by airway epithelial cells*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007. 55(6): p. 353-62.
 54. Kaplanski, G., et al., *IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation*. Trends Immunol, 2003. 24(1): p. 25-9.
 55. Fu, X., et al., *M2 polarized macrophages induced by CSE promote proliferation, migration, and invasion of alveolar basal epithelial cells*. Int Immunopharmacol, 2015. 28(1): p. 666-74.
 56. Kletting, S., et al., *Co-culture of human alveolar epithelial (hAELVi) and macrophage (THP-1) cell lines*. ALTEX, 2017. 34(4).
 57. Hammad, H. and B.N. Lambrecht, *Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(3): p. 193-204.
 58. Borchers, M.T., et al., *NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. 291(2): p. L222-31.
 59. Thorley, A.J., et al., *Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung--role of alveolar epithelial TLR expression and signalling*. PLoS One, 2011. 6(7): p. e21827.
 60. Mclsaac, S.M., A.W. Stadnyk, and T.J. Lin, *Toll-like receptors in the host defense against Pseudomonas aeruginosa respiratory infection and cystic fibrosis*. J Leukoc Biol, 2012. 92(5): p. 977-85.
 61. Tolle, L., et al., *Redundant and cooperative interactions between TLR5 and NLRC4 in protective lung mucosal immunity against Pseudomonas aeruginosa*. J Innate Immun, 2015. 7(2): p. 177-86.
 62. Parker, D. and A. Prince, *Epithelial uptake of flagella initiates proinflammatory signaling*. PLoS One, 2013. 8(3): p. e59932.

63. Riquelme, S.A., D. Ahn, and A. Prince, *Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae Adaptation to Innate Immune Clearance Mechanisms in the Lung*. J Innate Immun, 2018.
64. Sauer, K., et al., *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm*. J Bacteriol, 2002. 184(4): p. 1140-54.
65. Smith, R.S. and B.H. Iglewski, *P. aeruginosa quorum-sensing systems and virulence*. Curr Opin Microbiol, 2003. 6(1): p. 56-60.
66. Malloy, J.L., et al., *Pseudomonas aeruginosa protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. 288(2): p. L409-18.
67. Vareechon, C., et al., *Pseudomonas aeruginosa Effector ExoS Inhibits ROS Production in Human Neutrophils*. Cell Host Microbe, 2017. 21(5): p. 611-618 e5.
68. Faure, E., et al., *Pseudomonas aeruginosa type-3 secretion system dampens host defense by exploiting the NLRC4-coupled inflammasome*. Am J Respir Crit Care Med, 2014. 189(7): p. 799-811.
69. Li, A., et al., *IL-22 Up-Regulates beta-Defensin-2 Expression in Human Alveolar Epithelium via STAT3 but Not NF-kappaB Signaling Pathway*. Inflammation, 2015. 38(3): p. 1191-200.
70. Dumoutier, L., J. Louahed, and J.C. Renault, *Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9*. J Immunol, 2000. 164(4): p. 1814-9.
71. Dumoutier, L., et al., *IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes*. Genes Immun, 2000. 1(8): p. 488-94.
72. Sonnenberg, G.F., L.A. Fouser, and D. Artis, *Functional biology of the IL-22-IL-22R pathway in regulating immunity and inflammation at barrier surfaces*. Adv Immunol, 2010. 107: p. 1-29.
73. Dudakov, J.A., A.M. Hanash, and M.R. van den Brink, *Interleukin-22: immunobiology and pathology*. Annu Rev Immunol, 2015. 33: p. 747-85.
74. Sonnenberg, G.F., L.A. Fouser, and D. Artis, *Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22*. Nat Immunol, 2011. 12(5): p. 383-90.
75. Wolk, K. and R. Sabat, *Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. 17(5): p. 367-80.
76. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. Nat Med, 2008. 14(3): p. 282-9.
77. Rutz, S., et al., *Transcription factor c-Maf mediates the TGF-beta-dependent suppression of IL-22 production in T(H)17 cells*. Nat Immunol, 2011. 12(12): p. 1238-45.

78. Wolk, K., et al., *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. *Immunity*, 2004. 21(2): p. 241-54.
79. Perusina Lanfranca, M., et al., *Biological and pathological activities of interleukin-22*. *J Mol Med (Berl)*, 2016. 94(5): p. 523-34.
80. Lejeune, D., et al., *Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10*. *J Biol Chem*, 2002. 277(37): p. 33676-82.
81. Bi, Y., et al., *Interleukin-22 promotes lung cancer cell proliferation and migration via the IL-22R1/STAT3 and IL-22R1/AKT signaling pathways*. *Mol Cell Biochem*, 2016. 415(1-2): p. 1-11.
82. Martin, J.C., et al., *Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid*. *Mucosal Immunol*, 2014. 7(1): p. 101-13.
83. Hoegl, S., et al., *Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. 44(3): p. 369-76.
84. Aujla, S.J., et al., *IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia*. *Nat Med*, 2008. 14(3): p. 275-81.
85. Sonnenberg, G.F., et al., *Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A*. *J Exp Med*, 2010. 207(6): p. 1293-305.
86. Hernandez, P.P., et al., *Interferon-lambda and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection*. *Nat Immunol*, 2015. 16(7): p. 698-707.
87. Lazear, H.M., T.J. Nice, and M.S. Diamond, *Interferon-lambda: Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond*. *Immunity*, 2015. 43(1): p. 15-28.
88. Sheppard, P., et al., *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R*. *Nat Immunol*, 2003. 4(1): p. 63-8.
89. Witte, K., et al., *IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. 21(4): p. 237-51.
90. Mordstein, M., et al., *Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections*. *J Virol*, 2010. 84(11): p. 5670-7.
91. Odendall, C. and J.C. Kagan, *The unique regulation and functions of type III interferons in antiviral immunity*. *Curr Opin Virol*, 2015. 12: p. 47-52.
92. Kotenko, S.V. and J.E. Durbin, *Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location*. *J Biol Chem*, 2017. 292(18): p. 7295-7303.
93. Siegel, R., J. Eskdale, and G. Gallagher, *Regulation of IFN-lambda1 promoter activity (IFN-lambda1/IL-29) in human airway epithelial cells*. *J Immunol*, 2011. 187(11): p. 5636-44.

94. Cohen, T.S. and A.S. Prince, *Bacterial pathogens activate a common inflammatory pathway through IFN λ regulation of PDCD4*. PLoS Pathog, 2013. 9(10): p. e1003682.
95. Bierne, H., et al., *Activation of type III interferon genes by pathogenic bacteria in infected epithelial cells and mouse placenta*. PLoS One, 2012. 7(6): p. e39080.
96. Pott, J. and S. Stockinger, *Type I and III Interferon in the Gut: Tight Balance between Host Protection and Immunopathology*. Front Immunol, 2017. 8: p. 258.
97. Zanoni, I., F. Granucci, and A. Broggi, *Interferon (IFN)-lambda Takes the Helm: Immunomodulatory Roles of Type III IFNs*. Front Immunol, 2017. 8: p. 1661.
98. Blazek, K., et al., *IFN-lambda resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1beta production*. J Exp Med, 2015. 212(6): p. 845-53.
99. Odendall, C., A.A. Voak, and J.C. Kagan, *Type III IFNs Are Commonly Induced by Bacteria-Sensing TLRs and Reinforce Epithelial Barriers during Infection*. J Immunol, 2017. 199(9): p. 3270-3279.
100. Silva Miranda, M., et al., *The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria?* Clin Dev Immunol, 2012. 2012: p. 139127.
101. Pai, M., et al., *Tuberculosis*. Nat Rev Dis Primers, 2016. 2: p. 16076.
102. Alvarez-Rueda, N., et al., *First human model of in vitro Candida albicans persistence within granuloma for the reliable study of host-fungi interactions*. PLoS One, 2012. 7(6): p. e40185.
103. Deknuydt, F., et al., *An in vitro model of mycobacterial granuloma to investigate the immune response in brain-injured patients*. Crit Care Med, 2013. 41(1): p. 245-54.
104. Sarrabayrouse, G., et al., *CD4CD8alphaalpha lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease*. PLoS Biol, 2014. 12(4): p. e1001833.
105. Aubin, G.G., et al., *Immune discrepancies during in vitro granuloma formation in response to Cutibacterium (formerly Propionibacterium) acnes infection*. Anaerobe, 2017. 48: p. 172-176.
106. Meconi, S., et al., *Adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro*. Cell Microbiol, 2007. 9(5): p. 1252-61.
107. Jensen, P.O., et al., *The immune system vs. Pseudomonas aeruginosa biofilms*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. 59(3): p. 292-305.
108. Raga, S., et al., *Gammadelta T lymphocytes from cystic fibrosis patients and healthy donors are high TNF-alpha and IFN-gamma-producers in response to Pseudomonas aeruginosa*. Respir Res, 2003. 4: p. 9.

109. Pan, T., et al., *IL17-Producing gammadelta T Cells May Enhance Humoral Immunity during Pulmonary Pseudomonas aeruginosa Infection in Mice*. Front Cell Infect Microbiol, 2016. 6: p. 170.
110. Paats, M.S., et al., *Cytokines in nasal lavages and plasma and their correlation with clinical parameters in cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2013. 12(6): p. 623-9.
111. Bayes, H.K., et al., *IL-22 exacerbates weight loss in a murine model of chronic pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection*. J Cyst Fibros, 2016. 15(6): p. 759-768.
112. Folkesson, A., et al., *Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective*. Nat Rev Microbiol, 2012. 10(12): p. 841-51.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Interleukin-22 level is negatively correlated with neutrophil recruitment in the lungs in a *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model

Alexis Broquet¹, Cédric Jacqueline¹, Marion Davieau¹, Anissa Besbes¹, Antoine Roquilly^{1,2}, Jérôme Martin^{3,4,5}, Jocelyne Caillon¹, Laure Dumoutier⁶, Jean-Christophe Renaud⁶, Michèle Heslan^{3,4}, Régis Josien^{3,4,5} & Karim Asehnoune^{1,2}

Pseudomonas aeruginosa is a major threat for immune-compromised patients. Bacterial pneumonia can induce uncontrolled and massive neutrophil recruitment ultimately leading to acute respiratory distress syndrome and epithelium damage. Interleukin-22 plays a central role in the protection of the epithelium. In this study, we aimed to evaluate the role of interleukin-22 and its soluble receptor IL-22BP in an acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model in mice. In this model, we noted a transient increase of IL-22 during *Pseudomonas aeruginosa* challenge. Using an antibody-based approach, we demonstrated that IL-22 neutralisation led to increased susceptibility to infection and to lung damage correlated with an increase in neutrophil accumulation in the lungs. On the contrary, rIL-22 administration or IL-22BP neutralisation led to a decrease in mouse susceptibility and lung damage associated with a decrease in neutrophil accumulation. This study demonstrated that the IL-22/IL-22BP system plays a major role during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia by moderating neutrophil accumulation in the lungs that ultimately leads to epithelium protection.

Pneumonia induced by *Pseudomonas aeruginosa* (PA), a Gram-negative opportunistic bacteria, is a major threat for immune-compromised patients¹. During infection, the host must activate a robust but adapted immune response against the pathogen while protecting the integrity and the functionality of the lungs. In the early period of pulmonary infection, there is massive polymorphonuclear neutrophil (PMN) recruitment generating oedema and tissue damage through the generation of an oxidative burst and pro-inflammatory microenvironment. Deregulated and overwhelming activation of PMN can lead to destruction of the alveolar-capillary barrier and to acute respiratory distress syndrome (ARDS)².

Interleukin (IL)-22 is a member of the IL-10 superfamily and is currently described as the cytokine of epithelium protection. Although ROR γ T_{pos} type-3 Innate Lymphoid Cells (ILC3) are characterized by their ability to produce IL-22³, other cells such as NK cells⁴, alveolar macrophages⁵ and neutrophils⁶ have been suspected of producing IL-22⁷. Owing to an almost restricted expression of the membrane IL-22 receptor (IL-22R) to epithelial cells⁸, IL-22 exerts crucial functions in regulating epithelial biology⁹. Based on antimicrobial peptides (AMP) and mucus production induction, the actions of IL-22 have been shown to be significant in fighting a number of extracellular bacteria and fungi at barrier surfaces of the gut and the lungs^{10–12}. For example, IL-22 expression induced by *C. albicans* exposure in the lungs is protective against secondary PA infection¹³. In addition, IL-22

¹Laboratoire UPRES EA3826 « Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections », IRS2 – Nantes Biotech, Université de Nantes, Nantes, France. ²CHU Nantes, Pôle anesthésie réanimations, Service d'anesthésie réanimation chirurgicale, Hôtel Dieu, Nantes, F-44093, France. ³Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France. ⁴Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France. ⁵Laboratoire d'Immunologie, CHU Nantes, Nantes, France. ⁶Ludwig Institute for cancer Research and Institut de Duve, Université Catholique de Louvain, B-1200, Brussels, Belgium. Correspondence and requests for materials should be addressed to K.A. (email: Karim.asehnoune@univ-nantes.fr)

displays significant tissue-protective properties and supports epithelium wound healing and regeneration after injury by controlling epithelial cell proliferation, survival and differentiation^{14–16}. Overall, these data suggest that IL-22 could limit epithelial lung injury during ARDS, especially when secondary to acute bacterial infection.

In contrast, there are indications that IL-22 could also contribute to pathogenic epithelial-destructive inflammation by stimulating the release of matrix metalloproteases and PMN-recruiting chemokines and by promoting aberrant epithelial cell proliferation and differentiation^{17–19}. This duality of IL-22 functions during inflammation probably reflects the significance of tissue context in determining the balance of IL-22 protective vs. deleterious actions on epithelial cells. In support of this idea, Sonnenberg *et al.* previously showed that during bleomycin-induced acute lung injury, the tissue-protective effects of IL-22 are overwhelmed by pro-inflammatory properties owing to the synergistic actions with IL-17 to recruit PMNs²⁰. Therefore, it is not surprising that IL-22 possesses a specific system of regulation that is an IL-22 Binding Protein (IL-22BP), a secreted, soluble and specific inhibitor²¹ which we previously showed to be produced by a specific subset of immature dendritic cells in rodent gut that negatively regulates the protective actions of IL-22 during DSS-induced acute colitis^{22,23}.

There are indications that both IL-22 and IL-22BP are produced in the bronchoalveolar fluid of ARDS patients²⁴. However, it has remained unclear if, in this condition, IL-22 exerts protective actions on the epithelial cells that are blocked by IL-22BP and vice versa. Given the critical importance of epithelial injury in determining the outcome of ARDS patients²⁵, deciphering the role of the IL-22/IL-22R/IL-22BP axis could provide a major new therapeutic perspective.

In this study, we showed that IL-22 neutralisation led to an increase in PMN recruitment and lung lesions. Increased IL-22 levels (administration of recombinant IL-22 (rIL-22) or neutralisation of IL-22BP) induced a decrease in PMN recruitment and lung lesions. Taken together, these data demonstrated a protective role of IL-22 through its ability to modulate PMN recruitment.

Materials and Methods

Mice, bacteria strain and cell line. Eight-to-ten-week-old pathogen-free RjOrl:SWISS mice (weight, 29–32 g) were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest Saint Isle, France). The mice were maintained on a 12-hour light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*. The animals were treated in accordance with institutional policies and the guidelines stipulated by the animal welfare committee. The Ethics Committee for Animal Experiments of the Loire Department (University of Angers, C2EA-06) approved all of the animal experiments in this study. PA strain PAO1 was grown as previously described²⁶ and the inoculum was calibrated by nephelometry (2×10^8 CFU/mL). A549 cell line was obtained from Dr Vié (Nantes, France) and was cultured in RPMI medium complemented with 10% foetal bovine serum and 5mM L-glutamin. Cells were seeded at a density of 500,000 cells/mL in 24-well plates and cultivated at 37 °C with 5% CO₂ for 3 days until the time of the experiment.

Pneumonia model and neutralising antibody administration. Pneumonia was induced as previously described²⁶. For the IL-22 and IL-22BP neutralisation experiments, anaesthetised mice were subjected to a single anti-IL22, anti-IL-22BP or isotype control (mouse IgG2a, BioLegend) antibody administration *i.v.* the day before the induction of pneumonia (50 µg/mouse). Neutralising anti-IL22 and IL-22BP (clone AM22BP.4) antibodies were provided by JC Renaud²⁷.

Bacteriological assessment of lung and evaluation of systemic dissemination. Lungs were removed and homogenised in 1 mL of saline buffer (Mixer Mill MM 400, Retsch Inc., Newtown, PA, USA) and used for quantitative cultures on Mueller-Hilton agar for 24 hours at 37 °C. Serial dilutions were performed and viable counts after 24 hours of incubation were expressed as the mean \pm SD log₁₀ Colony Forming Unit (CFU) per gram of organ.

Determination of cytokine levels in the lungs by ELISA. Immediately after removal, weighed lung samples were mechanically homogenised in cold lysis buffer (1X phosphate buffered saline [PBS, pH 7.4], 0.1% Triton X-100) containing 1 mM protease inhibitor cocktail (Sigma, St Quentin Fallavier, France). CXCL-2 (MIP-2a), interleukin (IL)-1 β , interleukin (IL)-6, IL22 and Tumour Necrosis Factor (TNF)- α concentrations in lung homogenates were quantified with ELISA kits according to manufacturer instructions (For CXCL2: R&D Systems, Lille, France; for IL1- β , IL-6, IL22 and TNF- α : eBioscience, France). The protein concentration in each sample was determined using a BCATM protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

Bronchoalveolar Fluid (BALF). Euthanized mice were put in dorsal recumbency and the trachea were exposed. A 22-gauge catheter was inserted in the trachea and the lungs were washed 3 times with 1 mL of cold 0.9% NaCl. Red blood cell counts were determined in BALF through Iris IQ200 select automated system (Beckman Coulter).

Histology and immunohistochemistry. At 0, 24, 48 or 72 hours of infection, groups of 3 mice were euthanized and both lungs were removed and immediately placed in 4% formalin. Formalin-fixed tissues were processed and stained with haematoxylin and eosin (H&E). For IL-22 and neutrophil staining, anti-IL-22 (polyclonal goat IgG, 2 µg/mL, R&D Systems, Lille, France) and anti-Ly6-G (clone 1A8, 5 µg/mL, Ozyme, Saint Quentin-en-Yvelines, France) antibodies respectively and corresponding isotype control antibodies were used following manufacturer instructions. See suppl. method for detailed information.

Real-time quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated using Trizol reagent (Fisher Scientific) or Qiagen RNeasy Mini Kit according to manufacturer instructions. Reverse transcription was performed using Murine Moloney Leukaemia Virus Reverse Transcriptase (Fisher Scientific) or Superscript First-Strand Synthesis System

for RT-PCR (Fisher Scientific), following manufacturer instructions. For gene expression, Power Sybr[®] Green 2 × reagent was used (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time PCR was performed using the Viia[™] 7 Real Time PCR system (Applied Biosystems). See suppl. method for primer information.

Statistical analysis. GraphPad prism software (La Jolla, CA, United States) was used for statistical analysis. Continuous non-parametric variables were expressed as median (25th–75th percentile). The Kruskal-Wallis test was used for comparisons of multiple groups. Dunn's multiple comparison test was used as post hoc test for intergroup comparisons. Survival curves were compared with a log-rank test. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

PA pneumonia induces lung epithelial cell damage. The PA acute pneumonia model in mice led to the development of severe epithelium damage and lung oedema with stable pulmonary bacteria loads from 24 to 48 hours of infection (Fig. 1a). Compared with non-infected lungs where single-layer cells surround alveoli (Fig. 1b, panel 1), PAO1 infection led to rapid and increasing epithelium cell layer thickening, massive recruitment of immune cells and alveolar septa destruction from 6 hours to 48 hours of infection (Fig. 1b, panels 2–4). Alveolar space evaluation showed a significant decrease in the alveoli compartment consistent with the generation of lung oedema (Fig. 1c). PAO1 pneumonia then induced alveoli haemorrhage in infected-BALF (Fig. 1d).

Interleukin-22 is transient during PA pneumonia. In this context of epithelium damage, we assessed the expression of the interleukin (IL)-22 during PA pneumonia (Fig. 2). PAO1 infection induces a tremendous and transient IL-22 mRNA increase at 6 hours of infection (Fig. 2a). This is correlated with the transient increase of IL-22 protein levels in the lungs of infected mice 6 and 24 hours after the onset of pneumonia ($p < 0.01$) followed by a drop back to IL-22 basal levels at 48 hours (ns; $p = 0.4$ compared with the sham group) (Fig. 2b). IL-22 detection on paraffin-embedded lung sections confirmed this transient IL-22 increase (Fig. 2c). IL-22 positive pixel surface quantification revealed that after an initial increase, IL-22 positive staining in the 48-hour infected lungs was significantly decreased compared with the sham group ($p < 0.05$) (Fig. 2d).

IL-22 *in vivo* neutralisation increases mice susceptibility to infection. In order to assess the relevance of IL-22 in the context of PA pneumonia, IL-22 and IL-22BP neutralising antibody-based approaches were conducted. Intravenous administration of neutralising IL-22 antibody 18 hours before the induction of pneumonia led to the abolition of the IL-22 protein increase in the lungs of the 24-hour infected mice (Fig. 3a) whereas a slight IL-22 increase, although not significant ($p = 0.08$), was observed in IL-22BP neutralised mice at 6 hours of infection. To confirm the relevance of IL-22 neutralisation *in vivo*, antimicrobial peptide REGIII γ mRNA was monitored while IL-22 regulated REGIII γ expression¹¹. IL-22 neutralisation is correlated to a decrease in REGIII γ mRNA expression in the lungs of infected mice (Fig. 3b). It is of interest to note that IL-22 neutralisation led to enhanced mouse susceptibility to infection (Fig. 3c, left panel. $p = 0.04$) whereas IL-22BP neutralisation decreased it (Fig. 3c, right panel. $p = 0.03$). This increased susceptibility in IL-22 neutralised animals was correlated with an increase in lung damage and oedema (Fig. 3d and e. $p = 0.03$), thereby demonstrating the protective role of IL-22 during PA acute pneumonia.

IL-22 neutralisation enhances PMN recruitment during infection. To highlight the impact of IL-22 and IL-22BP neutralisations, bacteria loads and host inflammatory response were assessed. As shown in Fig. 4a, *in vivo* neutralisation of IL-22 prior to infection did not affect pulmonary bacteria loads. Interestingly, IL-22 neutralisation tended to increase the levels of all cytokines tested although only significantly for the chemokine CXCL2 ($p < 0.05$) (Fig. 4b). CXCL2 (IL-8 human homolog) is known to be central for the recruitment of PMN in the lungs during infection. As shown in Fig. 4c and d, IL-22 neutralisation led to a significant increase in Ly6-G immunostaining (Fig. 4c, panel 2) showing higher PMN recruitment (Fig. 4d, $p = 0.03$) whereas IL-22BP neutralisation led to a decrease in PMN recruitment ($p = 0.05$) in the lungs of 6-hour infected mice.

rIL-22 administration moderates PMN recruitment during infection. During PA pneumonia, we observed a correlation between the levels of IL-22 in the lungs of infected mice and the histological damage observed. We addressed the impact of the *in vivo* administration of recombinant IL-22 before infection on lung damage after infection. As shown in Fig. 5a, intra-tracheal administration of 100ng of rIL-22 18 hours before the induction of pneumonia greatly decreased epithelial cell damage and lung oedema. In particular, rIL-22 administration significantly attenuated shrinking of the alveolar space during infection at 6 and 24 hours (Fig. 5b, $p < 0.05$ and $p < 0.001$ respectively). Since rIL-22 administration did not have an impact on bacteria load during pneumonia (Fig. 5c), we suspected an effect of rIL-22 on the host response. rIL-22 administration led to a moderate but significant decrease in PMN recruitment during infection as shown by Ly6-G IHC (Fig. 5d, right panel) and Ly6G surface staining quantification (Fig. 5e, $p = 0.03$). Interestingly, rIL-22 administration prior to infection tended to decrease MIP-2 expression in the lungs of infected mice compared with PBS-treated mice ($p = 0.17$) in contrast with IL-22 neutralisation which led to an increase of CXCL2 expression (Fig. 5f). IL-22 action is restricted to epithelial cells owing to the specific expression of the IL22RA1 receptor chain in these cells. Since IL-22 neutralisation impacted CXCL2 levels in the lungs and PMN recruitment, we explored the ability of rIL-22 to directly modulate IL-8 production on human epithelial A549 cell lines. As displayed in Fig. 5g, rIL-22 incubation on cells 18 hours before infection decreased IL-8 secretion during 6-hour PAO1 infection in a dose-effect manner ($p < 0.01$) confirming *in vitro* the effect of rIL-22 observed *in vivo*.

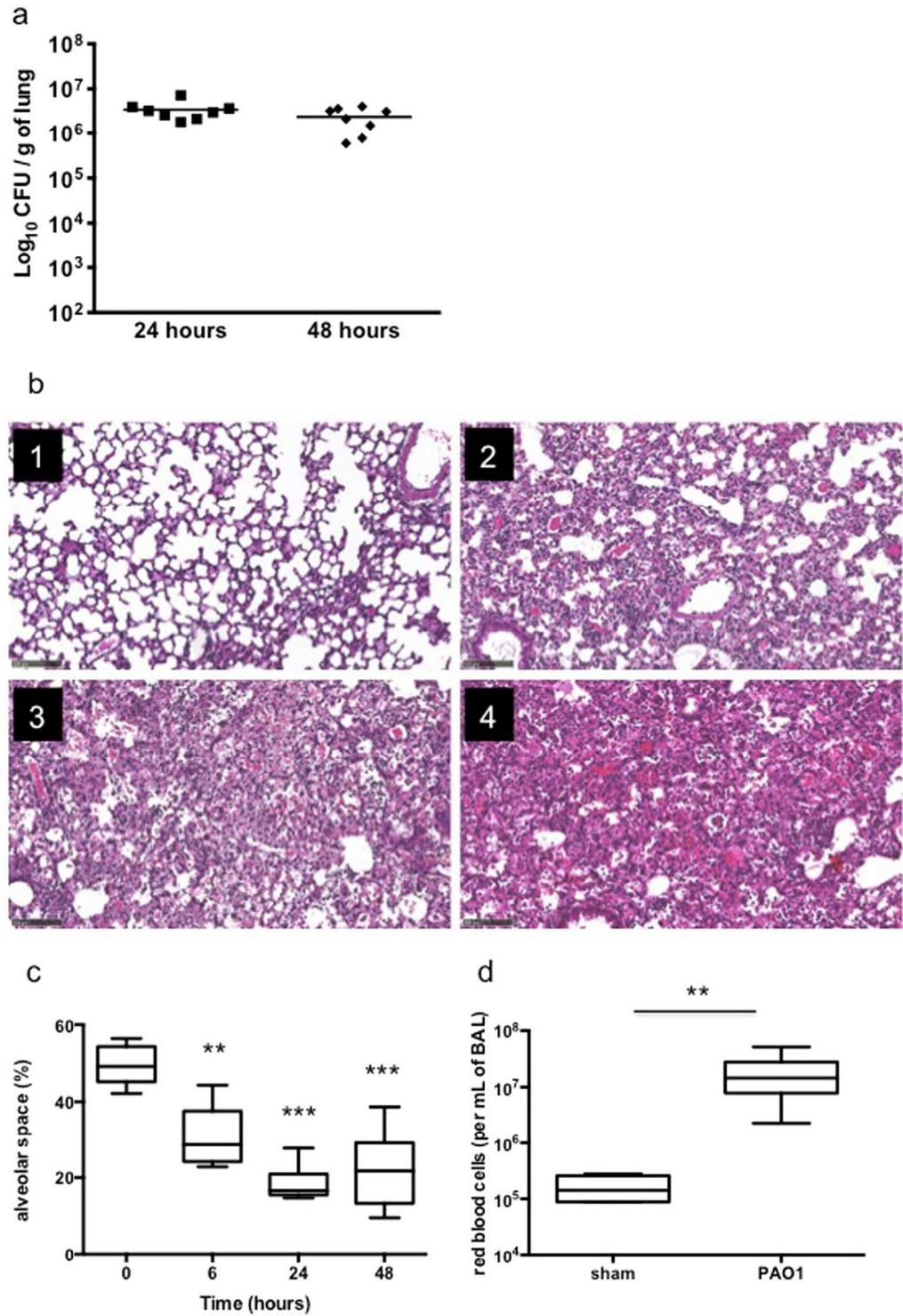


Figure 1. PA induces lung oedema and epithelium damage during pneumonia. **(a)** Pulmonary bacteria loads of mice infected with PA for 24 and 48 hours. Data are representative of two independent experiments (n = 8). **(b)** Lung histological analysis from sham Swiss mice (panel 1) or PA infected mice at 6 (panel 2), 24 (panel 3), and 48hrs (panel 4) of infection. Magnification × 100 (bar = 100 μm). Data are representative of two independent experiments (n = 3). **(c)** Alveolar space quantification by SIOX analysis of histology slides presented in **(b)** (3 mice per slide, 4 fields per slide). **(d)** Red blood cell counts in BALF fluid in sham mice versus 24-hour infected mice. Data are representative of two independent experiments (n = 3). **p < 0.01 and ***p < 0.001.

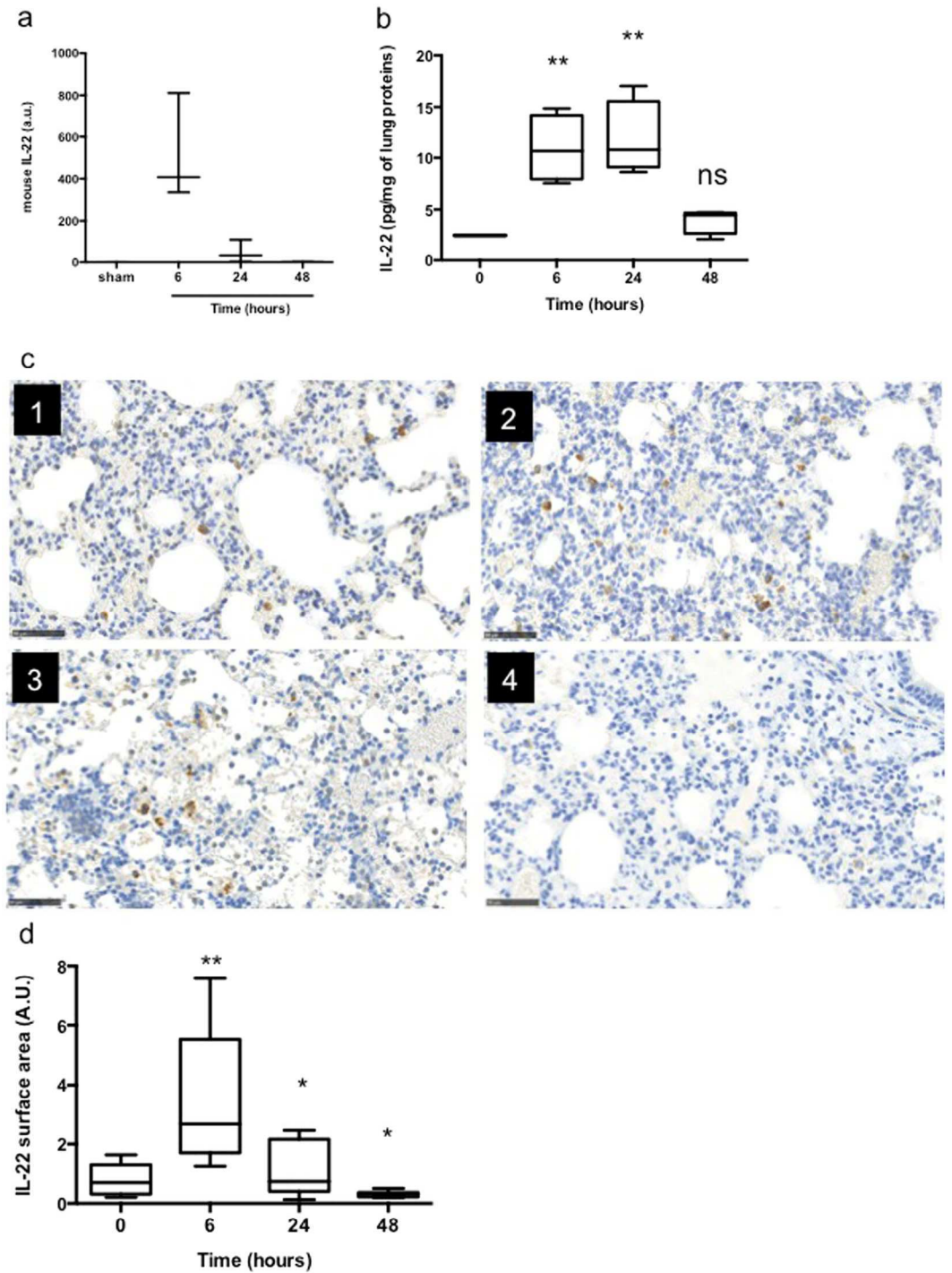


Figure 2. PA induces a transient increase of interleukin-22 in the lungs. **(a)** IL-22 mRNA expression levels in total lungs at different time points of infection. Data are representative of two independent experiments (n = 3 per group). **(b)** IL-22 levels by ELISA in lung homogenates of mice infected at different time points. Boxes represent median (interquartile range). Data are representative of two independent experiments (n = 6 per infected group, n = 3 for the sham group). **(c)** IL-22 IHC of lung section from sham (panel 1) and infected mice at 6 (panel 2), 24 (panel 3) and 48hrs (panel 4). Data are representative of two independent experiments (n = 3 per group). Magnification: $\times 100$. Bar = 100 μm . **(d)** Quantification of IL-22 positive pixels surface area by SIOX analysis of the slides presented in (c). Data are representative of two independent experiments (3 mice per group; four fields per slide). *p < 0.05, **p < 0.01, and n.s.: not significant compared with the sham group.

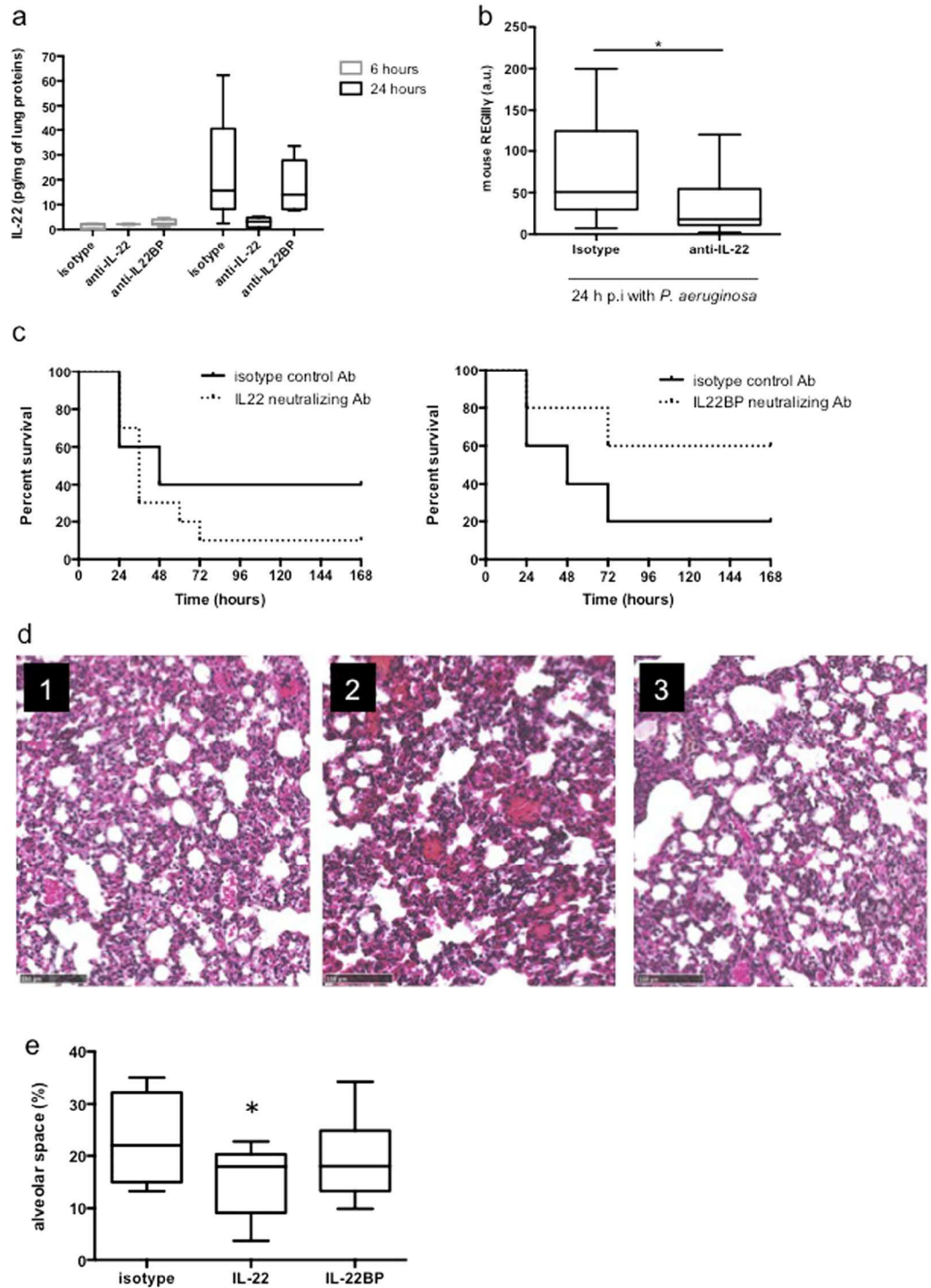


Figure 3. IL-22 neutralisation enhances mice susceptibility and lung damage to PA. **(a)** IL-22 level assessment by ELISA in lung homogenates of IL-22 neutralised mice. Boxes represent median (interquartile range). Data are representative of two independent experiments (n = 6 per infected group). *p < 0.05 and n.s.: not significant compared with the sham group. **(b)** Impact of IL-22 neutralisation on REGIII γ mRNA expression in total lungs of 6-hour infected mice. Data are representative of 2 independent experiments (n = 5). **(c)** Survival curves of infected mice treated with an isotype control antibody (solid line) or with an IL-22- neutralising antibody (left panel – dashed line) or with and IL-22BP neutralising antibody (right panel – dashed line). Survival rates are expressed as percentage and are representative of 2 independent experiments (anti-IL-22: n = 8 per group; anti-IL-22BP: n = 5 per group). **(d)** Lung histological analysis from infected mice treated with an isotype control antibody (panel 1), an IL-22- neutralising antibody (panel 2) or with an IL-22BP neutralising antibody (panel 3). Magnification $\times 100$. Bar = 100 μ m. Data are representative of two independent experiments (n = 3). **(e)** Alveolar space quantification by SIOX analysis of histology slides presented in **(d)** (3 mice per slide. 4 fields per slide). *p < 0.05 compared with the isotype group.

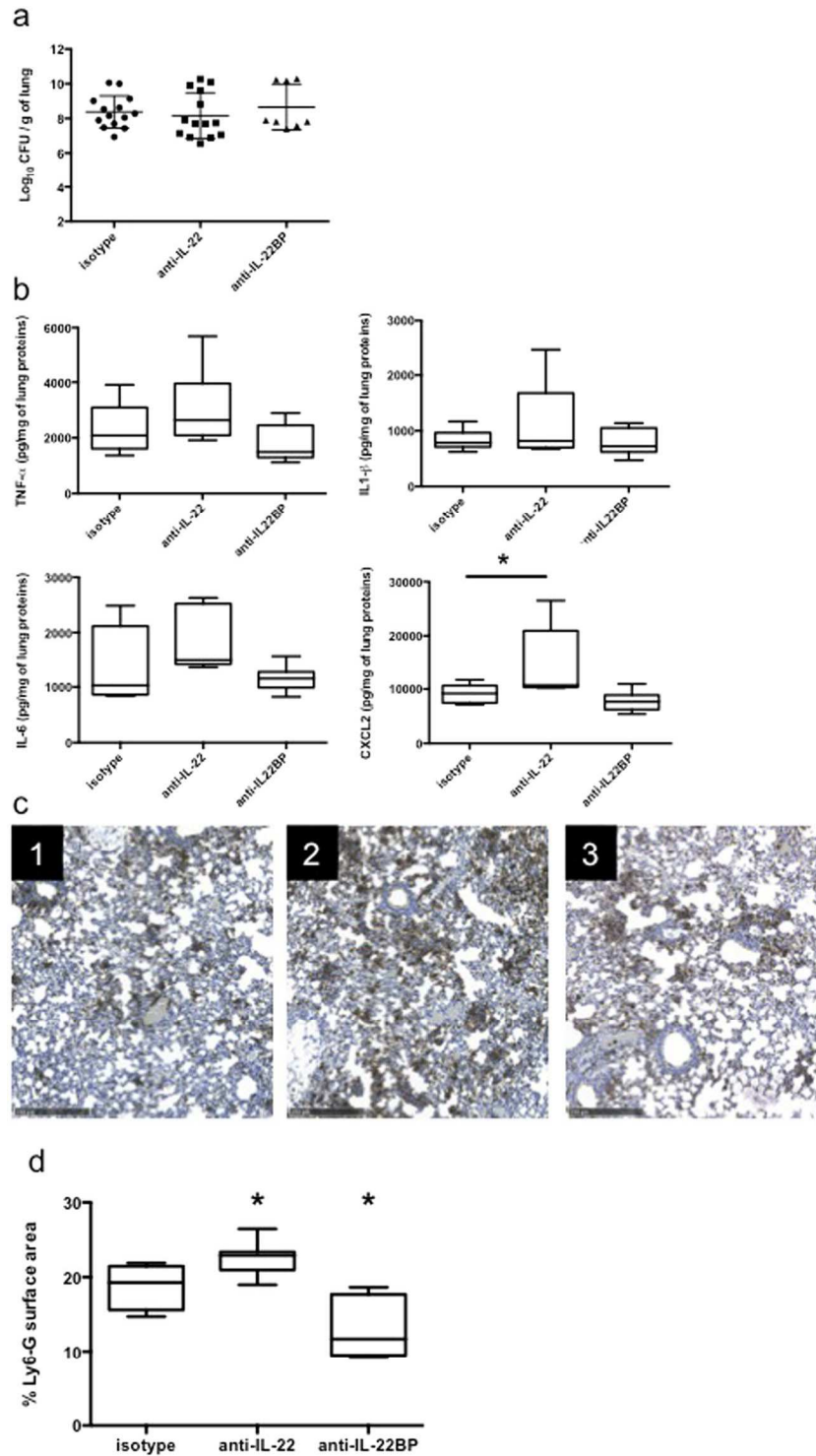


Figure 4. IL-22 neutralisation enhances a PMN-based response during infection. **(a)** Bacterial counts (expressed in log₁₀ colony-forming units [CFU]/grams of organ) in the lungs, spleen and kidney of 24-hour infected mice treated with an isotype control antibody or an IL-22 neutralising antibody. Boxes represent median (interquartile range). Data are representative of two independent experiments (n = 6 per group). **p < 0.001. **(b)** TNF- α , IL-1 β , IL-6 and CXCL2 concentration assessment by ELISA in lung homogenates of 6-hour infected mice treated with an isotype control antibody or an IL-22 neutralising antibody. Boxes represent median (interquartile range). Data are representative of two independent experiments (n = 6 per group). *p < 0.05. **(c)** Ly6-G IHC of lung section from 6-hour infected mice treated with an isotype control antibody (panel 1), an IL-22 neutralising antibody (panel 2) or an IL-22BP neutralising antibody (panel 3). Data are representative of two independent experiments (n = 3 per group). Magnification: \times 40. Bar = 250 μ m. **(d)** Quantification of Ly6-G positive pixels surface area by SIOX analysis of the slides presented in (c). Data are representative of two independent experiments (3 mice per group; four fields per slide). *p < 0.05.

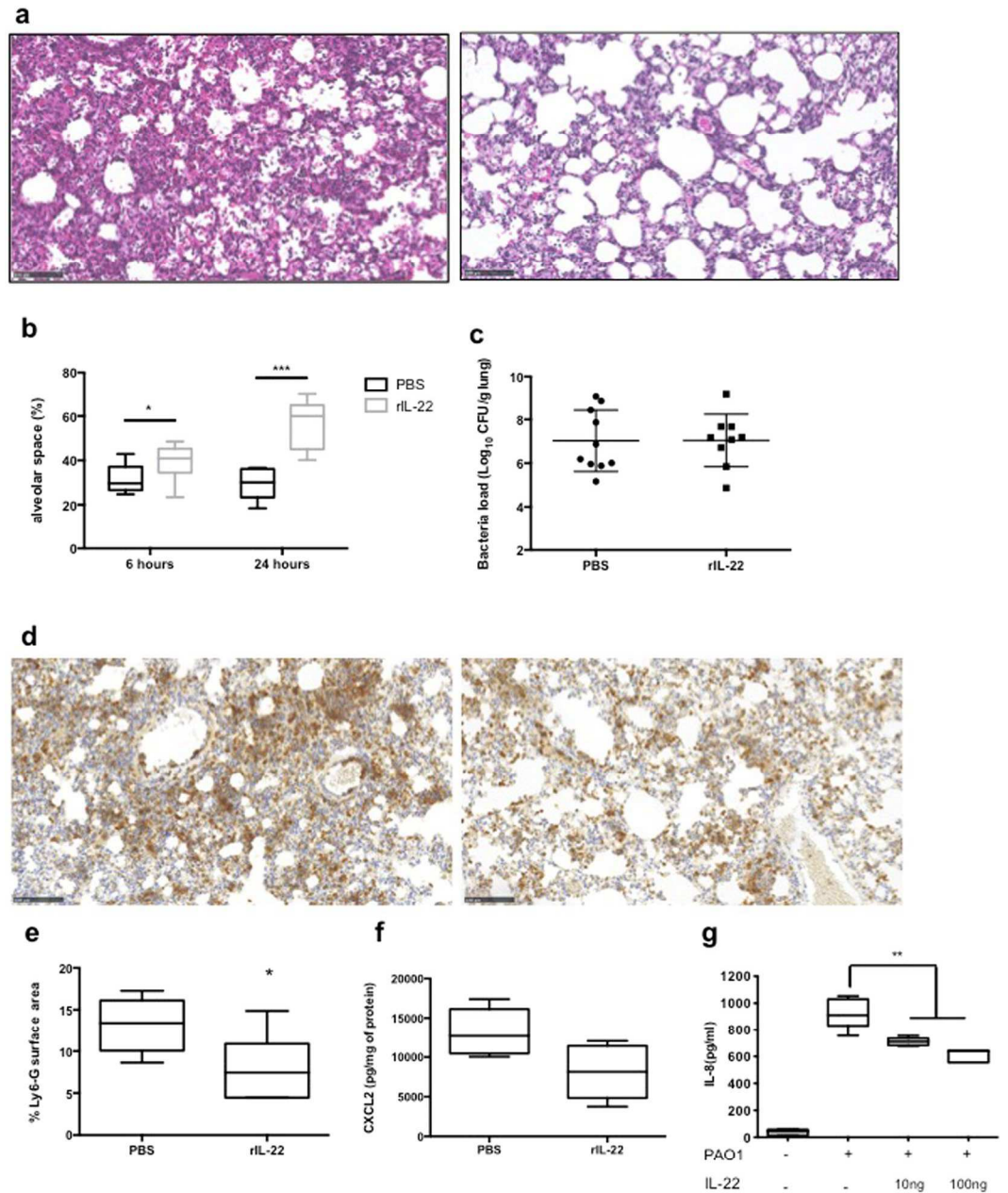


Figure 5. rIL-22 administration during PA infection attenuates lung damage and oedema. **(a)** Histology of 24-hour infected lung PBS-treated (left panel) or rIL-22-treated (right panel) 18hrs before infection. Data are representative of two independent experiments ($n = 3$ per group). Magnification $\times 20$. Bar = $100\mu\text{m}$. **(b)** Alveolar space quantification by SIOX after rIL-22 administration in 6- and 24-hour infected lungs. Data are representative of two independent experiments (3 mice per group; four fields per slide). $*p < 0.05$ and $***p < 0.01$. **(c)** Pulmonary bacteria loads of 24-hour infected mice treated with rIL-22. Data are representative of two independent experiments ($n = 6$ per group). **(d)** Ly6-G IHC of lung section from 6-hour infected mice treated with PBS (left panel) or recombinant IL-22 (rIL-22 - right panel) 18 hours before infection. Data are representative of two independent experiments ($n = 3$ per group). Magnification: $\times 20$. Bar = $100\mu\text{m}$. **(e)** Quantification of Ly6-G positive surface area by SIOX analysis of the slides presented in **(d)**. Data are representative of two independent experiments (3 mice per group; four fields per slide). $*p < 0.05$. **(f)** CXCL2 concentrations assessment by ELISA in lung homogenates of 6hrs infected mice treated with 100ng of rIL-22 or PBS. Boxes represent median (interquartile range). Data are representative of two independent experiments ($n = 6$ per group). **(g)** IL-8 quantification by ELISA of 6-hour infected A549 cell supernatant treated or not with rIL-22 18hrs before infection. Data are representative of two independent experiments ($n = 3$ per group). $**p < 0.01$.

Discussion

In this study, we showed a correlation between the protective role of IL-22 during PA pneumonia and PMN recruitment in the lungs. Mice in which IL-22 had been neutralised displayed aggravated lung damage, increased neutrophilic response and mice susceptibility during infection. On the other hand, mice rescued with rIL-22 administration or in which IL22-BP had been neutralised showed a decrease in pulmonary damage and neutrophilic response.

In agreement with other studies addressing the role of IL-22 in the context of pathogen-induced pulmonary disease⁷, we observed a protective role of IL-22 during acute PA pneumonia in mice. However, in contrast to S.J. Aujla *et al.* in a *K. pneumoniae* pneumonia model¹⁰, pulmonary IL-22 level modulation by exogenous administration or antibody neutralisation did not affect pulmonary bacterial loads compared with the untreated animals. The absence of bacterial burden modification suggests that the protective action IL-22 is not mediated by its direct anti-bacterial properties but rather through the ability of IL-22 to modulate host inflammatory response and susceptibility. To the best of our knowledge, the role of AMP in mucosal immunity in lungs has been poorly studied. It may be hypothesized that like in the gut, RegIII- γ regulates bacterial virulence by maintaining a zone of physical separation between the mucosal surface and bacteria without the need to decrease bacterial burden²⁸. RegIII- γ could also interfere with the lung microbiome and decrease the virulence of PA.

IL-22 exhibits pro- or anti-inflammatory properties depending on the environment²⁹. In our model, IL-22 acted as an anti-inflammatory molecule since it was correlated with PMN recruitment in the lungs. Tuning appropriate host response, especially PMN recruitment in response to pathogen aggression, is critical for host survival. PMN recruitment and activation during bacterial infection is a double-edged sword³⁰. Neutropenic mice display exacerbated susceptibility of PA pneumonia³¹ and neutrophil depletion (by i.v. administration of Ly6-G neutralisation antibody) which led to a fatal lung infection in our model within 12 hours (data not shown). Failure to properly control PMN accumulation following pulmonary infection will contribute to tissue damage and ARDS^{26, 30, 32}. In the context of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Guillon *et al.* showed that PMN proteases may alter IL-22 pathways leading to an increase in tissue damage³³. The current results confirm that PA may alter the outcome of pneumonia through a massive recruitment of PMN in the lungs, thereby enhancing pulmonary lesions. Confirming these data, prophylactic administration of IL-22 correlated with a decrease in CXCL2 levels and PMN accumulation during infection. Although intra-tracheal administration of rIL-22 in the lung suggests a local effect, we cannot exclude systemic spreading of rIL-22 especially to the liver, an organ known to highly express IL22RA1. For example, in a model of pneumococcal pneumonia, G. Trevero-Nunez *et al.* demonstrated that liver-specific IL22RA1 deletion resulted in an increase of bacterial burden in the lungs³⁴.

Several studies have pointed out the correlation between CXCL2 expression and disease severity in ARDS^{35, 36}. This is consistent with the study by Hoegl *et al.* in which a diminution of CXCL2 levels in the lungs after IL-22 administration in a ventilator-induced lung injury (VILI) model in rat was observed³⁷. Moreover, current results show that IL-22-treated A549 human cell line secreted less IL-8 on infection as observed by H.A. Whittington *et al.*²⁴. In our model, IL-22 could act as an immune-modulatory cytokine with anti-inflammatory properties. It is consistent with the role of this cytokine in the VILI model of Hoegl *et al.* where the authors found, aside from CXCL2 modulation, an increase of the immune-modulatory protein SOCS3 expression after IL-22 stimulation³⁷. Finally, it has been shown that protease IV of PA alters IL-22 dependent lung defence³³, highlighting the correlation between this pathogen, IL-22 and PMN recruitment.

IL-22 is the only IL10 family member that can interact with a soluble receptor, IL22-BP, a receptor that is highly expressed in the lungs^{21, 38, 39}. IL-22 BP is a soluble inhibitor of the IL-22 receptor that could be a major regulator of IL-22 in the context of bacterial pneumonia. Neutralising IL22-BP in our model induced a decreased susceptibility of the mice to the infection, decreased lung damage and PMN recruitment as observed with the administration of recombinant IL-22. These data underlined the significant role of IL-22BP in controlling IL-22 availability during pathological conditions such as acute pneumonia. Our data are in agreement with the G. F. Weber *et al.* study in which administration of recombinant IL-22BP-Fc resulted in an increase in PMN counts in a cecal ligation puncture model of microbial sepsis⁴⁰. More recently, we showed in the imiquimod-induced psoriasis model in mice, known to be IL-22 dependent, that *in vivo* neutralisation of IL-22BP with the same neutralising antibody used in the present study led to increased severity of psoriasis-like skin inflammation⁴¹. Taken together, our data highlighted the role of the IL-22/IL-22BP system during bacterial pneumonia and the need for additional studies to assess its therapeutic interest for patients suffering from bacterial pneumonia or ARDS.

References

1. Gaynes, R. & Edwards, J. R. National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 848–854 (2005).
2. Matthay, M. A., Ware, L. B. & Zimmerman, G. A. The acute respiratory distress syndrome. *J. Clin. Invest.* **122**, 2731–2740 (2012).
3. Van Maele, L. *et al.* Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J. Infect. Dis.* **210**, 493–503 (2014).
4. Xu, X. *et al.* Conventional NK cells can produce IL-22 and promote host defense in *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *J. Immunol.* **192**, 1778–1786 (2014).
5. Hansson, M., Silverpil, E., Lindén, A. & Glader, P. Interleukin-22 produced by alveolar macrophages during activation of the innate immune response. *Inflamm. Res.* **62**, 561–569 (2013).
6. Zindl, C. L. *et al.* IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 12768–12773 (2013).
7. Dudakov, J. A., Hanash, A. M. & van den Brink, M. R. M. Interleukin-22: Immunobiology and Pathology. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 747–785 (2015).
8. Wolk, K. *et al.* IL-22 Increases the Innate Immunity of Tissues. *Immunity* **21**, 241–254 (2004).
9. Sabat, R., Ouyang, W. & Wolk, K. Therapeutic opportunities of the IL-22–IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 21–38 (2013).
10. Aujla, S. J. *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine* **14**, 275–281 (2008).

11. Zheng, Y. *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature Medicine* **14**, 282–289 (2008).
12. Gessner, M. A. *et al.* Dectin-1-dependent interleukin-22 contributes to early innate lung defense against *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **80**, 410–417 (2012).
13. Mear, J.-B. *et al.* *Candida albicans* airway exposure primes the lung innate immune response against *Pseudomonas aeruginosa* infection through innate lymphoid cell recruitment and interleukin-22-associated mucosal response. *Infect. Immun.* **82**, 306–315 (2014).
14. Dudakov, J. A. *et al.* Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* **336**, 91–95 (2012).
15. Simonian, P. L. *et al.* $\gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J. Exp. Med.* **207**, 2239–2253 (2010).
16. Radaeva, S., Sun, R., Pan, H.-N., Hong, F. & Gao, B. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* **39**, 1332–1342 (2004).
17. Sonnenberg, G. F., Fouser, L. A. & Artis, D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.* **12**, 383–390 (2011).
18. Muñoz, M. *et al.* Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrix metalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J. Exp. Med.* **206**, 3047–3059 (2009).
19. Perera, G. K. *et al.* Integrative biology approach identifies cytokine targeting strategies for psoriasis. *Science Translational Medicine* **6**, 223ra22 (2014).
20. Sonnenberg, G. F. *et al.* Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J. Exp. Med.* **207**, 1293–1305 (2010).
21. Dumoutier, L., Lejeune, D., Colau, D. & Renauld, J. C. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J. Immunol.* **166**, 7090–7095 (2001).
22. Martin, J. C. *et al.* IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal Immunol* **9**, 539–549 (2016).
23. Martin, J. C. *et al.* Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol* **7**, 101–113 (2014).
24. Whittington, H. A., Armstrong, L., Uppington, K. M. & Millar, A. B. Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**, 220–226 (2004).
25. Lorraine, B., Ware, J. A. G. W. E. F. A. M. A. M. Alveolar Epithelial Fluid Transport Capacity in Reperfusion Lung Injury after Lung Transplantation. 1–9 (1999).
26. Broquet, A., Roquilly, A., Jacqueline, C. & Potel, G. Depletion of natural killer cells increases mice susceptibility in a *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model. *Crit. Care Med.* **42**(6), e441–50 (2014).
27. Lemaire, M. M., Vanhaudendarde, A., Nizet, Y., Dumoutier, L. & Renauld, J.-C. Induction of autoantibodies against mouse soluble proteins after immunization with living cells presenting the autoantigen at the cell surface in fusion with a human type 2 transmembrane protein. *J. Immunol. Methods* **367**, 56–62 (2011).
28. Vaishnava, S. *et al.* The Antibacterial Lectin RegIII γ Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine. *Science* **334**, 255–258 (2011).
29. McAleer, J. P. & Kolls, J. K. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunol. Rev.* **260**, 129–144 (2014).
30. Pechous, R. D. With Friends Like These: The Complex Role of Neutrophils in the Progression of Severe Pneumonia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**, 119 (2017).
31. Koh, A. Y., Priebe, G. P., Ray, C., Van Rooijen, N. & Pier, G. B. Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect. Immun.* **77**, 5300–5310 (2009).
32. Williams, A. E. & Chambers, R. C. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **306**, L217–30 (2014).
33. Guillon, A. *et al.* Neutrophil proteases alter the interleukin-22-receptor-dependent lung antimicrobial defence. *Eur. Respir. J.* **46**, 771–782 (2015).
34. Trevejo-Nunez, G., Elsegeiny, W., Conboy, P., Chen, K. & Kolls, J. K. Critical Role of IL-22/IL22-RA1 Signaling in Pneumococcal Pneumonia. *J. Immunol.*, doi:10.4049/jimmunol.1600528 (2016).
35. Miller, E. J. *et al.* Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**, 427–432 (1992).
36. Miller, E. J., Cohen, A. B. & Matthay, M. A. Increased interleukin-8 concentrations in the pulmonary edema fluid of patients with acute respiratory distress syndrome from sepsis. *Crit. Care Med.* **24**, 1448–1454 (1996).
37. Hoegl, S. *et al.* Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**, 369–376 (2011).
38. Kotenko, S. V. *et al.* Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J. Immunol.* **166**, 7096–7103 (2001).
39. Xu, W. *et al.* A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *PNAS* **98**, 9511–9516 (2001).
40. Weber, G. F. *et al.* Inhibition of interleukin-22 attenuates bacterial load and organ failure during acute polymicrobial sepsis. *Infect. Immun.* **75**, 1690–1697 (2007).
41. Martin, J. C. *et al.* Limited Presence of IL-22 Binding Protein, a Natural IL-22 Inhibitor, Strengthens Psoriatic Skin Inflammation. *J. Immunol.* **198**, 3671–3678 (2017).

Acknowledgements

This work was supported only by institutional funds. We thank the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for assistance in histological sample preparation and analysis.

Author Contributions

conceived and designed the experiments: A.B. and K.A. Performed the experiments: A.B., C.J., M.D., A.B., J.M. and M.H. Analysed the data: A.B., J.M. and K.A. Contributed reagents/materials/analysis tools: J.C., L.D., J.C.R. and R.J. Wrote the paper: A.B., J.M. Edited the paper: C.J., A.R., J.C., L.D., J.C.R., R.J. and K.A. Statistical analysis: A.B.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-11518-0

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Thèse de Doctorat

Anissa BESBES

Physiopathologie de la pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* :

Implication des cellules épithéliales alvéolaires

via l'IL-22 et l'échappement immunitaire

Physiopathology of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia:

Involvement of alveolar epithelial cells through IL-22 and role of the immune escape

Résumé

Pseudomonas aeruginosa (PA) est un pathogène opportuniste responsable de pneumonies nosocomiales chez les patients immunodéprimés. L'émergence des souches multirésistantes rend les traitements antibiotiques inefficaces nécessitant la mise en place de thérapeutiques alternatives.

Les cellules épithéliales alvéolaires (AEC) constituent la première barrière physique que rencontre PA et ces cellules jouent un rôle important dans la réponse innée suite à l'infection. L'interleukine(IL)-22 est une cytokine dont l'intérêt thérapeutique est prometteur de par son action de protection des épithéliums. Le renforcement de la barrière épithéliale par le traitement à l'IL-22 a montré des effets protecteurs contre l'infection à PA dans un modèle murin de pneumonie. Nous avons caractérisé l'action *in vitro* de l'IL-22 au cours de l'infection à PA en utilisant une lignée transformée d'AEC de type II et nous avons démontré que cette cytokine potentialise l'expression d'interférons lambda (IFN- λ) connus pour être bénéfiques au cours des infections virales. L'administration *in vivo* d'IFN- λ dans un modèle murin de pneumonie aiguë à PA montre une amélioration significative de la pathologie accompagnée d'une réduction du recrutement de polynucléaires neutrophiles.

PA est un pathogène capable d'échappement immunitaire lors de la mise en place de la réponse de l'hôte au cours de l'infection. En développant *ex vivo* un modèle de granulome à PA, nous avons observé une augmentation d'expression des molécules PD-L1 sur les monocytes. Ceci suggère une implication de la voie PD-1/PD-L1 dans l'épuisement lymphocytaire au cours de l'infection à PA.

Mots clés :

***Pseudomonas aeruginosa*, pneumonie, Cellules épithéliales alvéolaires (AECs), Interleukine-22 (IL-22), Interféron lambda (IFN- λ), granulome, Programmed death-ligand 1(PD-L1)**

Abstract

Pseudomonas aeruginosa (PA) is an opportunistic pathogen, and a leading cause of nosocomial infections. Emergence of multidrug resistant strains alter antibiotic efficacy and requires the development of alternative therapeutics.

Alveolar epithelial cells (AEC) are the first line of defence against PA and play a crucial role in initiating immune response following infection. Interleukin (IL)-22 is cytokine recently discovered acting specifically onto epithelial cells. IL-22 is a promising therapeutic when considering its epithelium protective action during infections. Reinforcement of epithelial barrier by IL-22 treatment showed protective effects against PA in a murine pneumonia model. We here characterized the *in vitro* IL-22 effects during PA infection by using transformed cell line of AEC type II and showed enhanced Interferons lambda (IFN- λ) production, which are known to be protective against viral infection. *In vivo* IFN- λ administration in a murine model of acute PA pneumonia showed significant pathology improvement and dampened neutrophil recruitment.

PA is a pathogen able to interfere and to escape the host response during infection. To study the mechanisms of immune escape and subversion of PA during host response, we developed an *in vitro* granuloma model following PA infection. We showed a significant induction of PD-L1 expression in monocytes suggesting a PD-1/PD-L1 involvement in T cells exhaustion during PA infection.

Key Words :

***Pseudomonas aeruginosa*, pneumonia, Alveolar epithelial cells (AEC), Interleukine-22 (IL-22), Interferon lambda (IFN- λ), granuloma, Programmed death-ligand 1 (PD-L1)**