

Table des matières

LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	14
LISTE DES ABREVIATIONS	15
AVANT-PROPOS.....	17
ÉTAT DE L'ART.....	19
I- L'IMMUNITE INNEE DES VOIES AERIENNES INFERIEURES	19
1. Introduction	19
2. Les composants cellulaires	20
a. Une barrière physique aux pathogènes : les épithéliums de surface	20
i. Les cellules épithéliales des bronches et bronchioles.....	21
ii. Les cellules épithéliales des alvéoles.....	23
b. Les macrophages alvéolaires	24
c. Les cellules dendritiques	26
d. Les cellules <i>natural killer</i>	27
e. Les cellules de l'immunité innée recrutées : les polynucléaires neutrophiles	27
3. Le système de reconnaissance des pathogènes.....	28
a. Les <i>toll like receptors</i>	29
b. Les <i>C-type lectin receptors</i>	31
c. Les <i>nucleotide oligomerisation domain like receptors</i>	34
d. Les récepteurs sécrétés	35
e. Autres pattern recognition receptors.....	39
4. Médiateurs antimicrobiens des voies aériennes.....	39
a. Le système du complément	39
b. Les peptides et protéines antimicrobiens.....	40
c. Les molécules oxydantes.....	42
d. Les enzymes	43
e. Les cytokines	44
5. La régulation de l'immunité innée pulmonaire par le microbiote	46
6. Place des cellules épithéliales bronchiques dans la défense antimicrobienne pulmonaire....	47
7. Pathologies respiratoires chroniques et infections.....	48
a. La bronchopneumopathie chronique obstructive	49
b. La mucoviscidose	49
II- LA MEMOIRE DE L'IMMUNITE INNEE.....	52
1. Analyse historique	52
2. Cellules de l'immunité innée capables de mémoriser	57
a. Cellules matures de la lignée hématopoïétique	57
b. Cellules souches hématopoïétiques	58
c. Cellules épithéliales.....	59
3. Mécanismes en jeu	60
a. L'épigénétique.....	60
b. Le métabolisme cellulaire.....	64

OBJECTIFS DU TRAVAIL	68
MISE AU POINT DU MODELE.....	69
RESULTATS	72
I- MISE EN EVIDENCE DE LA MEMOIRE IMMUNITAIRE INNÉE DES CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES.....	72
II- ANALYSES COMPLEMENTAIRES	74
1. Effet de la pré-exposition des CEB à d'autres PAMP sur la mémoire innée	81
a. Matériels et méthodes.....	81
b. Résultats	81
2. Implication de TLR5 dans la tolérance et le <i>training</i> induit par la flagelline.....	83
a. Matériels et méthodes.....	83
b. Résultats	84
3. Conclusion.....	85
III- IMPACT DE LA MEMOIRE INNÉE DES CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES INDUITE PAR LA FLAGELLINE SUR LA REPONSE A DIFFERENTS PATHOGENES FONGIQUES	86
1. Contexte de l'étude et objectifs	86
2. Résultats	87
3. Conclusion.....	87
IV- ANALYSE DES MODIFICATIONS TRANSCRIPTOMIQUES ET EPIGENETIQUES ASSOCIEES A LA MEMOIRE DE L'IMMUNITE DES CEB	110
1. Contexte de l'étude.....	110
2. Matériel et méthodes	110
a. Culture cellulaire et stimulation	110
b. Purification de l'ARN et transposition de l'ADN	111
c. Préparation des librairies et séquençages	111
d. Analyses ATAC-seq et annotation des pics	113
e. Analyse statistique des pics	114
f. Analyse des données ATAC-seq	114
g. Analyse des données issues du microarray.....	115
h. Analyse de l'activité des facteurs de transcription	116
3. Résultats	116
a. Validation des conditions expérimentales	116
b. Partie 1 : Analyse du génome complet	117
i. Analyse différentielle de l'ATAC-seq.....	117
ii. Description globale du transcriptome.....	121
iii. Association entre les données épigénétiques et le transcriptome	122
iv. Caractérisation de l'activité des facteurs de transcription	124
c. Partie 2 : Analyse gènes spécifiques.....	127
4. Conclusion.....	129
DISCUSSION	131
ANNEXES	141
I- ANNEXE 1 : ROLE DES CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES DANS LA REPONSE IMMUNE PULMONAIRE ANTI-ASPERGILLAIRE	141

II- ANNEXE 2 : ETUDE DE L'IMPACT DE LA PRE-INFECTION DES CELLULES EPITHELIALES RESPIRATOIRES PAR PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUR LE RISQUE DE DEVELOPPER UNE FORME SEVERE DE COVID-19	143
1. Contexte scientifique et objectifs	155
2. Résultats	155
III- ANNEXE 3 : REVUE DES CONNAISSANCES SUR LE ROLE DE SLC6A14 DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE PULMONAIRE ET GASTROINTESTINALE DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE	179
IV- ANNEXE 4 : VALORISATIONS	181
1. Communications orales et affichées.....	195
2. Publications	196
a. Publiées	196
b. En révision.....	196
3. Prix	196
4. Formations non obligatoires dans le cadre du parcours doctoral	197
BIBLIOGRAPHIE	199
ABSTRACT	217
RESUME	218

Liste des figures

<i>Figure 1 : L'appareil respiratoire est partagé entre les voies aériennes supérieures et inférieures, délimitées par la trachée.</i>	19
<i>Figure 2 : Les complexes jonctionnels intercellulaires au niveau de l'épithélium des voies aériennes ; les jonctions serrées, adhérentes, communicantes et les desmosomes.</i>	21
<i>Figure 3 : Représentation schématique de la composition cellulaire d'un épithélium trachéo-bronchique et d'un épithélium bronchiolaire.</i>	22
<i>Figure 4 : Représentation d'un épithélium alvéolaire. Adaptée de (Whitsett et Alenghat 2014).</i>	24
<i>Figure 5 : Fonctions des macrophages alvéolaires impliquées dans l'immunité innée (en bleu), dans l'immunité adaptative (en orange) et dans la réparation tissulaire (en vert).</i>	25
<i>Figure 6 : Induction de la réponse immunitaire des cellules dendritiques (CD).</i>	26
<i>Figure 7 : Bactéries capturées dans des NET. Microscopie électronique à balayage de neutrophiles humains incubés avec Salmonella,</i>	28
<i>Figure 8 : Voies de signalisation des Toll-like receptors humains.</i>	31
<i>Figure 9 : Voies de signalisation des C-type lectine receptors.</i>	33
<i>Figure 10 : Les quatre grandes fonctions des NLR : autophagie, transduction de signaux, activation de la transcription et formation de l'inflammasome.</i>	35
<i>Figure 11 : Schéma simplifié des trois voies d'activation du complément.</i>	40
<i>Figure 12 : Prévalence des bactéries respiratoires dans la mucoviscidose, par catégories d'âge.</i>	50
<i>Figure 13 : Mortalité mondiale en morts par million d'habitants, due à la COVID 19 (A) et programme de vaccination du BCG (B).</i>	54
<i>Figure 14 : Taux de survie des souris SCID infectées par une souche de C. albicans vivante par voie intraveineuse.</i>	55
<i>Figure 15 : Nombre de publications par année, issues de la recherche dans Pubmed des mots clés « innate immune memory », de 1980 à 2020.</i>	57
<i>Figure 16 : Différents types de modifications épigénétiques : modifications biochimiques des histones, méthylation de l'ADN et micro-ARN.</i>	61
<i>Figure 17 : Principe de l'ATAC-seq.</i>	62
<i>Figure 18 : Principe du ChIP-seq.</i>	62
<i>Figure 19 : Modèle d'activation métabolique des monocytes pré-stimulés par le β-glucane (training), caractérisé par une augmentation forte de la glycolyse aérobie, une diminution de la phosphorylation oxydative et une modulation des métabolites du cycle de Krebs.</i>	66
<i>Figure 20 : Schéma récapitulatif des deux phénotypes opposés observés après stimulation de monocytes pré-exposés au LPS, au β-glucane ou au BCG ; training (en rouge) et tolérance (en vert).</i>	67
<i>Figure 21 : Protocole général suivi, de la mise en culture des cellules en plaques au prélèvement des surnageants, à partir desquels sont dosés les différents paramètres inflammatoires et infectieux.</i>	69
<i>Figure 22 : Synthèse d'IL-8 (A et C) et d'IL-6 (B et D) suite à la stimulation pendant 15 heures par 0,1 μg/mL de flagelline (A et B), ou 100 ng/mL de PIC (C et D), de CEB pré-stimulées ou non par différentes concentrations de flagelline de P. aeruginosa (A et B) ou d'ODN (C et D).</i>	83

<i>Figure 23 : Illustration du protocole utilisé pour l'étude de l'implication du TLR5 dans la mémoire induite par la flagelline.</i>	84
<i>Figure 24 : Effet de l'inhibition de TLR5 sur sur la mémoire des CEB pré-exposées à la flagelline.</i>	85
<i>Figure 25 : Plan suivi pour cette étude. CEB : cellules épithéliales bronchiques, CF : Cystic fibrosis, LDH : lactate déshydrogénase</i>	87
<i>Figure 26 : Illustration du protocole mis en place pour la caractérisation des régions accessibles de la chromatine par ATAC-seq et l'analyse de l'expression des ARN messagers par microarray.</i>	111
<i>Figure 27 : Profil des reads obtenus pour les différentes tailles de fragments séquencés par ATAC-seq.</i>	113
<i>Figure 28 : Représentation schématique des pics, correspondant aux fragments d'ADN quantifiés par ATAC-seq dans les régions accessibles de la chromatine.</i>	113
<i>Figure 29 : Représentation du principe de l'annotation des pics identifiés par ATAC-seq.</i>	114
<i>Figure 30 : Analyse en composante principale.</i>	116
<i>Figure 31 : Synthèse d'IL-8 (en haut) et IL-6 (en bas) suite à une infection par A. fumigatus, de CEB pré-stimulées ou non par la flagelline.</i>	117
<i>Figure 32 : Upset plot représentant les pics différemment accessibles (DA) entre J2 (D2) ou J6 (D6) versus (vs) J0 (D0), avec ou sans pré-stimulation par la flagelline (F).</i>	118
<i>Figure 33 : Profils d'accessibilité des pics Memory Flagellin (A) et Control (B), au cours du temps avec (+ Flagellin) ou sans (- Flagellin) pré-stimulation par la flagelline.</i>	120
<i>Figure 34 : Analyse fonctionnelle des données transcriptomiques par analyse « gene set enrichment analysis » (GSEA) avec la base de données REACTOME.</i>	122
<i>Figure 35 : Distribution de la proportion des pics Memory Flagellin (A) ou Control (B) parmi chaque catégorie d'ensemble de gènes enrichis.</i>	124
<i>Figure 36 : Analyse de l'activité des facteurs de transcription (FT) au cours du temps et en fonction de la pré-stimulation.</i>	125
<i>Figure 37 : Diagramme de Venn des gènes différemment exprimés en fonction des comparaisons étudiées, avec les gènes différemment surexprimés (à gauche « up ») et les gènes différemment sous-exprimés (à droite « down ») ($p < 0,05$).</i>	127
<i>Figure 38 : Diagramme de Venn croisant les gènes prédis comme étant associés aux 608 pics Memory Flagellin (bleu) et les 1887 gènes spécifiquement modulés par la flagelline issus des données du transcriptome (jaune).</i>	128
<i>Figure 26 : Schéma récapitulatif des effets de la pré-stimulation par la flagelline sur des stimulations secondaires avec le LPS d'E. coli ou de P. aeruginosa, la flagelline de P. aeruginosa et les bactéries P. aeruginosa et S. maltophilia sur la synthèse d'IL-8 et d'IL-6.</i>	132

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Toll-like receptors (TLR) et leurs ligands naturels ou synthétiques.</i>	29
<i>Tableau 2 : Les C-type lectin receptors (CLR) et leurs ligands naturels ou synthétiques.</i>	32
<i>Tableau 3 : Sous-familles des NOD-Like receptors et leurs ligands.</i>	34
<i>Tableau 4 : Les PRR sécrétés au niveau pulmonaire, leur principale source cellulaire, leur PAMP et les micro-organismes reconnus.</i>	38
<i>Tableau 5 : Les principaux peptides et protéines antimicrobiens présents au niveau pulmonaire.....</i>	42
<i>Tableau 6 : Bilan des différentes combinaisons de PAMP utilisés pour les pré-stimulations, ainsi que les PRR stimulés par chacun entre parenthèses.....</i>	82
<i>Tableau 7 : Analyse du nombre de gènes différentiellement exprimés entre les cellules épithéliales bronchiques pré-stimulées (J2F et J6F) ou non par la flagelline (J2 et J6) par rapport à J0.....</i>	121
<i>Tableau 8 : Liste des facteurs de transcription (FT) actifs ou inactifs strictement en présence de flagelline, à J6F vs J0 ou en communs à J2F et J6F vs J0.</i>	126
<i>Tableau 9 : Croisement des listes de gènes, de pics Memory Flagellin et de facteurs de transcription spécifiquement modulés par la flagelline.</i>	129

Liste des abréviations

A

ABPA : Aspergillose bronchopulmonaire allergique

ACE2 : Récepteur de l'*Angiotensin-Converting Enzyme 2*

AIM2 : *Absent in melanoma 2*

ALI : Interface air-liquide

AMCase : *Acid mammalian chitinase*

AP-1 : *Activating protein-1*

ASC : *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

ATAC-seq : *Assay for transposase-accessible chromatin with sequencing*

B

BCG : Bacille Calmette et Guérin

BCL10 : *B-cell lymphoma/leukemia 10*

BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive

C

CAM : Complexe d'attaque membranaire

CARD9 : *Caspase recruitment domain containing protein 9*

CC : Protéine des cellules Club

CCR : Récepteur de chimiokine

CD : Cellule dendritique

CEB : Cellule épithéliale bronchique

CF : *Cystic Fibrosis*

CFTR : *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CFU : unités formant colonies

CLP : « *Chitinase-like* » protéines

CLR : *C-type lectin receptors*

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

COVID-19 : Coronavirus Infectious Disease 2019

CPA : Cellules présentatrices d'antigène

CSPH : Cellules souches progénitrices hématopoïétiques

D

DA : Différentiellement accessible

E

ERK : *Extracellular signal-regulated protein kinase*

F

FT : Facteur de transcription

G

G-CSF : *Granulocyte colony stimulating factor*

GM-CSF : *Granulocyte macrophage colony stimulating factor*

H

HIF : *Hypoxia Inducible Factor*

I

IFN : Interféron

IgA : Immunoglobuline A

IKK : I κ B Kinases

IL : Interleukine

IL-1Ra : *IL-1 receptor antagonist*

IMQ : imiquimod

IRAK-4 : *IL-1 receptor-associated kinase-4*

IRAK-M : *IL-1 receptor-associated kinase M*

ITAM : *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

J

JMM : *Jumonji domain-containing*

L

LBP : *LPS binding protein*

LDH : Lactate deshydrogénase

LPS : Lipopolysaccharide

LRR : *Leucin-rich Repeat*

M

Mal : *MyD88 adaptor-like*

MALT1 : *Mucosa-associated lymphoid tissue 1*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*

MBL : *Mannose-binding lectin*

MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein*

MDA5 : *Melanoma differentiation-associated gene 5*

MIP : *Macrophage inflammatory protein*

MOI : *Multiplicity of infection*, nombre de pathogènes par cellules

mTOR : *mechanistic target of rapamycin*

MyD88 : *Myeloid differentiation primary response gene 88*

N

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NES : *Normalized enrichment score*

NET : *Neutrophils Extracellular Traps*

NK : *Natural Killer*

NLR : *NOD-like receptors*

NOD : *Nucleotide oligomerisation domain*

P

PAM : Peptides antimicrobiens

PAMP : *Pathogen-associated molecular patterns*

PCL : Couche de liquide périciliaire

PLA2 : Phospholipase A2

PNN : Polynucléaires neutrophiles

PRR : *Pattern-recognition receptors*

PTX3 : Pentraxine 3

R

RIG : *Retinoic acid inducible gene*

RLR : *RIG-I-like receptors*

ROS : *Reactive oxygen species*

S

SAR : *Systemic acquired resistance*

SARS-CoV-2 : *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SLPI : *Secretory leucoprotease inhibitor*

SP : *Surfactant protein*

Syk : *Spleen Tyrosine Kinase*

T

TIR : *Toll/IL1 Receptor domain*

TIRAP : *TIR domain-containing adaptor protein*

TMRSS2 : *Transmembrane protease serine 2*

TNF- α : *Tumor necrosis factor*

TRAF6 : *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*

TRAM : *TRIF-related adaptor molecule*

TRIF : *TIR domain-containing adaptor inducing interferon β*

TSS : *Transcription start site*

Avant-propos

Au cours de l'évolution, la défense immunitaire, notamment dirigée contre les micro-organismes de l'environnement, s'est raffinée avec le développement d'une réponse dite adaptative. Celle-ci permet en cas de seconde rencontre avec un pathogène, la mise en place de mécanismes spécifiquement dirigés contre l'agresseur aboutissant à son éradication plus rapide et plus efficace.

La notion de mémoire immunitaire qui caractérise la réponse adaptative a été récemment élargie à la réponse innée. Chez les mammifères et dans les organismes dépourvus d'immunité adaptative, tels que les insectes ou les plantes, le système immunitaire inné peut être responsable d'une résistance à la réinfection. On observe ainsi, selon les cas, une réponse inflammatoire secondaire exacerbée (on parle alors de *training*) ou au contraire réprimée (on parle de tolérance immunitaire). De manière remarquable, il a été montré que cette mémoire n'était pas spécifique du premier stimulus infectieux. L'étude des mécanismes soustendant cette mémoire de l'immunité innée a montré que celle-ci reposait notamment sur une reprogrammation épigénétique avec un remodelage de la chromatine.

La possibilité de modulation de la réponse innée par un premier stimulus ouvre de nouveaux horizons thérapeutiques dans le domaine de la vaccinologie ou de certaines pathologies inflammatoires chroniques comme la mucoviscidose. Cette maladie génétique, due à des mutations du gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) exprimé par les cellules épithéliales, est caractérisée au niveau bronchique par une inflammation chronique combinée à la colonisation par de nombreux micro-organismes inhalés tant bactériens que fongiques. Le rôle des cellules épithéliales bronchiques est essentiel dans la réponse immunitaire innée anti-infectieuse et inflammatoire.

Il était donc tentant d'examiner l'existence d'une mémoire de l'immunité au sein des cellules bronchiques épithéliales dont on reconnaît le rôle essentiel dans la modulation de la réponse inflammatoire et dans l'élimination des pathogènes inhalés.

État de l'art

I- L'immunité innée des voies aériennes inférieures

1. Introduction

Les voies aériennes ont pour principal rôle de délivrer l'oxygène aux alvéoles pulmonaires qui constituent le lieu des échanges gazeux avec le sang. On distingue les voies aériennes supérieures constituées de la bouche, du nez, du larynx et du pharynx et, dans leur prolongement, les voies aériennes inférieures. Ces dernières débutent par la trachée qui se divise en deux bronches souches qui, à leur tour, vont se subdiviser en plusieurs bronches puis bronchioles et finir avec les alvéoles (**Figure 1**).

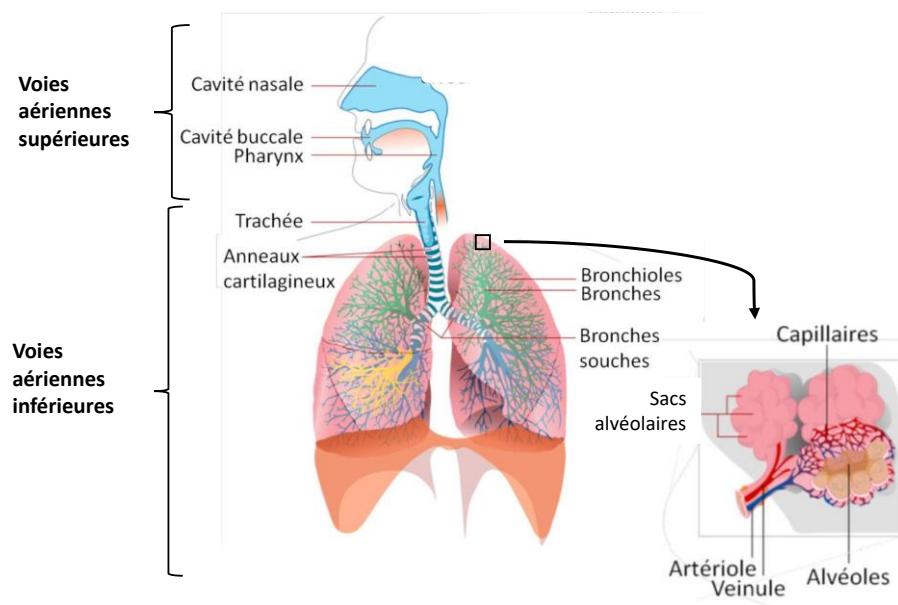


Figure 1 : L'appareil respiratoire est partagé entre les voies aériennes supérieures et inférieures, délimitées par la trachée. Adapté de www.commons.wikimedia.org

Outre leur rôle dans l'absorption de l'oxygène, le rejet du dioxyde de carbone, le réchauffement et l'humidification de l'air inhalé, les voies aériennes participent activement à la filtration des substances nocives et des agents pathogènes présents dans l'air ambiant. En effet, avec 10 000 à 15 000 litres d'air inhalés par jour, elles sont constamment exposées à une grande variété de particules et micro-organismes. Afin de maintenir le rôle essentiel des alvéoles pulmonaires dans les échanges gazeux, un système complexe de protection est mis en place le long des voies aériennes. Il est composé d'un large arsenal de mécanismes de défenses cellulaires et humorales, efficaces et finement régulés, dont la plupart appartiennent au système immunitaire innée (Hartl et al. 2018). En effet, l'immunité comprend deux composantes, l'une innée et l'autre adaptative (acquise), agissant de manière complémentaire pour lutter contre les agressions. L'immunité innée est une réponse immédiate qui survient chez tout individu en l'absence d'immunisation préalable ; elle constitue la première barrière de défense vis-à-vis des

agents pathogènes. Elle est en grande partie assurée par des cellules phagocytaires (monocytes, polynucléaires) et des lymphocytes *natural killer* qui ne possèdent pas de récepteur spécifique d'un antigène donné mais expriment des récepteurs se liant à plusieurs composés bactériens, viraux ou fongiques. Contrairement à l'immunité innée, le développement d'une immunité adaptative vis-à-vis d'un ou plusieurs antigène(s) découle de leur reconnaissance par des lymphocytes B ou T, dotés de récepteurs spécialisés, qui entraîne leur prolifération et leur différenciation en cellules effectrices. C'est le cas des lymphocytes T, qui ne peuvent détecter l'antigène que sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II exprimées à la surface de cellules présentatrices, comme les cellules dendritiques. Les caractéristiques spécifiques de l'immunité adaptative ne seront pas abordées dans la suite de ce manuscrit.

L'élimination d'une partie des particules inhalées a lieu au niveau des voies aériennes supérieures grâce à la clairance muco-ciliaire des parois nasales, et aux moyens de défense mécanique comme la toux et l'éternuement. Les particules qui passent cette première barrière arrivent alors au niveau des voies aériennes inférieures où les différents composants de l'immunité innée interviennent.

2. Les composants cellulaires

a. Une barrière physique aux pathogènes : les épithéliums de surface

Les voies respiratoires sont tapissées par un épithélium qui représente la plus large surface du corps en contact avec l'environnement extérieur (Dickson, Martinez, et Huffnagle 2014) et dont le rôle est d'empêcher le passage des particules et pathogènes inhalés vers les tissus sous-jacents. Les complexes jonctionnels intercellulaires, les jonctions serrées, adhérentes, communicantes et les desmosomes, assurent le maintien de l'intégrité et donc de l'étanchéité de la barrière épithéliale (Adam et al. 2014) (**Figure 2**). Au niveau apical, les jonctions serrées permettent l'adhésion des cellules entre elles pour former une barrière imperméable. Elles sont constituées de protéines telles que les *zonula occludens* (1 et 2), les *claudines* et l'*occludine*, qui interagissent avec le cytosquelette d'actine des cellules. Immédiatement en dessous d'elles se trouvent les jonctions adhérentes, composées de β -caténine et E-cadhérine, qui relient mécaniquement les cellules adjacentes et initient la prolifération et la différenciation (Invernizzi, Lloyd, et Molyneaux 2020). Les jonctions communicantes permettent une communication directe entre les cytoplasmes des cellules adjacentes et ainsi le passage d'électrolytes et de petites molécules. Enfin, les desmosomes sont des jonctions d'ancre qui permettent l'attachement d'une cellule et de son cytosquelette à la cellule voisine.

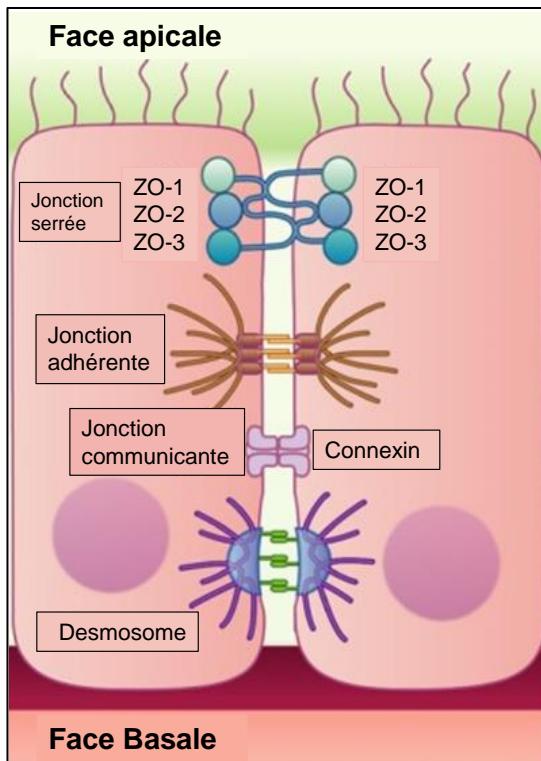


Figure 2 : Les complexes jonctionnels intercellulaires au niveau de l'épithélium des voies aériennes ; les jonctions serrées, adhérentes, communicantes et les desmosomes. ZO : zonula occludens. Adaptée de (Invernizzi, Lloyd, et Molyneaux 2020).

i. Les cellules épithéliales des bronches et bronchioles

De la trachée aux bronches, l'épithélium est pseudostratifié et composé de plusieurs types cellulaires, tous ancrés à une lame basale (**Figure 3**). Cet épithélium est constitué principalement de cellules ciliées et de cellules sécrétrices de mucus, aussi appelées cellules caliciformes, qui contribuent à la fonction de barrière et recouvrent des cellules basales plus petites. L'épithélium des voies aériennes inférieures se poursuit avec celui des bronchioles proximales, toujours pseudostratifié, dans lequel on voit apparaître un autre type de cellules sécrétoires, les cellules Club, alors que les cellules basales se raréfient. Enfin, les bronchioles les plus distales sont bordées par un épithélium cuboïde simple, constitué d'une seule couche de cellules Club, et dépourvu de cellules basales. L'ensemble de ces cellules est recouvert d'un liquide de surface des voies aériennes, qui se compose de deux parties : une couche de mucus qui emprisonne les particules inhalées, et une couche de liquide périciliaire de faible viscosité qui lubrifie les surfaces des voies respiratoires et facilite le battement des cils pour une élimination efficace du mucus (Bustamante-Marin et Ostrowski 2017).

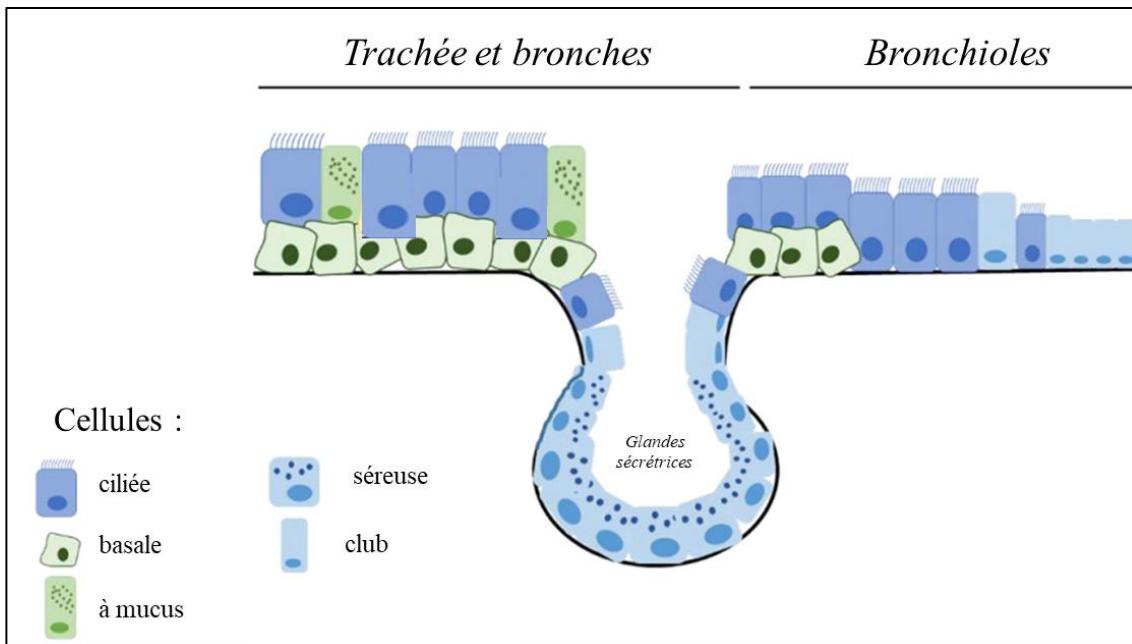


Figure 3 : Représentation schématique de la composition cellulaire d'un épithélium trachéo-bronchique et d'un épithélium bronchiolaire.

Les cellules basales présentent des propriétés de cellules progénitrices, montrant non seulement une capacité d'auto-renouvellement et d'expansion clonale, mais donnant également naissance aux cellules ciliées et sécrétoires (Invernizzi, Lloyd, et Molyneaux 2020). Le phénomène se produit aussi bien à l'état physiologique qu'à des fins de réparation, lors de lésions de l'épithélium.

Les cellules ciliées représentent plus de 50% des cellules épithéliales des voies aériennes (Spina 1998). Elles portent à leur surface apicale des cils permettant le transport des particules et pathogènes, piégés par le mucus (Bellanger 2010). Au niveau bronchique, ce mucus est synthétisé en partie par les cellules caliciformes. Cependant ce sont les glandes séreuses, muqueuses ou mixtes, présentes le long des voies aériennes sous la lame basale sur laquelle repose l'épithélium, qui synthétisent majoritairement le mucus (Bustamante-Marin et Ostrowski 2017). Le mucus est sécrété en réponse à différents signaux, appelés secrétagogues, comme les neurotransmetteurs, les neuropeptides, mais aussi en réponse à des signaux inflammatoires et infectieux comme les leucotriènes ou l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* (Rose et Voynow 2006). Dans les conditions physiologiques, le mucus est composé de 97 % d'eau et de 3 % de mucines, de protéines non muqueuses (peptides antimicrobiens, immunoglobulines), d'électrolytes (Na ou KCl), de lipides (phospholipides principalement, comme la phosphatidyle choline ou le phosphatidyle glycerol) (Fahy et Dickey 2010; Bansil et Turner 2018), et se présente sous la forme d'un gel visco-élastique. La formation du gel est largement attribuée aux mucines gélifiantes qui captent et retiennent l'eau (Demouveaux et al. 2018). En effet, il existe trois classes de mucines dans les voies aériennes : celles qui sont sécrétées mais ne polymérisent pas (MUC7), celles qui sont sécrétées et polymérisent pour former des gels (MUC5AC et MUC5B), et celles qui ont des domaines transmembranaires et sont associées à la surface cellulaire (MUC1, MUC4, MUC16, MUC20) (Ma,

Rubin, et Voynow 2018). MUC5AC et MUC5B sont de grandes glycoprotéines avec des domaines riches en sérine/thréonine liés par leurs groupes latéraux hydroxyles aux chaînes polysaccharidiques formant un gel polymérique qui assure les propriétés du mucus (Cowley et al. 2017). Ainsi, le mucus synthétisé par les cellules caliciformes et les glandes sous-muqueuses piège les particules et pathogènes inhalés, et le battement coordonné des cils des cellules ciliées les transporte vers les voies aériennes supérieures où ils seront déglutis ou expectorés. Tous ces acteurs contribuent donc directement à la clairance mucociliaire de l'épithélium et donc à l'élimination des pathogènes. Outre son rôle de barrière physique, le mucus participe également à la défense antibactérienne, antioxydante et antiprotéasique de l'épithélium des voies aériennes grâce aux molécules antimicrobiennes (IgA sécrétaires, lactoferrine, lysozyme, ...) qu'il contient (Coraux et al. 2005) et dont le rôle sera abordé dans la partie I-4b. de ce document.

Les cellules Club, nouvelle appellation des cellules de Clara (Winkelmann et Noack 2010), sont principalement localisées au niveau de l'épithélium bronchiolaire (**Figure 3**). Elles ont la particularité d'exprimer un niveau très élevé de cytochrome P450 oxydase, ce qui leur permet de jouer un rôle crucial dans la détoxication des xénobiotiques au niveau pulmonaire (Laacho-Contreras et al. 2016). Les cellules Club sont les principales sécrétrices de la protéine des cellules Club (CC)-16 contenue dans des granules denses aux électrons, et qui constitue la protéine la plus abondante dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire prélevé chez des volontaires sains (Laacho-Contreras et al. 2016). Cette protéine qui peut diffuser dans le compartiment sanguin, possède un rôle anti-fibrotique et anti-inflammatoire. En effet, CC-16 est décrite pour inhiber l'activité de la phospholipase A2 (PLA2), une enzyme impliquée dans la régulation de l'immunité en catalysant la synthèse des eicosanoïdes et thromboxanes (Pang et al. 2017) et dans la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales des voies aériennes, et principalement l'IL-8 (Laacho-Contreras et al. 2016). Xu *et al.* ont aussi montré que CC-16 agissait sur les polynucléaires neutrophiles (PNN) en diminuant leur capacité de migration, essentielle lors de leur recrutement sur les sites d'infection (Xu et al. 2019).

En plus de leur rôle de barrière mécanique et physique, les cellules épithéliales des voies aériennes sont capables de détecter des pathogènes et de participer activement à la défense immunitaire innée (Roach et al. 2005). Ceci sera détaillé dans la partie I-6. de ce manuscrit.

ii. Les cellules épithéliales des alvéoles

Malgré les différents mécanismes mis en jeu au niveau des voies aériennes supérieures, des bronches et des bronchioles, certaines particules ou pathogènes inhalés, de très petite taille, peuvent atteindre les alvéoles.

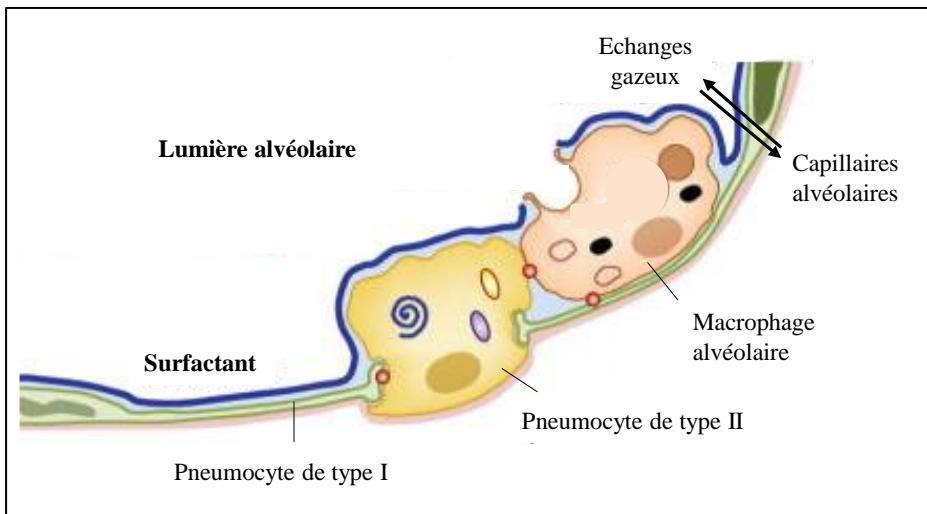


Figure 4 : Représentation d'un épithélium alvéolaire. Adaptée de (Whitsett et Alenghat 2014).

Au niveau alvéolaire, l'épithélium est composé de deux types cellulaires : les pneumocytes de type I et de type II (**Figure 4**). Les premiers présentent la particularité de ne pas se diviser (Naeem, Rai, et Pierre 2020) et d'avoir un cytoplasme très aplati et étendu permettant des échanges gazeux efficaces avec les vaisseaux capillaires dont ils ne sont séparés que par la lame basale. Les pneumocytes de type II sont, au contraire, compacts, cuboïdes et présentent des microvillosités au niveau apical. Ils sont capables de se diviser et de se différencier en pneumocytes de type I (Naeem, Rai, et Pierre 2020). Ils possèdent des corps lamellaires, qui contiennent le surfactant pulmonaire, un matériel sécrété continuellement dans la lumière alvéolaire par les pneumocytes de type II mais aussi par les cellules Club au niveau bronchiolaire. Constitué de 90 % de lipides et de 10 % de protéines, le rôle principal du surfactant est de réduire la tension superficielle afin de faciliter l'expansion des alvéoles à l'inspiration et de maintenir leur forme à l'expiration. Il est constitué de quatre protéines, ou SP pour *surfactant proteins*, SP-A et SP-B hydrophiles, et SP-C et SP-D hydrophobes. SP-A et SP-D sont des collectines (S. Han et Mallampalli 2015), appartenant à la superfamille des lectines de type C qui reconnaissent et se lient à des structures glycoconjuguées présentes dans les parois cellulaires de certains micro-organismes, entraînant ainsi leur neutralisation ou opsonisation (Watson et al. 2018).

b. Les macrophages alvéolaires

En plus des pneumocytes, on retrouve, au niveau alvéolaire, des cellules phagocytaires résidentes, les macrophages (**Figure 4**). Ils sont situés dans la lumière des alvéoles mais aussi au niveau de l'interstitium inter-alvéolaire (Kopf, Schneider, et Nobs 2015). Ces cellules, issues des cellules souches hématopoïétiques, sont les cellules de l'immunité innée les plus abondantes dans le parenchyme pulmonaire distal à l'état basal (Allard, Panariti, et Martin 2018). Comme les autres macrophages tissulaires résidents, capables de vivre quelques mois voire des années (Naeem, Rai, et Pierre 2020), les macrophages alvéolaires remplissent également des fonctions homéostatiques permettant de maintenir un échange gazeux optimal (Joshi, Walter, et Misharin 2018). Ainsi, dans l'alvéole, les macrophages

jouent un rôle important aussi bien dans l'élimination des pathogènes et des particules inhalées (charbon, silice, amiante), que dans l'élimination des cellules cancéreuses ou apoptotiques et du surfactant qui, en excès, peut provoquer une protéinose alvéolaire pulmonaire et une insuffisance respiratoire. Les particules phagocytées sont dirigées dans des phagosomes, qui fusionnent avec les lysosomes, formant ainsi des phagolysosomes, où elles sont dégradées grâce à l'action d'un ensemble d'enzymes hydrolytiques fonctionnant à pH acide (Riches et Martin 2018). Lors d'une infection, le complexe de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase s'assemble au niveau de la membrane du phagolysosome mais aussi à la membrane cellulaire du macrophage (G. T. Nguyen, Green, et Mecsas 2017). Cette enzyme de l'immunité innée contribue à la destruction des pathogènes (bactéries et champignons essentiellement) via la production d'espèces réactives de l'oxygène qu'elle catalyse et qui, libérées dans les phagolysosomes et dans l'espace extracellulaire, oxydent les composants structuraux des pathogènes (Dupont et al. 2016). Pour assurer leur fonction de cellules immunitaires, les macrophages expriment différents récepteurs, tels que les *Pattern Recognition Receptors* (PRR, cf paragraphe I. 3) leur permettant d'interagir directement avec les pathogènes, mais aussi des récepteurs d'immunoglobulines et les récepteurs du complément pour reconnaître les particules opsonisées, facilitant ainsi leur phagocytose. Enfin, les macrophages alvéolaires sont capables de présenter les antigènes, issus des particules dégradées lors de la phagocytose, aux lymphocytes T CD4 qui vont à leur tour, d'une part, activer le macrophage pour amplifier la réponse immunitaire innée et, d'autre part, déclencher la réponse adaptative (**Figure 5**).

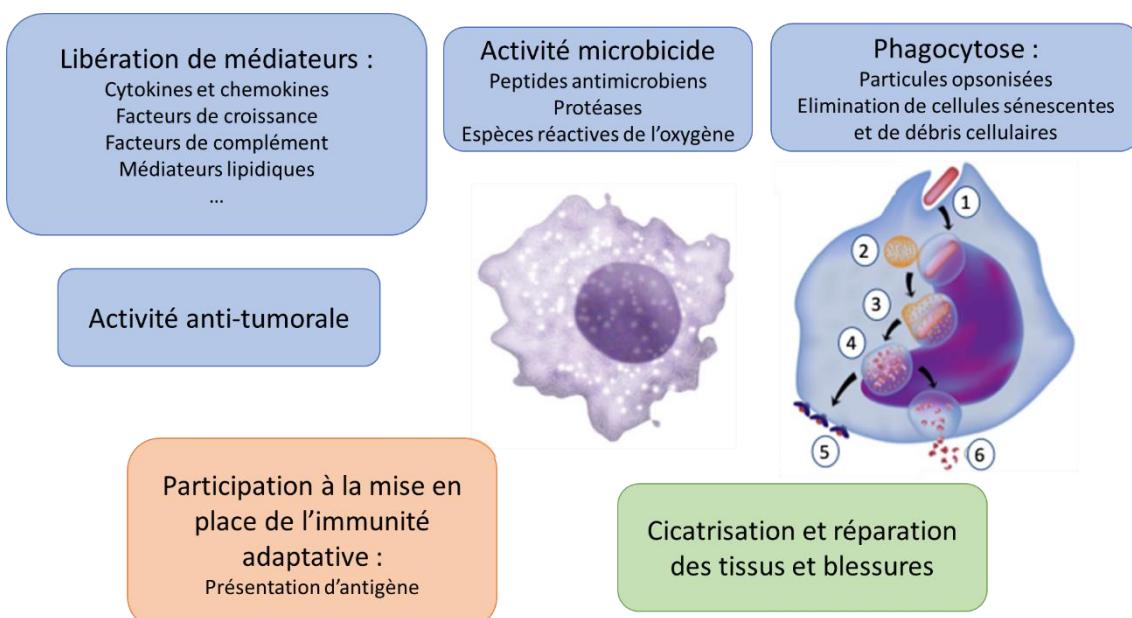


Figure 5 : Fonctions des macrophages alvéolaires impliquées dans l'immunité innée (en bleu), dans l'immunité adaptative (en orange) et dans la réparation tissulaire (en vert). La phagocytose commence par l'émission de pseudopodes autour de la particule à phagocytter (1) formant une vésicule appelée phagosome (2) qui fusionne avec des lysosomes, formant des phagolysosomes (3). S'ensuit alors une libération d'enzymes protéolytiques accompagnée d'une diminution du pH, permettant la dégradation de la particule ingérée en peptides et l'assemblage des sous-unités de la NADPH oxydase (4). Les antigènes (peptides) associés avec des molécules de CMH de classe II sont exportés à la surface cellulaire pour présentation aux lymphocytes T CD4 (5) s'accompagnant de l'exocytose des débris (6).

c. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules de l'immunité innée issues d'un progéniteur commun avec les macrophages et produites au niveau de la moelle osseuse. A partir de là, ces cellules vont peupler les tissus lymphatiques et différents organes, notamment la muqueuse des voies aériennes jusqu'à la lumière alvéolaire (Lambrecht et al. 2001). Dans les tissus où elles résident, les CD immatures exercent des fonctions de sentinelles permanentes. Devenues matures, elles deviennent des cellules présentatrices d'antigène et jouent alors un rôle clé dans l'articulation entre la réponse immunitaire innée et la réponse adaptative. La réponse inflammatoire entraîne une augmentation du nombre de CD dans la muqueuse pulmonaire et l'activation de celles-ci qui deviennent matures. L'état inflammatoire pulmonaire et l'invasion microbienne induisent l'augmentation d'expression de chimiokines, de cytokines ou de facteurs de croissance qui attirent les CD immatures par un mécanisme dépendant du récepteur aux chimiokines CCR-6 (Lambrecht et al. 2001). Pour détecter les signaux inflammatoires, les CD expriment un grand nombre de récepteurs qui, une fois activés, induisent leur maturation. Cette différentiation implique, d'une part, la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 et IL-8) et, d'autre part, l'activation de leur capacité de présentation d'antigènes avec notamment l'augmentation de l'expression membranaire de molécules du CMH. Les CD migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques où elles activent les lymphocytes T naïfs initiant ainsi la réponse immune adaptative (**Figure 6**).

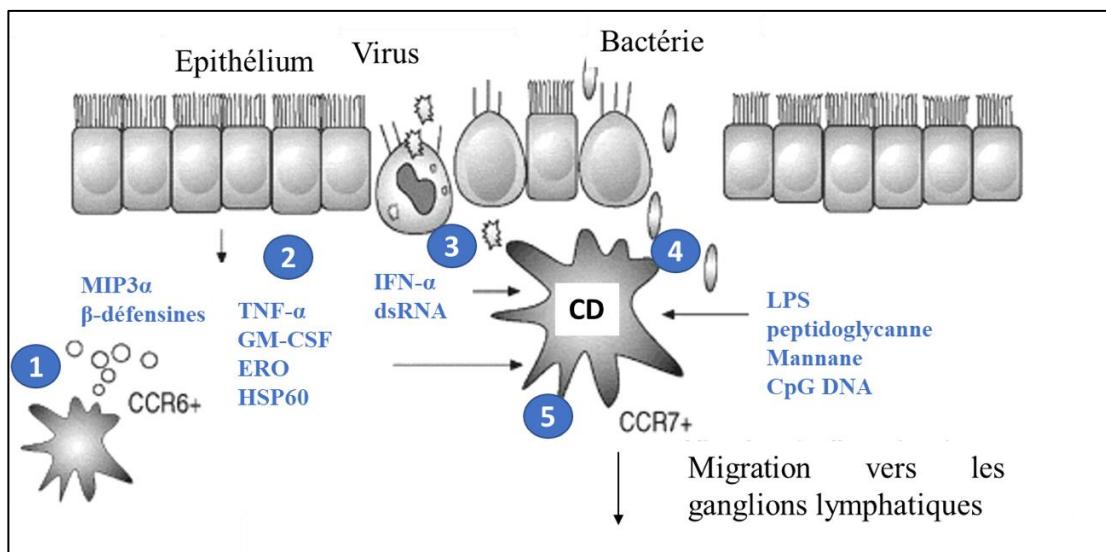


Figure 6 : Induction de la réponse immunitaire des cellules dendritiques (CD). (1) L'épithélium des voies aériennes, exposé à des stimuli microbiens, produit du MIP3 α et des β -défensines pour attirer les CD immatures exprimant le récepteur CCR6. (2) La production de médiateurs inflammatoires (TNF- α , HSP60, ROS) et de facteurs de croissance (GM-CSF) par l'épithélium attire et active les CD. (3) Les CD sont des cibles pour l'invasion virale et sont capables de phagocytter les cellules apoptotiques infectées par les virus. La libération locale d'IFN- γ ou de composés viraux (ARNdb) active les CD. (4) Les CD peuvent phagocytter les bactéries et être activées par certains motifs bactériens (LPS, CpG ADN ..). (5) La détection d'une infection ou d'une lésion tissulaire par les CD augmente l'expression de CCR7 impliquée dans la migration des CD vers les ganglions lymphatiques. MIP : macrophage inflammatory protein ; CCR : CC-chemokine receptor ; TNF : tumor necrosis factor ; HSP : heat shock protein ; IFN : interféron ; ARNdb : acide ribonucléique double brin ; LPS : lipopolysaccharide ; CpG ADN : Cytosine- p -;Guanine acide désoxyribonucléique. Adaptée de (Lambrecht et al. 2001)

Cependant, même en l'absence de stimulation (infection ou inflammation), il semble y avoir une migration continue des CD des voies aériennes vers les ganglions lymphatiques. Une des hypothèses permettant d'expliquer ce phénomène pourrait être liée au fait que les CD capturent continuellement des antigènes inhalés, même « inoffensifs », grâce à des expansions cellulaires, telles des pseudopodes, au niveau des couches supérieures de l'épithélium des voies aériennes (Lambrecht et al. 2001). Une autre hypothèse suggère que, par analogie avec la muqueuse intestinale, les CD immatures capturent des cellules épithéliales bronchiques apoptotiques et que la présentation des corps apoptotiques conduirait à une tolérance aux antigènes du « soi ». L'ensemble de ces mécanismes protégerait la muqueuse contre l'induction d'une réponse immunitaire vis-à-vis des cellules épithéliales bronchiques apoptotiques ou nécrotiques dans la lumière aérienne, conséquence d'une infection virale, bactérienne ou fongique.

d. Les cellules *natural killer*

De la même manière que les CD, les cellules *natural killer* (NK) sont dérivées de cellules souches hématopoïétiques. Elles se développent principalement dans la moelle osseuse puis peuvent migrer vers les poumons où elles se logent dans le parenchyme (Cong et Wei 2019). Les cellules NK sont des lymphocytes du système immunitaire inné capables de tuer des cellules qui possèdent un niveau d'expression anormale des molécules de surface, notamment l'absence de CMH de classe I, phénomène observé surtout pour les cellules tumorales ou infectées par des pathogènes à développement intracellulaire. Les cellules NK peuvent également détecter directement certains virus, notamment le virus de la grippe ou *Influenzae virus* (Cong et Wei 2019). Des études ont aussi montré que ces cellules peuvent reconnaître le bacille tuberculeux, *Mycobacterium tuberculosis*, induisant leur activation (Esin et al. 2013). L'activation directe des cellules NK par les motifs bactériens est médiée par les *Toll-like receptors* et conduit à la sécrétion de cytokines et d'α-défensines qui contribuent, respectivement, à l'activation des cellules environnantes (par exemple, les macrophages) et à la destruction directe des pathogènes. Ainsi, les cellules NK participent à l'immuno-surveillance tumorale et au contrôle précoce des infections microbiennes. De plus, la sécrétion de cytokines par les cellules NK participe à l'orientation de la réponse immunitaire adaptative (orientation Th1/Th2/Treg).

e. Les cellules de l'immunité innée recrutées : les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont des cellules phagocytaires sanguines qui constituent les leucocytes circulants les plus abondants chez l'homme (G. T. Nguyen, Green, et Mecsas 2017). Ils sont recrutés au niveau de l'épithélium respiratoire sous l'influence de molécules chimio-attractantes, comme l'IL-8, produites par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires. Les PNN expriment les mêmes récepteurs et possèdent sensiblement les mêmes mécanismes que les macrophages pour lutter contre les infections. Une fois sur le site infectieux, ces cellules vont détecter les corps étrangers grâce à l'expression des récepteurs membranaires pour le fragment Fc des IgG et du complément, qui reconnaissent les particules opsonisées, et des PRR qui interagissent cette fois directement avec

différents composants de pathogènes. La membrane du PNN émet alors autour de la particule étrangère des pseudopodes, qui s'unissent ensuite en formant une vacuole, le phagosome. Les sous-unités de la NADPH oxydase s'assemblent alors à la membrane du phagosome. Il y a formation de produits oxydants qui se concentrent dans le phagolysosome, dans lequel s'ajoute, après leur fusion, le contenu antimicrobien des granules comprenant la myélopéroxydase, des peptides antimicrobiens cationiques, des serine protéases comme la cathepsine G ou l'élastase (Pham 2006). La lyse des micro-organismes se produit dans l'environnement protégé du phagolysosome mais peut aussi se faire de manière extracellulaire. De façon originale, les PNN peuvent produire un réseau formé d'enzymes et d'acides nucléiques appelé *Neutrophils Extracellular Traps* (NET) qui immobilisent les pathogènes, empêchant leur propagation et facilitant également leur phagocytose ultérieure (G. T. Nguyen, Green, et Mecsas 2017) (**Figure 7**).

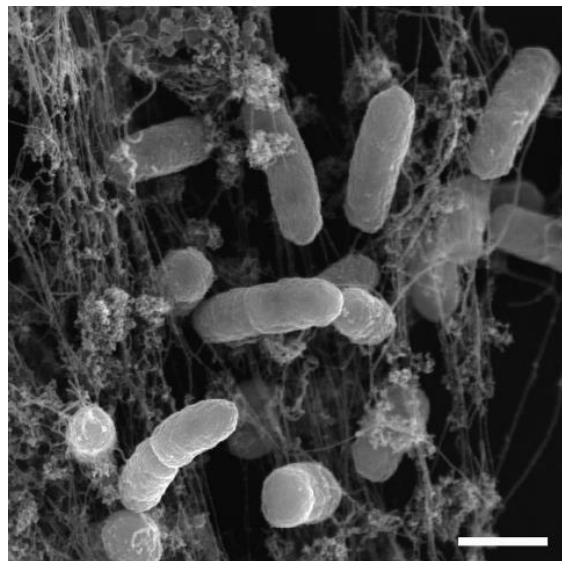


Figure 7 : Bactéries capturées dans des NET. Microscopie électronique à balayage de neutrophiles humains incubés avec la bactérie Salmonella, barre = 1 µm. Image issue de (Brinkmann et Zychlinsky 2012)

3. Le système de reconnaissance des pathogènes

Les cellules de l'immunité innée des voies aériennes reconnaissent des motifs hautement conservés chez les pathogènes, appelés *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP), grâce à l'expression de récepteurs spécifiques, les *Pattern Recognition Receptors* (PRR), qui peuvent être extracellulaires, membranaires ou cytoplasmiques. Les PAMP peuvent être communs à plusieurs espèces bactériennes, virales ou fongiques et permettent ainsi la reconnaissance d'un large spectre de micro-organismes. L'interaction entre PAMP et PRR initie une cascade de signaux intracellulaires permettant la libération de cytokines pro-inflammatoires, l'activation de mécanismes de défenses antimicrobiennes et la modulation de l'immunité adaptative. Différentes familles de PRR existent.

a. Les toll like receptors

Les TLR, pour *toll-like receptor*, constituent la famille la plus étudiée de PRR. On connaît à l'heure actuelle 10 TLR au sein de l'espèce humaine ; certains sont extracellulaires (TLR1, 2, 5, 6, 10), d'autres intracellulaires endosomaux (TLR3, 7, 8 et 9) ou de localisation mixte (TLR4) selon les types cellulaires (Guillot et al. 2004; O'Neill, Golenbock, et Bowie 2013) (**Figure 8**). Ces récepteurs fonctionnent en homodimères (TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, et TLR9) ou en hétérodimères (TLR1/TLR2, TLR2/TLR6). Chaque TLR est spécifique de PAMP, comme par exemple TLR4 qui reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatif ou TLR3 qui reconnaît l'ARN double brin et est impliqué dans la reconnaissance des virus (Tartey et Takeuchi 2017; Guillot et al. 2005) (**Tableau 1**).

TLR	PAMP naturels	PAMP synthétiques	Microorganismes
TLR 1/2	Lipopeptides triacylés	Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4)	Bactéries et mycobactéries
TLR 2/6	Peptidoglycanes et acide lipotéichoïque Lipoprotéine et diacyl lipopeptides Porines Lipoarabinomannanes Phospholipomannanes β -glucane/Zymosan	Pam2CSK4	Bactéries Gram positif Différentes bactéries <i>Neisseria</i> Mycobactéries <i>Candida albicans</i> Champignons
TLR 3	ARN double brin	Acide Polyinosinique-polycytidylque (poly(I:C))	Virus <i>A. fumigatus</i>
TLR 4	Lipopolysaccharides	Lipide A synthétique	Bactéries Gram négatif
TLR 5	Flagelline	Flagelline recombinante	Bactéries flagellées
TLR 7 et 8	ARN simple brin	Imiquimod (TLR 7) Resiquimod (R848) (TLR 7 et 8)	Virus
TLR 9	ADN riche en motifs CpG hypométhylés	Oligonucléotides riches en motifs CpG (CpG-ODN)	Bactéries, mycobactéries et virus
TLR 10	Non connu	Non connu	Non connu

Tableau 1 : Toll-like receptors (TLR) et leurs ligands naturels ou synthétiques. PAMP : pathogen associated molecular pattern. Tableau adapté de (Tartey et Takeuchi 2017)

Les TLR possèdent tous un domaine extracellulaire riche en leucine, appelé LRR (*Leucine-Rich Repeat ou Leucine Rich Region*). La fixation des PAMP microbiens à ces domaines facilite la dimérisation des TLR, entraînant une cascade de signalisation intracellulaire. Le domaine intracellulaire est très proche de celui du récepteur de l'Interleukine-1, à savoir le domaine TIR (Toll /IL1 Receptor domain) qui permet le recrutement de protéines adaptatrices, principalement MyD88 (*Myeloid Differentiation*

primary response gene 88) mais aussi TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing interferon β*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) ou Mal (*MyD88 adaptor-like*) aussi appelée TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*). Il existe 2 types de voies de signalisation ; celles qui sont dépendantes de MyD88 et celles qui sont au contraire indépendantes. Dans les premières, MyD88 interagit avec la kinase IRAK-4 (*IL-1 receptor-associated kinase-4*) ce qui induit la formation du complexe IRAK1/2/4-TRAF6. TRAF6 active à son tour le complexe TAK1-TAB2/3 qui peut alors activer deux voies de signalisation différentes. La première implique les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) et conduit à l'activation de facteurs de transcription comme AP-1 (*Activating protein-1*). La seconde fait appel aux protéines IKK (*IκB Kinases*) et induit la phosphorylation de IκB et sa dégradation par le protéasome, conduisant à l'activation du facteur de transcription NF-κB (*Nuclear factor-κB*). Une troisième voie d'activation dépendante de MyD88 a été mise en évidence et concerne l'activation de TLR7, 8 et 9. Elle implique IRF7 (*Interferon regulatory factor 7*) qui se lie au complexe MyD88-IRAK1/2/4-TRAF6/3 et qui, une fois phosphorylé, est transloqué dans le noyau et régule l'expression des IFN α et β. Concernant les voies indépendantes de MyD88, elles font intervenir soit uniquement la molécule adaptatrice TRIF pour la signalisation de TLR3, soit TRAM et TRIF pour celle du TLR4 endosomal. Le recrutement de TRIF aboutit à l'activation des facteurs de transcription IRF3, *via* TRAF3 induisant la synthèse d'IFN, et NF-κB, *via* la kinase RIP1 conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires (**Figure 8**).

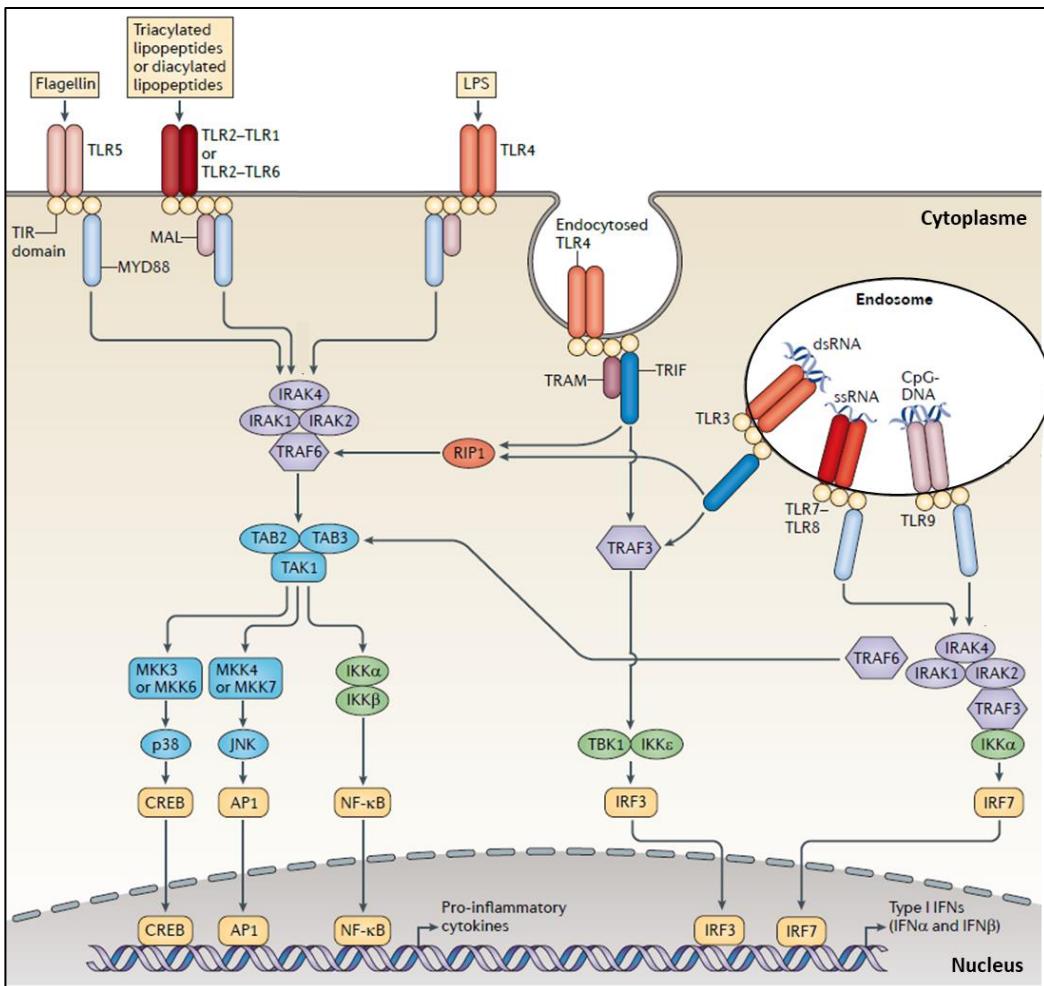


Figure 8 : Voies de signalisation des toll-like receptors humains. TLR5, TLR2/1 et TLR2/6 sont exprimés à la surface des cellules. TLR3, TLR7, TLR8, et TLR9 se localisent dans les endosomes, où ils détectent les acides nucléiques microbiens. TLR4 se localise à la fois sur la membrane plasmique et au niveau endosomal. La signalisation des TLR est initiée par la dimérisation des récepteurs induite par la liaison de leur ligand. Les domaines TIR recrutent des protéines adaptatrices ; soit MYD88 et MAL, soit TRIF et TRAM. TLR4 se déplace de la membrane plasmique aux endosomes afin de passer de la signalisation de MYD88 à TRIF. L'induction des voies de signalisation en aval impliquent des interactions entre les kinases IRAK et TRAF, qui conduisent à l'activation MAPK, JNK et p38, et à l'activation des facteurs de transcription. Deux familles importantes de facteurs de transcription sont activées ; NF-κB et les IRF, mais d'autres facteurs de transcription, tels que CREB et AP1, sont également activés. Une conséquence majeure de la signalisation TLR est la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, et dans le cas des TLR endosomaux, la synthèse d'IFN de type I.

TLR : Toll-like receptors ; dsRNA : ARN double brin ; IKK : inhibiteur de la NF-κB kinase ; LPS : lipopolysaccharide ; MKK : MAP kinase kinase ; RIP1 : protéine 1 interagissant avec le récepteur ; ARNr : ARN ribosomique ; ARN ss : ARN simple brin ; TAB : protéine de liaison TAK1 ; TAK : TGFβ-kinase activée ; TBK1 : kinase 1 se liant à TANK. Image adaptée de (O'Neill, Golenbock, et Bowie 2013).

Une petite particularité concerne TLR4 qui reconnaît le LPS. Ce dernier se fixe à la LBP (LPS Binding Protein) au niveau extracellulaire puis le complexe LPS-LBP se fixe à CD14. Une fois le complexe formé, TLR4 s'associe alors à CD14 pour initier la signalisation intracellulaire.

b. Les *C-type lectin receptors*

Il existe d'autres familles de PRR exprimées par les cellules des voies aériennes comme les *C-type lectin receptors* (CLR) membranaires, dont les chefs de file sont Dectine 1 et 2, Mincle et DC-SIGN,

particulièrement impliqués dans l'immunité antifongique (Shiokawa, Yamasaki, et Saijo 2017) (**Tableau 2**).

CLR	PAMP naturels	PAMP synthétiques	Microorganismes
Dectine 1	β -glucane/Zymosan	/	Champignons
Dectine 2	α -mannanes Glycoprotéines riches en mannose	/	<i>Candida albicans</i> <i>Malassezia</i>
Dectine 3	α -mannanes Trehalose-6,6-dimycolate	/	<i>Candida albicans</i> Mycobactéries
MINCLE	Trehalose-6,6-dimycolate Glyceroglycolipides Acides gras mannosylés liés au mannitol Diacylglycérol	Trehalose dibehenate	Mycobactéries <i>Malassezia</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>
DC-SIGN	Glycoproteine gp120 Glycoproteine E2 Lipoarabinomannane	/	VIH-1 Virus de l'hépatite C Mycobactéries

Tableau 2 : Les C-type lectin receptors (CLR) et leurs ligands naturels ou synthétiques. PAMP : pathogen associated molecular pattern, Mincle : Macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin receptor ; DC-SIGN : Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin ; VIH : virus de l'immunodéficience humaine. Données issues de (Tartey et Takeuchi 2017; Lu, Nagata, et Yamasaki 2018; Khoo et al. 2008)

La liaison des ligands à ces récepteurs déclenche le recrutement et la phosphorylation d'une tyrosine kinase appelée Syk pour *spleen tyrosine kinase*, par l'intermédiaire du motif ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). La phosphorylation de Syk induit, d'une part, la production d'espèces réactives de l'oxygène déclenchant l'assemblage et l'activation de l'inflammasome et, d'autre part, la liaison de CARD9 (*caspase recruitment domain containing protein 9*), BCL10 (*B-cell lymphoma/leukemia 10*) et MALT1 (*mucosa-associated lymphoid tissue 1*). Le complexe qui en résulte active le facteur de transcription NF- κ B (Tang et al. 2018). L'activation de Dectine 1 induit l'activation de ERK (*Extracellular signal-regulated protein kinase*) par l'intermédiaire de CARD9, qui relie Ras-GRF1 à H-Ras, et également l'activation de voies indépendantes de Syk médiées par la kinase Raf-1, entraînant une activation de NF- κ B. Cette dernière voie est partagée avec le récepteur DC-SIGN (**Figure 9**).

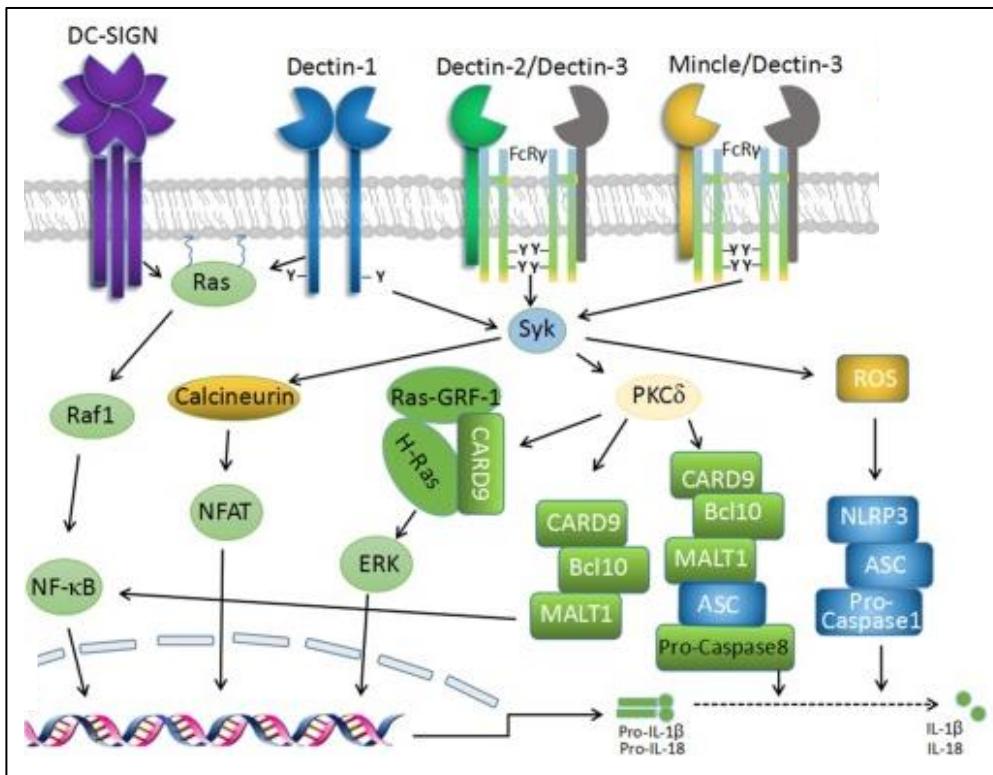


Figure 9 : Voies de signalisation des C-type lectine receptors. La reconnaissance des composants fongiques par plusieurs CLR, dont Dectine 1, Dectine 2, Dectine 3, Mincle et DC-SIGN, induit l'activation de voies dépendantes de Syk et de Raf 1. Les homodimères de Dectine 1, les hétérodimères de Dectine 2/3 et Mincle/Dectine 3 recrutent Syk conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à l'assemblage du complexe CARD9/BCL10/MALT1 activant la voie NF-κB. Les ROS déclenchent l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3, qui clive le pro-IL-1 β et pro-IL-18 en formes matures actives. La voie de signalisation associée à Dectine 1 induit également l'activation de Ras-GRF-1 dépendante de Syk, qui recrute H-Ras via l'adaptateur CARD9 et conduit à une activation de ERK. Enfin, la signalisation par Syk entraîne l'activation du facteur NF-AT, qui s'associe à la signalisation NF-κB pour réguler l'expression de gènes cibles. Mincle : Macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin receptor ; DC-SIGN : Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-intégrin ; ROS : espèces réactives de l'oxygène. Adaptée de (Tang et al. 2018)

Les mutations perte de fonction du gène de *CARD9* chez l'homme ont démontré l'importance de cette molécule dans l'immunité antifongique. En effet, le déficit en *CARD9* est caractérisé par des infections fongiques localisées principalement au niveau de la muqueuse buccale et des tissus cutanés, et impliquent le plus souvent des espèces du genre *Candida* ou *Aspergillus* (Drummond, Franco, et Lionakis 2018). Ces phénotypes cliniques sont très proches de ceux observés chez les patients présentant des mutations du gène *DECTINE 1*, à savoir une susceptibilité aux mycoses muco-cutanées à *Candida albicans* (Ferwerda et al. 2009). En effet, la stimulation par du β -glucane, un composant de la paroi fongique, de cellules mononucléées isolées du sang circulant de patients homozygotes pour la mutation Y238X (responsable de l'apparition d'un codon stop sur le gène *DECTINE 1* et donc de la synthèse d'une protéine tronquée), pendant 4 heures, montre d'une part une diminution de l'expression membranaire du récepteur mais aussi une diminution d'un facteur 10 de la production d'IL-6 (Ferwerda et al. 2009). En revanche, la phagocytose et la destruction de *C. albicans*, par ces cellules, ne sont pas impactées, ce qui pourrait expliquer pourquoi le déficit en Dectine 1 n'est pas associé à des infections fongiques invasives.

c. Les nucleotide oligomerisation domain like receptors

Les *nucleotide oligomerisation domain (NOD)-like receptors* (NLR) sont des récepteurs intracellulaires possédant un domaine *Leucin-Rich Repeat* en C-terminal qui leur permet de reconnaître les PAMP microbiens des pathogènes intracellulaires. Chez l'Homme, 22 récepteurs appartenant à cette famille ont été identifiés et classés en quatre sous-familles en fonction de leur domaine N-terminal : NLRA (*acidic transactivation domain*), NLRB (*baculoviral inhibitory repeat-like domain*), NLRC (*caspase activation and recruitment domain ou CARD*) et NLRP (*pyrin domain*) (Kim, Shin, et Nahm 2016) (**Tableau 3**).

Sous-familles de NLR	Nom du récepteur	PAMP naturels	Microorganismes
NLRA	CIITA	/	/
NLRB	NAIP	Flagelline	Bactéries flagellées
NLRC	NOD1	DAP de la paroi bactérienne	Bactéries Gram négatif
	NOD2	MDP de la paroi bactérienne ssRNA viraux	Bactéries Virus
	NLRC3-5	NLRC4 : flagelline et protéine Rod du flagelle	<i>P. aeruginosa, Legionella pneumophila, Shigella flexneri, et Salmonella enterica</i>
NLRP	NLRP1-14	NLRP1 : MDP et facteur létal de la toxine de l'anthrax	Bactéries

Tableau 3 : Sous-familles des NOD-Like receptors et leurs ligands. DAP : acide diaminopimétique ; MDP : muramyl dipeptide. Adaptée de (Kim, Shin, et Nahm 2016).

L'interaction de PAMP avec des NLR conduit à l'activation de quatre mécanismes impliqués à différents niveaux dans la réponse anti-infectieuse : l'autophagie, la transduction de signaux, l'activation de la transcription et la formation de l'inflammasome (**Figure 10**). Ainsi, NOD2 induit l'autophagie, un mécanisme homéostatique cellulaire fondamental dans lequel les cellules « autodigèrent » des parties de leur cytoplasme pour éliminer les pathogènes en recrutant des protéines spécifiques (ATG16L1) au niveau du site d'invasion à la membrane plasmique. La reconnaissance par NOD1 et NOD2 de, respectivement, l'acide γ -D-glutamyl-méso-diaminopimélique (iE-DAP) et le dipeptide muramyle (MDP), présents tous deux dans le peptidoglycane de la paroi bactérienne, induit l'activation des voies de signalisation MAPK et NF- κ B, conduisant à une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires (Girardin et al. 2003). NLRP2 et NLRP4 agissent au contraire comme régulateurs négatifs de la voie NF- κ B en agissant sur TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*), alors que NLRA (CIITA) et NLRC5 induisent l'expression du CMH, qui joue un rôle central dans l'immunité adaptative. Enfin, la reconnaissance de PAMP par certains NLR mène à l'activation de l'inflammasome en induisant

l'activation du complexe ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), responsable du clivage de la pro-caspase 1 en sa forme mature qui induit la transformation des précurseurs pro-IL-1 β et pro-IL-18 en IL-1 β et IL-18 matures (Pinkerton et al. 2017) (Figure 10).

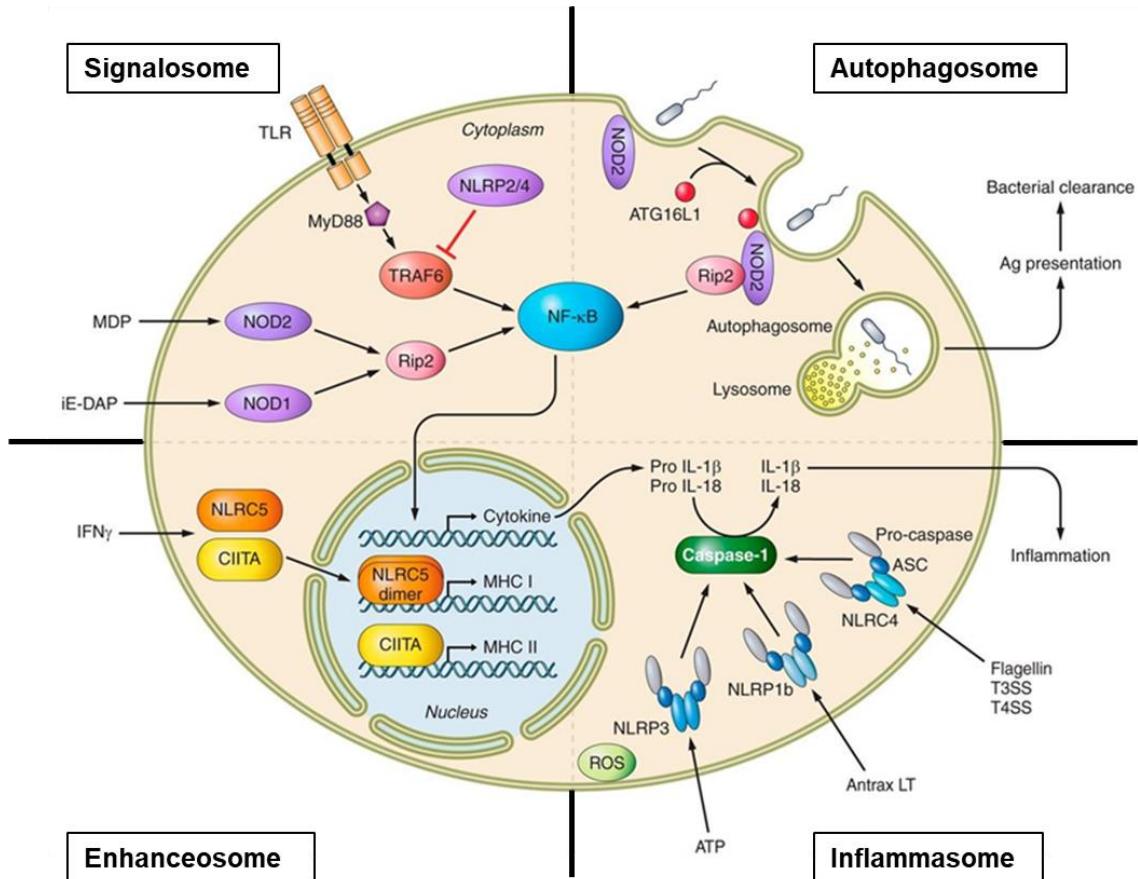


Figure 10 : Les quatre grandes fonctions des NLR : autophagie, transduction de signaux, activation de la transcription et formation de l'inflammasome. NOD2 induit l'autophagie en recrutant ATG16L1 dans la membrane plasmique au niveau du site d'entrée de la bactérie. NOD1 et NOD2 reconnaissent respectivement l'acide γ -D-glutamyl-méso-diaminopimélique (iE-DAP) et le dipeptide muramyl (MDP) et activent les voies de signalisation NF- κ B et MAPK. NLRP2 et NLRP4 agissent comme régulateurs négatifs de la voie NF- κ B en agissant sur TRAF6. CIITA et NLRC5 sont des activateurs de l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Les NLR (cercle orange) induisent l'inflammasome et convertissent les pro-cytokines en IL-1 β et IL-18 actives via la caspase-1. NOD, domaine de liaison aux nucléotides et d'oligomérisation ; NLRs, récepteurs de type NOD ; NF- κ B, facteur nucléaire kappa B ; MAPK, protéine kinase activée par un mitogène ; TRAF, facteur associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNF) ; IL, interleukine ; INF- γ , interféron- γ . Adaptée de (Motta et al. 2015).

d. Les récepteurs sécrétés

Les PRR peuvent également être sécrétés, exerçant alors un rôle d'opsonine et favorisant ainsi l'interaction des pathogènes avec les cellules de l'immunité (Balloy et Chignard 2009) (Tableau 4).

La Pentraxine 3 (PTX3) est produite et libérée par différents types cellulaires comme les macrophages, les cellules épithéliales bronchiques, les PNN ou les CD, en réponse à des stimuli inflammatoires (Garlanda et al. 2002). Différentes études ont montré que la PTX3 possédait des rôles non redondants dans la prévention des infections pulmonaires. Des souris déficientes en PTX3 (*Ptx3*^{-/-}) ont permis de mettre en évidence son importance dans la défense antifongique ou antibactérienne. En effet, l'infection pulmonaire par le champignon *Aspergillus fumigatus* par voie intratrachéale provoque la mort de la

totalité des souris *Ptx3*^{-/-} (non immunodéprimées), alors que les souris *wild type* ont quant à elles toutes survécu à J6. Le traitement à J0, J1 et J6 après infection par *A. fumigatus*, des souris *Ptx3*^{-/-} par la PTX3 purifiée permet de restaurer le même phénotype que celui des souris sauvages (Garlanda et al. 2002). Parmi les PRR sécrétés, on trouve également les collectines, membres de la superfamille des lectines de type C, famille de protéines contenant un *carbohydrate recognition domains* (CRD) responsable de la reconnaissance des pathogènes. Chez l'homme, cette famille contient notamment la *mannose-binding lectin* (MBL) et les protéines du surfactant SP-A et SP-D. Ces deux dernières reconnaissent des ligands distincts, ce qui permet l'opsonisation d'un spectre large de cibles possibles, tels que les virus, les bactéries et les cellules apoptotiques (Casals et al. 2018). La liaison des collectines à leurs ligands permet leur neutralisation et facilite ainsi leur élimination par la clairance mucociliaire. Les collectines liées à leur cible peuvent aussi se fixer sur leurs récepteurs présents à la surface des phagocytes, favorisant la phagocytose. Ces PRR auraient également un rôle microbicide direct (Casals et al. 2018) et sont capables d'interagir avec les cellules de l'immunité pour moduler l'expression des cytokines et des médiateurs inflammatoires (Watson et al. 2018). La SP-A, en contact avec une culture de macrophages dérivés de moelle osseuse de souris, est capable d'induire la synthèse de TNF- α (Guillot et al. 2002). Ces mêmes auteurs ont montré que cette collectine provoque l'activation de la voie NF- κ B par une voie dépendante du TLR4. Cependant, la SP-A permettrait aussi de limiter l'inflammation en agissant sur la réponse aux stimuli infectieux des macrophages alvéolaires. Ainsi, le traitement avec la SP-A de macrophages de lavage broncho-alvéolaires issus de volontaires sains, induit l'expression d'IRAK-M (IL-1 receptor-associated kinase M) (H. A. Nguyen et al. 2012), une kinase exprimée uniquement par les monocytes/macrophages, inhibant l'activation de TRAF6 (**Figure 7**) et par conséquent de NF- κ B lors de stimulation de TLR (Kobayashi et al. 2002). Chez ces mêmes macrophages prétraités par la SP-A pendant 12 heures puis stimulés par le LPS d'*Escherichia coli* pendant 5 heures, il a été observé une diminution de 50% de la production de deux cytokines inflammatoires, le TNF- α et l'IL-6, comparé aux macrophages non pré-stimulés par SP-A (H. A. Nguyen et al. 2012). Ce mécanisme pourrait favoriser un retour rapide à l'état homéostatique au niveau alvéolaire après une infection. La MBL est une protéine produite par les hépatocytes, retrouvée dans le sérum et capable de diffuser sur les sites inflammatoires et infectieux, notamment au niveau pulmonaire (Eisen 2010). La MBL peut se lier à une grande variété de pathogènes activant ainsi la voie des lectines du complément (cf I-4a.) mais aussi permettant l'induction de la phagocytose grâce à son interaction avec le récepteur au C1q présent à la surface des phagocytes (Eisen 2010).

Les ficolines sont des lectines caractérisées par leur affinité pour une vaste gamme de polysaccharides acetylés mais aussi pour certains PAMP comme l'acide sialique, les lipopolysaccharides, le peptidoglycane et le β -D-glucane fongique, pouvant ainsi se fixer à un large spectre de micro-organismes (Bidula, Sexton, et Schelenz 2019). Chez l'homme, 3 ficolines ont été identifiées et retrouvées à des concentrations différentes dans le sérum ; la M-ficoline produite par les monocytes/macrophages, la L-ficoline produite par les hépatocytes et la H-ficoline synthétisée aussi par

les hépatocytes mais également par les cellules épithéliales bronchiques et les pneumocytes de type II (Smole, Kratzer, et Pickl 2020). Bien que fonctionnant principalement comme des opsonines, les ficolines contribuent également à l'activation de la voie des lectines du complément tout comme la MBL dont elles sont structurellement très proches (Bidula, Sexton, et Schelenz 2019). Elles auraient aussi une activité modulatrice sur la synthèse de cytokines. Ainsi, il a été montré que la synthèse d'IL-8 observée suite à l'infection de cellules épithéliales alvéolaires (lignée A549) par des conidies d'*A. fumigatus*, était significativement augmentée, trois fois supérieures, lorsque ces conidies étaient opsonisées par la H-ficoline, le mécanisme sous-jacent n'étant pas connu (Bidula et al. 2015).

Enfin, les galectines, exprimées par les PNN, les macrophages et les cellules dendritiques, sont des protéines solubles qui contiennent un ou deux *carbohydrate recognition domains*. Elles possèdent une affinité pour des polysaccharides contenant des β -galactosides présents à la surface des micro-organismes. Chez l'homme, 12 galectines ont été identifiées, réparties en trois groupes selon leur organisation structurelle (Casals et al. 2018). Elles sont intracellulaires, présentes dans le cytoplasme, mais également extracellulaires, permettant une action antimicrobienne très proche de celle des collectines par opsonisation (Casals et al. 2018).

PRR sécrétés pulmonaires		Source cellulaire	PAMP naturels	Microorganismes
PTX3		Cellules épithéliales, PNN, macrophages, CD		<i>A. fumigatus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , cytomegalovirus
Collectines	MBL	Hépatocytes et cellules intestinales	Sucres terminaux (D-mannose, L-fucose et N-acétyl-D-glucosamine) Hémagglutinine et neuraminidase Glycoprotéine d'enveloppe du virus Ebola Mannanes, β -glucane	Bactéries Virus Influenza A Virus Ebola <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>
	SP-A et SP-D	Cellules Club, pneumocytes de type II	LPS Capsule polysaccharidique de <i>Klebsiella</i> Peptidoglycane (SP-D) Hémagglutinine et neuraminidase Sucres viraux (SP-A) β -glucane	Bactéries Virus Influenza A Virus herpès simplex type 1 (SP-A) Champignons
Ficolines	H-ficoline	Cellules ciliées bronchiques et pneumocytes de type II	LPS N-acetylglucosamine et N-acetylgalactosamine Fucose	Bactéries Gram négatif <i>A. fumigatus</i> , Mycobactéries et virus Influenza A
Galectines		Cellules épithéliales, PNN et macrophages	Acide mycolique LPS Glycoprotéines d'enveloppe virale	Mycobactéries Bactéries Gram négatif Virus <i>Cryptococcus neoformans</i>

Tableau 4 : Les PRR sécrétés au niveau pulmonaire, leur principale source cellulaire, leur PAMP et les micro-organismes reconnus. PNN : polynucléaire neutrophile ; CD : cellule dendritique ; MBL : Mannose binding lectine ; SP : protéine du surfactant ; LPS : lipopolysaccharide. Données issues de (Murugaiah, Tsolaki, et Kishore 2020; Bidula, Sexton, et Schelenz 2019; Casals et al. 2018)

e. Autres pattern recognition receptors

D'autres récepteurs reconnaissant les pathogènes sont également exprimés au niveau pulmonaire. Parmi ceux-ci, la famille des récepteurs cytosolique *RIG-I-like receptors* (RLR), dans laquelle on trouve RIG-I (*Retinoic acid inducible gene*) et MDA5 (*Melanoma differentiation-associated gene 5*), est exprimée par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales pulmonaires (Opitz et al. 2010). Cette famille est impliquée dans la reconnaissance de composants viraux (ARN double brin) conduisant à la synthèse d'IFN de type I ainsi qu'à l'induction de cytokines inflammatoires dépendantes de la voie NF-κB. De plus, très récemment, des chercheurs ont mis en évidence l'existence de récepteurs spécifiques de l'ADN (microbien ou de l'hôte) au niveau cytosolique, responsables de l'induction d'IFN de type I. *DNA-dependent activator of IFN* (DAI), aussi appelé ZBP-1, dont l'expression est inductible par l'IFN, est capable de réguler l'expression de l'IFN de type I via NFκB et IRF3 en réponse à l'ADN viral. D'autres senseurs de l'ADN cytosolique ont par la suite été découverts comme la protéine *absent in melanoma* 2 (AIM2) qui détecte l'ADN double brin viral ou l'ADN de bactéries intracellulaires comme *Listeria monocytogenes* permettant le recrutement du complexe *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*, et l'activation de la cascade de l'inflammasome (Dempsey et Bowie 2015).

4. Médiateurs antimicrobiens des voies aériennes

La reconnaissance de pathogènes via la liaison entre les PAMP et les PRR déclenche dans la cellule une signalisation pro-inflammatoire ayant pour but de produire une réponse immunitaire adaptée, modulée et résolutive visant à éliminer l'agression. Cette réponse inclut des médiateurs anti-microbiens.

a. Le système du complément

Le système du complément est un groupe de 35 protéines sériques. Il est basé sur une succession de clivages protéolytiques de zymogènes en protéases activées qui deviennent ainsi capables d'exercer une activité protéolytique vis-à-vis des pathogènes ou de se fixer à eux de manière covalente. Il existe 3 voies d'activation du complément : la voie classique, celle des lectines initiées respectivement par la fixation d'anticorps ou de MBL sur un pathogène, et la voie alternative se déclenchant spontanément (**Figure 11**). Ces voies aboutissent toutes à la production de C3 convertase, une protéase qui clive la protéine C3 en C3a, une molécule diffusible, et en C3b, principal effecteur du complément se liant aux micro-organismes. Se forme alors la C5 convertase à la surface de ces derniers qui va couper à son tour C5 en C5a et C5b.

Le système du complément agit par 3 mécanismes principaux. Le premier repose sur l'opsonisation des pathogènes qui facilite leur phagocytose. C3b produit en grande quantité se fixe à la surface des micro-organismes permettant leur reconnaissance par le phagocyte via un récepteur, *complement receptor 1* (CR1). Le second est l'exacerbation de la réaction inflammatoire grâce au rôle chimiотактического des protéines diffusibles C3a et C5a, qui permettent le recrutement et l'activation des PNN. Enfin, dans

certains cas, le complément peut former un complexe d'attaque membranaire (CAM) après recrutement des protéines terminales du complément, et induire la lyse osmotique du pathogène (Villiers 1995).

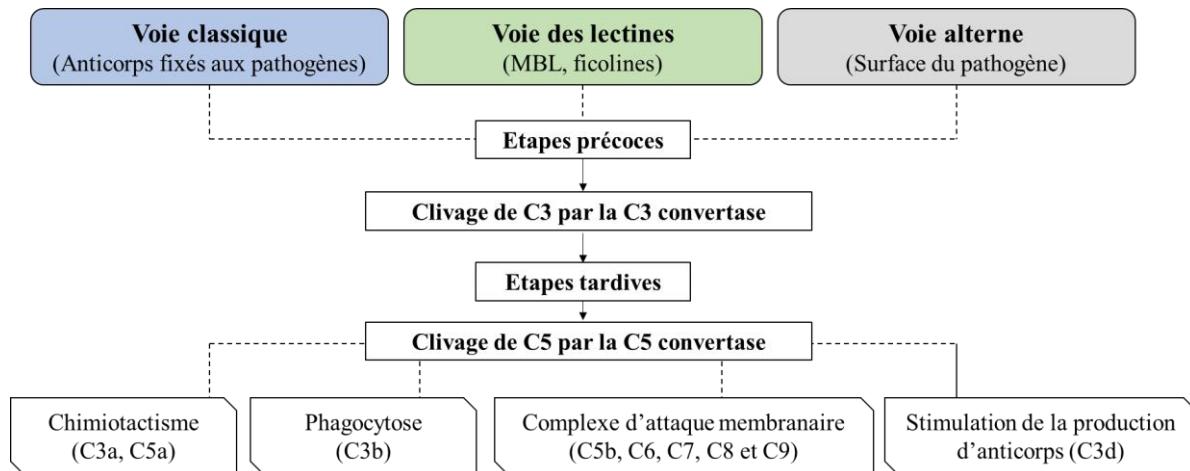


Figure 11 : Schéma simplifié des trois voies d'activation du complément. La voie classique initiée par la fixation d'anticorps à un pathogène, la voie des lectines induite par la fixation du MBL ou de ficolines à la surface du micro-organisme, et la voie alterne qui se déclenche sans intermédiaire. Ces étapes précoce aboutissent à la production de C3a et C3b, permettant ensuite les étapes tardives avec clivage du C5 en C5a et C5b. Les différents médiateurs produits ont une action chimiotactique, un rôle dans la phagocytose des pathogènes par opsonisation, vont former le complexe d'attaque membranaire ou encore stimuler la production d'anticorps.

b. Les peptides et protéines antimicrobiens

Les IgA (Immunoglobulines A) sécrétaires, principale classe d'immunoglobulines produites au niveau de la muqueuse respiratoire, assurent à la fois une première ligne de défense antimicrobienne efficace et empêchent le développement d'une réponse inflammatoire potentiellement nocive (Pilette et al. 2001). Les IgA, produites par le tissu lymphoïde associé aux muqueuses, se lient au pathogène, le neutralisent, puis le complexe ainsi formé est éliminé grâce à la clairance mucociliaire.

Au niveau pulmonaire, on observe également la présence de nombreuses protéines effectrices du système immunitaire possédant des propriétés antimicrobiennes directes. Il peut s'agir soit de petits peptides cationiques (comme les défensines ou la cathélicidine), soit de protéines de poids moléculaire plus important (lysozyme, lactoferrine) (**Tableau 5**). Les premiers, appelés peptides antimicrobiens (PAM), de petite taille (moins de 100 acides aminés), sont produits principalement par les cellules épithéliales (Hiemstra et al. 2016). Les PAM présentent une activité antimicrobienne à large spectre, y compris sur les micro-organismes multirésistants aux antibiotiques et ceux présents au sein de biofilms (Hiemstra et al. 2016). Ceci est permis par leur mode d'action aspécifique. Brièvement, la plupart de ces petits peptides chargés positivement viennent se fixer par interaction électrostatique sur les charges négatives des parois microbiennes, puis déstabilisent ces enveloppes en formant des pores, entraînant la lyse des micro-organismes (Bals 2000). D'autres altèrent la viabilité des pathogènes en interagissant avec des processus métaboliques tels que la biosynthèse de leur paroi cellulaire. Outre leur activité antimicrobienne directe, ils jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire pulmonaire, en présentant des propriétés pro- et anti-inflammatoires, une activité chimiotactique par l'induction de

l'expression de cytokines et de chimiokines par les cellules de l'hôte. De plus, les peptides antimicrobiens peuvent favoriser la réparation de l'épithélium des voies aériennes et l'angiogenèse (Hiemstra et al. 2016). Leur synthèse est constitutive ou induite par une exposition microbienne, une lésion, des cytokines, ou encore des nutriments tels que la vitamine D. Les cellules myéloïdes, en particulier les PNN, synthétisent aussi des peptides antimicrobiens comme les α -défensines, qui agissent au sein du phagolysosome pour lyser les micro-organismes ingérés, ou sont libérés et intègrent les complexes NET avec l'ADN. Les PAM peuvent également stabiliser ces structures en fournissant une protection contre la dégradation médiée par les nucléases bactériennes (Neumann et al. 2014). Parmi les protéines antimicrobiennes aux poids moléculaires plus élevés (>15 kDa), on trouve le lysozyme qui hydrolyse le peptidoglycane de la paroi bactérienne, entraînant la lyse des bactéries à Gram négatif. La lactoferrine, présente en forte concentration dans le mucus bronchique, séquestre quant à elle le fer pour diminuer sa disponibilité, freinant alors la croissance de certaines bactéries (Jouan, Si-Tahar, et Guillon 2017).

Le *secretory leucoprotease inhibitor* (SLPI) et l'elafine (ou *trappin-2*) sont des antiprotéases qui jouent un rôle important dans la balance protéases/anti-protéases au niveau des voies respiratoires. Ces deux enzymes sont principalement synthétisées par les cellules épithéliales et les cellules de la lignée myéloïde (Sallenave 2010). Elles agissent notamment sur les protéases libérées par les PNN lors de leur stimulation par des pathogènes, pour protéger l'hôte des dommages causés par ces enzymes. Outre ce rôle anti-inflammatoire, il a été démontré *in vitro* que ces protéines avaient aussi une action antimicrobienne, et ceci sur une grande variété de pathogènes (Sallenave 2010). Cette activité pourrait être due à leur charge cationique, comme pour les défensines.

Principaux peptides antimicrobiens et leur charge	Cellules pulmonaires sécrétrices	Principaux modes d'action antimicrobiens
Cathélicidines (hCAP18 et LL-37) (cationique)	Cellules épithéliales, glandes muqueuses, macrophages alvéolaires, PNN	« Killing » direct des pathogènes, Recrute les PNN, monocytes, et CD Favorise la phagocytose par les cellules myéloïdes, Induit l'activation des CD
α défensines (cationique)	PNN (granules azurophiles), cellules NK	
β défensines (cationique) ou hBD	Cellules épithéliales, glandes muqueuses, macrophages alvéolaires	
Principales protéines antimicrobiennes et leur charge	Cellules pulmonaires sécrétrices	Principaux modes d'action antimicrobiens
Lysozyme	Cellules épithéliales, macrophages alvéolaires, PNN	Activité antibactérienne : clivage spécifique des liaisons glycosidiques des peptidoglycanes de la paroi bactérienne
Lactoferrine (cationique)	Cellules épithéliales, glandes muqueuses, PNN	Activité indirecte : perturbe le métabolisme du fer, Activité directe : liaison aux molécules chargées négativement (GAG, ADN, LPS et acide lipoteichoïque) de la membrane des bactéries induisant leur lyse
Elafine (cationique)	Cellules épithéliales, macrophages alvéolaires, PNN	Activité antiprotéase, antibactérienne, et antifongique.
SLPI (cationique)	Cellules épithéliales, macrophages alvéolaires, PNN	Activité antiprotéase, antibactérienne, et antivirale. Activité inhibitrice de la croissance fongique

Tableau 5 : Les principaux peptides et protéines antimicrobiens présents au niveau pulmonaire. PNN : polynucléaire neutrophile ; GAG : galactosaminogalactane. CD : cellule dendritique, hBD : human β -defensin. Données issues de (Teclu, Tripathi, et Hartshorn 2010).

c. Les molécules oxydantes

Les espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour *reactive oxygen species*) et de l'azote regroupent des espèces radicalaires comme l'anion superoxyde (O_2^-) ou le radical hydroxyde (OH^\cdot), et des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou l'acide hypochloreux ($HOCl$). Ces produits sont issus du métabolisme cellulaire normal, lors de la respiration cellulaire par les enzymes mitochondrielles, mais sont aussi des produits d'enzymes spécifiques de certaines cellules, libérés dans des contextes particuliers.

La NADPH oxydase libère des anions superoxydes pouvant se transformer en peroxyde d'hydrogène au niveau du phagolysosome. Cependant, cette enzyme s'assemble aussi au niveau de la membrane

cellulaire. La libération d'espèces réactives de l'oxygène et du contenu des granules directement dans l'environnement extracellulaire permet ainsi d'endommager les particules de grande taille impossibles à phagocytter (Riches et Martin 2018). L'activation par excès de ce mécanisme peut néanmoins causer des dommages tissulaires et induire certaines pathologies comme des cancers ou des maladies cardiovasculaires (Brieger et al. 2012). L'importance de la NADPH oxydase dans les réponses aux stimuli infectieux est révélée par la gravité du phénotype clinique observé chez les patients présentant un déficit primaire héréditaire causé par des mutations d'une des sous-unités du complexe NADPH oxydase induisant une anomalie fonctionnelle, la granulomatose septique chronique. Cette maladie est caractérisée notamment par des infections bactériennes et fongiques récurrentes, sévères et potentiellement mortelles, principalement pulmonaires ou cutanées mais parfois disséminées, et causées le plus fréquemment par *Aspergillus*, *Staphylococcus aureus* ou encore *Salmonella* (Arnold et Heimall 2017). Les oxyde nitrique synthases, sont quant à elles responsables de la production d'oxyde nitrique à partir de l'arginine (Bogdan 2015). Ces enzymes peuvent avoir une expression constitutive ou inductible, suite à un stimulus infectieux par exemple, et sont exprimées par les cellules myéloïdes mais aussi les cellules épithéliales respiratoires. La myélopéroxydase, une enzyme principalement localisée dans les granules azurophiles des PNN, catalyse la formation l'acide hypochloreux (HOCl) à partir de l' H_2O_2 (Aratani 2018). Tout comme la NADPH oxydase, elle est libérée à la fois dans le compartiment phagolysosomal et dans l'environnement extracellulaire. En plus des cellules phagocytaires, il a été montré que les cellules épithéliales bronchiques étaient aussi capables de libérer des ROS (Sun et al. 2012).

Les effets des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sont dus à des réactions avec les groupements thiols des enzymes, des protéines, de l'ADN mais aussi des membranes cellulaires des bactéries, champignons et virus (Dryden 2018). Il a aussi été constaté que ces composés pouvaient induire des effets indirects, comme l'apoptose de la cellule hôte restreignant ainsi la croissance de micro-organismes intracellulaires (Bogdan 2015).

d. Les enzymes

Plusieurs autres médiateurs enzymatiques participant à l'immunité innée pulmonaire ont été identifiés. La phospholipase A2 (PLA2), une enzyme produite par les macrophages, possède une activité antimicrobienne en hydrolysant les phospholipides des membranes bactériennes (van Hensbergen et al. 2020). Les chitinases, appartenant à la famille des 18-glycosyl-hydrolases, sont des enzymes qui clivent la chitine en chito-oligomères de faible poids moléculaire. La chitine est un composant structurel important d'agents pathogènes tels que les parasites et les champignons, ces enzymes ont donc un potentiel rôle protecteur contre des infections par ces pathogènes. Les chitinases peuvent être divisées en deux groupes : les chitinases véritables, à activité enzymatique (*acid mammalian chitinase* ou AMCase et chitotriosidase) et les *chitinase-like proteins* (ou CLP) qui peuvent se lier à la chitine ou aux

chito-oligosaccharides, mais qui n'ont pas d'activité enzymatique (Przysucha, Górska, et Krenke 2020). La chitotriosidase, qui possède une activité hydrolytique et de trans-glycosylation, est produite, au niveau pulmonaire, principalement par les macrophages alvéolaires, les PNN et les cellules dendritiques (Ziatabar et al. 2018). Le rôle exact de cette enzyme dans la réponse immunitaire innée est encore mal connu mais elle interviendrait dans l'activation des macrophages alvéolaires (Przysucha, Górska, et Krenke 2020; Ziatabar et al. 2018). L'enzyme AMCase est quant à elle, exprimée au niveau de la muqueuse gastrique et de l'épithélium broncho-pulmonaire par les cellules épithéliales et les macrophages (Przysucha, Górska, et Krenke 2020). Cette enzyme libérée dans la lumière des voies aériennes, permettrait d'éviter l'accumulation de chitine exogène pro-inflammatoire et donc de maintenir l'homéostasie des voies aériennes (Steven J. et Richard M. 2018). Les *chitinase-like proteins* sont aussi considérées comme des « *chitine lectines* » et sont produites par de nombreux types cellulaires comme les PNN, les macrophages mais aussi les cellules épithéliales. Leurs modes d'action dans la défense antimicrobienne sont encore indéterminés mais leurs concentrations sériques et pulmonaires sont augmentées en contexte infectieux (Lee et al. 2011).

e. Les cytokines

La reconnaissance d'un pathogène par des PRR déclenche une cascade de signaux intracellulaires induisant l'activation de facteurs de transcription, dont NF-κB et AP-1 qui transloquent dans le noyau et induisent l'activation de la transcription d'une grande variété de gènes impliqués dans l'inflammation et la réponse immunitaire comme les cytokines et les chimiokines. Ces médiateurs permettent la communication entre les différents acteurs cellulaires du système de défense antimicrobien afin d'orchestrer la localisation, l'intensité et la résolution de la réponse inflammatoire, permettant *in fine* l'élimination du pathogène tout en préservant l'intégrité des tissus infectés. Leur action peut être pro- ou anti-inflammatoire (J.-M. Zhang et An 2007). Nous évoquerons dans la suite de ce paragraphe, uniquement le rôle des cytokines et chimiokines impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire innée.

Les chimiokines sont des cytokines qui régulent la migration des leucocytes du sang vers les tissus. Elles sont classées en plusieurs familles en fonction du nombre de cystéines en C-terminal qu'elles possèdent ; les chimiokines de type C avec une cystéine, de type CC avec 2 cystéines adjacentes, les chimiokines de type CXC, et CXXXC, et CXXXC avec 2 cystéines séparées par 1 ou 3 acides aminés représentés par la lettre X, les deux derniers types étant minoritaires. La reconnaissance d'un signal infectieux au niveau des voies aériennes inférieures induit rapidement la production de TNF- α (*tumor necrosis factor*) et d'IL-1 β , par les macrophages, et les cellules NK. Ces cytokines stimulent l'expression de molécules d'adhésion et la production de chimiokines par l'endothélium vasculaire (Toews 2001). Les chimiokines forment alors un gradient et dirigent ainsi la migration des populations leucocytaires requises vers le site infectieux ou inflammatoire mais aussi l'activation des PNN, et la synthèse de cytokines pro-

inflammatoires telles qu'IL-1 β ou l'IL-6 par les cellules immunitaires. La chimiokine la plus étudiée est l'IL-8 ou CXCL-8. Elle est produite par l'ensemble des cellules de l'immunité innée, présentes au niveau pulmonaire (PNN, macrophages et cellules épithéliales) (Hoffmann et al. 2002). Sa production est déclenchée par un signal infectieux mais aussi par des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α ou l'IL-1 (Kunkel et al. 1991). En plus de son fort pouvoir chimiotactique sur les PNN, l'IL-8 stimule leur dégranulation et la production de radicaux libres (Palomino et Marti 2015). Une autre chimiokine a une action sur le recrutement des PNN au niveau pulmonaire ; la *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1). L'IL-6, principalement sécrétée en réponse à l'activation des TLR et les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 ou le TNF- α , contribue à la défense de l'hôte en stimulant la production hépatique des protéines de la phase aiguë, l'hématopoïèse ainsi que le recrutement et l'activation des cellules mononucléées (Tanaka, Narasaki, et Kishimoto 2014). Bien qu'elle soit généralement considérée comme une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6 a également de nombreuses activités régénératrices et anti-inflammatoires (Scheller et al. 2011). Le mécanisme moléculaire qui expliquerait cette dualité d'action de l'IL-6 serait basé sur le récepteur activé ; la signalisation « classique » via le récepteur membranaire induirait des effets anti-inflammatoires alors que l'activation du récepteur soluble par la voie « trans » serait à l'origine de l'action pro-inflammatoire de l'IL-6 (Scheller et al. 2011). L'IL-12, une cytokine produite par les cellules dendritiques et les macrophages activés, stimule l'activité cytotoxique des cellules NK, qui vont elles-mêmes produire de l'interféron- γ (IFN- γ). Grâce à son action sur ce type cellulaire, l'IL-12 joue un rôle fondamental, en association avec l'IFN- γ , lors d'infections par des bactéries intracellulaires ou par des virus. Les IFN de type I (α et β) sont produits par les cellules infectées par des particules virales et par les macrophages, et permettent d'une part d'inhiber la réplication virale et d'autre part d'activer les cellules NK. L'interféron de type II (γ) est produit par les lymphocytes T activés et les cellules NK. Comme l'IL-12, l'IFN- γ active les macrophages, augmente leur activité microbicide et induit l'activité cytotoxique des cellules NK. D'autres molécules participent de manière indirecte à la réponse anti-infectieuse. C'est le cas des facteurs de croissance hématopoïétiques, comme le *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF) et le *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) notamment secrétés par les lymphocytes T, B et les cellules épithéliales. Ces cytokines agissent sur la multiplication des cellules progénitrices myéloïdes induisant leur prolifération et leur différenciation, et augmentent ainsi le taux de PNN et de macrophages sur le site de l'inflammation. Le GM-CSF augmente également les fonctions antimicrobiennes des cellules myéloïdes (Becher, Tugues, et Greter 2016).

Une mauvaise régulation de l'inflammation peut devenir délétère pour le tissu pulmonaire. Il existe donc aussi des processus de régulation telle que la synthèse de cytokines anti-inflammatoires qui vont limiter l'inflammation afin qu'elle ne s'exacerbe et ne devienne pathologique. Ces cytokines, comme l'IL-10 ou le *transforming growth factor- β* (TGF- β), vont agir sur les cellules immunitaires pour inhiber leur activation et la production des cytokines pro-inflammatoires (Muehlstedt, Lyte, et Rodriguez 2002). Il

existe aussi des récepteurs qui comme le récepteur soluble de l'IL-1, l'*IL-1 receptor antagonist* (IL-1Ra) va entrer en compétition avec les récepteurs membranaires de l'IL-1 β pour en neutraliser ses effets (Adib-Conquy et Cavaillon 2012). Ces cytokines sont synthétisées par divers types cellulaires pulmonaires, notamment par les cellules résidentes des voies aériennes (Branchett et Lloyd 2019).

5. La régulation de l'immunité innée pulmonaire par le microbiote

Les épithéliums de la peau et des muqueuses sont colonisés de façon permanente par des communautés microbiennes variées (incluant des bactéries, virus, champignons et protozoaires). L'ensemble de ces communautés est appelé microbiote, le plus étudié étant le microbiote intestinal. Celui-ci joue un rôle de protection contre les infections intestinales grâce à différents mécanismes : effet barrière limitant l'interaction entre les micro-organismes pathogènes et les cellules de l'épithélium, effet de compétition pour les nutriments mais également grâce à une production continu de peptides antimicrobiens par les cellules immunitaires (Brown et Clarke 2017). Cette régulation de l'immunité s'exerce donc localement mais peut également se faire à distance notamment au niveau pulmonaire, elle est décrite sous le terme de « *gut-lung axis* ». Ainsi Schuijt *et al.* ont montré que des souris, dépourvues de microbiote intestinal, infectées par voie intranasale par la bactérie *Streptococcus pneumoniae* présentaient une charge pulmonaire bactérienne plus élevée, une mortalité accélérée, et une activité phagocytaire des macrophages alvéolaires diminuée par rapport aux souris possédant un microbiote intestinal normal (Schuijt *et al.* 2016). De la même manière, un rôle protecteur du microbiote intestinal a été montré face aux infections pulmonaires virales (Brown et Clarke 2017). Récemment, l'existence d'un microbiote pulmonaire a été suggérée. En effet, même si des indices de sa présence avaient déjà émergés, une étude métagénomique de patients asthmatiques a fait le constat de la présence de communautés bactériennes dans des lavages broncho-alvéolaires de sujets contrôles (Hilty *et al.* 2010). Malgré les difficultés liées à ce type de prélèvement, réalisé par des méthodes invasives et donc réservé, pour des raisons éthiques, à des individus malades, et pouvant être contaminés par la flore des voies respiratoires supérieures, la caractérisation du microbiote pulmonaire commensal se précise. Sa biodiversité est forte ainsi que son abondance en bactéries anaérobies strictes (Hilty *et al.* 2010). En plus des bactéries, d'autres micro-organismes ont été détectés au sein de l'écosystème pulmonaire, comme des champignons (L. D. N. Nguyen, Viscogliosi, et Delhaes 2015) et des virus (Billard *et al.* 2017). Tout comme le microbiote intestinal, le microbiote pulmonaire aurait un rôle primordial dans l'homéostasie pulmonaire. Concernant ses effets sur l'immunité, il présenterait un rôle de barrière, qui fait référence au concept d'exclusion compétitive avec les pathogènes, décrit aussi au niveau intestinal, et un rôle d'éducation dès la naissance limitant le développement d'asthme et d'allergie. Le microbiote pulmonaire participerait à l'inhibition de la réponse immunitaire excessive en cas d'infection aiguë par le virus de la grippe, en induisant la différenciation des macrophages alvéolaires en phénotype M2 impliqués dans la réparation et la cicatrisation tissulaires (Wang, Li, et Tian 2017). Il a également été suggéré qu'une dysbiose pouvait contribuer aux maladies pulmonaires. Les patients asthmatiques présentent une composition

différente (proportion de certaines espèces modifiée) de leur microbiote pulmonaire comparée à celle de témoins (Hilty et al. 2010). Chez les patients atteints de mucoviscidose, il a été montré qu'une diminution de la diversité bactérienne corrélait avec une dégradation de la fonction pulmonaire (Coburn et al. 2015).

L'étude du microbiote pulmonaire, ainsi que son lien avec le microbiote intestinal, offre des perspectives prometteuses en termes de clés physiopathologiques des maladies multifactorielles et de nouvelles potentialités diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques.

6. Place des cellules épithéliales bronchiques dans la défense antimicrobienne pulmonaire

Différents modèles existent pour étudier les interactions hôtes-pathogènes à partir des cellules épithéliales bronchiques (CEB). Certains auteurs utilisent des lignées de CEB, immortalisées ou tumorales, comme les BEAS-2B et les 16HBE, toutes deux isolées à partir de l'épithélium bronchique d'un patient sain, et secondairement immortalisées. Un raffinement du modèle consiste à utiliser des CEB primaires, exemptes de toute modification génétique et dont les fonctions physiologiques sont intactes. Enfin, pour mieux reproduire les conditions physiologiques, des systèmes de culture cellulaire sur filtres à interface air-liquide (ALI) ont été mis au point. Dans ces conditions de culture, les CEB primaires se différencient jusqu'à atteindre le phénotype caractéristique d'un épithélium pseudostratifié cilié et sécrétant du mucus. Grâce à ces différents modèles, nous trouvons des preuves de plus en plus nombreuses qui suggèrent que l'épithélium bronchique joue un rôle clé dans la réponse antimicrobienne, au même titre que les cellules hématopoïétiques.

De nombreux *pattern recognition receptors* ont été identifiés chez les CEB. Elles expriment l'ensemble des TLR (Beisswenger, Hess, et Bals 2012; Greene et al. 2005), mais aussi Dectine 1 (Sun et al. 2012), NLRP3 (C.-C. Liu et al. 2021), le récepteur du mannose, un *C-type lectin receptor* reconnaissant des carbohydrates riches en mannoses (Michael et al. 2017), ou encore la PTX3 (B. Han et al. 2005, 3). Ces cellules sont donc capables d'interagir avec différents pathogènes et de répondre par différents mécanismes immunitaires. Les CEB sécrètent des peptides antimicrobiens et cette sécrétion est inducible dès la reconnaissance d'un agent pathogène. Les molécules antimicrobiennes produites par les CEB peuvent être de petites molécules cationiques, constitutives (hBD1), ou induites par divers pathogènes (hBD2, -3 et -4, LL-37), ou des protéines de plus gros poids moléculaire, comme le lysozyme et la lactoferrine (Diamond, Legarda, et Ryan 2000). Plusieurs études ont montré que les CEB étaient capables de produire et sécréter des ROS en réponse à une infection. Ainsi, Sun et al. ont observé la génération de ROS, dépendante de Dectine 1, par les CEB infectées par *A. fumigatus*, (Sun et al. 2012). De même, l'infection de CEB par le virus *Influenza A* induit une augmentation significative de la sécrétion de ROS, de plus de 3 fois par rapport au contrôle (C.-C. Liu et al. 2021, 1). Cependant, le rôle précis de ces composés produits par les CEB dans l'activité antimicrobienne est indéterminé jusqu'à ce

jour. Comme toutes autres cellules immunitaires, les CEB synthétisent des cytokines et chimiokines comme l'IL-6, l'IL-8, ou le GM-CSF (Sun et al. 2012) en réponse aux stimuli infectieux. Ces cellules participent donc activement au recrutement des PNN et monocytes sur le site de l'infection. Les CEB sont aussi capables d'internaliser des pathogènes. Ce phénomène a notamment été mis en évidence pour les conidies d'*A. fumigatus* (Paris et al. 1997; Gomez et al. 2010; Clark et al. 2019; Toor et al. 2018). Cependant les résultats obtenus concernant la fréquence de ce phénomène sont très différents d'une étude à l'autre, ce qui peut être expliqué en partie par l'utilisation de modèles d'étude variés (multiplicité d'infection, types de CEB, ...). De plus, Fernandes *et al.* ont décrit la formation, à l'intérieur des CEB, d'un tunnel d'actine dans lequel peuvent pénétrer les filaments d'*A. fumigatus* et qui n'altère pas la viabilité cellulaire (Fernandes et al. 2018). Les CEB sont aussi capables d'internaliser la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, un phénomène qui serait dépendant de la protéine *cystic fibrosis conductance regulator* (CFTR), présente à la membrane plasmique apicale des CEB (Pier et al. 1996). Cependant plusieurs études donnent des données divergentes sur cet aspect. Darling, *et al* ont montré à l'inverse que l'absence de CFTR ou la présence d'une protéine non fonctionnelle, favorisait l'internalisation de cette bactérie. Les auteurs font l'hypothèse que CFTR inhiberait l'invasion cellulaire par *P. aeruginosa* et que cette propriété rendrait les CEB des patients atteints de mucoviscidose plus susceptibles aux infections par cette bactérie (Darling, Dewar, et Evans 2004). Le devenir de ces pathogènes après internalisation reste incertain. Il reste donc à comprendre si cette internalisation fait partie intégrante des mécanismes de l'immunité innée des CEB ou s'il s'agit d'une stratégie d'échappement des pathogènes qui se serviraient des CEB comme d'un réservoir leur permettant de se protéger des mécanismes antimicrobiens. Enfin, il a été récemment montré que les CEB avaient un rôle fongistatique vis-à-vis d'*A. fumigatus*. En effet, il a été observé que la formation de filaments par ce champignon, qui reflète un mécanisme invasif chez l'Homme, était significativement inhibée en présence de CEB (Richard et al. 2018). Cette action antifongique des CEB est dépendante de la voie PI3-kinase et de l'interaction des cellules avec la lectine fongique FleA.

En conclusion, il ne fait aucun doute que les cellules épithéliales des voies aériennes inférieures ne jouent pas seulement le rôle d'une simple barrière physique et mécanique vis-à-vis des pathogènes. Toutes les familles de récepteurs de l'immunité innée sont exprimées par les CEB leur donnant le potentiel de détecter à un large panel de pathogènes. L'activation de ces récepteurs induit une grande diversité de mécanismes antimicrobiens, et contribue à l'initiation précoce de la réponse immunitaire innée.

7. Pathologies respiratoires chroniques et infections

Le rôle des CEB dans la réponse immunitaire innée est aussi révélé par la forte prévalence de la colonisation bronchique par différents pathogènes chez les patients dont la barrière épithéliale des voies

aériennes est altérée. Les principales causes de ce dysfonctionnement peuvent avoir une origine génétique, comme par exemple des mutations au niveau du gène *CFTR* responsables de la mucoviscidose, ou encore être induites par l'environnement comme l'intoxication exogène par le tabac qui est la cause principale de bronchopneumopathie chronique obstructive.

a. La bronchopneumopathie chronique obstructive

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une forme grave de bronchite, causée dans environ 80% des cas par le tabagisme selon santé publique France (<https://www.santepubliquefrance.fr>). Elle est caractérisée par une inflammation des voies aériennes, notamment des bronches, entraînant l'épaississement de leur paroi et donc leur rétrécissement, et aggravée par une hypersécrétion de mucus. L'inflammation qui s'étend à l'ensemble du tissu pulmonaire entraîne des lésions épithéliales et des troubles de la réparation tissulaire. Cette maladie, à progression lente, évolue sur plusieurs années et provoque des dommages irréversibles du parenchyme pulmonaire tel que l'emphysème, dû à la destruction des alvéoles pulmonaires, qui conduit à terme à une insuffisance respiratoire chronique.

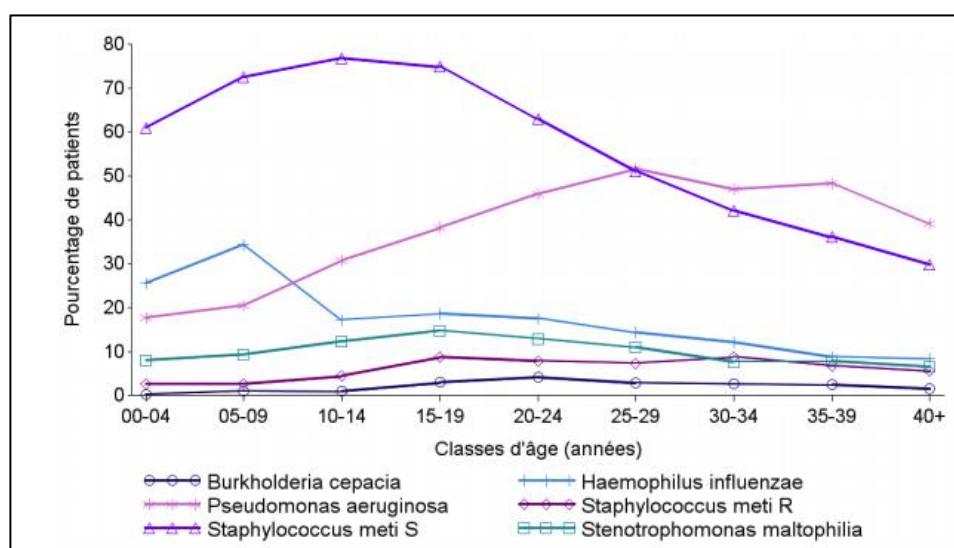
Ces anomalies sont responsables de l'altération de la clairance mucociliaire qui favorise les infections bronchiques (Sethi et Murphy 2009). Ces infections augmentent à leur tour la production de mucus et maintiennent dans un état inflammatoire les bronches et les bronchioles et peuvent ainsi être à l'origine d'exacerbations (Decramer, Janssens, et Miravitles 2012). L'isolement de bactéries *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa* est fortement associé à l'apparition d'une exacerbation chez les patients BPCO (Sethi et Murphy 2009) même s'il est difficile d'incriminer tel ou tel pathogène puisque souvent multiples au sein des bouches. Selon les études, le taux de détection des virus dans les prélèvements respiratoires de patients au cours d'une exacerbation varie de 22 % à 64 % (Hewitt et al. 2016). Parmi les virus les plus fréquemment associés aux exacerbations, on observe les rhinovirus ainsi que le virus de la grippe, celui-ci étant détecté au cours des exacerbations les plus sévères et nécessitant une hospitalisation (Hewitt et al. 2016). Le virus respiratoire syncytial et le métapneumovirus humain ont aussi récemment été associés aux exacerbations de bronchites (Sethi et Murphy 2009). Enfin, la BPCO est un facteur favorisant de la colonisation pulmonaire aspergillaire, *Aspergillus* étant retrouvé chez 24,6 % des patients BPCO (Shahi et al. 2015), mais aussi de développement d'aspergillose pulmonaire chronique (APC). Alors que la tuberculose est le facteur de risque principal des APC dans les pays du sud, la BPCO apparaît comme le principal facteur dans les pays occidentaux, en France notamment. L'APC, dont il existe une grande variabilité radiologique, présente un taux de mortalité à 5 ans compris entre 20 et 50 %, même après prescription de traitements antifongiques (Denning et al. 2016).

b. La mucoviscidose

La mucoviscidose (ou CF pour *Cystic Fibrosis*) est une maladie génétique autosomale récessive. Cette pathologie est causée par des mutations du gène *CFTR*, codant pour la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis*

Transmembrane conductance Regulator) exprimée à la membrane apicale des cellules de nombreux épithéliums, notamment l'épithélium pulmonaire. Cette protéine est un canal ionique, responsable de l'export d'ions chlorures du cytoplasme des cellules vers la lumière des voies aériennes. L'absence ou la synthèse d'un CFTR défectueux, entraînent une hyperabsorption d'eau conduisant à la déshydratation du mucus qui devient épais et incapable de jouer son rôle dans la clairance des particules et micro-organismes inhalés. La conséquence directe de cette anomalie est l'implantation de divers pathogènes (bactériens, viraux et fongiques) qui vont coloniser les voies aériennes des patients CF. Le dépistage de ces micro-organismes est donc une nécessité absolue dès le plus jeune âge, afin d'optimiser la prise en charge de ces patients.

Les infections bronchiques bactériennes surviennent en général dès les premières années de vie des enfants CF. L'infection est initialement aigüe, avec une possibilité d'éradication du pathogène, puis devient le plus souvent chronique avec une persistance de germes multiples malgré la mise en place d'une antibiothérapie adaptée. Classiquement, les premières bactéries à coloniser les bronches des enfants CF sont *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus* (O'Sullivan et Freedman 2009; « Registre et muco en chiffres » 2015). A l'âge adulte, *Pseudomonas aeruginosa* devient le pathogène prédominant. Ce bacille Gram négatif de l'environnement est retrouvé chez environ 70 % des patients âgés entre 25 et 34 ans (*The Cystic Fibrosis Foundation* 2017). L'infection à *P. aeruginosa* est associée à un déclin plus rapide de la fonction respiratoire des patients (Ren et al. 2012). D'autres bactéries comme *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, les mycobactéries non tuberculeuses ou le complexe *Burkholderia cepacia* sont également communément isolées chez les patients CF (**Figure 12**).



*Figure 12 : Prévalence des bactéries respiratoires dans la mucoviscidose, par catégories d'âge. Données issues du "Registre français de la mucoviscidose, 2018". Meti S : *Staphylococcus aureus* meticilline sensible ; Meti R : *Staphylococcus aureus* meticilline résistant.*

L'impact des infections virales sur la détérioration des voies respiratoires des patients CF est maintenant reconnu (Billard et al. 2017). En effet, une infection virale peut être à l'origine d'exacerbation pulmonaire, l'étiologie bactérienne étant écartée. L'infection virale peut également faire le lit de surinfections bactériennes (Armstrong et al. 1998). Bien que l'incidence des infections virales ne diffère pas entre patients CF et non-CF, les conséquences cliniques sont beaucoup plus sévères pour ces premiers. Les virus majoritairement identifiés sont identiques à ceux trouvés chez les sujets sains : Rhinovirus, les virus *Influenza*, virus respiratoire syncytial, virus *Parainfluenza*. Les Rhinovirus et les virus *Influenza* peuvent être à l'origine d'exacerbations particulièrement sévères (Asner et al. 2012).

L'isolement d'espèces fongiques à partir des prélèvements broncho-pulmonaires des patients CF est aussi fréquent. Une étude française multicentrique de 2018 notait une culture fongique positive chez 81 % des patients issus d'une cohorte de 243 patients CF de plus de 6 ans (Coron et al. 2018). L'amélioration globale du pronostic de la maladie et l'utilisation d'antibiotiques au long cours expliquent en partie cette prévalence accrue chez les patients les plus âgés. *Candida* et *Aspergillus* sont les genres fongiques les plus couramment rencontrés. La fréquence d'isolement de *Candida albicans* varie de 35 à 93 %, celle d'*Aspergillus fumigatus* de 6 à 60 % (Singh et al. 2018). Par ailleurs, l'optimisation des moyens de détection et d'identification des agents fongiques fait émerger de « nouvelles » espèces dans ce contexte, comme les espèces cryptiques d'*Aspergillus*. Le rôle d'*Aspergillus fumigatus* dans l'aggravation de la maladie pulmonaire sous-jacente est maintenant décrite (King, Brunel, et Warris 2016), l'impact des autres pathogènes fongiques fait toujours l'objet de discussion. La colonisation bronchique par *Aspergillus* est le point de départ de bronchites aspergillaires et de formes immuno-allergiques, dont principalement l'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA) (Gago, Denning, et Bowyer 2019). Chez les patients CF, la prévalence de l'ABPA varie de 2 à 25 % et augmente avec l'âge (King, Brunel, et Warris 2016). En France, en 2009, un diagnostic d'ABPA a été porté chez 18 % des patients CF de plus de 18 ans (Armstead, Morris, et Denning 2014). L'ABPA, si elle n'est pas prise en charge précocement, peut entraîner des bronchectasies et/ou une fibrose pulmonaire. L'ABPA est donc une complication sévère qui survient avec une prévalence élevée chez les patients CF. Le diagnostic est difficile car les symptômes miment ceux de la maladie sous-jacente. Il repose sur un faisceau de critères cliniques, radiologiques et biologiques. Enfin, certains patients CF ayant bénéficié d'une transplantation pulmonaire et recevant, de fait, des thérapies immunosuppressives sont à risque de développer une aspergillose pulmonaire invasive (Hatzagiorgou et al. 2009). Cette forme, la plus grave des maladies aspergillaires, expose à un risque de mortalité d'environ 50%. Citons enfin d'autres pathogènes fongiques tels que *Scedosporium sp.*, *Penicillium sp.*, et *Exophiala dermatitidis* communément isolés des voies respiratoires des patients CF (Coron et al. 2018), sans que leur rôle précis dans la survenue de signes cliniques n'aient été clairement établi.

II- La mémoire de l'immunité innée

L'immunité innée, caractérisée notamment par son action pléiotropique et par l'absence de mémoire immunologique, n'est pas toujours suffisante pour éliminer les pathogènes. Pour y remédier, les organismes supérieurs ont développé un système immunitaire particulier, l'immunité adaptative, médiee par les lymphocytes. Ces cellules présentent plusieurs caractéristiques importantes telles que leur spécificité antigénique obtenue grâce au réarrangement des gènes codant pour leurs récepteurs, leur capacité à proliférer en un clone à la suite de la reconnaissance d'un antigène « étranger », et leur différenciation en cellules effectrices capables d'éliminer l'agent infectieux. Une partie des lymphocytes se différencie en cellules mémoires, prêtes à répondre rapidement et spécifiquement vis-à-vis du même agent pathogène s'il est à nouveau rencontré. Cependant, le cloisonnement entre l'immunité innée et l'immunité adaptative n'est pas absolu car plusieurs types cellulaires sont impliqués dans les deux types de réponse immunitaire comme les lymphocytes T $\gamma\delta$ ou les cellules lymphoïdes innées.

L'analyse de la littérature, parfois ancienne, ainsi que des données expérimentales publiées au cours de la dernière décennie montrent l'existence d'une mémoire immunologique pour les cellules appartenant au système de l'immunité innée.

1. Analyse historique

Dès le début du 20^e siècle, il a été montré que l'inoculation d'agents pathogènes, à plusieurs espèces de plantes dépourvues d'immunité adaptative, induit une résistance accrue aux infections ultérieures par d'autres pathogènes (Chester 1933). Ce phénomène, appelé *systemic acquired resistance* (SAR), se caractérise par une réponse systémique, présente même dans les organes qui n'ont pas été infectés lors de la première stimulation, capable de durer de quelques semaines à plusieurs mois, voire tout au long de la vie de la plante (Conrath 2006). Bien que le mécanisme exact à l'origine du SAR ne soit pas encore connu, il a été suggéré que l'acide salicylique jouait un rôle important. En effet, sa concentration augmente significativement dans le tissu infecté mais aussi au niveau systémique, et cette augmentation est corrélée avec l'induction de l'expression des *pathogenesis-related genes* des plantes, qui codent pour des protéines aux propriétés antimicrobiennes (Durrant et Dong 2004).

Des observations similaires ont été faites chez les invertébrés, organismes qui ne possèdent ni lymphocytes (T ou B), ni équivalents cellulaires (Kurtz 2005). Chez ces organismes, l'effet d'*« immune priming »* n'est pas spécifique du pathogène rencontré lors de la primo-infection et peut être durable (Schmid-Hempel 2004). Ainsi, chez le coléoptère *Tenebrio molitor*, 7 jours après une injection de LPS, mimant une infection par des bactéries Gram négatif, on observe une protection contre une infection secondaire par des spores de *Metarhizium anisopliae*, un champignon entomopathogène (Moret et Siva-Jothy 2003). La survie des larves de *T. molitor* traitées au LPS est donc meilleure après l'infection fongique et cette résistance a été corrélée à une activité antimicrobienne significativement plus

importante dans l'hémolymphé des larves. De même, des larves de *Galleria mellonella*, un lépidoptère, pré-stimulées avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* inactivée à la chaleur, ont une durée de vie allongée par rapport aux témoins non traités, lorsqu'elles sont exposées secondairement à des doses létales de *Beauveria bassiana*, un champignon entomopathogène (Vilcinskas et Wedde 1997). Ceci pourrait être lié à une concentration accrue, dans l'hémolymphé, de médiateurs inhibant la croissance fongique et donc retardant le développement de l'infection. Enfin, la pré-exposition de moustiques du genre *Anopheles* au protozoaire *Plasmodium sp.* induit une réponse immunitaire plus efficace lors d'une réinfection 7 ou 14 jours après. Selon les auteurs, ceci pourrait être expliqué par une augmentation quantitative et qualitative des granulocytes en circulation dans l'hémolymphé des moustiques pré-infectés (Rodrigues et al. 2010).

Chez l'Homme, ce sont d'abord des études observationnelles et épidémiologiques sur la vaccination qui ont témoigné de l'existence probable du même type de phénomène. Les auteurs de différentes études suggèrent que la réduction de la mortalité infantile globale observée chez les enfants vaccinés ne peut s'expliquer uniquement par la prévention de la maladie ciblée par le vaccin (Benn et al. 2013). Historiquement, différents travaux ont montré qu'en plus des effets spécifiques contre une pathologie, les vaccins avaient également des effets non spécifiques bénéfiques et augmentaient la capacité du système immunitaire à lutter contre d'autres agents pathogènes. Depuis l'introduction de la vaccination contre la variole, il y a environ 200 ans, jusqu'à son interruption en 1980, année au cours de laquelle l'Organisation Mondiale de la Santé a déclaré la maladie éradiquée, des rapports de médecins et de scientifiques ont été publiés sur les effets secondaires bénéfiques de cette vaccination (Mayr 2004). Ainsi, à la fin du 19^e siècle, le Dr Gierl, médecin bavarois écrit : « Dans le cadre de mes vaccinations, j'ai remarqué que les troubles oculaires et auriculaires non seulement s'amélioraient mais disparaissaient ainsi que les maladies chroniques, [...] les éruptions de toutes sortes s'amélioraient. La vaccination est donc utilisée non seulement comme une protection contre la variole, mais aussi comme un remède pour un certain nombre de maladies ». Dans le règlement autrichien sur la vaccination de 1805, l'article 28 indique que « Les éruptions cutanées et autres affections chroniques ont même été considérées comme s'améliorant assez fréquemment à la suite de cette vaccination ». Dans son manuel de 1930, le médecin allemand E. Paschen liste différentes observations faites au 19^e siècle, notamment celles du médecin « Dubousquet-Laborderie [qui] a même montré que de nombreux écoliers et occupants vaccinés d'asile sont moins sensibles aux maladies infectieuses telles que la rougeole, la scarlatine, la coqueluche que les personnes non vaccinées » ou celles du médecin français Daniel Fouquet en 1850, qui indique que « [cette vaccination possède] un effet positif, parfois même prophylactique, sur la syphilis » (Mayr 2004). Le même type d'observation a été fait plus récemment avec le vaccin antituberculeux ou BCG (Bacille Calmette et Guérin), vaccin vivant atténué constitué d'une souche de *Mycobacterium bovis*, agent de la tuberculose bovine très proche de l'agent généralement responsable de la forme humaine, *Mycobacterium tuberculosis*. On considère que ce vaccin protège contre des formes particulièrement

graves de l'infection tuberculeuse que sont la méningite et la tuberculose disséminée. Très tôt après son introduction, il a été suggéré que la très faible mortalité observée chez les enfants vaccinés avec le BCG pouvait être due à une immunité non spécifique. En 1927, les enfants suédois vaccinés par le BCG à la naissance avaient un taux de mortalité presque trois fois inférieur à celui des enfants non vaccinés (Benn et al. 2013). Des essais randomisés ont confirmé ces observations. En Guinée-Bissau, les enfants nés avec un petit poids de naissance (cohorte de 2 320 nourrissons), ayant reçu le BCG à la naissance, présentaient un taux de mortalité néonatale réduit de 40% par rapport à ceux l'ayant reçu de façon retardée, à 6 semaines de vie (Aaby et al. 2011). Cependant, la mortalité infantile à 1 an n'était pas significativement différente entre les 2 groupes. Il a alors été suggéré que le BCG injecté de façon précoce est associé à des effets bénéfiques sur la survie au cours de la petite enfance et que la réduction de la mortalité néonatale est principalement due à une diminution des cas de septicémie néonatale, d'infection respiratoire et de fièvre chez les enfants. Très récemment, une étude a émis l'hypothèse selon laquelle les pays sans programme national de vaccination par le BCG présentaient une mortalité liée à l'infection par le SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) plus importante que les pays possédant un programme de vaccination (Escobar, Molina-Cruz, et Barillas-Mury 2020) (**Figure 13**). L'association entre la vaccination par le BCG et la réduction de la mortalité due à la COVID-19 (*coronavirus disease 2019*), maladie induite par le SARS-CoV-2, observée dans cette étude est séduisante, mais insuffisante pour établir un lien de causalité entre la vaccination par le BCG et la protection contre les formes graves de la COVID-19.

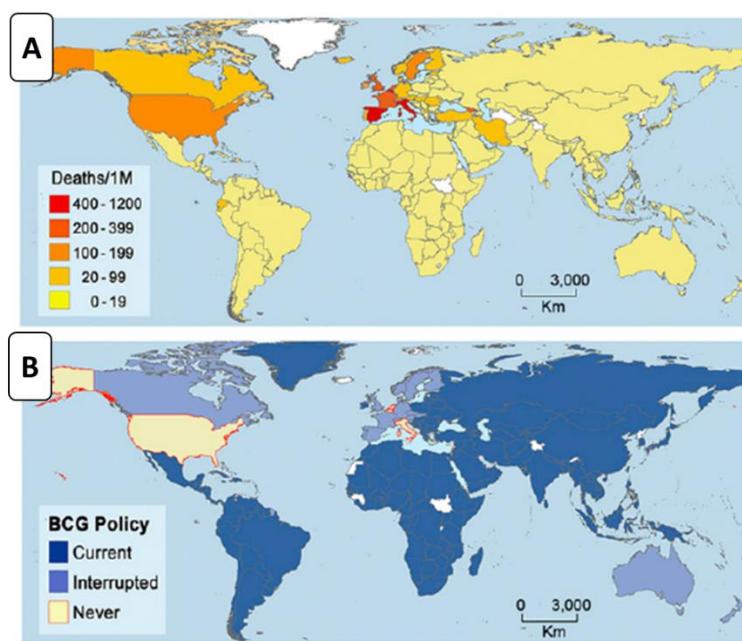


Figure 13 : Mortalité mondiale en morts par million d'habitants, due à la COVID 19 (A) et programme de vaccination du BCG (B), figure adaptée de (Escobar, Molina-Cruz, et Barillas-Mury 2020)

Les effets non spécifiques du BCG ont également été étudiés *in vivo*, en utilisant des modèles murins. Ainsi des souris nude (caractérisées par l'absence de lymphocytes T) recevant le BCG par voie

intraveineuse, présentent, 5 jours après l'infection avec le trématode *Schistosoma mansoni*, une charge parasitaire pulmonaire significativement réduite par rapport aux souris témoins non vaccinées (Tribouley, Tribouley-Duret, et Appriou 1978). Plus récemment, une étude a validé ces observations à la fois *in vitro*, en utilisant des monocytes issus de donneurs sains vaccinés par le BCG, et *in vivo* grâce à un modèle de souris SCID, déficientes en lymphocytes T et B (Kleinnijenhuis et al. 2012). Les monocytes ont été isolés des volontaires, avant la vaccination puis 2 semaines et 3 mois après leur vaccination. La stimulation *in vitro* des monocytes par *M. tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* ou encore *C. albicans* montre que les monocytes isolés après vaccination produisent 2 à 6 fois plus de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α et IL1 β), que les monocytes isolés avant (Kleinnijenhuis et al. 2012). Ces résultats ont été appuyés par des expériences *in vivo*, qui ont montré que les souris SCID, vaccinées par le BCG et infectées 2 semaines plus tard par des doses létale de *C. albicans*, présentaient un taux de survie de 100%, 28 jours post-injection, par rapport aux animaux contrôles dont le taux de survie à ce même moment était de 30% (**Figure 14**). La diminution de mortalité était accompagnée d'une diminution significative de la charge fongique.

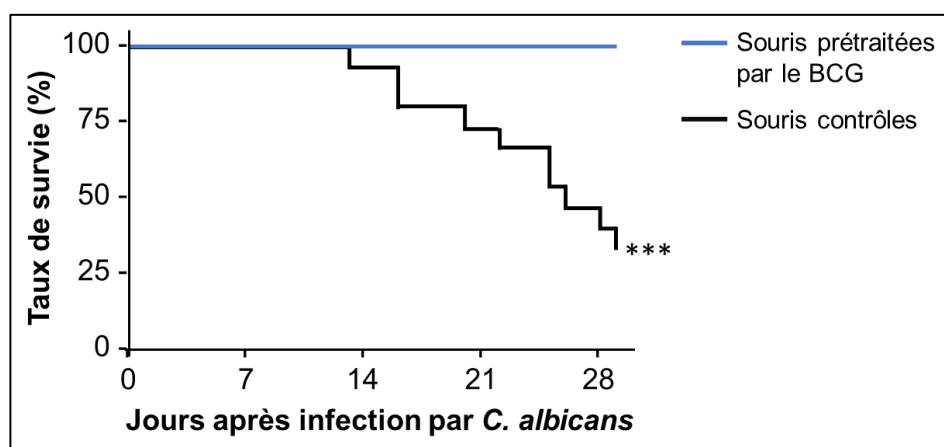


Figure 14 : Taux de survie des souris SCID infectées par une souche de *C. albicans* vivante par voie intraveineuse. Les souris ont été vaccinées par voie intraveineuse soit avec du PBS (contrôle) soit avec du BCG 14 jours avant l'inoculation avec une dose létale de *C. albicans* ($n \geq 15$ par groupe, deux expériences indépendantes, *** $p < 0.005$). D'après (Kleinnijenhuis et al. 2012).

Le BCG n'est pas le seul composé capable d'induire ce renforcement de l'immunité innée. L'injection à des souris d'une souche atténuee de *C. albicans* (incapable de former des filaments), induit une protection, 14 jours plus tard, vis-à-vis d'une infection intraveineuse par une souche virulente de *C. albicans* mais aussi par la bactérie *S. aureus* (Bistoni et al. 1986). En effet, « l'immunisation » par voie intraveineuse de la souche vivante avirulente induit une amélioration significative de la médiane de survie, qui est supérieure à 60 jours après l'infection, comparée à celle des souris non immunisées qui n'est que de 3 jours après l'infection à *C. albicans* ou 8,5 jours après l'infection à *S. aureus*. Cette protection a également été induite chez les souris athymiques, démontrant un mécanisme indépendant des lymphocytes T (Bistoni et al. 1988).

Certains composés sont connus pour empêcher les monocytes/macrophages de développer une réponse immunitaire normale dans un processus appelé « *endotoxin tolerance* ». Dans ce cas, les cellules, exposées à de faibles concentrations d'endotoxines, présentent un état transitoire dans lequel elles sont incapables de répondre aux stimuli ultérieurs (López-Collazo et del Fresno 2013). Le pré-traitement d'une lignée de macrophages ou de monocytes/macrophages isolés de donneurs par du LPS, a rendu ces cellules hypo-réactives à un second stimulus par le LPS, avec une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL-6 et l'IFN- γ (Cavaillon et Adib-Conquy 2006). Ce processus d'*endotoxin tolerance* peut être considéré comme un mécanisme de protection de l'organisme vis-à-vis d'une réponse immune trop importante pouvant générer des lésions immuno-pathologiques parfois mortelles. Freudenberg *et al.* ont ainsi observé que l'injection à des souris d'une dose de 0,01 µg de LPS, 90 min avant l'injection intraveineuse d'une dose létale de LPS, couplée au D-galactosamine augmentant les effets létaux du LPS, protégeait tous les animaux, alors que les souris qui n'avaient pas reçu de pré-traitement succombaient toutes à la seconde dose de LPS (Freudenberg et Galanos 1988). L'effet bénéfique de l'*endotoxin tolerance* dans les modèles inflammatoires est contrebalancé par des effets délétères chez des patients présentant une septicémie bactérienne. L'évolution de la septicémie comprend deux phases ; initialement, les patients présentent un état hyper-inflammatoire qui conduit secondairement à une phase d'immunodépression. Au cours de la deuxième phase, les cellules de l'immunité innée présentent les caractéristiques de l'*endotoxin tolerance*. Ainsi, les monocytes isolés de patients ayant présenté un sepsis ne produisent pas de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- α , IL-12, IL-23 et IL-6, après une stimulation *ex vivo* avec le LPS, contrairement aux monocytes de volontaires sains. L'immunodépression des monocytes est corrélée à un risque élevé d'infection secondaire et de mortalité chez ces patients (López-Collazo et del Fresno 2013).

L'analyse des données de la littérature montre que les cellules de l'immunité innée, à la suite d'un premier contact avec un micro-organisme ou un de ses composants, sont capables de mettre en place une réponse modulée vis-à-vis d'un stimulus secondaire, définissant ainsi une mémoire immunitaire innée. Ce concept, intitulé « *trained immunity* » par M. Netea (Netea, Quintin, et van der Meer 2011), a été par la suite caractérisé plus précisément au niveau cellulaire et d'un point de vue mécanistique (Hamon et Quintin 2016). La première caractéristique fondamentale de la mémoire immunitaire innée est la capacité des cellules immunitaires innées à développer une réponse variable lors d'une seconde infection, qu'il s'agisse d'une réponse accrue « *training* » ou diminuée tolérance. La deuxième caractéristique est l'absence de spécificité de cette mémoire, ce qui contraste fortement avec la réponse immunitaire adaptative.

Le phénomène de *trained immunity* suscite de plus en plus d'intérêt comme le montre le nombre de publications recensées dans la base Pubmed, avec les mots clés "innate immune memory" entre 1980 et 2020 (**Figure 15**).

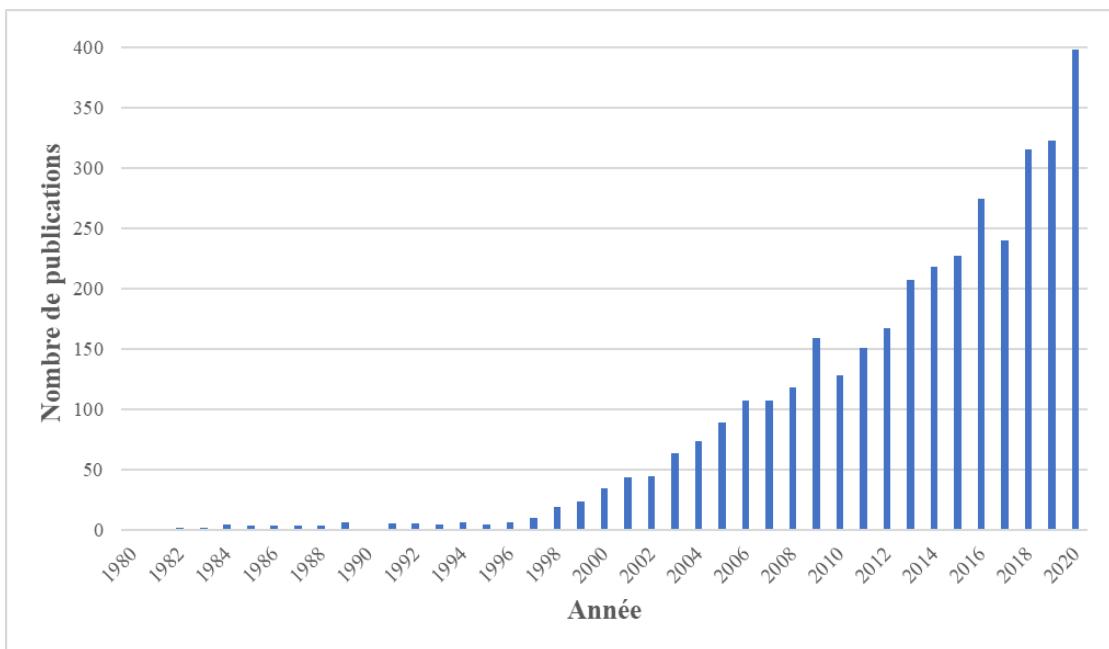


Figure 15 : Nombre de publications par année, issues de la recherche dans Pubmed des mots clés « innate immune memory », de 1980 à 2020.

2. Cellules de l'immunité innée capables de mémoriser

Plusieurs études ont contribué à identifier les cellules de l'immunité innée capables de mémoriser une activation antérieure.

a. Cellules matures de la lignée hématopoïétique

La mémoire de l'immunité innée a été décrite dans différentes populations cellulaires hématopoïétiques, notamment les monocytes/macrophages et les cellules NK.

Dans ses expériences utilisant des souris immunisées par une souche avirulente PCA-2 de *C. albicans*, Bistoni *et al.* ont montré que la protection contre une infection, 14 jours plus tard, était non spécifique et donc probablement liée à l'immunité innée. En effet, une résistance à différents micro-organismes telles qu'une autre espèce de levure *C. tropicalis* ou une bactérie *S. aureus*, était observée (Bistoni *et al.* 1986). Le tri et l'isolement de différentes populations cellulaires de la rate ont permis aux auteurs d'identifier que les macrophages avaient une activité cytotoxique vis-à-vis des pathogènes, augmentée par l'immunisation par PCA-2. De plus, cette résistance pouvait être transférée par transplantation des macrophages d'une souris immunisée par la souche avirulente, chez des souris receveuses non préalablement immunisées mais infectées par *C. albicans* (Bistoni *et al.* 1986). Cette démonstration a été appuyée par d'autres expériences réalisées chez des souris pré-traitées par une molécule antitumorale inhibant l'activité des lymphocytes T et B, 20 jours avant une pré-stimulation par la souche PCA-2 et enfin infectées, 14 jours plus tard, avec la souche virulente de *C. albicans*. Il n'a pas été observé de diminution de la résistance de ces souris à l'infection, démontrant que les lymphocytes n'intervenaient pas dans ce phénomène (Bistoni *et al.* 1988). Inversement, l'utilisation de particules de silice, connues

pour inhiber les fonctions macrophagiennes, annule la résistance précédemment observée (Freudenberg et Galanos 1988). De même Freudenberg *et al.* ont montré que le transfert de macrophages, de souris exprimant TLR4 (souris C3H/HeN) et pré-stimulées par une faible dose de LPS, chez des souris déficientes pour TLR4 (souris C3H/HeJ) traitées 24 h plus tard par une dose létale de LPS injectée par voie IV, induisait une survie de 100% de ces souris (Freudenberg et Galanos 1988).

Plus récemment, des expériences utilisant des souris déplétées en monocytes/macrophages ont aussi souligné l'importance de ces cellules dans la protection induite par *C. albicans*. En effet, le taux de survie de ces souris pré-stimulées n'était pas significativement différent de celui des souris non pré-stimulées par *C. albicans*, montrant que l'absence de ces cellules abolit toute protection (Quintin et al. 2012). La mémoire des monocytes a été démontrée par ces mêmes auteurs en utilisant des cellules isolées de volontaires sains. Les monocytes, pré-stimulés pendant 24 heures avec une dose faible de *C. albicans* tué par la chaleur ou de β -glucane, composant de la paroi fongique, puis lavés et remis en contact avec du milieu de culture pendant 6 jours avant une seconde stimulation de 24 h par différents pathogènes ou composants microbiens (doses létales de *C. albicans*, du LPS d'*Escherichia coli* ou *M. tuberculosis*), montrent une augmentation significative de la production de cytokines pro-inflammatoires, IL-6 et TNF- α . A l'inverse, la pré-incubation des monocytes avec *E. coli* tué par la chaleur, 6 jours avant une stimulation par les mêmes agents, induit un phénotype de type tolérance, avec une diminution significative de la synthèse de TNF- α . Une étude a ensuite exploré l'impact d'un pré-traitement des monocytes par différents PAMP, 5 jours avant une seconde stimulation par un PAMP identique ou différent (Ifrim et al. 2014). L'exposition primaire des monocytes modifie leur phénotype inflammatoire observé après un second challenge, à la hausse (*training*) ou à la baisse (tolérance), selon les concentrations des PAMP et la nature des PRR engagés.

Comme pour les monocytes/macrophages, il a été montré que les cellules NK mémorisent également une activation antérieure. Grâce à un modèle de transfert cellulaire, Cooper *et al.* ont découvert que les cellules NK, isolées de souris *Rag*-/- donneuses, puis activées *in vitro* par un mélange de cytokines pro-inflammatoires (IL-12 + IL-18) et injectées à des souris *Rag*-/- receveuses, réagissaient plus fortement à la réactivation *in vitro* (Cooper et al. 2009). Dans cette étude, les auteurs ont pu isoler, 1 et 3 semaines après la transplantation, les cellules NK transférées, grâce à une coloration spécifique faite avant transplantation. Ainsi, la re-stimulation *in vitro* par un mélange d'IL-12 et IL-15 ou via le récepteur Ly49H de la protéine virale m157, des cellules NK transférées et isolées, induit une augmentation significative de la sécrétion d'IFN- γ .

b. Cellules souches hématopoïétiques

Un aspect important à noter concernant la mémoire innée est que ce phénomène semble se maintenir dans le temps puisqu'il a été observé que les monocytes d'individus vaccinés par le BCG conservaient pendant au moins 3 mois leur capacité à produire de fortes quantités de TNF et d'IL-1 β , en réponse à

des pathogènes bactériens et fongiques non apparentés (Kleinnijenhuis et al. 2012). Cependant, on sait que la durée de vie de monocytes en circulation est courte, environ 24 heures. Ceci suggère que la reprogrammation doit également avoir lieu au niveau des cellules progénitrices de la moelle osseuse. En effet, la mémoire immunitaire innée peut être transférée par l'intermédiaire de cellules souches progénitrices hématopoïétiques (CSPH). Ainsi, les CSPH isolées de la moelle osseuse de souris puis différencier en macrophages à l'aide du facteur de croissance M-CSF supplémenté par le Pam3CSK4, un ligand synthétique de TLR2, induit le développement d'un phénotype immunitaire de type tolérant, comparé à celui des macrophages qui n'avaient pas été en contact avec le Pam3CSK4. Les macrophages tolérants produisent des quantités de cytokines inflammatoires, IL-6 et TNF- α , et de ROS significativement plus faibles, après stimulation respectivement par du LPS ou du zymosan, ligand de Dectine 1 (Yáñez et al. 2013, 2). Les auteurs ont ensuite observé, dans des CSPH naïves, mises en culture avec des CSPH exposées préalablement au Pam3CSK4, mais physiquement séparées d'elles par un système de Transwell®, que les macrophages issus de leur différenciation présentaient une production réduite de TNF- α et de ROS, et donc un phénotype tolérant (Yáñez et al. 2013, 2). Ceci suggère que les macrophages rendus tolérants par l'exposition au Pam3CSK4, libèrent des médiateurs solubles, responsables de la reprogrammation fonctionnelle paracrine des CSPH non sensibilisées ou leur descendance. De plus, il a été montré que l'injection intraveineuse de BCG à des souris induisait l'expansion des CSPH au niveau de la moelle osseuse, et leur différenciation en macrophages capables de répondre, de façon plus efficace, à une infection *in vitro* par une souche virulente de *M. tuberculosis* (décompte des unités formant colonies ou CFU, après infection) jusqu'à 5 mois après la vaccination (Kaufmann et al. 2018). L'ensemble de ces données pourrait expliquer la durée de la mémoire innée observée chez les monocytes/macrophages.

c. Cellules épithéliales

Chez les mammifères, les barrières épithéliales de la peau, des voies respiratoires et des intestins forment des interfaces essentielles qui détectent et répondent à différents signaux (Ordovas-Montanes et al. 2020). Les cellules épithéliales jouent un rôle fondamental dans la protection contre les infections, en agissant à la fois comme une barrière physique et comme des producteurs de composés antimicrobiens ; ce sont des acteurs centraux de l'inflammation tissulaire. L'étude de la capacité des cellules épithéliales à mémoriser des contacts microbiens est donc pertinente.

El-Osta et al. ont montré que l'exposition *in vitro* de cellules endothéliales aortiques primaires (bovines et humaines) à une hyperglycémie de 16 heures, provoquait une augmentation de la transcription de la sous-unité p65 de NF- κ B se maintenant 2, 4 et 6 jours après un retour à une glycémie physiologique (El-Osta et al. 2008). Cette période d'hyperglycémie transitoire cause un état hyperinflammatoire persistant de la cellule et a été nommé « la mémoire hyperglycémique ».

Très récemment, Naik *et al.* ont montré que des souris soumises à des plaies par abrasion épidermique présentaient une cicatrisation plus rapide 30 et 180 jours après traitement par un stimulant inflammatoire, l'imiquimod (IMQ) administré par voie topique. Des expériences de déplétion des macrophages résidants de la peau et d'inhibition des réponses induites par les cellules T et B ont démontré que les cellules souches épithéliales étaient effectivement responsables de la guérison accélérée induite par l'IMQ et que les cellules épithéliales matures pouvaient alors hériter de cette mémoire inflammatoire (Naik et al. 2017). Le même type de résultat a été obtenu en utilisant comme second challenge inflammatoire, un composé mimant une dermatite atopique, le 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate, ou une infection par *Candida albicans*. Ces résultats soulignent une nouvelle fois l'absence de spécificité de cette réponse et indiquent qu'après sensibilisation par un composant inflammatoire, la peau cicatrice plus rapidement lorsqu'elle est confrontée à une agression secondaire.

3. Mécanismes en jeu

Les mécanismes sous-jacents à l'induction, au maintien et la régulation de la mémoire innée reposent sur l'interaction complexe entre le métabolisme cellulaire et l'épigénétique.

a. L'épigénétique

Dans leurs travaux sur l'étude des mécanismes moléculaires à l'origine de la tolérance induite par le LPS chez les monocytes/macrophages, Foster *et al.*, ont montré que l'exposition à ce PAMP aboutit à l'inhibition de l'expression d'une classe de gènes appelés « tolérables » (notamment les gènes codant pour des cytokines inflammatoires) alors qu'une seconde classe de gènes, « non tolérables » (parmi lesquels ceux codant pour des effecteurs antimicrobiens) restent inductibles après infection (Foster, Hargreaves, et Medzhitov 2007). D'autres travaux se sont ensuite intéressés aux mécanismes impliqués dans ce phénomène. Il a été montré dans des monocytes isolés de volontaires vaccinés par le BCG que l'expression de l'ARNm du *TNF- α* et de l'*IL-1 β* , ainsi que celle de différents marqueurs de surface (TLR4, CD11b) était augmentée 2 semaines et 3 mois après la vaccination (Kleinnijenhuis *et al.* 2012).

Il est connu que la transcription est étroitement contrôlée par l'interaction d'éléments régulateurs avec les promoteurs des gènes, mais aussi avec des régions distales appelées « *enhancer* » ou « *silencer* ». L'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription et à la machinerie transcriptionnelle au niveau de ces régions régulatrices est essentielle pour l'expression des gènes (van der Heijden *et al.* 2017). L'assemblage de l'ADN et des protéines nucléosomiques, connu sous le nom de chromatine, permet d'obtenir une structure dynamique, qui peut être décondensée et donc transcriptionnellement permissive (appelée euchromatine) ou alors condensée et ainsi répressive (appelée hétérochromatine). L'épigénétique est définie comme l'étude de ces changements de phénotype, transmissibles d'une division cellulaire à l'autre, sans modification de la séquence d'ADN. Les mécanismes épigénétiques, multiples et réversibles, permettent d'agir sur l'état de condensation de la chromatine pour moduler son

accès à différentes protéines impliquées dans la transcription. Un premier mécanisme épigénétique, qui consiste en la méthylation des cytosines, intervient au niveau même de l'ADN. D'autres mécanismes affectent l'organisation de la chromatine par le biais de modifications post-traductionnelles des histones, telles que des méthylations, des acétylations ou des phosphorylations, au niveau de leurs extrémités amino-terminales. Enfin, les ARN non-codants, tels que les microARN, participeraient également aux régulations épigénétiques (**Figure 16**).

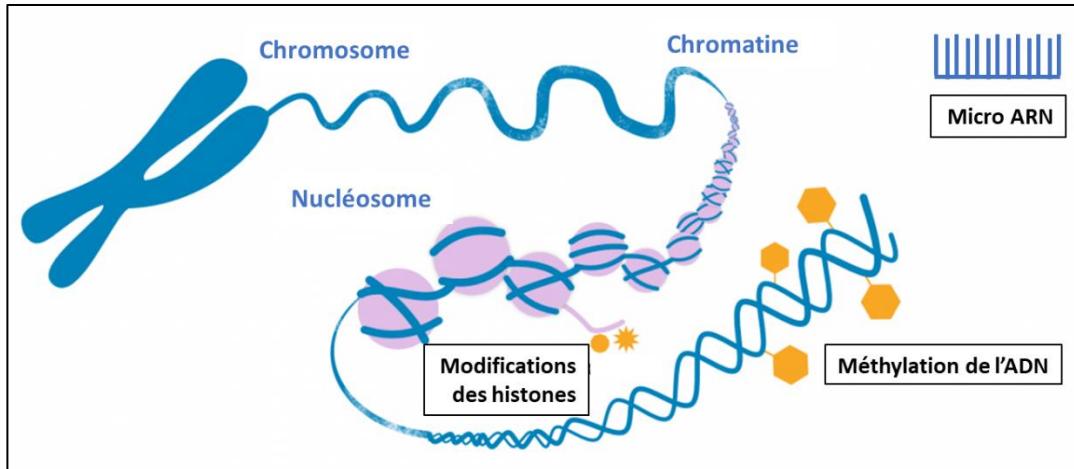


Figure 16 : Différents types de modifications épigénétiques : modifications biochimiques des histones, méthylation de l'ADN et micro-ARN.

Les mécanismes basés sur la méthylation de l'ADN et les microARN ne seront pas discutés dans la suite de cette partie, aucune donnée n'existant à l'heure actuelle sur leur rôle dans le contexte de la mémoire de l'immunité innée.

Parmi les modifications biochimiques des histones, les acétylations vont générer des domaines ouverts sur la chromatine alors que les méthylations, associées à une chromatine condensée, préviennent la liaison des protéines, comme des facteurs de transcription, conduisant ainsi à l'absence d'expression des gènes. Cependant, l'effet de la méthylation des histones sur la transcription dépend de la position de l'acide aminé méthylé et du nombre de groupements méthyl liés. Ainsi, l'activation de la transcription génique est souvent liée à la méthylation de H3K4 (lysine 4 de l'histone 3), H3K6 et H3K79 alors que la répression de la transcription résulte de la méthylation de H3K9, H3K27 et H4K20 (van der Heijden et al. 2017). De plus, ces signatures épigénétiques sont spécifiques de régions régulatrices du génome. Par exemple, la mono (me1) et la triméthylation (me3) de H3K4 lient respectivement des *enhanceurs* et des promoteurs, alors que H3K27Ac peut être retrouvée sur ces deux types de régions (Saeed et al. 2014).

L'avènement du séquençage haut débit a permis d'améliorer la caractérisation des modifications épigénétiques et de mieux comprendre les processus biologiques notamment dans la mémoire de l'immunité innée. Les différentes modifications d'histones, l'état d'ouverture de la chromatine, l'expression des gènes, la présence en facteurs de transcription établissent une signature chromatinienne

spécifique d'un type cellulaire dans un phénotype donné. Différentes techniques d'étude pangénomique des modifications épigénétiques se sont récemment développées. Parmi celles-ci, l'*Assay for Transposase-Accessible Chromatin with Sequencing* (ATAC-Seq) permet de déterminer l'accessibilité de la chromatine à travers l'ensemble du génome (**Figure 17**) (Buenrostro et al. 2015). L'ADN génomique extrait est exposé à la Tn5, une transposase très active. Tn5 s'insère au niveau des sites de chromatine ouverte, ajoute des amorces de séquençage et fragmente simultanément l'ADN, un processus connu sous le nom de tagmentation. L'ADN fragmenté est purifié puis séquencé. L'analyse des données permet d'identifier les régions accessibles de la chromatine.

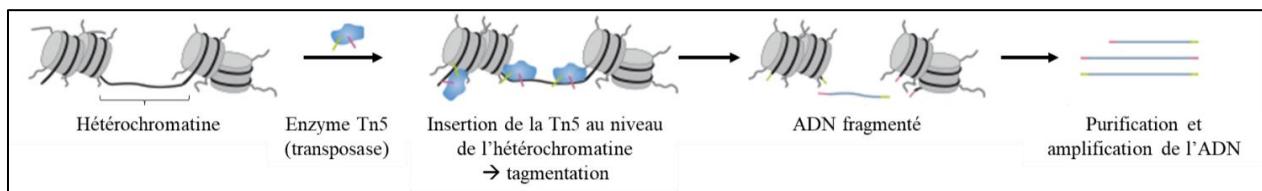


Figure 17 : Principe de l'ATAC-seq. D'après illumina.com

L'étude de la régulation des gènes peut être approfondie en combinant des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) avec le séquençage (ChIP-Seq). Cette méthode permet d'identifier les protéines liées à l'ADN, comme les facteurs de transcription, ainsi que les modifications biochimiques des histones. À l'aide d'anticorps spécifiques ciblant la protéine ou la modification recherchée, le complexe est isolé par immunoprécipitation, purifié et l'ADN est séquencé (**Figure 18**). Les données du séquençage permettent d'identifier tous les sites de liaison d'une protéine d'intérêt à l'échelle du génome et toutes les régions génomiques associées à une histone portant une modification biochimique (acétylation, méthylation, ...).

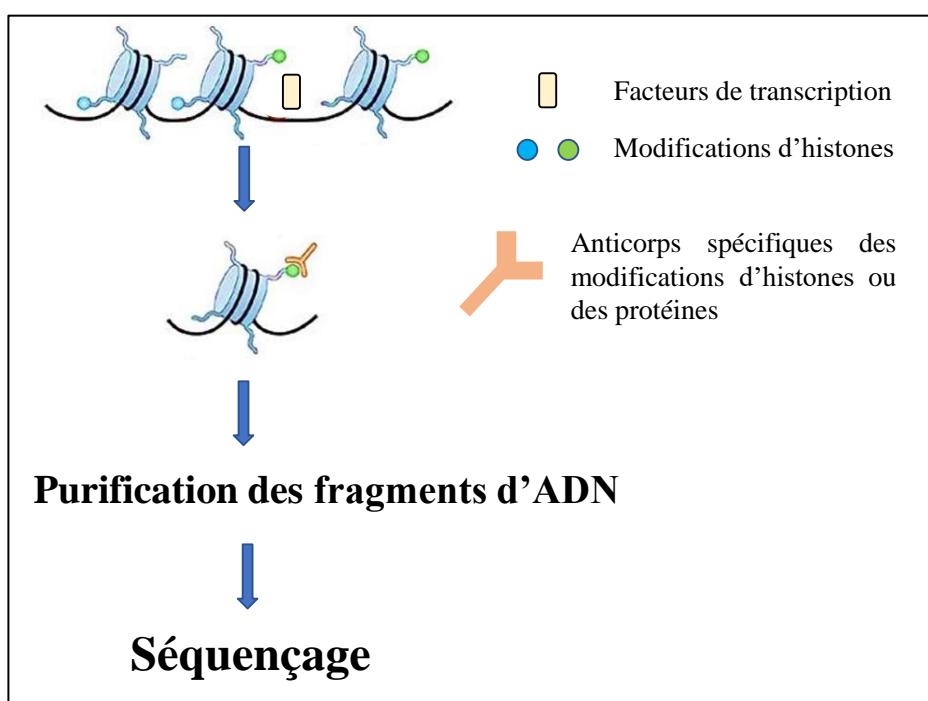


Figure 18 : Principe du ChIP-seq. Adaptée de www.france-genomique.org

Lorsque les loci d'interêt ont été identifiés et afin de comprendre les mécanismes de modulation de leur accessibilité, il existe une variante au ChIP-Seq, moins couteuse, le ChIP-PCR utilisant des amores ciblant les régions d'intérêt. Cette technique permet donc d'identifier si l'expression de gènes associés au loci cibles est liée à un enrichissement en histones modifiées ou en facteurs de transcription.

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des enzymes impliquées dans l'acétylation ou la méthylation des histones, a permis à différents auteurs de démontrer l'implication de l'épigénétique dans la reprogrammation des monocytes/macrophages (Foster, Hargreaves, et Medzhitov 2007; Ifrim et al. 2014). Concernant les mécanismes induits lors de la tolérance au LPS, Foster *et al.*, ont observé que les gènes « tolérables », dont l'expression est réprimée après une seconde stimulation par le LPS, perdent spécifiquement deux marques épigénétiques au niveau de leur promoteur ; l'acétylation de H4 et H3K4me3. A l'inverse, les gènes « non tolérables » gardent ces signatures épigénétiques acquises lors de la première stimulation au LPS (Foster, Hargreaves, et Medzhitov 2007). De plus, il a été montré qu'une première exposition des monocytes au β -glucane de *Candida albicans* induisait un fort taux de triméthylation de H3K4 (H3K4me3), particulièrement au niveau de la région promotrice de gènes codant pour des molécules pro-inflammatoires dont l'expression est augmentée, expliquant ainsi le *training* observé (Quintin et al. 2012). De même, l'effet protecteur d'une pré-stimulation de macrophages péritonéaux par une faible dose de *C. albicans* sur une infection 7 jours plus tard avec une dose élevée de ce même pathogène, a été associé à la présence de H3K4me3 au niveau de gènes codant pour des molécules pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IL-18), et pour des protéines impliquées dans la reconnaissance de *C. albicans*, comme Dectine 1 (Quintin et al. 2012). De façon similaire, les monocytes isolés de volontaires, prétraités par le BCG, présentent un enrichissement significatif en H3K4me3 au niveau du promoteur des gènes de l'*IL-6* et du *TNF- α* , expliquant la surexpression de ces cytokines (Kleinnijenhuis et al. 2012). Un point important à noter est que la présence de cette marque persiste au moins une semaine après un traitement par le β -glucane ou *Candida albicans* (Quintin et al. 2012), et 3 mois suivant la vaccination par le BCG (Kleinnijenhuis et al. 2012). Enfin, une étude a comparé les profils épigénétiques de 3 marques, H3K4me1, H3K4me3 et H3K27ac, lors de la différenciation de monocytes en macrophages, stimulés ou non (contrôles) pendant 24 heures par le β -glucane ou par le LPS, puis laissés au repos dans du sérum pendant 5 jours (Saeed et al. 2014). Cette analyse a mis en évidence, parmi les régions épigénétiquement dynamiques durant la différenciation, que H3K27ac était retrouvée sur des régions spécifiques en fonction du pré-traitement des macrophages. En effet, après pré-stimulation par le β -glucane, cette marque était retrouvée sur 17 % des promoteurs et 40 % des éléments régulateurs distaux, et seulement sur 6 % des éléments régulateurs distaux dans les cellules pré-stimulées par le LPS. Il apparaît donc que les macrophages prétraités acquièrent des marques d'histone de façon stable et durable au niveau de régions cibles de régulation de gènes, et la persistance ou au contraire la perte spécifique de certaines de ces marques pourrait être directement liée à la mémoire innée. Les cellules NK peuvent aussi subir des modifications épigénétiques à la suite d'une

pré-stimulation engendrant une modification de leur réponse inflammatoire ultérieure. En effet, les cellules NK issues de souris prétraitées par du LPS présentent un phénotype de type *training*, caractérisé par une augmentation de la synthèse d'IFN γ après à une stimulation par du LPS 14 jours plus tard. L'analyse épigénétique de ces cellules NK reprogrammées montre spécifiquement la marque H3K4me1 au niveau d'un *enhanceur* de l'*Ifng* au moment de la seconde infection. Le rôle de H3K4me1 dans la modulation d'expression d'IFN γ a été validé par l'utilisation d'un inhibiteur de la méthyltransférase qui a eu pour conséquence d'annuler le phénomène de mémoire immunitaire innée des cellules NK (Rasid et al. 2019).

b. Le métabolisme cellulaire

Dans les conditions homéostatiques, la plupart des cellules utilisent la respiration aérobie comme principale source énergétique par le biais de l'ATP. Il existe des différences métaboliques importantes selon le type de cellules du système immunitaire et leur état d'activation. Par exemple, les macrophages de phénotype M1, pro-inflammatoires, ont besoin d'une génération rapide d'ATP et de métabolites. Cette demande entraîne une modification du métabolisme de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse aérobie, associée à un cycle de Krebs perturbé à 2 étapes ; le citrate va être prélevé pour augmenter la synthèse d'acide gras (prostaglandines ...) et le succinate va activer le facteur de transcription *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)1 α qui régule l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Les macrophages M2, exprimant les gènes impliqués dans la réparation tissulaire ont, quant à eux, un cycle de Krebs intact (Gj et al. 2018). L'importance du métabolisme cellulaire pour le phénotype des macrophages suggère que des mécanismes similaires pourraient jouer un rôle dans les reprogrammations fonctionnelles et de plus long terme des monocytes/macrophages au cours de la mémoire innée. L'analyse des modifications épigénétiques globales chez les monocytes/macrophages, en particulier H3K4me3 et H3K27ac, a permis d'identifier un grand nombre de promoteurs de gènes spécifiquement induits par le β -glucane (Cheng et al. 2014). Cette étude a révélé que, parmi ces gènes, ceux codant les enzymes impliquées dans la glycolyse et son régulateur principal, *mechanistic Target Of Rapamycin* (mTOR), étaient ciblés et surexprimés. Ces auteurs ont montré que l'activation de Dectine 1, récepteur du β -glucane, entraînait la phosphorylation d'Akt, puis de mTOR, deux intermédiaires indispensables au *training* des macrophages, et dont le rôle a été confirmé par l'utilisation de leurs inhibiteurs respectifs, la wortmannin et la metformine. Une autre voie semble nécessaire au *training* des monocytes, celle du facteur de transcription HIF1 α . Alors que la pré-stimulation par le β -glucane induit une survie de 90% des souris sauvages infectées par *S. aureus*, les souris HIF1 α -KO pré-stimulées par du β -glucane ont un taux de survie de 50% équivalent aux souris non pré-stimulées, 14 jours post-infection (Cheng et al. 2014). Ainsi, la voie Akt/mTOR/HIF1 α semble indispensable à la mise en place et au maintien de la reprogrammation du phénotype des macrophages pré-stimulés par le β -glucane. En plus du passage de la phosphorylation oxydative à la glycolyse pour assurer les besoins énergétiques lors d'un *training* des monocytes, il a été observé que ces cellules présentaient un autre changement dans le métabolisme

cellulaire ; une réalimentation du cycle de Krebs par le glutamate et une accumulation de fumarate (Arts et al. 2016) (**Figure 19**).

Chez les macrophages activés par le LPS, il a été montré que la réponse inflammatoire aiguë était caractérisée par une augmentation forte mais transitoire de la glycolyse, alors qu'une stimulation plus longue, 24 - 48 heures, était médiaée par la β -oxydation des acides gras (T. F. Liu et al. 2012). Ce passage de l'oxydation du glucose à celle des acides gras est un processus dépendant de l'activation des histones désacétylases de classe III (sirtuines), en particulier les sirtuines-1 et -6, elles-mêmes dépendantes du taux de NAD⁺. Ceci renvoie au phénomène observé chez les patients atteints de sepsis, qui présentent un état hyper-inflammatoire qui conduit secondairement à une phase d'immunodépression. Contrairement à la tolérance induite par le LPS, le *training* lié au β -glucane inhibe l'expression de la sirtuine-1. L'ajout d'un activateur de sirtuine-1, pendant les 24 premières heures de pré-stimulation, inhibe partiellement la surproduction d'IL-6 (Cheng et al. 2014). Les sirtuines désacétylases joueraient donc aussi un rôle dans la mémoire innée des monocytes.

Il est aussi à noter que certains intermédiaires métaboliques contrôlent la méthylation et l'acétylation des histones, et que d'autres sont des cofacteurs d'enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles des histones. En effet, certains métabolites du cycle de Krebs sont des déterminants importants de familles d'enzymes impliquées dans les modifications épigénétiques, en particulier le fumarate, un inhibiteur d'histones déméthylases, les KDM5 (pour lysine demethylase) qui appartient à la famille des JMJ (Jumonji domain-containing)-lysine déméthylases (Arts et al. 2016). De plus, la production accrue d'acétyl-CoA, induit une plus forte acétylation des histones (Netea et al. 2016). L'inhibition de la déméthylation de H3K4, rôle de KDM5, ou l'induction de l'acétylation comme celle de H3K27Ac, permet le maintien de l'accessibilité de la chromatine (**Figure 19**).

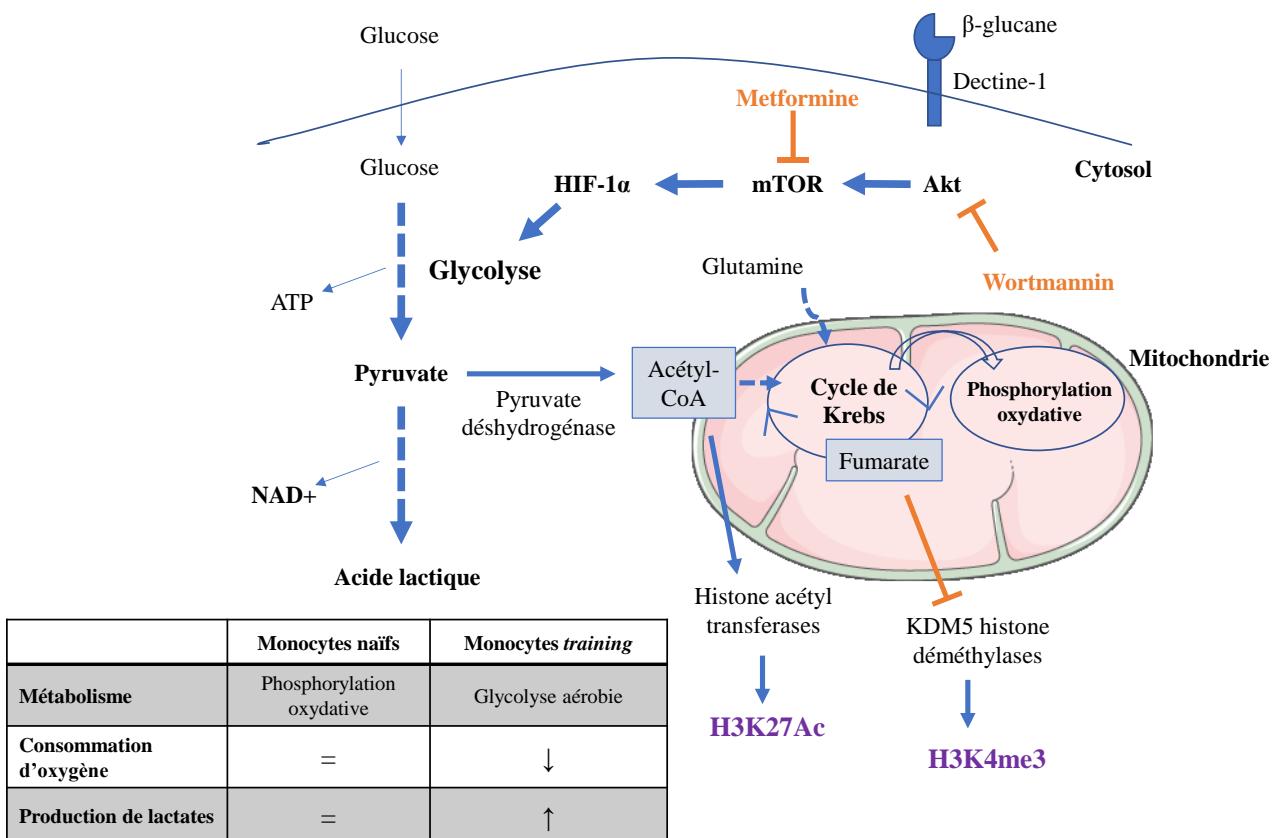


Figure 19 : Modèle d'activation métabolique des monocytes pré-stimulés par le β-glucane (training), caractérisé par une augmentation forte de la glycolyse aérobie, une diminution de la phosphorylation oxydative et une modulation des métabolites du cycle de Krebs. Les différences métaboliques entre les monocytes naïfs et les monocytes en phénotype training sont résumées dans le tableau. Le rôle potentiel de la wortmannin et de la metformine dans l'inhibition de la mémoire de l'immunité innée est également représenté. Le fumarate qui s'accumule dans les monocytes pré-stimulés par le β-glucane, inhibe les histones démethylases KDM5, ce qui permet de maintenir H3K4me3 et l'accès de la chromatine, tout comme l'accumulation de H3K27Ac. Les métabolites présentés en caractères gras et violet s'accumulent dans les monocytes en phénotype training. Adaptée de (Cheng et al. 2014; Netea, Joosten, et Meer 2017)

Ces résultats montrent les interactions complexes qui existent entre le métabolisme énergétique et les enzymes de modification de la chromatine, capables de moduler les réponses immunitaires ultérieures.

La **figure 20** récapitule de façon succincte les données principales présentées dans la partie II de cette introduction.

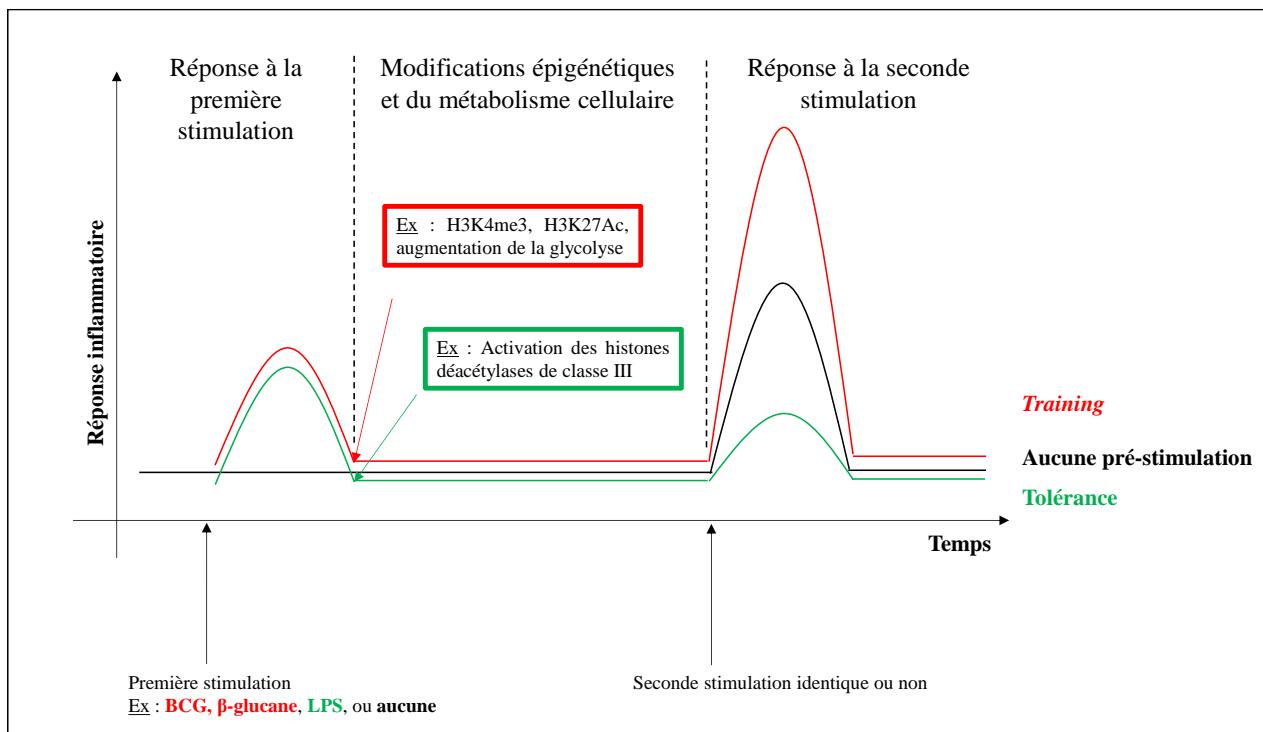


Figure 20 : Schéma récapitulatif des deux phénotypes opposés observés après stimulation de monocytes pré-exposés au LPS, au β -glucane ou au BCG ; training (en rouge) et tolérance (en vert). La première stimulation induit une inflammation et l'activation de mécanismes permettant une reprogrammation des cellules, en particulier des modifications épigénétiques et du métabolisme cellulaire. Ainsi lors d'une seconde stimulation à distance, on observe une exacerbation de la réponse inflammatoire, training, ou à l'inverse une diminution, tolérance.

Objectifs du travail

L'ensemble des observations décrites dans l'introduction souligne l'importance des cellules épithéliales des voies aériennes dans la réponse de l'hôte aux infections. Il ne fait, par ailleurs, aucun doute que les cellules épithéliales bronchiques, qui sont en première ligne lors de l'interaction avec les pathogènes inhalés, jouent un rôle majeur dans l'immunité innée au niveau pulmonaire. Nous avons émis l'hypothèse que ces cellules étaient capables de mémoriser une première rencontre avec un pathogène et de modifier leur réponse inflammatoire lors d'un second stimulus. Dans de nombreuses pathologies pulmonaires chroniques, comme la mucoviscidose ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive, les voies aériennes des patients sont colonisées par différents pathogènes au fil du temps. Le rôle de l'inflammation et sa régulation dans ces pathologies est majeur. Trop peu importante, l'inflammation se révèlera inefficace pour lutter efficacement contre l'implantation des pathogènes ; trop exacerbée, elle participera à la destruction du tissu pulmonaire sous-jacent avec des conséquences néfastes en termes de morbi-mortalité. La régulation de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques par le biais d'une action sur la mémoire de l'immunité innée pourrait donc s'avérer très pertinente.

L'objectif de mon projet de thèse était d'étudier la capacité des cellules épithéliales bronchiques à développer une mémoire immunitaire innée et de caractériser les mécanismes moléculaires à l'origine de cette mémoire.

Mise au point du modèle

Le modèle d'étude utilisé pendant mes travaux s'inspire des publications de l'équipe du Pr. M. Netea utilisant des monocytes/macrophages pour la mise en évidence de la mémoire de l'immunité innée (Ifrim et al. 2014). Néanmoins la capacité des cellules épithéliales bronchiques (CEB) à se multiplier pour parvenir à un tapis cellulaire à confluence, contrairement aux monocytes/macrophages, nous a conduits à optimiser ce modèle. Les mises au point ont donc consisté à trouver une concentration de cellules optimale à ensemencer à J-1 afin que le tapis cellulaire soit confluente 7 jours plus tard à J6, lors du second stimulus.

Le protocole a été adapté en fonction des expériences mais le schéma général, représenté en **Figure 21**, est resté le même.

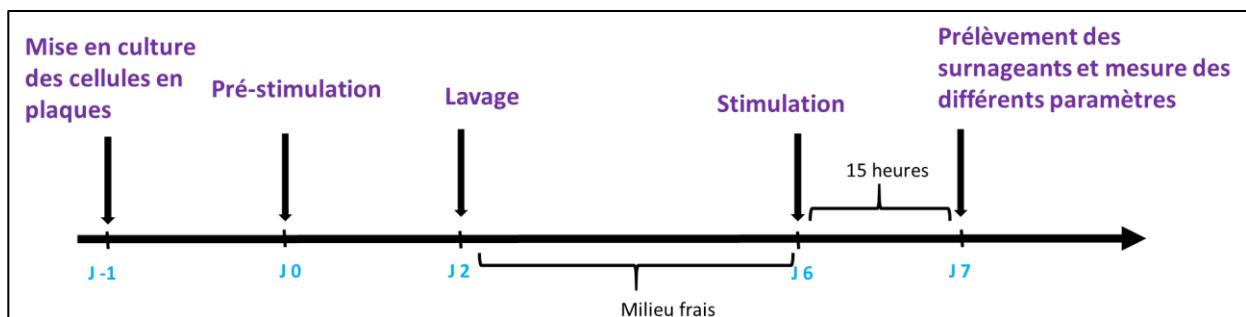


Figure 21 : Protocole général suivi, de la mise en culture des cellules en plaques au prélèvement des surnageants, à partir desquels sont dosés les différents paramètres inflammatoires et infectieux.

A J-1, les cellules épithéliales bronchiques (lignée BEAS-2B ou cellules primaires fournies par la société Epithélix®) ont été ensemencées dans des plaques 96 puits, 200 µL/puit, à la concentration de $7,5 \times 10^4$ cellules/mL. A J0, les cellules ont été pré-stimulées ou non par différents agonistes microbiens, à différentes concentrations pendant 48 heures. Les cellules non-pré-stimulées ont été incubées avec du milieu de culture seul durant le même temps. A J2, les cellules ont été lavées 2 fois avec du milieu de culture après quoi une période de « repos » de 4 jours a été observée. A J6, les cellules (pré-stimulées ou non) ont été stimulées par différents agonistes microbiens ou infectées par des pathogènes bactériens ou fongiques pendant 15 heures. Les cellules non stimulées secondairement (pré-stimulées ou non) ont été incubées dans du milieu de culture seul pendant le même temps. Après 15 heures de stimulation, différentes analyses ont été réalisées pour répondre aux diverses questions scientifiques posées ;

- le surnageant de culture a été prélevé pour mesurer la cytotoxicité par dosage de l'activité lactate déshydrogénase (LDH), la réponse inflammatoire par dosage ELISA (IL-6 et IL-8) et la croissance fongique par quantification de sucres de la paroi fongique,
- le tapis cellulaire a été lysé pour dosage de l'activité lactate déshydrogénase.

Dans certaines expériences, le protocole a été arrêté à J6, au moment de la stimulation, afin de lyser les cellules dans le but de comparer l'expression de gènes d'intérêts dans nos différentes conditions.

Pour la pré-stimulation, nous avons testé différents PAMP connus pour interagir avec des récepteurs cellulaires identifiés. Le stimulus secondaire à J6, a été réalisé avec des PAMP mais aussi par des pathogènes connus pour coloniser et infecter les bronches des patients atteints de mucoviscidose.

De manière préliminaire, les CEB ont été stimulées avec des gammes de concentrations d'agonistes ou de pathogènes, afin de déterminer les concentrations optimales à utiliser à J6 pour la stimulation, c'est à dire présentant la plus faible cytotoxicité et induisant une production d'IL-8 modérée, pouvant être modulée à la hausse (*training*) ou à la baisse (tolérance) après pré-stimulation des cellules.

Pour l'analyse des résultats de la réponse inflammatoire, mesurée par dosage de l'IL-6 et IL-8 à J7, aux valeurs obtenues après stimulation des cellules pré-stimulées, ont été soustraites les valeurs obtenues pour les cellules pré-stimulées puis non stimulées. De la même manière, aux valeurs obtenues après stimulation des cellules non pré-stimulées ont été soustraites les valeurs obtenues pour les cellules non pré-stimulées puis non stimulées. Les résultats ont ensuite été comparés au contrôle, représenté par la stimulation induite à J6 des CEB non pré-stimulées.

Résultats

I- Mise en évidence de la mémoire immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques

Nous avons observé que l'exposition à J0 des CEB à la flagelline purifiée de *Pseudomonas aeruginosa*, un composant du flagelle bactérien, pendant 48 heures, induit des modifications de la réponse inflammatoire des cellules lorsque celles-ci sont infectées, 4 jours plus tard, par le champignon *Aspergillus fumigatus* (souche de laboratoire DAL, *multiplicity of infection* = 2), ou stimulées par du LPS à la concentration de 10 ng/mL. Ainsi, la pré-exposition des CEB à la flagelline induit une augmentation de la réponse inflammatoire après infection par *A. fumigatus* et une diminution de la réponse inflammatoire après stimulation par le LPS. Nous avons confirmé la diminution de la réponse inflammatoire observée après stimulation par le LPS en infectant les CEB avec des bactéries Gram négatif : *P. aeruginosa* (souche PAK) et *Stenotrophomonas maltophilia* (souche clinique, laboratoire de bactériologie de l'hôpital Saint-Antoine) (*multiplicity of infection* = 0,25). Cette diminution de la réponse inflammatoire peut être expliquée, au moins en partie, par une diminution de l'expression du récepteur au LPS, le TLR4 que nous avons mise en évidence à J6 au moment de la stimulation, dans les cellules pré-stimulées par la flagelline.

Nous avons, par ailleurs, validé ces résultats en utilisant des cellules épithéliales bronchiques primaires. Nous avons abordé l'aspect mécanistique de cette mémoire de l'immunité des CEB par l'utilisation d'inhibiteurs de méthylation et d'acétylation d'histones. Les résultats obtenus confortent l'idée de l'implication de processus épigénétiques.

Il s'agit donc de la première étude montrant l'existence d'une mémoire de l'immunité innée chez les CEB, phénomène qui semble sous-tendu par des mécanismes épigénétiques

L'ensemble des résultats de cette première partie a donné lieu à une publication dans *The Journal of Infectious Diseases* en mars 2020.

Respiratory Epithelial Cells Can Remember Infection: A Proof-of-Concept Study

Jeanne Bigot,¹ Loïc Guillot,¹ Juliette Guitard,^{1,2} Manon Ruffin,¹ Harriet Corvol,^{1,3} Michel Chignard,¹ Christophe Hennequin,^{1,2*} and Viviane Balloy,^{1,3}

¹Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, France, ²Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Saint Antoine, Paris, France, ³Pneumologie Pédiatrique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Trousseau, Paris, France

Human bronchial epithelial cells play a key role in airway immune homeostasis. We hypothesized that these sentinel cells can remember a previous contact with pathogen compounds and respond nonspecifically to reinfection, a phenomenon called innate immune memory. We demonstrated that their preexposure to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin modify their inflammatory response to a second, nonrelated stimulus, including live pathogens or lipopolysaccharide. Using histone acetyltransferase and methyltransferase inhibitors, we showed that this phenomenon relied on epigenetic regulation. This report is a major breakthrough in the field of multimicrobial respiratory tract infections, wherein control of inflammatory exacerbations is a major therapeutic issue.

Keywords. trained immunity; bronchial epithelial cells; infection; inflammation; innate immune memory.

The human immune system includes the innate and adaptive immune responses. Adaptive immunity results from pathogen-specific immunological memory, whereas innate immunity, the first line of defense against pathogens, is nonspecific, without memory of the first contact [1].

Innate immune cells, originating from hematopoietic progenitors are capable of modulating their response on reinfection, a phenomenon called trained immunity or innate immune memory [2]. This memory is initiated by interactions between pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and pattern recognition receptors. A functional reprogramming that occurs through metabolic/epigenetic regulation leads the cells to become hyperresponsive (training) or hyporesponsive (tolerance) [3].

To date, innate immune memory has not been reported for bronchial epithelial cells (BECs), which are frequently in contact

with inhaled microorganisms. Respiratory epithelial cells are nonhematopoietic cells playing a crucial role in orchestrating the host immune response [4]. Moreover, BECs are sensitive to epigenetic modifications in clinical contexts such as asthma [5, 6] and viral infections [7].

Sequential pulmonary infections are common in clinical contexts. For instance, bronchi in patients with cystic fibrosis are commonly chronologically colonized by *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and then *Aspergillus fumigatus* [8]. These infections and the associated inflammation result in a progressive decrease in the respiratory function. In the current study, we investigated the potential immune memory of BECs with the hypothesis that initial exposure to PAMPs could modify their subsequent response to infection.

METHODS

Culture of BECs and Pathogens

Human BECs (BEAS-2B; American Type Culture Collection) were maintained at 37°C and 5% carbon dioxide in F-12 medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum, 1% penicillin-streptomycin, and 10-mmol/L IIEPES and stimulated in F-12 without antibiotics. Primary human BECs (Epithelix SaRL) were isolated from a 72-year-old man and a 72-year-old woman; both were white and nonsmokers, without reported disease. The BECs were cultured according to the manufacturer's instructions.

The *A. fumigatus* DAL strain (CBS 144.89) was grown as described elsewhere [9]. The conidia concentration was adjusted to obtain a multiplicity of infection of 2. The *P. aeruginosa* PAK strain and a *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strain were grown as described elsewhere [10]. The concentrations were adjusted to obtain a multiplicity of infection of 0.25.

Stimulation of BECs

A flow diagram of the BEC stimulation is shown in Figure 1A. On day -1, cells were cultured in 96-well plates (1.5×10^4 cells per well) and then prestimulated on day 0 (mean [standard error of the mean (SEM)], $2.8 [0.5] \times 10^4$ cells per well) with ultrapure flagellin (InvivoGen) from *P. aeruginosa* (10^{-6} to $5 \mu\text{g/mL}$) or Pam3CSK4 (10^{-6} to $1 \mu\text{g/mL}$), a synthetic triacylated lipopeptide (InvivoGen), for 48 hours. The prestimulated supernatants were collected, and the cells were washed twice with medium, followed by a resting period of 4 days. On day 6, cells reaching confluence (10.3×10^4 cells per well) were stimulated or not (control) with 10 ng/mL *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich), live *A. fumigatus* conidia or *S. maltophilia* for 15 hours, or *P. aeruginosa* for 4 hours.

Received 27 June 2019; editorial decision 23 October 2019; accepted 28 October 2019; published online November 3, 2019.

*Christophe Hennequin and Viviane Balloy contributed equally to this work.

Correspondence: Viviane Balloy, Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, Ile de France, France (viviane.balloy@inserm.fr).

The Journal of Infectious Diseases® 2020;221:1000–5
© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com.
DOI: 10.1093/infdis/jiz569

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/221/6/1000/5611237 by INSERM user on 03 October 2020

Pharmacological inhibitors of histone acetyltransferase, epigallocatechin-3-gallate(EGCG), or histone methyltransferase, BIX01294 trihydrochloride-hydrate (BIX; Sigma-Aldrich), were used to investigate the role of epigenetic modifications. Cells were preincubated for 1 hour with 15- μ mol/L EGCG or 4- μ mol/L BIX, before prestimulation. Subsequently, the inhibitors were maintained during the prestimulation and resting phases, and removed when cells were stimulated on day 6. The supernatants were collected on day 7 and stored at -20°C until interleukin 8 (IL-8) and interleukin 6 (IL-6) quantification with enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems).

Measurement of Toll-Like Receptor 4 Gene Expression

Toll-like receptor 4 gene (*TLR4*) messenger RNA expression was quantified by means of quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (TaqMan probe Hs_00152939) on day 6 in cells prestimulated with flagellin (1 μ g/mL) and in nonstimulated cells. The expression level of *TLR4* was normalized to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TaqMan probe Hs_2786624), with control cells used as a calibrator, and relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (where Ct indicates cycle threshold) [10].

Statistical Analysis

Data are presented as means with standard errors of the mean. Differences among groups were assessed using Prism 7.00 software (GraphPad). Differences with were considered statistically significant at $P < .05$.

RESULTS

To test the hypothesis of an immune memory in BECs, we adapted to the BEAS-2B cell line, the protocol developed by Ifrim et al [3] to study monocytes innate memory (Figure 1A). To mimic the first infection with *P. aeruginosa* or *S. aureus*, we prestimulated BECs with flagellin or Pam3CSK4 and determined whether their inflammatory response was modified when the cells were subsequently stimulated with LPS, *A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, or *S. maltophilia*. The most striking results were obtained after prestimulation with flagellin, a TLR5 ligand (Figure 1B). Indeed, prestimulation with 5- μ g/mL flagellin led to a trained immune response, compared with nonprestimulated cells, with increased secretion of IL-8 (mean [SEM], 3253 [574] vs 1663 [107] pg/mL, respectively) and IL-6 (275 [38] vs 148 [13] pg/mL) when *A. fumigatus* conidia were used as a second stimulus. In contrast, 1- μ g/mL flagellin induced a tolerant response, compared with nonprestimulated cells, with decreased secretion of IL-8 (mean [SEM], 66 [24] vs 250 [49] pg/mL, respectively) and IL-6 (9 [2] vs 24 [5] pg/mL, respectively) when the cells were subsequently challenged with LPS.

Similar decreased responses were obtained when BECs were infected with 2 strains of live gram-negative bacteria, *P. aeruginosa*

and *S. maltophilia*. Indeed, we observed that 5- μ g/mL flagellin induced a tolerant response, compared with nonprestimulated cells, with decreased secretion of IL-8 (mean [SEM], 145 [14] vs 1279 [235] pg/mL and 341 [62] vs 961 [56] pg/mL) and IL-6 (26 [13] vs 237 [41] pg/mL and 46 [3] vs 167 [1] pg/mL) when the cells were subsequently infected with *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, respectively. This regulation seemed to be linked to the flagellin signaling pathway, because prestimulation with Pam3CSK4, a TLR2 ligand, did not modify IL-8 and IL-6 secretion by cells subsequently challenged with LPS, flagellin, or *A. fumigatus* (data not shown). Importantly, using primary BECs from human donors, we confirmed the modulation of the inflammatory response after flagellin prestimulation and subsequent *A. fumigatus* infection, with a trend for a tolerant (not significant) and a trained immune response observed for the BECs from donor 1 and donor 2, respectively (Figure 1C).

To assess whether the level of cytokine secretion induced by the first stimulation influences the secondary response, we compared IL-8 and IL-6 concentrations in the cell supernatants after 48 hours of prestimulation with PAMPs. We found that 1- and 5- μ g/mL flagellin triggered similar levels of IL-8 (mean [SEM], 854 [114] and 817 [97] pg/mL, respectively, vs 227 [54] pg/mL for nonstimulated cells) and IL-6 (67 [10] and 84 [20] pg/mL, respectively, vs 20 [3] pg/mL for nonstimulated cells), whereas these 2 concentrations could induce either a trained or a tolerant immune response, depending on the second stimulus. Furthermore, we observed that 1- μ g/mL Pam3CSK4, which did not lead to any modification in the secondary response, induced IL-8 and IL-6 secretion at levels (mean [SEM], 791 [48] and 90 [11] pg/mL, respectively) similar to those induced with 1- or 5- μ g/mL flagellin (Supplementary Figure 1A and 1B). These results suggest that the innate immune memory would not depend on the level of the inflammatory response of prestimulated cells but rather on the nature and concentration of PAMPs, by way of pattern recognition receptors engaged during the first contact.

To test the role of epigenetic mechanisms, we inhibited enzymes involved in the chromatin condensation or decondensation. Inhibition of histone acetyltransferase with EGCG significantly diminished the flagellin-induced IL-8-trained immune response to *A. fumigatus* (mean [SEM], 1229 [120] pg/mL with EGCG vs 1747 [170] pg/mL without EGCG), without modifying the IL-8 response to *A. fumigatus* in nonprestimulated cells (845 [73] pg/mL with vs 1024 [93] pg/mL without EGCG) (Figure 2A). Similarly, inhibition of histone 3 at lysine 9 (H3K9) methylation with BIX diminished the flagellin-induced IL-8-trained immune response to *A. fumigatus* (mean [SEM], 742 [38] pg/mL with BIX vs 1236 [132] pg/mL without BIX), without affecting IL-8 synthesis in nonprestimulated cells in response to *A. fumigatus* infection (482 [16] pg/mL with vs 557 [31] pg/mL without BIX) (Figure 2B). In contrast, neither EGCG nor BIX treatment modified the IL-6-trained immune response (data not shown).

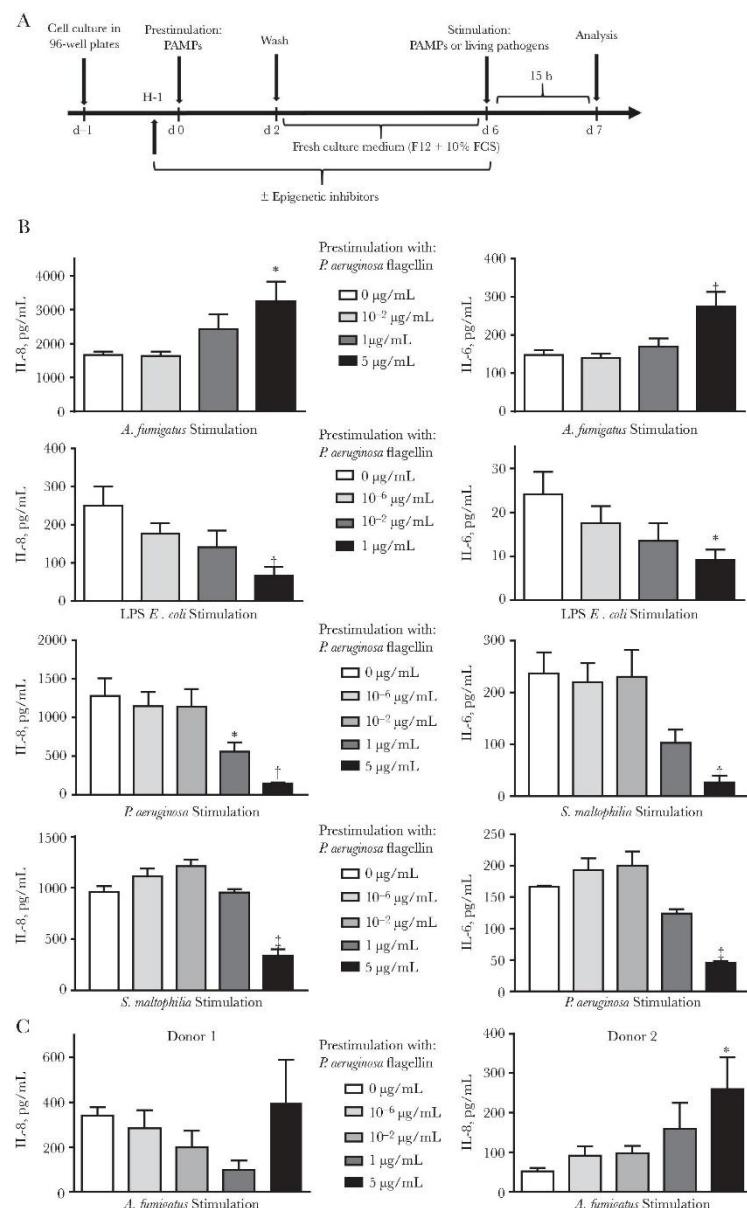


Figure 1. Protocol and cytokine secretion by bronchial epithelial cells (BECs) during trained immunity. *A*, Protocol used to study the memory effect in BECs. *B*, Interleukin 8 (IL-8) and interleukin 6 (IL-6) secretion after prestimulation of BEAS-2B cells with different concentrations of flagellin and stimulation with *Aspergillus fumigatus* conidia ($10^6/\text{mL}$), *Escherichia coli* lippopolysaccharide (LPS) (10 ng/mL), *Pseudomonas aeruginosa* ($1.3 \times 10^5 \text{ cells/mL}$), or *Stenotrophomonas maltophilia* ($1.3 \times 10^5 \text{ cells/mL}$) on day 6. *C*, IL-8 secretion after prestimulation of primary human BECs isolated from donor 1 (72-year-old man) and donor 2 (71-year-old woman), with different concentrations of flagellin and infection with conidia of *A. fumigatus* ($10^6/\text{mL}$) on day 6. Data are presented as means with standard errors of the mean for 3–8 independent experiments performed in triplicate. Statistical analysis was performed using analysis of variance, followed by Bonferroni multiple comparison test. * $P < .05$; † $P < .01$; ‡ $P < .001$ (vs control [nonprestimulated cells]). Abbreviations: PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; FCS, fetal calf serum.

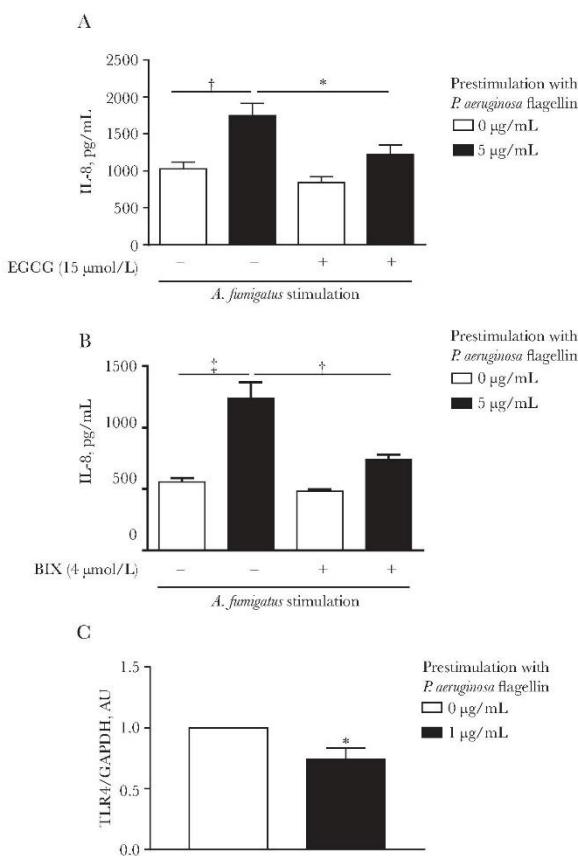


Figure 2. Involvement of epigenetic mechanisms in innate immune memory in bronchial epithelial cells (BECs). *A, B*, Effects of epigenetic modulators on cytokine secretion. Cells incubated with (+) or without (-) 15-μmol/L epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (*A*) or 4-μmol/L BIX (*B*) were prestimulated with 5-μg/mL *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and infected with *Aspergillus fumigatus* conidia (10⁵/mL). Data are presented as means with standard errors of the mean for 3–7 independent experiments performed in duplicate. Statistical analysis was carried out using analysis of variance, followed by Bonferroni multiple comparison test. **P* < .05; †*P* < .01; ‡*P* < .001 (vs control [nonprestimulated cells]). *C*, Expression of *TLR4* messenger RNA on day 6 after prestimulation with flagellin (1 μg/mL). Data are presented as means with standard errors of the mean for 9 independent experiments. Statistical analysis was conducted using the Mann-Whitney test. **P* < .05 (prestimulated vs nonprestimulated group). Abbreviations: AU, Arbitrary unit; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL-8, interleukin 8; TLR4, toll-like receptor 4.

Altogether, our data suggest the involvement of epigenetic mechanisms in the reprogramming of the transcriptional response in BECs. This conclusion was further supported by a significant decrease (26%) in the expression of *TLR4*, an LPS receptor, in BECs preincubated with 1-μg/mL flagellin, compared with that in nonprestimulated cells (Figure 2C).

DISCUSSION

Innate immune cells, originating from hematopoietic progenitors such as macrophages/monocytes and natural killer cells, are capable of immune memory [2]. This phenomenon has also

been described in nonprofessional immune cells, such as epithelial stem cells, fibroblasts, and intestinal stromal cells, which, similarly to BECs, exhibit immune properties, express pattern recognition receptors, and promote cell replacement and tissue regeneration [11]. However, to our knowledge, this phenomenon has not been reported for BECs that are frequently in contact with inhaled environmental microorganisms.

In the current study, we demonstrated that BEAS-2B cells could be reprogrammed, like monocytes [3], after the first contact with flagellin and were able to reduce or exacerbate their inflammatory response to a second microbial stimulus. We further

confirmed the memorization capacity of BECs using primary cells and demonstrated that the innate memory observed in the BEAS-2B cell line was not a consequence of its immortalization process. Interestingly, the modulation differed between the donors, with either a reduction or exacerbation of the inflammatory response that may be explained by their previous exposition to different pathogens during their lifetime. Furthermore, immune responses and epigenetic mechanisms are known to be influenced by sex [12], which differed between the 2 donors.

A limitation of our study is that PAMPs were used during preexposure, instead of living pathogens, which cause cellular toxicity after 48 hours of infection. In addition, other inflammatory molecules may be modulated on preexposure of BECs to PAMPs.

Thus, our data highlight the capability of BECs to develop innate immune memory. We also demonstrated the existence of epigenetic mechanisms involved in innate immune memory of BECs, similar to those reported elsewhere for macrophages/monocytes [13]. Indeed, by inhibiting histone acetylation or methylation, known to play a role in the condensation and decondensation of the chromatin, thus affecting the transcriptional machinery, we observed a dramatic decrease in the IL-8-trained memory of flagellin-prestimulated cells in response to *A. fumigatus* infection.

These results require further investigations to identify histone modifications involved. The expression of *TLR4*, an LPS receptor, was reduced in flagellin-prestimulated cells on day 6; this may explain, at least in part, the tolerance to subsequent stimulation with LPS or LPS-expressing bacteria. However, *TLR4* expression was not completely abolished to fully account for the drastic decrease in cytokine levels. The expression of TLR4 coreceptors should be studied to further elucidate the mechanism. A similar approach cannot be used for *A. fumigatus*, because its receptor has not yet been identified in BECs.

There are some differences between the response of flagellin-prestimulated BECs, observed in our study and that of monocytes, described elsewhere. Indeed, Ifrim et al [3] demonstrated that the monocytes initial exposure to low concentrations of flagellin elicited an enhanced response upon secondary exposure to LPS, contrary to that of BECs. This is probably owing to the difference in TLR expression levels [14]. Moreover, it is important to note that our BEC model differs from monocytes/macrophages by their capacity to divide.

Therefore, whereas Ifrim et al [3] prestimulated and subsequently challenged the same monocyte population, in our model, BECs challenged on day 6 were daughter cells, derived from cells prestimulated on day 0. Thus, as epigenetic changes, the memory of BECs seems to be transmitted during cell division. This capacity for memory transfer to daughter cells may be of major importance in an inflammatory context, especially in cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease, or bronchiectasis, in which epithelial lesions, due to inflammatory

exacerbations and infections, frequently lead to tissue repair and cell renewal [15].

In conclusion, we demonstrated that the inflammatory response of BECs could be reprogrammed after the first contact with a microbial ligand. Intracellular processes associated with this innate immune memory should be identified to assess various epigenetic and metabolic defects that may occur in immune-related diseases associated with chronic infections or inflammation.

Note

Financial support. This work was supported by a grant from a French nonprofit cystic fibrosis organization, Vaincre la Mucoviscidose.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:241–9; quiz 50.
- Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 2011; 9:355–61.
- Ifrim DC, Quintin J, Joosten LA, et al. Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21:534–45.
- Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 2015; 16:27–35.
- Nicodemus-Johnson J, Myers RA, Sakabe NJ, et al. DNA methylation in lung cells is associated with asthma endotypes and genetic risk. *JCI Insight* 2016; 1:e90151.
- Stefanowicz D, Ullah J, Lee K, et al. Epigenetic modifying enzyme expression in asthmatic airway epithelial cells and fibroblasts. *BMC Pulm Med* 2017; 17:24.
- Caixia L, Yang X, Yurong T, Xiaoqun Q. Involvement of epigenetic modification in epithelial immune responses during respiratory syncytial virus infection. *Microb Pathog* 2019; 130:186–9.
- O'Brien S, Fothergill JL. The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiol Lett* 2017; 364:fnx128.
- Richard N, Marti L, Varrot A, et al. Human BEC inhibit *Aspergillus fumigatus* germination of extracellular conidia via FleA recognition. *Sci Rep* 2018; 8:15699.
- Perra L, Balloy V, Foussignière T, et al. CHAC1 is differentially expressed in normal and cystic fibrosis bronchial epithelial

- cells and regulates the inflammatory response induced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Immunol* **2018**; 9:2823.
11. Hamada A, Torre C, Drancourt M, Ghigo E. Trained immunity carried by non-immune cells. *Front Microbiol* **2018**; 9:3225.
 12. Schurz H, Salie M, Tromp G, Hoal EG, Kinnear CJ, Möller M. The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility. *Hum Genomics* **2019**; 13:2.
 13. Ivashkiv LB, Park SH. Epigenetic regulation of myeloid cells. *Microbiol Spectr* **2016**; 4.
 14. Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. *Folia Biol (Praha)* **2005**; 51:188–97.
 15. Parker D, Ahn D, Cohen T, Prince A. Innate immune signaling activated by MDR bacteria in the airway. *Physiol Rev* **2016**; 96:19–53.

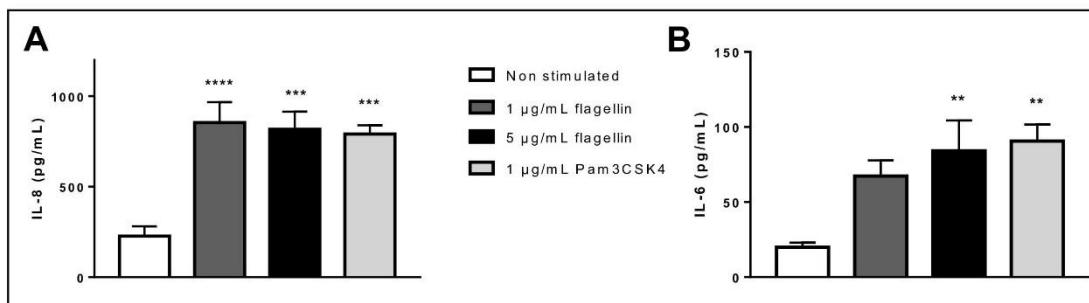


Fig S1

Supplementary figures : Cytokine secretion by bronchial epithelial cells stimulated by flagellin or Pam3CSK4. BEAS-2B cells were pre-stimulated or not with 1 and 5 µg/mL of flagellin or 1 µg/mL of Pam3CSK4 at day 0 and supernatants were collected at day 2. IL-8 (A) and IL-6 (B) secretion were measured by ELISA. The data are represented as the mean of 7 to 8 independent experiments, in duplicate ± standard error at mean (SEM). Statistical analysis was carried out using analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test (** p <0.01; ***p<0.001; **** p<0.0001).

II- Analyses complémentaires

1. Effet de la pré-exposition des CEB à d'autres PAMP sur la mémoire innée

a. Matériels et méthodes

Par la suite, nous avons élargi le panel de molécules utilisées pour la pré-stimulation avec :

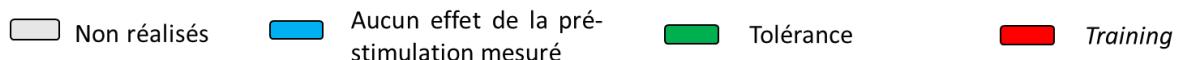
- le Pam3CSK4, un lipopeptide triacylé synthétique, reconnu par TLR2, récepteur impliqué dans la reconnaissance du peptidoglycane de *Staphylococcus aureus* et du LPS de *Pseudomonas aeruginosa*,
- le poly (I:C), un ARN double brin synthétique mimant une infection virale, qui active TLR3,
- le LPS et la flagelline de *P. aeruginosa* capables d'activer respectivement TLR2, 4 et TLR5,
- le R848 (Resiquimod) molécule synthétique d'imidazoquinolone, avec une puissante activité antivirale, reconnue par les TLR7/8,
- l'ODN oligodeoxynucléotides synthétiques contenant CpG hypométhylés motifs distinguant l'ADN microbien de l'ADN des mammifères reconnu par TLR9
- le β -D-glucane, un PAMP pan-fongique, reconnu par la Dectine-1,
- le Tri-DAP, un tripeptide synthétique présent dans le peptidoglycane de la paroi des bactéries, reconnu par Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD)1,
- le Muramyl dipeptide (MDP) motif minimum du peptidoglycane, reconnu par NOD2.

A J6, le stimulus secondaire a été réalisé avec des PAMP spécifiques de TLR2, 3, 4 ou 5 ainsi que par des spores d'*A. fumigatus* (DAL, *multiplicity of infection* = 2). De la même manière, la réponse inflammatoire a été effectuée après 15 heures d'infection ou de stimulation par dosage de l'IL-6 et de l'IL-8.

b. Résultats

Selon les combinaisons (pre-stimulus/stimulus secondaire), il a été possible d'observer à J7, plusieurs types de réponses : une synthèse d'IL-8 et/ou d'IL-6 inchangée, diminuée (tolérance) ou augmentée (*training*).

L'effet de l'ensemble des combinaisons testées sur la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 est résumé dans le **Tableau 6** ci dessous.



Pré-stimulation \ Stimulation	Pam3CSK4	LPS de <i>E. coli</i>	Flagelline de <i>P. aeruginosa</i>	LPS de <i>P. aeruginosa</i>	Spores d' <i>A. fumigatus</i>	Poly I:C
Pam3CSK4 (TLR1/2)		■	■	■	■	■
Poly I:C (TLR3)			■	■	■	■
LPS de <i>E. coli</i> (TLR4)		■	■		■	
Flagelline de <i>P. aeruginosa</i> (TLR5)	■		■	■	■	
LPS de <i>P. aeruginosa</i> (TLR2/4)			■	■	■	■
ODN (TLR9)	■		■		■	■
R848 (TLR7/8)	■		■		■	■
Tri-DAP (NOD1)	■		■		■	■
MDP (NOD2)	■		■		■	■

Tableau 6 : Bilan des différentes combinaisons de PAMP utilisés pour les pré-stimulations, ainsi que les PRR stimulés par chacun entre parenthèses, les stimulations des CEB, et les résultats obtenus en termes de synthèse d'IL-6 et d'IL-8.

Plusieurs PAMP utilisés lors de la pré-stimulation n'ont pas induit de modification de la synthèse d'IL-8 et d'IL-6 lors de la seconde stimulation. Cependant, alors que nous n'avons pas mesuré de modification significative de la synthèse d'IL-8 des cellules pré-stimulées par la flagelline de *P. aeruginosa* puis stimulées par le même agoniste (**Figure 22A**), la pré-stimulation des cellules bronchiques par 5 µg/mL de flagelline diminue significativement la synthèse d'IL-6 en réponse à ce même PAMP (**Figure 22B**). Par ailleurs, la pré-stimulation des CEB par de fortes concentrations d'ODN (1,5 et 2 µM) diminuent significativement la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 mesurée après 15h de stimulation par 100 ng/mL de PIC (**Figures 22C et D**).

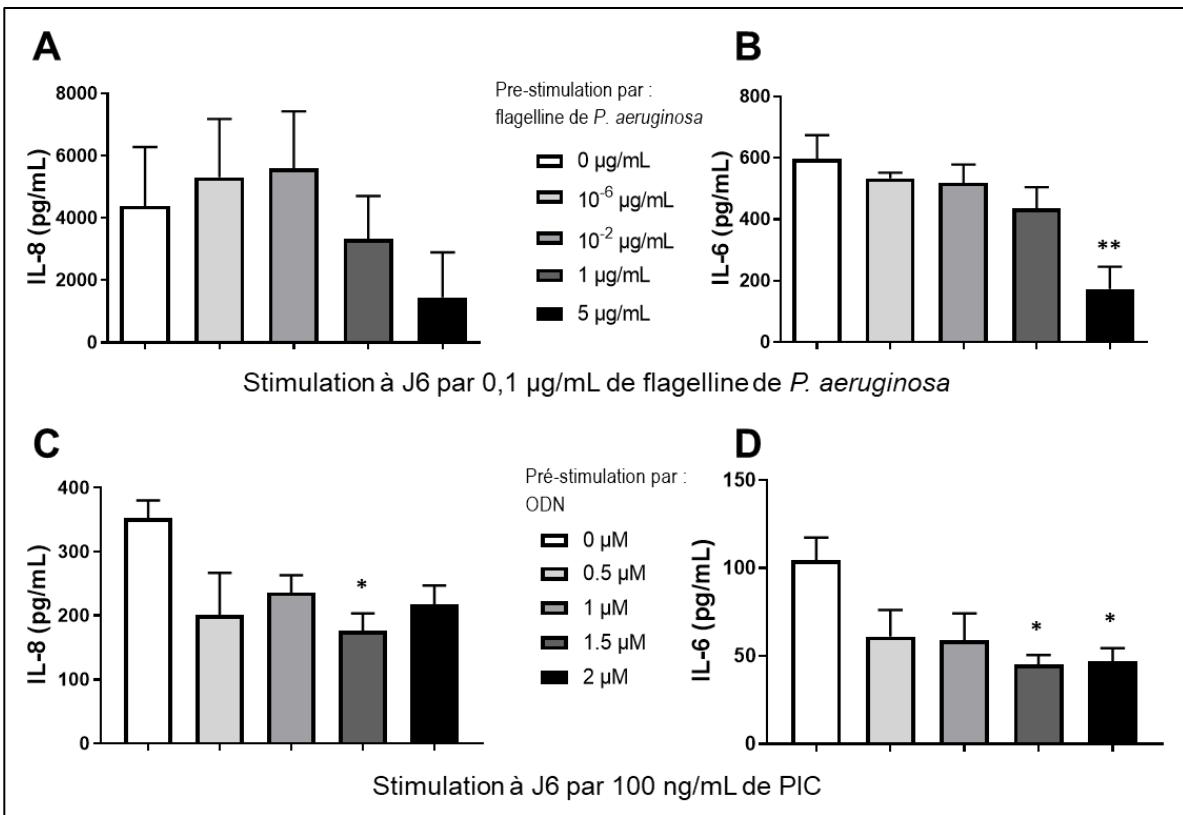


Figure 22 : Synthèse d'IL-8 (A et C) et d'IL-6 (B et D) suite à la stimulation pendant 15 heures par 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de flagelline (A et B), ou 100 ng/mL de PIC (C et D), de CEB pré-stimulées ou non par différentes concentrations de flagelline de *P. aeruginosa* (A et B) ou d'ODN (C et D). Les valeurs sont exprimées en pg/mL, après soustraction des valeurs obtenues pour les conditions non stimulées. Chaque histogramme représente la moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM) de 7 expériences indépendantes, en duplicate. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ (ANOVA Bonferroni).

2. Implication de TLR5 dans la tolérance et le *training* induit par la flagelline

Nous avons ensuite cherché à identifier l'implication de TLR5, le récepteur de la flagelline, aussi bien dans le *training* induit par cet agoniste dans la réponse à *A. fumigatus* mais aussi son impact dans la tolérance observée après stimulation par le LPS de *E. coli*.

a. Matériels et méthodes

Afin d'étudier l'implication de TLR5, un anticorps anti-TLR5 bloquant (Anti-hTLR5-IgA, Invivogen, USA) ou un isotype contrôle (Human IgA2 control, Invivogen) ont été introduits dans le protocole précédemment mis au point. 10 $\mu\text{g/mL}$ d'anticorps ont été pré-incubés avec les cellules, 1 heure avant, puis durant la période de pré-stimulation de 48 heures avec 1 ou 5 $\mu\text{g/mL}$ de flagelline. Les cellules ont ensuite été lavées, et la flagelline et les anticorps éliminés. Les CEB sont restées au repos pendant 4 jours puis ont été infectées à J6 par 10^6 spores d'*A. fumigatus* par mL (MOI = 2) ou par 10 ng/mL de LPS pendant 15 heures. Les surnageants ont été prélevés afin de mesurer la production d'IL-8 et d'IL-6 (Figure 23).

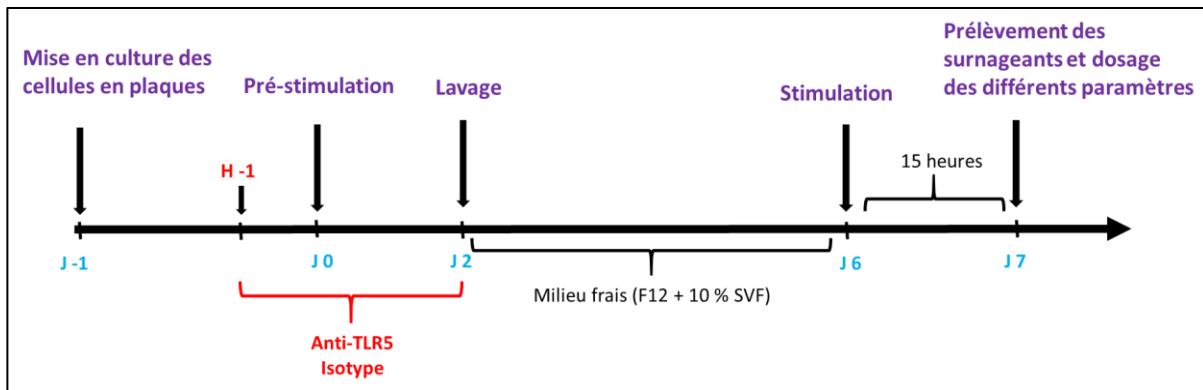


Figure 23 : Illustration du protocole utilisé pour l'étude de l'implication du TLR5 dans la mémoire induite par la flagelline. Les CEB, lignée BEAS-2B, ont été mises en culture à J-1. A J0, 1 heure avant la pré-stimulation, les cellules ont été pré-incubées avec 10 µg/mL d'anticorps anti-hTLR5, l'isotype contrôle ou le milieu seul puis la flagelline (1 ou 5 µg/mL) a été ajoutée pendant 48 heures. Les cellules ont ensuite été lavées puis laissées au repos pendant 4 jours. A J6, les CEB ont été infectées avec 10⁶ spores/mL d'*Aspergillus fumigatus* ou stimulées avec 10 ng/mL de LPS pendant 15 heures. L'IL-6 et l'IL-8 ont ensuite été dosées par ELISA dans les surnageants cellulaires.

b. Résultats

L'augmentation de production d'IL-8 et d'IL-6 observée lors de la stimulation par *A. fumigatus* des CEB pré-stimulées par la flagelline, n'est pas modifiée par l'incubation des cellules avec l'isotype. En revanche, en présence de l'anticorps anti-TLR5, cette augmentation est inhibée (**Figure 24A et B**). L'inhibition de l'interaction entre la flagelline et TLR5 inhibe le *training* qu'elle induit. A l'inverse, la tolérance observée avec la pré-stimulation par 1 µg/mL de flagelline puis une stimulation 4 jours plus tard par le LPS ne semble pas inhibée à la suite du blocage du récepteur à la flagelline par l'anti-hTLR5 (**Figure 24C et D**). La tolérance ne semble donc pas dépendante de la voie du TLR5.

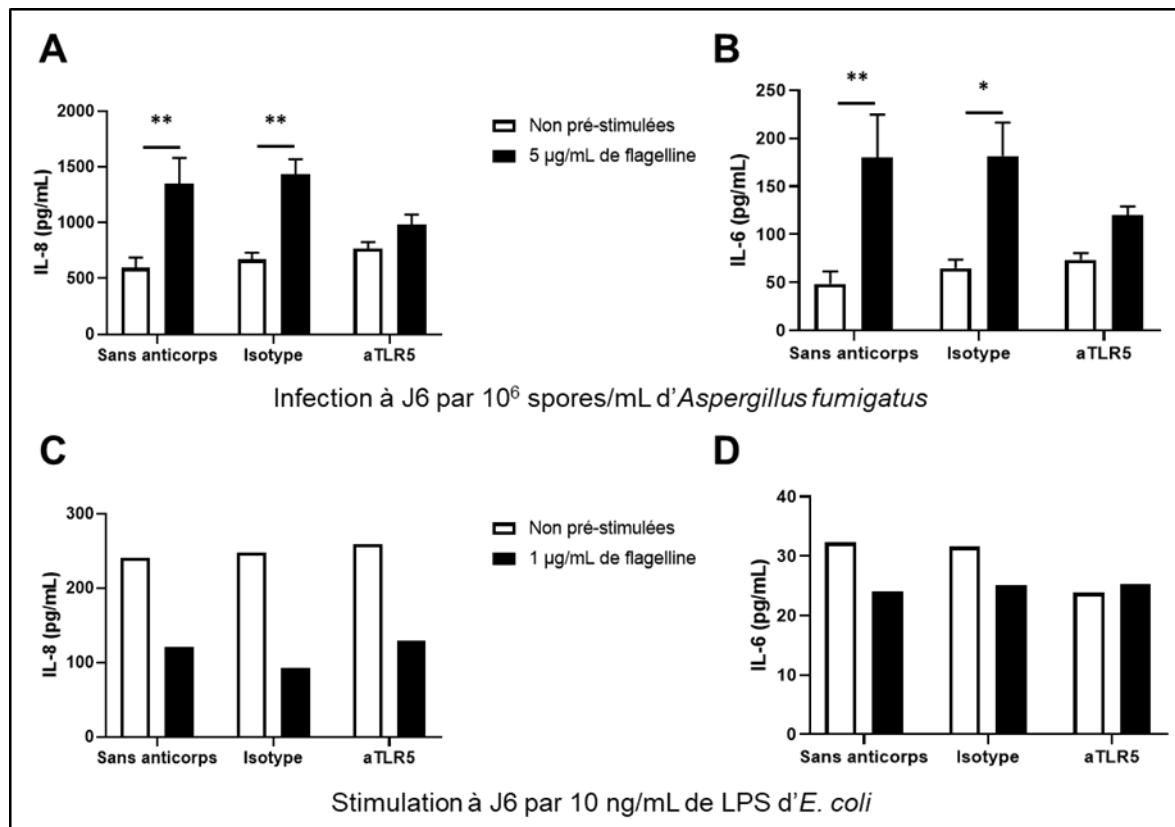


Figure 24 : Effet de l'inhibition de TLR5 sur sur la mémoire des CEB pré-exposées à la flagelline. Les cellules ont été pré-incubées avec 10 µg/mL d'anticorps anti-TLR5, 1h avant la pré-stimulation, puis pré-stimulées pendant 2 jours avec 5 (A et B) ou 1 µg/mL (C et D) de flagelline de *P. aeruginosa*, en présence de l'anticorps. A J6, les CEB ont été infectées avec *A. fumigatus* souche DAL (A et B) ou le LPS d'*E. coli* (C et D). Après 15 heures de stimulation, les surnageants de culture ont été prélevés et la synthèse d'IL-8 et d'IL-6 mesurée. Les résultats sont exprimés en pg/mL, après soustraction des valeurs obtenues pour les conditions non stimulées à J6. Les données sont représentées par des histogrammes faisant apparaître la moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes en duplicate pour A et B, * p<0,05 ; ** p<0,01 (ANOVA Bonferroni) et la moyenne d'une expérience en duplicate pour C et D.

3. Conclusion

Nous avons montré dans cette première partie de l'étude, l'existence d'une mémoire de l'immunité d'une lignée de cellules épithéliales bronchiques, BEAS-2B, que nous avons confirmé avec des cellules primaires. À notre connaissance, il s'agit de la première démonstration de ce phénomène chez des cellules bronchiques. Ce phénomène varie selon les couples pré-stimulus/stimulus ce qui indique que la mémoire est dépendante des PAMP utilisés et donc des PRR activés. De plus, l'inhibition de TLR5 montre que le *training* que nous avons observé est dépendant de la liaison de la flagelline à TLR5. D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de méthylation et d'acétylation d'histones suggère fortement une implication de mécanismes épigénétiques, comme pour les cellules hématopoïétiques, dans le phénomène de mémoire de l'immunité innée des CEB.

III- Impact de la mémoire innée des cellules épithéliales bronchiques induite par la flagelline sur la réponse à différents pathogènes fongiques

1. Contexte de l'étude et objectifs

Ainsi, nous avons montré que les CEB, étaient capables de mémoriser un premier contact avec un stimulus, ici la flagelline de *P. aeruginosa*, ce qui conduit à une réponse inflammatoire exacerbée, de type *training*, lors d'une infection secondaire par *A. fumigatus*. Ce contexte évoque d'embrée la situation observée chez les patients atteints de mucoviscidose chez qui ces deux pathogènes peuvent être isolés simultanément ou séquentiellement.

Nous avons souhaité explorer plus largement le phénomène de mémoire innée, d'une part avec des souches cliniques d'*Aspergillus fumigatus* mais également avec des souches appartenant à d'autres espèces fongiques fréquemment isolées dans les prélèvements respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (Coron et al. 2018). Par ailleurs, dans une étude précédente, l'équipe d'accueil a montré que les cellules épithéliales bronchiques étaient capables d'exercer une activité antifongique fongistatique vis-à-vis des spores d'*A. fumigatus* en inhibant leur germination, activité quantifiée grâce au dosage de sucres de paroi fongique, reflet de la croissance de ces pathogènes (Richard et al. 2018). Nous avons alors exploré le rôle de la mémoire innée des CEB en cas d'infection à J6 par différents pathogènes fongiques : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Candida albicans* et *Scedosporium apiospermum*.

Ainsi, nous avons mesuré l'impact de la pré-exposition des CEB à la flagelline de *P. aeruginosa*, sur leur réponse à une infection par différentes espèces fongiques. La réponse à cette infection a été mesurée en termes de viabilité cellulaire (dosage de la lactate deshydrogénase), de réponse inflammatoire (quantification de l'IL-6 et de l'IL-8) mais aussi d'activité antifongique des CEB (mesure de la croissance par dosage de sucres de paroi fongique) (**Figure 25**).

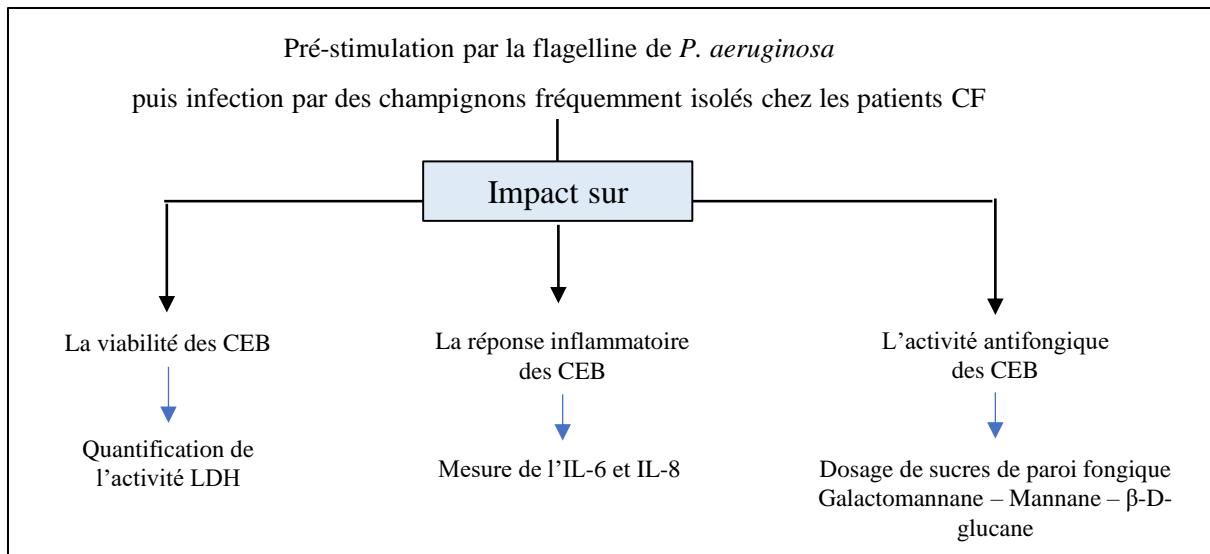


Figure 25 : Plan suivi pour cette étude. CEB : cellules épithéliales bronchiques, CF : Cystic fibrosis, LDH : lactate déshydrogénase

2. Résultats

En accord avec nos résultats précédents obtenus avec la souche de référence DAL, l'utilisation de souches cliniques d'*A. fumigatus* a conduit à une exacerbation de la réponse inflammatoire après pré-stimulation des CEB par la flagelline. La pré-stimulation a aussi un impact significatif sur la réponse inflammatoire des CEB à une infection par *S. apiospermum* et *C. albicans*. L'activité antifongique des CEB peut être étendue à d'autres espèces aspergillaires, *A. flavus* et *A. terreus*, mais la flagelline n'a aucun impact sur cette activité pour la première espèce. Cependant, après infection par *A. terreus*, la réponse inflammatoire des CEB pré-stimulées n'est pas modifiée alors que la réponse antifongique est diminuée.

3. Conclusion

Nos résultats montrent que la reprogrammation de la réponse inflammatoire à la suite d'une pré-stimulation par la flagelline peut être étendue à différents genres et espèces fongiques impliqués dans la colonisation des bronches de patients CF, avec néanmoins des conséquences différentes selon le genre. L'effet mémoire que nous avions observé avec une souche de laboratoire a été retrouvé avec des isolats cliniques d'*A. fumigatus* mais également avec *S. apiospermum*, et *C. albicans*. De façon plus générale et en adaptant ces observations au contexte de la mucoviscidose, la pré-exposition à la flagelline de *P. aeruginosa* pourrait engendrer une réponse inflammatoire exacerbée lors de l'infection par *Aspergillus*, *Scedosporium* et *Candida*, et participer au contexte déjà très inflammatoire des bronches des patients CF (O'Sullivan et Freedman 2009). Pour conclure, ces résultats suggèrent un rôle des CEB dans la modulation de la réponse inflammatoire en réponse aux infections mixtes bactériennes et fongiques. La compréhension des processus intracellulaires liés à cette mémoire pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques visant à moduler la réponse immunitaire innée lors des infections

polymicrobiennes retrouvées chez les patients CF. L'ensemble de ces résultats a donné lieu à la rédaction d'un article soumis à *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, actuellement en révision.

Innate immune memory of bronchial epithelial cells applied to fungi colonizing bronchial airways of Cystic Fibrosis patients

Jeanne Bigot¹, Loïc Guillot², Juliette Guitard¹, Sandra Velaissamy³, Sophie Thorez³, Harriet Corvol⁴, Viviane Balloy^{2\$*} and Christophe Hennequin^{1\$*}

¹Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service de Parasitologie-Mycologie, F-75012 Paris, France

²Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, France

³AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service de Parasitologie-Mycologie, F-75012 Paris, France

⁴Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Hôpital Trousseau, Service de Pneumologie Pédiatrique, F-75012 Paris, France

\$These authors contributed equally to this work.

*Corresponding Authors:

Dr Viviane Balloy

viviane.balloy@inserm.fr

Pr Christophe Hennequin

christophe.hennequin-sat@aphp.fr

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease associated with modifications in the bronchial mucus properties and alterations in the mucociliary clearance that cause chronic infections by various microbial pathogens. Respiratory infections and inflammation cycle lead to irreversible pulmonary lesions, ultimately responsible for life-threatening respiratory insufficiency. Filamentous fungi such as *Aspergillus* spp, *Scedosporium* spp, but also yeasts such as *Candida albicans* are commonly isolated from bronchopulmonary samples from CF patients. Bronchial epithelial cells (BEC) play a crucial role in the innate immunity against inhaled pathogens. Indeed, we previously showed that in addition to exerting a fungistatic action against *Aspergillus fumigatus* conidia, BEC are capable of innate immune memory allowing the cells to increase their inflammatory response against *A. fumigatus* conidia following a previous contact with *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. In this study, we aimed at investigating this phenomenon against other fungal pathogens frequently isolated from the sputum of CF patients (*Aspergillus* spp., *Scedosporium apiospermum*, and *Candida albicans*). We measured the impact of flagellin pre-stimulation on the inflammatory response, the antifungal activity and the cell viability of bronchial epithelial cells after infection with these fungal species whether the cells were pre-stimulated or not with flagellin. Our results suggest that memory properties of BEC modulates responses to fungal infections. Understanding the intracellular processes underlying the innate immune memory of BEC could open new therapeutic avenues to modulate the inflammatory response against polymicrobial infections observed in chronic pulmonary diseases such as CF.

Keywords:

Innate immunity, bronchial epithelial cells, innate immune memory, trained immunity, fungal lung infections, cystic fibrosis

Introduction

It is now admitted that healthy lower airways harbour a very diverse microbiota, including bacteria, viruses, and fungi, that contributes to the pathogenesis of various pulmonary diseases (Budden et al. 2019; Dumas et al. 2018). The microbial diversity and abundance of these microorganisms are significantly modified during the course of different chronic respiratory diseases such as cystic fibrosis (CF).

CF is an autosomal recessive disease due to variants in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, a protein involved in the regulation of chloride ion transport of epithelia. This results in dehydration of the cell surface liquid and thickening of the secretions affecting different organs such as the lungs, or the digestive tract. The production of an abnormal mucus by bronchial epithelial cells (BEC) prevents an efficient mucociliary clearance of the inhaled pathogens, leading to persistent microbial colonization, sometimes complicated by bronchitis exacerbations (Grasemann et Ratjen 2013). In addition, a vicious circle of inflammation locally occurs that also participates in the lung parenchyma deterioration. The consequences are a progressive decline in the respiratory functions and end-stage respiratory failure which accounts for over 90% of the mortality of CF patients (King, Henriet, et Warris 2016; O'Sullivan et Freedman 2009). Alterations in the lung microbiota of CF patients begin as early as infancy with *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* colonisation (O'Sullivan et Freedman 2009; « Registre et muco en chiffres » 2015). In adulthood, *Pseudomonas aeruginosa* becomes the predominant pathogen, found in about 70% of the sputum of patients aged between 25 and 34 years (« 2017 Patient Registry Annual Data Report » 2017). *P. aeruginosa* infection is significantly associated with a more rapid decline in the lung function (Schaedel et al. 2002; Ren et al. 2012). Whereas bacteria vastly outnumber fungi in the bronchial colonization, there is growing evidence indicating that the fungal microbiota is also altered in chronic respiratory disease. Recently, lung mycobiome gained attention and the CF lower respiratory tract microbiota has been investigated (L. D. N. Nguyen, Viscogliosi, et Delhaes 2015). Human lungs continually exchange 5–8 L/min of air with an environment containing about 10^2 – 10^4 or more fungal spores per cubic meter indoors and outdoors. It has been clearly demonstrated that some fungi present in the respiratory tract of CF patients contribute to the weakening of their respiratory performances through different pathologic processes such as infection, allergy or indirectly through inflammatory (L. D. N. Nguyen, Viscogliosi, et Delhaes 2015). In addition to inhaled fungal pathogens, endogenous fungi, such as *Candida* sp., commensals of the digestive tract and other mucous membranes, are commonly isolated from expectorations of CF patients (Coron et al. 2018). Indeed, *Candida albicans* is the fungal species the most frequently isolated from respiratory specimens of CF patients with prevalence as high as 93% in some studies (Muthig et al. 2010). The consequences of *C. albicans* airways colonization in CF patients are controversial. Some authors have shown that *C. albicans* repeated isolation is associated with a poor prognosis, increased the number of bronchitis exacerbations necessitating hospitalization

and a decline in the respiratory function (Gileles-Hillel et al. 2015) while others claim that *C. albicans* colonization has no deleterious effects (Baxter et al. 2013).

Aspergillus spp. are filamentous fungi, saprophytes of the environment from where they release small size spores (or conidia) in the air that can be inhaled. *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. terreus* are the most frequent species encountered in CF patients (Singh et al. 2018; Engel et al. 2018). In adult population of CF patients, about 60% of the patients are infected with *A. fumigatus* (Brandt et al. 2018; J. Zhao et al. 2018). Bronchial colonization with *A. fumigatus* may have deleterious consequences as it is the starting point of various clinical phenotypes ranging from bronchitis to allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) (Armstead, Morris, et Denning 2014; Gago, Denning, et Bowyer 2019). In the absence of treatment, the outcome of ABPA can lead to the formation of bronchiectasis and/or pulmonary fibrosis. Finally, terminal respiratory failure may be such that some patients must undergo lung transplantation that requires the use of immunosuppressive therapies increasing their risk to develop invasive pulmonary aspergillosis (Hatziagorou et al. 2009).

Scedosporium, like *Aspergillus*, is an environmental filamentous fungus which spores can be inhaled (Cortez et al. 2008). *S. apiospermum* is the main species and the second most frequent thermoresistant mold isolated from CF expectorations after *A. fumigatus* (Coron et al. 2018; Engel et al. 2018). Again, the role of *Scedosporium* in the deterioration of the lung function remains controversial (Cortez et al. 2008). In comparison with ABPA, some patients may develop allergic bronchopulmonary mycosis due to *S. apiospermum*. However, because of the natural resistance of this fungal species to different classes of antifungal drugs, invasive *Scedosporium* infection, which can occur in the case of immunosuppression, especially following lung transplantation, is the most feared complication.

BEC are the first cells of the low respiratory tract that encounter inhaled pathogens and face to endogenous colonizing pathogens, such as *Candida* spp. These cells express highly conserved Pattern Recognition Receptors (PRRs) (Roach et al. 2005) allowing the recognition of microbial motifs called Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). The interaction between cells and microbes initiates a cascade of intracellular signals that activate mechanisms of the innate immune defence. Several studies showed that interaction between BEC and fungi notably induced the secretion of pro-inflammatory cytokines and anti-microbial peptides that limit the fungal proliferation (Bigot et al. 2020).

Until recently, the absence of specific immune memory was considered a key characteristic of innate immunity as opposite to adaptive immunity. However, there is now a growing body of evidence showing that cells involved in the innate immunity can modulate their immune response when exposed to microbes depending on whether or not they have been previously stimulated by microbial components (Netea, Quintin, et van der Meer 2011). The cells can be thus hypo- or hyper-reactive type to the secondary stimulus leading to a suppressed (tolerance) or enhanced (training) immune response, respectively. The cellular mechanisms for this phenomenon rely on epigenetic changes, notably the induction of histone modifications, alterations in DNA methylation levels and synthesis of non-coding RNA (Netea et al. 2016). Studies have previously shown that macrophages, monocytes, natural killer

cells are capable of innate immune memory. In a recent study, we demonstrated that BEC exposed to a first microbial component are also able to modify their response to a second infection occurring distantly (Bigot et al. 2019). Indeed, we observed that pre-exposure of BEC to *P. aeruginosa* flagellin increases the inflammatory response when the BEC are subjected to a further *A. fumigatus* infection, leading to an increase of IL-6 and IL-8 synthesis. Interestingly, these 2 pathogens are frequently isolated from the airways of CF patients, so innate immune memory may play a role in the chronic inflammation of bronchial airways of those patients.

The aim of the present study was therefore to explore if this trained innate immune memory is observed with different fungal species frequently isolated from CF patients. For that, we measured the impact of pre-exposure of BEC to *P. aeruginosa* flagellin on their inflammatory and antifungal responses to infection by *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *S. apiospermum*, and *C. albicans* clinical strains.

Materials and Methods

Strains

Clinical strains, mainly isolated from CF patients, were used in this study (Table 1). Species were selected according to the frequency of isolation from those patients (Coron et al. 2018). For molds *A. fumigatus* (n=4), *A. flavus* (n=4), *A. terreus* (n=2), and *S. apiospermum* (n=3) were tested and so the yeast *C. albicans* (n=3). A reference strain of *A. fumigatus*, DAL strain (CBS 144.89), was also included as a control. All strains had their identification confirmed at the cryptic species level using MALDI-TOF mass spectrometry analysis. The spectra were acquired using a Microflex Brucker (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany) device and then compared to the MSI database available online (<https://biological-mass-spectrometry-identification.com>).

Filamentous fungi were grown at room temperature on Sabouraud agar medium containing chloramphenicol and gentamicin (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). After 7 days of culture, spores were recovered in 1 mL of sterile 0.1% PBS Tween 20. The resulting suspension was then filtered through a cell filter (40 µm Ø) and centrifuged for 10 minutes at 9,000 rpm. The pellet was resuspended in 500 µL of 0.1% Tween 20 PBS and, after counting in a Malassez cell, the concentration of spores adjusted in antibiotic-free culture medium to obtain the desired concentrations defined above. Strains of *C. albicans* were subcultured onto Chromagar medium plates (Becton-Dickinson, Pont de Claix, France) incubated at 37°C. The suspensions were prepared by adapting the protocol described by Reihill et al. (Reihill et al. 2011). Three colonies were inoculated into Sabouraud broth (Bio-Rad) and incubated for 7-8 hours at 37°C, under agitation at 100 rpm to reach the exponential growth phase. After centrifugation of 1 mL of the culture (10 min at 9,000 rpm), the pellet was washed then resuspended in 1 mL sterile PBS. After counting in a Malassez cell, the concentration was adjusted in antibiotic-free culture medium to the desired concentration.

In preliminary experiments, BEC were stimulated with different concentrations of conidia or yeasts in order to determine the optimal concentration to use, i.e. having the lowest cytotoxicity and inducing moderate IL-8 production which can thus be modulated up or down after cells exposure to the flagellin. Optimal Multiplicity of Infection (MOI), i.e. spore-to-BEC number ratios, was determined at 2, 0.05, 1, 0.5 and 0.1 for *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *S. apiospermum* and *C. albicans*, respectively.

Cell culture and in vitro model

The protocol was previously described in Bigot et al. 2020 (Bigot et al. 2019). Briefly, a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B), maintained in F-12 culture medium (Thermo Fisher, Villebon-sur-Yvette, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Eurobio, les Ulis, France), 1% penicillin and streptomycin (Thermo Fisher), and 10 mM HEPES in 75-cm² culture flasks (TPP, Trasadingen, Suisse), were seeded in on day -1, in 96-well plates (TPP) (1.5×10⁴ cells/well in 200 µL of medium). Cells were pre-stimulated from day 0 to day 2 with 5 µg/mL ultrapure flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* (InvivoGen, San Diego, United States). The cells were then washed twice

with fresh medium, then leave for a resting period of 4 days. On day 6, cells, reaching confluence, were infected, or not, with spores of the different species of filamentous fungi or yeast blastospores for 15 hours. Uninfected cells (pre-stimulated or not) were incubated in sterile culture medium for the same time. After 15 hours incubation, culture supernatants were collected to determine cell viability, antifungal activity and inflammatory response of BEC.

Antifungal activity

In a previous study, we showed that BEC exhibit a fungistatic activity against *A. fumigatus* (Richard et al. 2018), by inhibiting filaments growth. In this study, we estimated this antifungal activity of BEC by the quantification of different fungal cell-wall polysaccharides released in the medium during the growth of the fungi.

Galactomannan was used as an index of filament formation by *Aspergillus spp*. Galactomannan was quantified in the culture supernatant using the Platelia *Aspergillus* EIA commercial kit (Bio-Rad). Supernatants were treated as sera according to the manufacturer's recommendations. Mannan, a cell-wall polysaccharide released by *Candida* species in pathogenic condition, was measured using the *Candida* Ag Plus kit (Biorad) according to the recommendations of the manufacturer. Finally, *S. apiospermum* growth was estimated by dosing β-D-glucan using the FungiTell test (Cape Cod, East Falmouth, USA) following the supplier's recommendations. β-D-glucan is another cell-wall polysaccharide produced by a wide variety of pathogenic fungi mainly ascomycetes, such as *S. apiospermum*. In preliminary experiments, we observed an increase in β-D-glucan concentration correlated with the increase of the fungal growth (data not shown).

As a control, strains were inoculated with the same inoculum in wells without BEC, representing the maximum growth of the fungus (100%). For all the fungal biomarkers, values were expressed as the percentage of the values obtained for the control.

Inflammatory response

The inflammatory response of the cells was evaluated by measuring IL-8 and IL-6 release in the supernatant (R&D System, Minneapolis, USA) according to the manufacturer's recommendations. Analysis of the impact of flagellin pre-exposure on response of BEC to fungal infections was calculated as follow. In one hand, values obtained with cells non pre-stimulated with flagellin and non-infected (basal level) were subtracted from the values obtained with non pre-stimulated cells and infected by fungi (response to infection), given control values (pg/ml). In the other hand, values obtained with cells pre-stimulated with flagellin and non-infected were subtracted from the values obtained with pre-stimulated cells and infected by fungi, given impact of flagellin values (pg/ml). The impact flagellin values were then compared to the control values.

Cytotoxicity

Cytotoxicity of fungal infection was evaluated by measuring the lactate dehydrogenase (LDH) activity in the supernatant and intra-cellularly according the protocol provided with the CytoTox 96 Non-Radioactive kit (Promega, Madison, USA). The data were expressed as a lysis percentage by calculating the ratio of LDH activity measured in the cellular supernatant to total LDH activity (released LDH plus intracellular LDH) from the same well.

Statistical Analysis

Data are presented as the mean \pm SEM. Differences among groups were assessed using Prism version 7.00 (Graphpad Software). Mann-Whitney and analysis of variance (ANOVA) corrected by the Bonferroni tests were used when two and more than two quantitative variables were compared, respectively. A difference with $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Impact of flagellin pre-stimulation on the different fungal species cytotoxicity towards BEC

We investigated by the mean of LDH assay, the cytotoxicity of infection with different fungal species on BEC according to *P. aeruginosa* flagellin pre-stimulation. In the absence of flagellin pre-stimulation, we observed an increase of LDH release from BEC infected with clinical strains of *A. fumigatus* compared to the control condition (uninfected cells). This increase was significant for Af1 and Af2 strains ($13.8 \pm 1.5\%$ vs $6 \pm 0.9\%$ and $18 \pm 2.7\%$ vs $6 \pm 0.9\%$ respectively). This trend tends to be confirmed with Af3, although the difference was not significant. In addition, Af2 was significantly more cytotoxic than reference DAL strain ($18 \pm 2.7\%$ vs. $8 \pm 0.7\%$; $p=0.0005$) (Figure 1A). This heterogeneity in cytotoxicity between strains was not observed for the other *Aspergillus* species which, at the concentration used, exert no significant cytotoxic effect on BEC compared to uninfected BEC. Furthermore, no significant difference was observed when comparing the cytotoxicity of *Aspergillus* strains on BEC pre-stimulated or not with *P. aeruginosa* flagellin (Figure 1A, B and C).

All three *C. albicans* strains exerted a moderate cell toxicity which did not differ significantly from the uninfected control (Figure 1D). Among the *S. apiospermum* strains tested, Sa1 showed a major cytotoxic effect on BEC under our study conditions (Figure 1E). Consequently, this strain was subsequently excluded from the analysis of BEC inflammatory response and antifungal activity. As observed with *Aspergillus* spp. infection, no significant difference in cytotoxicity was measured for *C. albicans* or *S. apiospermum* infection when BEC were pre-stimulated or not by flagellin (Figure 1D and E respectively).

Impact of flagellin pre-stimulation on the antifungal activity of BEC infected with different fungal species

We investigated the impact of flagellin pre-stimulation on the capacity of BEC to inhibit the filament growth by the measurement of fungal cell-wall polysaccharides released during the fungal growth. For all three species of *Aspergillus*, we observed a decrease in the galactomannan concentration in the presence of BEC compared to the growing conditions of the fungus alone ($57.5 \pm 5.4\%$ vs $100 \pm 8.7\%$; $p<0.001$, $41.8 \pm 5\%$ vs $100 \pm 14\%$; $p<0.001$ and $30.25 \pm 1\%$ vs $100 \pm 3\%$; $p<0.0001$ for *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. terreus* respectively). Pre-stimulation of BEC with flagellin did not modify this antifungal activity against *A. fumigatus* and *A. flavus* (Figure 2A and B). In contrast, for *A. terreus* infection, there was a slight reduction in the BEC antifungal activity (increase in galactomannan concentration) when the cells were pre-stimulated with *P. aeruginosa* flagellin ($44 \pm 1.8\%$ vs $30 \pm 1\%$; $p<0.01$) (Figure 2C).

Similarly, the presence of BEC decreased the fungal growth of *C. albicans* after 15 h of infection but the difference observed is not significant ($53 \pm 4\%$ vs $100 \pm 26\%$; $p=0.14$) (Figure 2D). However, for Ca1 and Ca2 strains, fungal growth in the presence of cells is significantly reduced compared to yeast growth alone ($58 \pm 4\%$ vs $100 \pm 16.4\%$; $p=0.0341$) (data not shown). Whatever was the strain tested, pre-stimulation with flagellin did not significantly modify the amount of mannan released (Figure 2D). Concerning data obtained with *S. apiospermum* strains, whereas results were non-significant, it would seem on the one hand, that BEC are unable to limit *S. apiospermum* growth and, on the other hand, that flagellin pre-stimulation would be able to induce BEC antifungal activity towards this fungus (Figure 2E).

Impact of flagellin pre-stimulation on the inflammatory response of BEC infected with different fungal species

The impact of flagellin pre-stimulation on the inflammatory response of BEC following fungal infection was measured by quantifying IL-8 and IL-6 in supernatant after 15 hours of infection. Pre-stimulation of BEC with *P. aeruginosa* flagellin significantly induced an increase in the inflammatory response to infection with clinical strains of *A. fumigatus* compared to the response of non-pre-stimulated and infected BEC (control) (2775 ± 165.8 pg/mL vs 1510 ± 101.2 pg/mL; $p<0.0001$ for IL-8 and 181.8 ± 17.65 pg/mL vs 100.1 ± 10.33 pg/mL; $p<0.001$ for IL-6) (Figures 3A and B). A trend to the same training response was observed after infection with the 4 strains of *A. flavus*, for IL-8 synthesis (667.3 ± 75 pg/mL vs 485.7 ± 51.83 pg/mL; $p=0.0519$) but not for IL-6 synthesis (Figures 3C and D). The pre-stimulation did not modulate neither IL-8 nor IL-6 synthesis in response to *A. terreus* infection (Figures 3E and F).

Prior contact with *P. aeruginosa* flagellin significantly increased IL-8 synthesis when BEC are infected with *C. albicans* (491.5 ± 26 pg/mL vs 366.3 ± 18.9 pg/L; $p<0.001$). Conversely, a trend towards a decrease in IL-6 production was observed for flagellin pre-exposed BEC then infected with *C. albicans* as compared to non-pre-exposed and infected BEC (control) (32.8 ± 7.765 pg/mL vs. 49.4 ± 4.6 pg/mL; $p=0.16$) (Figure 3G and H).

Finally, BEC pre-stimulated with flagellin and then infected with *S. apiospermum* strains Sa2 and Sa3, showed a significant increased synthesis of IL-6 compared to non-pre-stimulated and infected BEC (control) (36.8 ± 4 pg/mL vs 14 ± 3 pg/mL; $p < 0.01$). However, no changes were noted for IL-8 synthesis (Figure 3I and J).

Discussion

CF is characterized by an inability to efficiently clear inhaled pathogens whatever there are bacteria, virus or fungi. This allows microbial colonization to settle, which results in bronchitis exacerbations and a chronic local inflammation which both, participate in the destruction of the pulmonary parenchyma and ultimately in reduced respiratory performances. In this clinical context, the interaction between bronchial cells and multiple pathogens should be considered in the pathophysiology of the disease.

Bronchial cells play a central role in anti-microbial processes both through a mechanical action (ciliary beating and mucus production) but also through the production of mediators such as pro-inflammatory cytokines and anti-microbial peptides (Bigot et al. 2020; Balloy et Chignard 2009). We recently demonstrated that the exposition of bronchial epithelial cells to *P. aeruginosa* flagellin led to an exacerbation of their inflammatory response to a subsequent *A. fumigatus* infection occurring several days later (Bigot et al. 2019). This phenomenon, previously described with bone-marrow derived immune cells, is called trained immunity.

In this study, we hypothesized that the innate immune memory set-up by bacterial exposition to BEC could influence the pathophysiology of fungal infections in CF patients. To test this hypothesis, we measured the impact on the viability and inflammatory response of BEC after their pre-exposition to *P. aeruginosa* flagellin several days before infection with different fungal species frequently isolated from respiratory samples of CF patients. In addition, we also studied if pre-exposure to flagellin could have an impact on the inhibitory activity of BEC on the filamentous development of the fungi.

A. fumigatus exerts moderate cell toxicity on BEC that appears to be strain-dependent. Among the virulence factors of *A. fumigatus*, one can cite the synthesis of mycotoxins such as gliotoxin that exhibits *in vitro* an immunosuppressive and pro-apoptotic properties and appears to play a major role in the pathophysiology of invasive aspergillosis in mammals (Gardiner, Waring, et Howlett 2005). Not all strains of *A. fumigatus* seem to be able to synthesize gliotoxin (Lewis et al. 2005) so this could explain in the variation in cytotoxicity observed between the strains tested in our study. However, neither fungal cell toxicity nor the ability of BEC to multiply (data not shown) were altered by flagellin pre-stimulation. This led us to conclude that pre-stimulation did not modify the number of cells at the time of fungal infection and thus the analysis of the results was not biased under the different experimental conditions. We confirmed here that the cells appeared able to limit the filament growth not only of *A. fumigatus* but also for *A. flavus* and *A. terreus*. However, in our conditions, this activity did not reach statistical significance for *C. albicans* and did not seem applicable for *S. apiospermum*. However BDG measurement to quantify *S. apiospermum* growth may not be the appropriate parameter.

Peptidorhamnomannan quantification, specific wall components for the species of the complex *Scedosporium/Pseudallescheria* (Lopes et al. 2011), might have been more informative. Besides, we did not observe any modifications of flagellin pre-stimulation on the growth of *A. fumigatus*, *A. flavus*, *S. apiospermum* and *C. albicans*, revealing absence of impact on antifungal activity of BEC. Interestingly, fungal growth of *A. terreus* was reduced when cells were pre-stimulated with flagellin. This result may suggest that exposure to flagellin decreased *A. terreus* recognition by BEC. We showed that pre-exposition of BEC with flagellin reduced by 25% mRNA expression of TLR4, a bacterial lipopolysaccharide receptor, as we observed in our previous study (Bigot et al. 2019). Moreover, although fungistatic activity of BEC towards *A. fumigatus*, that we highlighted, did not involve release of antifungal molecules (Richard et al. 2018), we cannot exclude that recognition of other fungal species by BEC could induce release of antimicrobial peptides (AMP). Indeed, AMPs are small peptides, with well-known anti-infectious role (Reddy, Yedery, et Aranha 2004) mainly through membrane permeabilization of targeted pathogens, (Sierra et al. 2017). BECs produce AMPs such as β -defensins or cathelicidin LL-37 (Bals 2000), this latter having a fungicidal action on certain fungal species such as *Candida albicans* (Tsai et al. 2014). Thus, whether a decrease in the expression of receptors recognizing *A. terreus* components or in the secretion of AMPs targeting more specifically *A. terreus* occurring after flagellin exposure should be explored.

Flagellin pre-exposition induced different modifications of the inflammatory response of BEC to fungal infection depending on the species tested. First of all, we retrieved a training effect when BEC pre-stimulated with flagellin were further infected with clinical strains of *A. fumigatus*, in line to what we previously demonstrated with a lab reference strain (Bigot et al. 2019). This result is of major importance as the occurrence of concomitant colonization with *P. aeruginosa* and *A. fumigatus* is commonly encountered in patients suffering from chronic pulmonary diseases such as CF. Indeed, increase of both IL-6 and IL-8 synthesis is a risk to worsen the local condition by increasing the inflammation. This phenomenon does not seem to be restricted to *A. fumigatus*. Indeed, inflammatory response to *A. flavus* or *S. apiospermum* infection was also increased almost significantly for IL-8 and significantly for IL-6, respectively. These results are to compare to the antifungal activity results and show that the trained effect is not related to an increase in the amount of filaments but to a modified response of BEC after flagellin exposure. Differences in IL-8 and IL-6 synthesis suggest that *P. aeruginosa* flagellin could induce distinct epigenetic changes, specifically activating the genes responsible for the recognition of those fungal species and involved in IL-8 or IL-6 synthesis pathways. It is also important to mention that the inoculum used for *A. flavus* was 40 times less than that used with *A. fumigatus* because of a higher cytotoxicity, and this may explain in part the weaker inflammatory response of infected BEC. The lack of modulation of IL-8 and IL-6 synthesis observed for flagellin pre-stimulated BEC infected by *A. terreus* strains may be due to a different parietal composition. Indeed, it has been shown that the conidia cell-wall of *A. terreus* is enriched in β -D-glucan and galactomannan compared to those of *A. fumigatus*, a peculiarity that may explain the faster phagocytosis by macrophages (Slesiona et al. 2012).

According to the authors, these variations in parietal composition could imply different patterns of recognition receptors and/or induce different affinity for some of these receptors present on the surface of macrophages. A similar mechanism with BEC could be considered and the recognition of *A. terreus* could induce other signalling pathways than those involved in IL-6 and IL-8 synthesis. Results obtained with *C. albicans* infection showed that pre-stimulation with flagellin induced an increase of IL-8 synthesis and a trend to a decrease in IL-6 synthesis. One can speculate that this difference is due to the activation and inhibition of two distinct pathways, the purpose of which is the synthesis of IL-8 and IL-6, respectively. As we have hypothesized for *A. flavus* infection, flagellin could induce distinct epigenetic changes, activating genes responsible for the specific recognition of these fungal species and leading to up and down regulation of genes involved in IL-8 and IL-6 synthesis, respectively. The results of our study can be compared to those obtained in a previous study showing that topical administration of flagellin into the cornea, 6 to 72 hours before infection with *C. albicans* in a mouse model of keratitis, increased the clearance of the fungal pathogen in the early stages of infection through a neutrophil-dependent mechanism (Gao et al. 2011). Nevertheless, flagellin reduced inflammation in response to the fungal infection, an inflammation responsible for corneal damage. Our results are consistent with these observations since we observed that the pre-stimulation with flagellin induced on one hand a training for the synthesis of IL-8, a chemokine which ensures the recruitment of neutrophils at the site of infection, and on the other hand a tolerance type response for IL-6, allowing a lower inflammatory environment which could possibly limit cellular damage.

The use of flagellin as a modulator of the response to fungal infection can also be discussed. Several studies pointed out the use of flagellin as a vaccine adjuvant because of its ability to stimulate the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, including those produced by dendritic cells, natural killer cells, and epithelial cells, which is essential for the activation and development of a specific adaptive immune response (Hajam et al. 2017). Thus, it can be hypothesized that a first exposure to the whole *P. aeruginosa* bacterium would lead to a protection against these fungal species, by "boosting" the production of pro-inflammatory cytokines allowing the recruitment of neutrophils at the infectious site and thus a more efficient and rapid eradication of the infection. Conversely, by adapting these observations to the context of CF, pre-exposure to flagellin from *P. aeruginosa* could lead to an exacerbated inflammatory response during infection by *Aspergillus*, *Scedosporium* and *Candida* and participate in the already highly inflammatory context of the bronchi of CF patients (O'Sullivan et Freedman 2009).

Finally, there are some limitations in our study that we would like to point out. We focused on thermotolerant species that are able to grow at 37°C and thus that they may play a direct pathogenic effect in patients. Nevertheless, sputum culture at 30°C shows that thermolabile fungal strains, such as *Penicillium* sp, are frequently present in the bronchi of these patients (Huang and LiPuma 2016). The indirect role of these fungi on the local or even distant immune response is currently under investigation in certain labs but we did not consider these species in this study.

Conclusion and perspectives

While respiratory epithelial cells are often considered as a simple barrier, in this study we show that BEC are actually able to recognize, interact and develop an inflammatory and antifungal response to certain fungal species frequently found in the airways of patients with chronic pulmonary disease, particularly in CF patients. Moreover, we confirm their capacity to memorize a first microbial contact, here *P. aeruginosa* flagellin that modifies their further response to fungal infection. Indeed, although our observations may need to be extended to a larger number of strains for some species, the memory effect we observed with a laboratory strain was observed with clinical isolates of *A. fumigatus* but also with other species such as *S. apiospermum*, and *C. albicans*. In our model, BEC divide all along the 7 days of the experiment suggesting that immune memory is transmitted during cell division. This capacity for transmission to daughter cells is important in a context such as cystic fibrosis, where epithelial lesions due to inflammatory exacerbations and infections are frequent and lead to tissue repair phenomena. A transcriptomic analysis and an Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencage (ATAC-seq) of cells pre-stimulated or not by flagellin are in progress to elucidate mechanisms involved in innate immune memory of BEC.

Understanding the intracellular processes related to this memory could open new therapeutic opportunities aimed at modulating the innate immune response to polymicrobial infections found in CF patients and other chronic respiratory diseases.

List of Nonstandard Abbreviations

BEC: Bronchial epithelial cells; CF: Cystic fibrosis; ABPA: Allergic bronchopulmonary aspergillosis; IL: Interleukin; AMPs: Antimicrobial peptides

Acknowledgments

We would like to warmly thank Dr M. Chignard, our deceased friend and mentor, for giving us the opportunity to develop this scientific topic.

The authors would like to thank Pr JP Bouchara for kindly provide us with *Scedosporium* strains and fruitful discussion.

Author Contributions Statement

Doing the experiments: JB, SV, ST, VB; Drafting of the manuscript: JB, VB, JG, LG, CH. Revision of the manuscript: JB, VB, CH, HC

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflict of interests.

Species	Clinical isolation		Source
<i>Aspergillus fumigatus</i>	DAL	CBS 144.89	JP Latgé, Laboratoire des <i>Aspergillus</i> , Institut Pasteur, Paris
		Sputum	
	Af1	Sputum non-CF patient	C Hennequin, Parasitology-Mycology unit, St Antoine Hospital, Paris
	Af2	Sputum non-CF patient	
	Af3	Sputum CF patient	
<i>Aspergillus flavus</i>	Afl1	Sputum CF patient	C Hennequin, Parasitology-Mycology unit, St Antoine Hospital, Paris
	Afl2	Cutaneous specimen	
	Afl3	Sputum non-CF patient	
	Afl4	Sputum CF patient	
<i>Aspergillus terreus</i>	At1	Sputum CF patient	C Hennequin, Parasitology-Mycology unit, St Antoine Hospital, Paris
	At2	Ear swab	
<i>Scedosporium apiospermum</i>	Sa1	Sputum of CF patient	JP Bouchara, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP, EA 3142), SFR ICAT 4208, UNIV Angers, UNIV Brest
	Sa2	Sputum of CF patient	
	Sa3	Sputum of CF patient	
<i>Candida albicans</i>	Ca1	Sputum of CF patient	C Hennequin, Parasitology-Mycology unit, St Antoine Hospital, Paris
	Ca2	Sputum non-CF patient	
	Ca3	Bronchial aspiration non-CF patient	

Table 1: Origin of the strains used in this study, CF: Cystic Fibrosis.

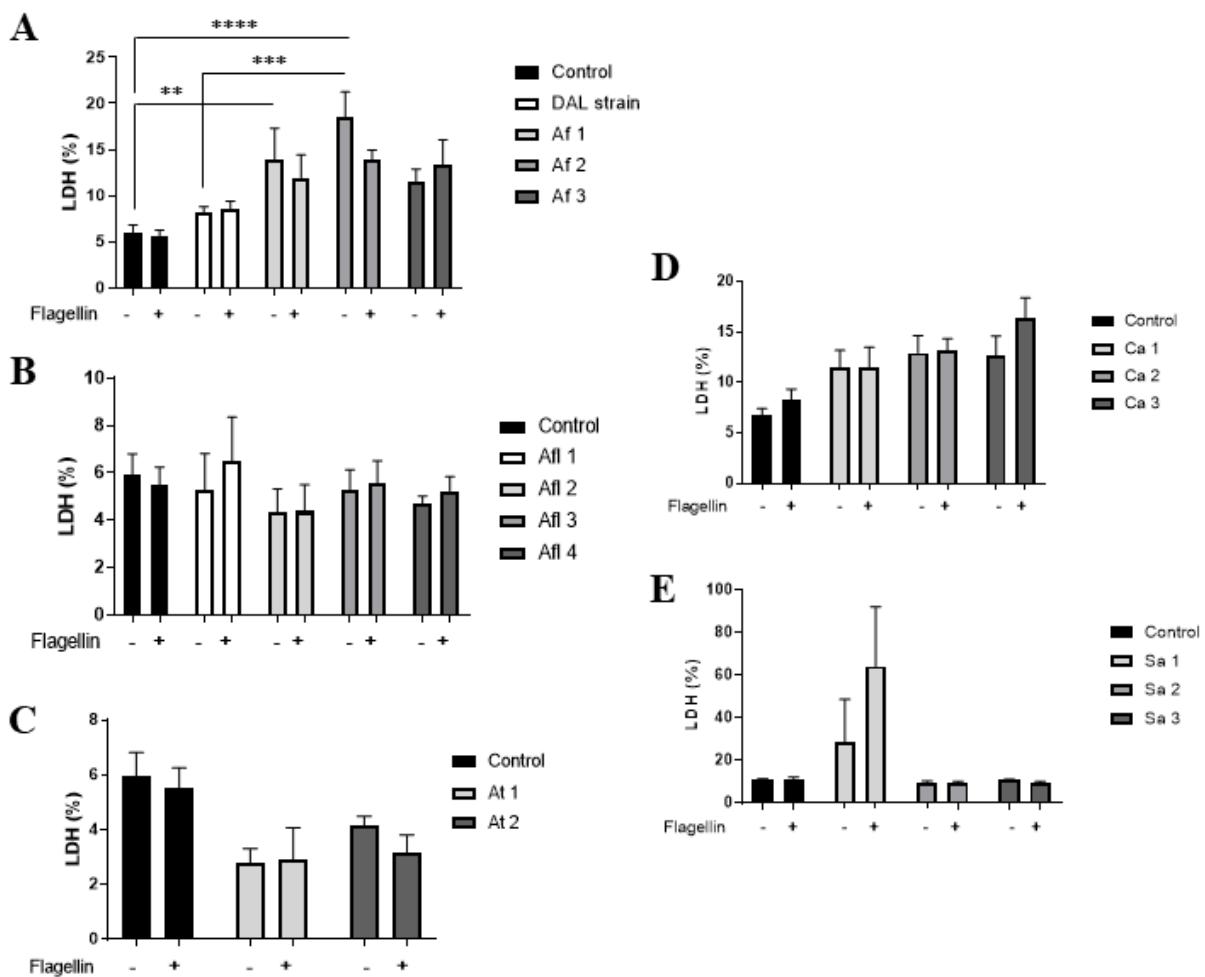


Figure 1: Cytotoxicity of different fungal infections on BEC pre-stimulated or not with *P. aeruginosa* flagellin (5 µg/ml) (% LDH release): *A. fumigatus* (Af) one lab strain (DAL) and 3 clinical strains (A), 4 clinical strains of *A. flavus* (Afl) (B), 2 clinical strains of *A. terreus* (At) (C), 3 clinical strains of *C. albicans* (Ca) (D) and 3 clinical strains of *S. apiospermum* (Sa) (E). Each bar represents the mean ± standard error to the mean (SEM) of 3 independent experiments, in duplicate, ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001 (ANOVA Bonferroni).

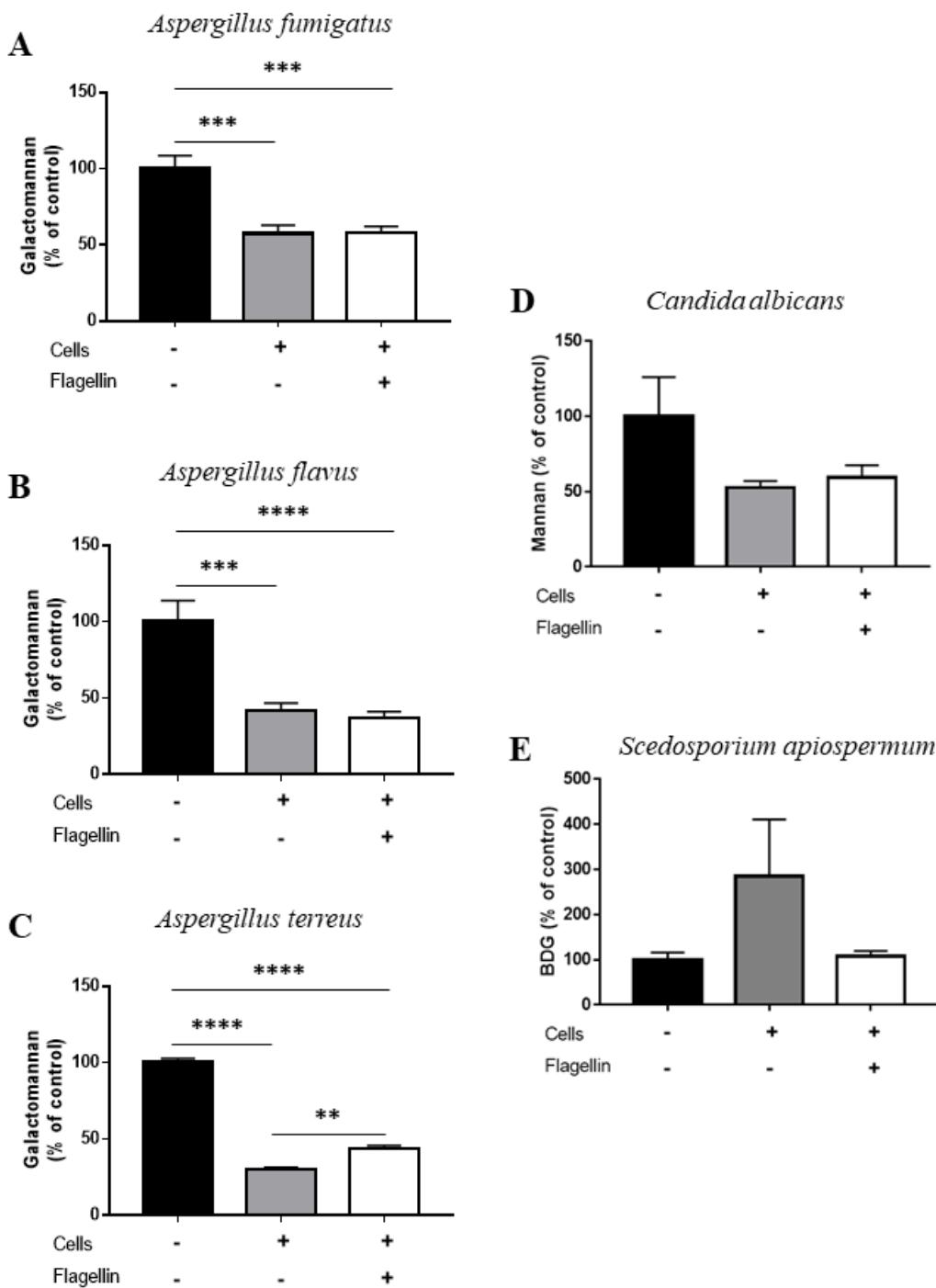


Figure 2: Measure of fungal growth under 3 conditions: without BEC (black bars), with cells (grey bars) and with *P. aeruginosa* flagellin pre-stimulated BEC (white bars). Growth control relied on culture in the absence of cells (black bars). Growth quantification was done by the mean of galactomannan assay in the culture supernatant for infection with *Aspergillus* species. 4 strains of *A. fumigatus* (A), 4 strains of *A. flavus* (B) and 2 strains of *A. terreus* (C); mannan assay for infection by *C. albicans* strains (D) and β -D-glucan assay for *S. apiospermum* infection (E). Each bar represents the mean \pm SEM of 3 independent experiments, ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001 (ANOVA Bonferroni).

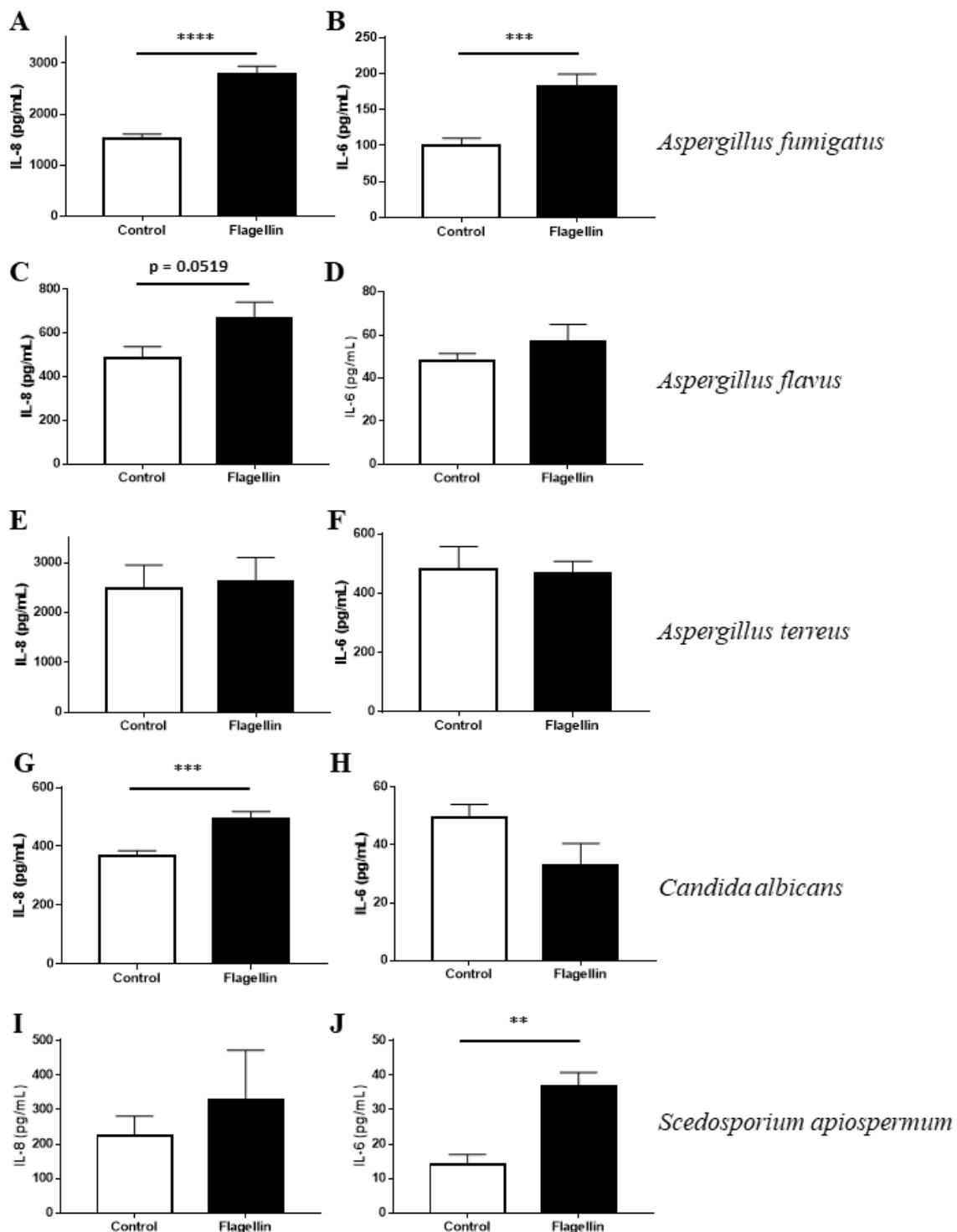


Figure 3: Inflammatory response (IL-8 and IL-6 release) of BEC, pre-stimulated (black bars) or not (white bars) with *P. aeruginosa* flagellin following infection with 4 strains of *A. fumigatus* (A and B), 4 strains of *A. flavus* (C and D), 2 strains of *A. terreus* (E and F), 3 strains of *C. albicans* (G and H), 2 strains of *S. apiospermum* (I and J). The results are expressed as pg/mL after subtraction of the values obtained for non-infected conditions. Control represents the stimulation induced by the different strains without any pre-stimulation. Each histogram represents the mean \pm SEM of 3 independent experiments, ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001 (Mann-Whitney test).

References

- “2017 Patient Registry Annual Data Report.” 2017, 96.
- Armstead, Joanne, Julie Morris, and David W. Denning. 2014. “Multi-Country Estimate of Different Manifestations of Aspergillosis in Cystic Fibrosis.” *PLOS ONE* 9 (6): e98502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098502>.
- Balloy, Viviane, and Michel Chignard. 2009. “The Innate Immune Response to *Aspergillus Fumigatus*.” *Microbes and Infection* 11 (12): 919–27. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.07.002>.
- Bals, Robert. 2000. “Epithelial Antimicrobial Peptides in Host Defense against Infection.” *Respiratory Research* 1 (3): 141–50. <https://doi.org/10.1186/rr25>.
- Baxter, Caroline G., Caroline B. Moore, Andrew M. Jones, A. Kevin Webb, and David W. Denning. 2013. “IgE-Mediated Immune Responses and Airway Detection of *Aspergillus* and *Candida* in Adult Cystic Fibrosis.” *Chest* 143 (5): 1351–57. <https://doi.org/10.1378/chest.12-1363>.
- Bigot, Jeanne, Loïc Guillot, Juliette Guitard, Manon Ruffin, Harriet Corvol, Viviane Balloy, and Christophe Hennequin. 2020. “Bronchial Epithelial Cells on the Front Line to Fight Lung Infection-Causing *Aspergillus Fumigatus*.” *Frontiers in Immunology* 11 (May). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01041>.
- Bigot, Jeanne, Loic Guillot, Juliette Guitard, Manon Ruffin, Harriet Corvol, Michel Chignard, Christophe Hennequin, and Viviane Balloy. 2019. “Respiratory Epithelial Cells Can Remember Infection: A Proof of Concept Study.” *The Journal of Infectious Diseases*, November, jiz569. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz569>.
- Brandt, Claudia, Jobst Roehmel, Volker Rickerts, Volker Melichar, Nadja Niemann, and Carsten Schwarz. 2018. “*Aspergillus* Bronchitis in Patients with Cystic Fibrosis.” *Mycopathologia* 183 (1): 61–69. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0190-0>.
- Budden, Kurtis F, Shakti D Shukla, Saima Firdous Rehman, Kate L Bowerman, Simon Keely, Philip Hugenholtz, Darius P H Armstrong-James, et al. 2019. “Functional Effects of the Microbiota in Chronic Respiratory Disease.” *The Lancet Respiratory Medicine* 7 (10): 907–20. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30510-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30510-1).
- Coron, Noémie, Marc Pihet, Emilie Fréalle, Yolande Lemeille, Claudine Pinel, Hervé Pelloux, Gilles Gargala, et al. 2018. “Toward the Standardization of Mycological Examination of Sputum Samples in Cystic Fibrosis: Results from a French Multicenter Prospective Study.” *Mycopathologia* 183 (1): 101–17. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0173-1>.
- Cortez, Karoll J., Emmanuel Roilides, Flavio Quiroz-Telles, Joseph Meletiadis, Charalampos Antachopoulos, Tena Knudsen, Wendy Buchanan, et al. 2008. “Infections Caused by *Scedosporium* Spp.” *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1): 157–97. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-07>.
- Dumas, Alexia, Lucie Bernard, Yannick Poquet, Geanncarlo Lugo-Villarino, and Olivier Neyrolles. 2018. “The Role of the Lung Microbiota and the Gut–Lung Axis in Respiratory Infectious Diseases.” *Cellular Microbiology* 20 (12): e12966. <https://doi.org/10.1111/cmi.12966>.
- Engel, Tobias G. P., Lydie Slabbers, Carmen de Jong, Willem J. G. Melchers, Ferry Hagen, Paul E. Verweij, Peter Merkus, and Jacques F. Meis. 2018. “Prevalence and Diversity of Filamentous Fungi in the Airways of Cystic Fibrosis Patients – A Dutch, Multicentre Study.” *Journal of Cystic Fibrosis* 0 (0). <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.11.012>.
- Gago, Sara, David W. Denning, and Paul Bowyer. 2019. “Pathophysiological Aspects of *Aspergillus* Colonization in Disease.” *Medical Mycology* 57 (Supplement_2): S219–27. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy076>.

Gao, Nan, Ashok Kumar, Hui Guo, Xinyi Wu, Michelle Wheater, and Fu-Shin X. Yu. 2011. "Topical Flagellin-Mediated Innate Defense against *Candida Albicans* Keratitis." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (6): 3074–82. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5928>.

Gardiner, Donald M., Paul Waring, and Barbara J. Howlett. 2005. "The Epipolythiodioxopiperazine (ETP) Class of Fungal Toxins: Distribution, Mode of Action, Functions and Biosynthesis." *Microbiology* 151 (4): 1021–32. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27847-0>.

Gileles-Hillel, Alex, David Shoevoy, Itzhack Polacheck, Maya Korem, Eitan Kerem, and Malena Cohen-Cymberknob. 2015. "Association of Chronic *Candida Albicans* Respiratory Infection with a More Severe Lung Disease in Patients with Cystic Fibrosis: *Candida Albicans* in CF Lung Disease." *Pediatric Pulmonology* 50 (11): 1082–89. <https://doi.org/10.1002/ppul.23302>.

Grasemann, Hartmut, and Felix Ratjen. 2013. "Early Lung Disease in Cystic Fibrosis." *The Lancet Respiratory Medicine* 1 (2): 148–57. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70026-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70026-2).

Hajam, Irshad A, Pervaiz A Dar, Imam Shahnawaz, Juan Carlos Jaume, and John Hwa Lee. 2017. "Bacterial Flagellin—a Potent Immunomodulatory Agent." *Experimental & Molecular Medicine* 49 (9): e373. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.172>.

Hatziagorou, Elpis, Thomas J. Walsh, John N. Tsanakas, and Emmanuel Roilides. 2009. "Aspergillus and the Paediatric Lung." *Paediatric Respiratory Reviews* 10 (4): 178–85. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2009.06.006>.

King, Jill, Shan F. Brunel, and Adilia Warris. 2016. "Aspergillus Infections in Cystic Fibrosis." *Journal of Infection, Hot Topics In Infection And Immunity In Children*, 72 (July): S50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.04.022>.

Lewis, Russell E., Nathan P. Wiederhold, Michail S. Lionakis, Randall A. Prince, and Dimitrios P. Kontoyiannis. 2005. "Frequency and Species Distribution of Gliotoxin-Producing Aspergillus Isolates Recovered from Patients at a Tertiary-Care Cancer Center." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (12): 6120–22. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.6120-6122.2005>.

Lopes, Livia Cristina L., Mariana Ingrid D. da Silva, Vera Carolina B. Bittencourt, Rodrigo T. Figueiredo, Rodrigo Rollin-Pinheiro, Guilherme L. Sasaki, Marcelo T. Bozza, Philip A. J. Gorin, and Eliana Barreto-Berger. 2011. "Glycoconjugates and Polysaccharides from the *Scedosporium/Pseudallescheria Boydii* Complex: Structural Characterisation, Involvement in Cell Differentiation, Cell Recognition and Virulence." *Mycoses* 54 (s3): 28–36. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02105.x>.

Muthig, Michaela, Alexandra Hebestreit, Uwe Ziegler, Marc Seidler, and Frank-Michael C. Müller. 2010. "Persistence of *Candida* Species in the Respiratory Tract of Cystic Fibrosis Patients." *Medical Mycology* 48 (1): 56–63. <https://doi.org/10.3109/13693780802716532>.

Netea, Mihai G., Leo A.B. Joosten, Eicke Latz, Kingston H.G. Mills, Gioacchino Natoli, Hendrik G. Stunnenberg, Luke A.J. O'Neill, and Ramnik J. Xavier. 2016. "Trained Immunity: A Program of Innate Immune Memory in Health and Disease." *Science (New York, N.Y.)* 352 (6284): aaf1098. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1098>.

Netea, Mihai G., Jessica Quintin, and Jos W. M. van der Meer. 2011. "Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense." *Cell Host & Microbe* 9 (5): 355–61. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>.

Nguyen, Linh D. N., Eric Viscogliosi, and Laurence Delhaes. 2015. "The Lung Mycobiome: An Emerging Field of the Human Respiratory Microbiome." *Frontiers in Microbiology* 6 (February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00089>.

O'Sullivan, Brian P., and Steven D Freedman. 2009. "Cystic Fibrosis." *The Lancet* 373 (9678): 1891–1904. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60327-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60327-5).

- Reddy, K. V. R., R. D. Yedery, and C. Aranha. 2004. "Antimicrobial Peptides: Premises and Promises." *International Journal of Antimicrobial Agents* 24 (6): 536–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>.
- "Registre et Muco En Chiffres." 2015. Vaincre La Mucoviscidose. February 4, 2015. <http://www.vaincrelamuco.org/face-la-mucoviscidose/registre-et-muco-en-chiffres>.
- Reihill, James A., John E. Moore, J. Stuart Elborn, and Madeleine Ennis. 2011. "Effect of Aspergillus Fumigatus and Candida Albicans on Pro-Inflammatory Response in Cystic Fibrosis Epithelium." *Journal of Cystic Fibrosis* 10 (6): 401–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2011.06.006>.
- Ren, Clement L., Margaret Rosenfeld, Oscar H. Mayer, Stephanie D. Davis, Margaret Kloster, Robert G. Castile, Peter W. Hiatt, et al. 2012. "Analysis of the Associations between Lung Function and Clinical Features in Preschool Children with Cystic Fibrosis." *Pediatric Pulmonology* 47 (6): 574–81. <https://doi.org/10.1002/ppul.21590>.
- Richard, Nicolas, Léa Marti, Annabelle Varrot, Loïc Guillot, Juliette Guitard, Christophe Hennequin, Anne Imbert, Harriet Corvol, Michel Chignard, and Viviane Balloy. 2018. "Human Bronchial Epithelial Cells Inhibit Aspergillus Fumigatus Germination of Extracellular Conidia via FleA Recognition." *Scientific Reports* 8 (October). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33902-0>.
- Roach, Jared C., Gustavo Glusman, Lee Rowen, Amardeep Kaur, Maureen K. Purcell, Kelly D. Smith, Leroy E. Hood, and Alan Aderem. 2005. "The Evolution of Vertebrate Toll-like Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (27): 9577–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502272102>.
- Romani, Luigina. 2011. "Immunity to Fungal Infections." *Nature Reviews Immunology* 11 (4): 275–88. <https://doi.org/10.1038/nri2939>.
- Schaedel, C., I. de Monestrol, L. Hjelte, M. Johannesson, R. Kornfält, A. Lindblad, B. Strandvik, L. Wahlgren, and L. Holmberg. 2002. "Predictors of Deterioration of Lung Function in Cystic Fibrosis*." *Pediatric Pulmonology* 33 (6): 483–91. <https://doi.org/10.1002/ppul.10100>.
- Sierra, Josep M., Ester Fusté, Francesc Rabanal, Teresa Vinuesa, and Miguel Viñas. 2017. "An Overview of Antimicrobial Peptides and the Latest Advances in Their Development." *Expert Opinion on Biological Therapy* 17 (6): 663–76. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315402>.
- Singh, A., A. Ralhan, C. Schwarz, D. Hartl, and A. Hector. 2018. "Fungal Pathogens in CF Airways: Leave or Treat?" *Mycopathologia* 183 (1): 119–37. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0184-y>.
- Slesiona, Silvia, Markus Gressler, Michael Mihlan, Christoph Zaehle, Martin Schaller, Dagmar Barz, Bernhard Hube, Ilse D. Jacobsen, and Matthias Brock. 2012. "Persistence versus Escape: Aspergillus Terreus and Aspergillus Fumigatus Employ Different Strategies during Interactions with Macrophages." *PLoS ONE* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031223>.
- Tsai, Pei-Wen, Yin-Lien Cheng, Wen-Ping Hsieh, and Chung-Yu Lan. 2014. "Responses of Candida Albicans to the Human Antimicrobial Peptide LL-37." *Journal of Microbiology* 52 (7): 581–89. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3630-2>.
- Zhao, Jingming, Wei Cheng, Xigang He, and Yanli Liu. 2018. "The Co-Colonization Prevalence of Pseudomonas Aeruginosa and Aspergillus Fumigatus in Cystic Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Microbial Pathogenesis* 125 (December): 122–28. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.010>

IV- Analyse des modifications transcriptomiques et épigénétiques associées à la mémoire de l'immunité des CEB

1. Contexte de l'étude

Les données issues des expériences présentées précédemment suggèrent fortement une implication de mécanismes épigénétiques dans le phénomène de mémoire de l'immunité innée des CEB. Nous avons recherché les modifications induites, par la pré-stimulation des cellules avec 5 µg/mL de flagelline de *P. aeruginosa*, sur la condensation de la chromatine. Nous avons utilisé la technique ATAC-seq permettant d'identifier les régions ouvertes de la chromatine et donc accessibles à la transcription (principe **Figure 17**). Une analyse de l'expression globale des ARNm des cellules par *microarray* a été faite en parallèle de l'ATAC-seq, dans les mêmes conditions et aux mêmes temps. Notre but était ainsi d'identifier les modifications de condensation de la chromatine responsables de la modulation d'expression de gènes et ainsi de la mémoire innée induites par l'exposition des cellules à la flagelline.

2. Matériel et méthodes

a. Culture cellulaire et stimulation

Le protocole de culture des CEB (BEAS-2B) et de stimulation a été le même que celui décrit dans les études précédentes. Les CEB ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits (TPP) à la concentration de $1,5 \times 10^4$ cellules par puits, à J-1. A J0, les CEB ont été stimulées ou non avec 5 µg/mL de flagelline ultrapure de *Pseudomonas aeruginosa* (InvivoGen) pendant 48 heures. A J2, les cellules ont été lavées et incubées dans du milieu sans flagelline, pendant 4 jours, jusqu'à J6. L'ADN et l'ARN ont été extraits des cellules à J0 juste avant la pré-stimulation par la flagelline, à J2 au moment du lavage, et à J6 après la période de repos (**Figure 26**). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata. Le protocole de préparation de l'ADN préconisait de travailler avec une concentration d'ADN extraite d'environ 5×10^4 cellules par échantillon. Comme les CEB se multiplient au cours de l'expérience, nous avons évalué le nombre de cellules par puits à J0 à $1,5 \times 10^4$ cellules, à J2 à $3,8 \times 10^4$ cellules et à J6 à $4,7 \times 10^4$ cellules. Ainsi, nous avons poolé 5 et 2 puits pour extraire l'ADN à J0 et J2 respectivement, et un seul puits a été utilisé J6. Concernant l'extraction des ARN, nous avons fait de même pour obtenir environ 3 µg d'ARN à chaque temps. Ainsi, 30, 12 et 10 puits ont été regroupés pour extraire l'ARN à J0, J2 et J6, ceci dans le but d'éviter d'introduire un biais lié au nombre de cellules lors de l'analyse de l'expression de gènes.

Avant d'entreprendre la purification des ARN et ADN, nous nous sommes assurés que les cellules avaient bien été reprogrammées par la flagelline. Pour cela, et en parallèle, les CEB d'une plaque dédiée à ce contrôle positif ont été pré-stimulées ou non par la flagelline et stimulées au jour 6 par des conidies d'*Aspergillus fumigatus* pendant 15 heures. La souche DAL (CBS 144.89) a été cultivée comme décrit dans les études précédentes (Bigot et al. 2019). La concentration de conidies a été ajustée pour obtenir

une MOI de 2. Après cette stimulation, le surnageant de culture a été récupéré et l'IL-8 et l'IL-6 ont été quantifiées par dosage immuno-enzymatique (R&D Systems).

b. Purification de l'ARN et transposition de l'ADN

L'ARN a été isolé à l'aide d'un kit NucleoSpin RNA/Protein (Macherey Nagel, Duren, Allemagne). Pour la préparation de l'ADN, nous avons utilisé un protocole inspiré de Buenrostro *et al.* (Buenrostro et al. 2015) et avons bénéficié des conseils du Dr Mathieu Legars (Department of Medicine, Stanford Immunology, California, USA). Les CEB adhérentes ont été lysées par ajout de 20 µL/puits de tampon de suspension ATAC (RSB) (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂) contenant 0.1% NP40 (Sigma Aldrich), 0.1 % de Tween-20 (Sigma Aldrich) et 0,01% de Digitonine (Promega), et incubées 3 min sur glace, puis lavées avec 0,1 mL d'ATAC-RSB froid contenant 0,1% de Tween-20 sans NP-40 ni digitonine. Les noyaux, ainsi extraits, ont été centrifugés à 500 g pendant 10 min à 4°C. L'ADN a ensuite été fragmenté et indexé. Pour cela, les culots ont été remis en suspension dans 50 µL de Mix de transposition (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 20 % Dimethyl Formamide, 100 nM transposase, 1 % digitonine, 0.1 % Tween-20) et incubés à 37°C pendant 30 minutes sous agitation à 1000 RPM. L'ADN indexé a été purifié à l'aide du kit Zymo DNA Clean and Concentrator-5, élué avec 21 µL de tampon d'élution, puis conservé à -20°C (**Figure 26**).

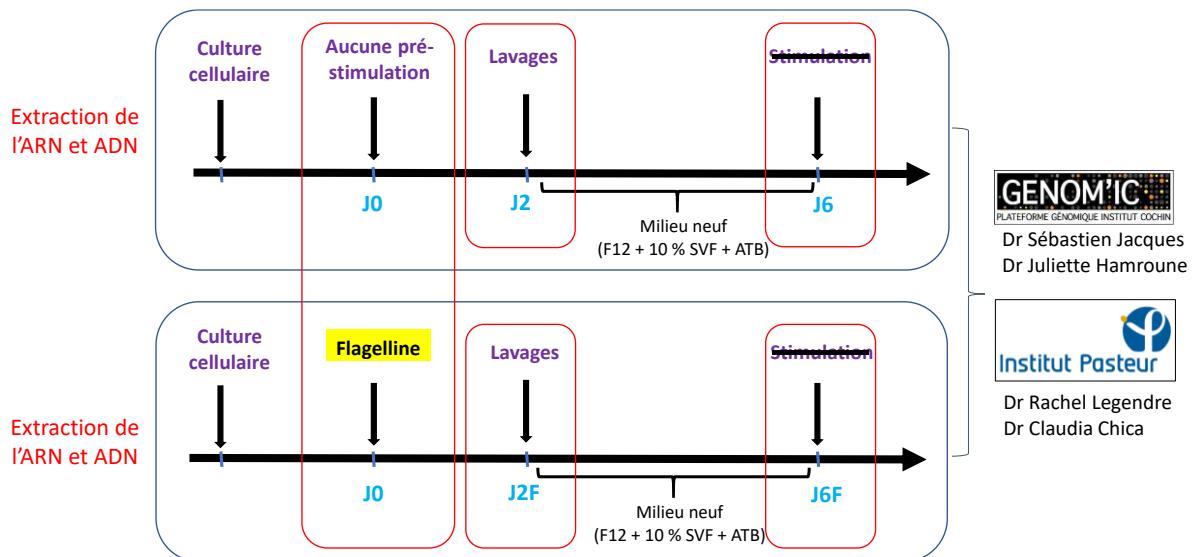


Figure 26 : Illustration du protocole mis en place pour la caractérisation des régions accessibles de la chromatine par ATAC-seq et l'analyse de l'expression des ARN messagers par microarray. Les données issues des CEB non pré-stimulées (frise du haut) et pré-stimulées par 5 µg/mL de flagelline (F) (frise du bas) ont été comparées au temps J0, chaque carré représentant une condition. SVF : sérum de veau fœtal, ATB : antibiotiques.

c. Préparation des librairies et séquençages

L'ensemble des échantillons d'ADN et d'ARN préparés a été traité par l'équipe GENOM'IC de l'Institut Cochin (INSERM U1016, Dr Juliette Hamroune et Dr Sébastien Jacques) qui a réalisé le *microarray* et l'ATAC-seq. L'analyse des résultats est faite en collaboration avec le Dr Rachel Legendre et le Dr

Claudia Chica, du Groupe d'expertise : *Genome Organization Regulation and Expression* de l'Institut Pasteur de Paris.

Les librairies d'ADN pour l'ATAC-seq ont été préparées à partir de l'ADN transposé avec le kit Nextera® DNA d'Illumina, suivies d'une amplification par PCR. La PCR a été réalisée à partir de 15µL Nextera PCR Master Mix, 5µL Illumina PCR Primer Cocktail, 5µL Index Primer i7, 5µL Index Primer i5, 10µL H₂O et 10µL d'ADN transposé, et suivant les paramètres suivants : 3' à 72°C, 30'' à 98°C, et 8 cycles à 10'' à 98°C, 30'' à 60°C, 2' à 72°C. Les produits de PCR ont été purifiés avec des billes AMPureXP™ (Agencourt) à un ratio de 1X. La qualité des librairies obtenues a été vérifiée en utilisant des puces DNA High Sensitivity™ avec un Bioanalyzer 2100 (Agilent) et leur concentration a été mesurée avec le kit Qubit dsDNA HS Assay™ kit (Thermo Fisher Scientific), le rendement moyen trouvé était de 12,1 ng/µL. La molarité de chaque librairie a été calculée avec la formule suivante : mesure Qubit * 1000000 / ((taille moyenne des pics en bp * 607,4)+157,9). Chaque librairie a été diluée afin d'obtenir une molarité de 10 nM et un pool final a été préparé à 2nM avant séquençage.

Le séquençage des librairies d'ATAC-Seq a été réalisé sur le NextSeq™ 500 d'Illumina (GENOM'IC) afin de produire des *reads* pairés de 75 pb. Un contrôle interne PhiX a été ajouté au pool de librairies pour atteindre 1% des *reads* totaux. Le pool séquencé a été dilué à la concentration 2 pM et chargé dans le séquenceur. Les 15 librairies ont été séquencées avec succès. Le nombre total de *reads* après le filtrage de qualité du séquenceur a atteint 419 765 351 avec un Q30 à 93,1% et une densité de cluster à 192,57 clusters/mm². Les *reads* PhiX représentaient 1,86% du total, comme attendu.

Les séquences obtenues par ATAC ont été validées par les différents contrôles qualités. Le nombre de *reads* par échantillon était en moyenne de 25,34 M *reads* après filtration. Le démultiplexage et la qualité des séquences ont été réalisés grâce au logiciel Aozan de l'ENS, Paris (Perrin et al. 2017), l'ensemble des contrôles qualités a été satisfaisant. Le reséquençage de 8 échantillons a été nécessaire. Le séquençage, réalisé comme précédemment, a atteint 527 141 088 *reads* après filtration avec un Q30 de 91,72% et une densité de cluster de 240,03 clusters/mm². Le contrôle PhiX control a atteint 1,05% des *reads* totaux. Le nombre de *reads* par échantillon était en moyenne de 61,10 M *reads* après filtration. Le démultiplexage et la qualité des séquences, réalisés avec le logiciel Aozan, comme précédemment, étaient satisfaisants. La distribution des tailles de fragments montre un enrichissement typique autour de 100 et 200 pb, correspondant aux fragments libres (inférieurs à 120 pb) ainsi qu'aux fragments liés à un seul nucléosome (autour de 200 pb). On observe également quelques fragments liés à plusieurs nucléosomes (supérieurs à 200 pb) (**Figure 27**).

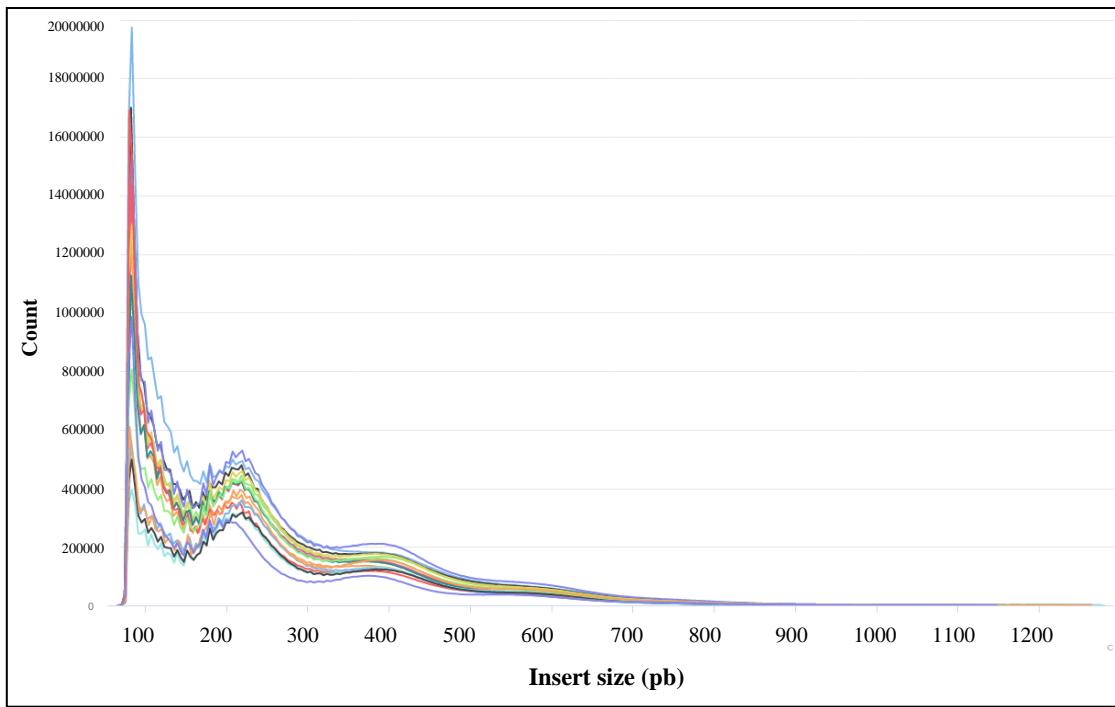


Figure 27 : Profil des reads obtenus pour les différentes tailles de fragments séquencés par ATAC-seq.

d. Analyses ATAC-seq et annotation des pics

L'analyse des séquences, obtenues par ATAC-seq, permet de détecter et quantifier les régions du génome accessibles à la transcription, c'est-à-dire dépourvues de nucléosomes. Quand une région est ouverte, elle devient accessible aux facteurs de transcription qui vont se lier à leurs sites de liaison et ainsi permettre d'activer la transcription des gènes cibles. Les régions ouvertes correspondent aux régions génomiques couvertes par les *reads* issus de l'ATAC-seq, sous la forme de pics de *reads* (schéma explicatif en **Figure 28**).

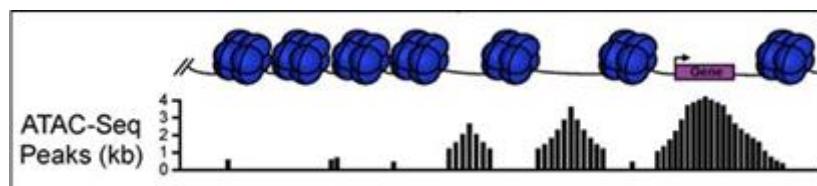


Figure 28 : Représentation schématique des pics, correspondant aux fragments d'ADN quantifiés par ATAC-seq dans les régions accessibles de la chromatine.

Les *reads* ont été alignés sur le génome humain (assemblage hg38 issu d'Ensembl release 94) via le logiciel bowtie2 v2.1.0 (Langmead et Salzberg 2012) avec des paramètres personnalisés permettant de ne garder pour la suite de l'analyse que les fragments dont les deux extrémités séquencées sont correctement alignées sur le génome (-X2000 --dovetail --no-mixed --no-discordant --end-to-end --very-sensitive). Les *reads* dupliqués ont été éliminés avec markDuplicates de picard-tools v1.94 et les régions blacklistées ont été exclues en utilisant bedTools intersectBed v2.17. Ces régions blacklistées correspondent aux régions génomiques que l'on sait anormalement couvertes ou sur-représentées dans le génome, quel que soit le tissu ou la condition étudiée. Puis nous avons sélectionné uniquement les

fragments sans nucléosome, c'est-à-dire les fragments inférieurs à 120 pb. Les pics accessibles sont ensuite identifiés par MACS2 v2.1.0 (Y. Zhang et al. 2008) avec les paramètres suivants : --nomodel --extsize=100 -p 0.01. Les pics reproductibles entre les différents réplicats ont été sélectionnés par la méthode IDR (irreproducible discovery rate) décrite par Landt *et al* (Landt et al. 2012). Une liste de pics a été créée en fusionnant l'ensemble des pics reproductibles dans toutes les conditions de l'expérience en utilisant bedTools merge avec les paramètres par défaut. Puis featureCounts v1.4.6-p3 (Liao, Smyth, et Shi 2014) a été utilisé afin de quantifier chaque pic de cette liste dans le but de réaliser une analyse différentielle des régions accessibles.

Ces pics ont également été annotés, en utilisant Bedtools closest et la liste des gènes humains issus de Gencode version 32, afin de déterminer le ou les gènes les plus proches de nos pics accessibles (schéma explicatif en **Figure 29**).

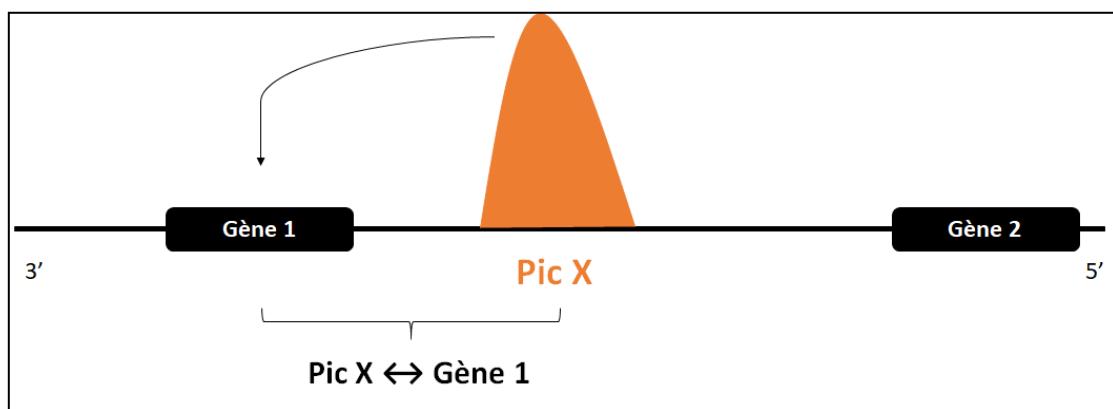


Figure 29 : Représentation du principe de l'annotation des pics identifiés par ATAC-seq. Le pic X observé est associé au gène le plus proche physiquement sur le génome, ici le gène 1.

e. Analyse statistique des pics

La matrice de comptage réalisée sur l'ensemble des pics communs à toutes les conditions a été analysée grâce au package R DESeq2 version 1.28.0 (Love, Huber, et Anders 2014) avec R version 4.0.2 (R paper). La normalisation a été réalisée avec les paramètres par défaut, et un modèle linéaire généralisé a été défini afin de tester l'accessibilité différentielle des pics entre les conditions J0, J2 et J6, en présence ou en absence de flagelline. Après une procédure de Benjamini et Hochberg (BH) (Benjamini et Hochberg 1995), les pics avec une valeur de p ajustée inférieure à 0,05 ont été considérés différemment accessibles.

f. Analyse des données ATAC-seq

Un *upset plot* (package R upsetR ref) nous a permis de visualiser les pics différemment accessibles et présents dans 1 ou plusieurs conditions d'intérêt (J0 vs J2, avec ou sans flagelline, et J0 vs J6, avec ou sans flagelline). Les Heatmaps ont été réalisées avec pheatmap package et l'annotation des pics avec le package GenomicRanges (Lawrence et al. 2013) en utilisant l'annotation Gencode (version 34). Les pics dont la localisation se situe entre -1kb et +1kb autour du début du gène ont été annotés comme pics

transcription start site (TSS). Les pics se trouvant à l'intérieur des coordonnées du gène et ne chevauchant pas le TSS ont été annotés comme intragéniques (intraG), les autres ont été considérés comme intergéniques (interG). Le clustering hiérarchique a été effectué par la méthode de Ward en sélectionnant 5 clusters.

g. Analyse des données issues du *microarray*

100 ng d'ARN total ont été rétro-transcrits avec the GeneChip® WT Plus Reagent Kit (Affymetrix). Brièvement, le double brin d'ADNc a été utilisé pour la transcription *in vitro* avec l'ARN polymérase T7 (toutes ces étapes sont incluses dans le kit de synthèse et d'amplification d'ADNc WT d'Affymetrix). Après purification selon le protocole Affymetrix, 5,5 µg d'ADN Sens Target ont été fragmentés et marqués à la biotine. Après contrôle de la fragmentation à l'aide du Bioanalyzer 2100, l'ADNc a ensuite été hybridé avec un GeneChip® ClariomS Human (LifeTechnologies) à 45°C pendant 17 heures.

Après une nuit d'hybridation, les puces ont été lavées sur la station fluidique FS450 suivant des protocoles spécifiques (Affymetrix) et scannées à l'aide du GCS3000 7G. Les images numérisées ont ensuite été analysées avec le logiciel Expression Console (Affymetrix) pour obtenir des données brutes (fichiers cel), ainsi que des métriques pour effectuer le contrôle qualité des données. Les observations de certaines de ces métriques et l'étude de la distribution des données brutes ne montrent aucune expérience aberrante. La normalisation RMA est réalisée en utilisant R avec la Version 23 du logiciel Entrezgene CDF brain array.

L'analyse en composante principale a montré qu'il existait une variabilité entre les échantillons et qu'il n'y avait pas de variabilité entre les réplicats, excepté pour un des réplicats de la condition J2F, qui a donc été retiré de l'étude (**Figure 30**).

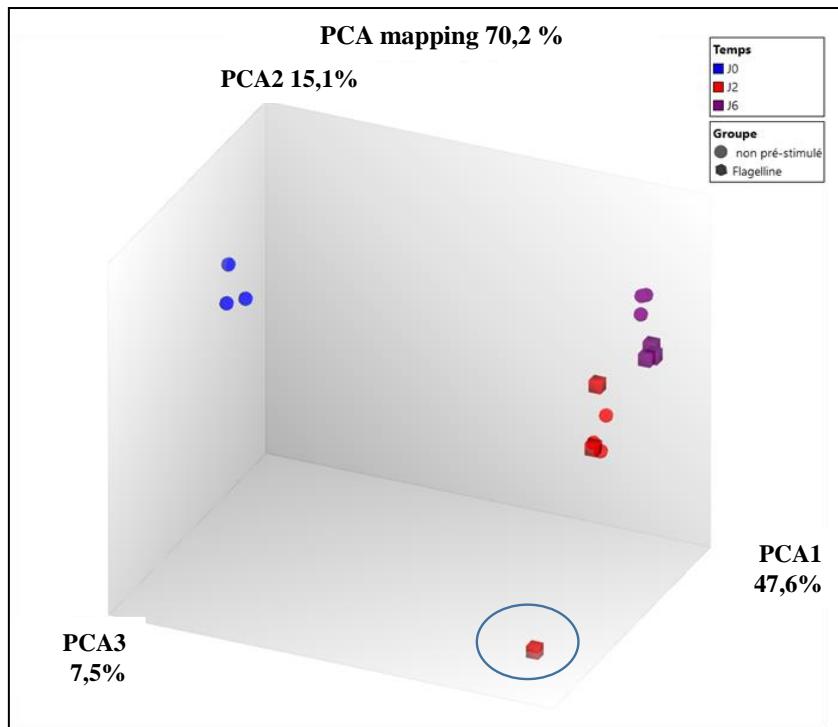


Figure 30 : Analyse en composante principale. L'échantillon entouré est celui retiré de l'étude car trop éloigné des autres échantillons.

h. Analyse de l'activité des facteurs de transcription

Une analyse de *footprinting* a été réalisée à l'aide de HINT-Atac v0.13.1 (Li et al. 2019) comme décrit ici : <https://www.regulatory-genomics.org/hint/tutorial/>. Les réplicats ont été fusionnés et les possibles régions de liaison des facteurs de transcription (FT) sont prédites avec ‘rgt-hint footprinting’ avec les paramètres suivants : --atac-seq --paired-end. Ensuite, les motifs chevauchant ces prédictions sont trouvés à l'aide de la commande ‘rgt-motifanalysis matching’. Enfin, les profils ATAC-seq moyens ont été calculés pour chaque FT et les profils ont été comparés entre conditions en utilisant la commande ‘rgt-hint differential’. Les FT avec des profils d'activité inférieure à -0,5 ou supérieure à 0,5 ont été considérés comme différemment inactifs/actifs dans les conditions étudiées.

3. Résultats

a. Validation des conditions expérimentales

La quantification de l'IL-6 et de l'IL-8, après infection à J6 par la souche DAL d'*A. fumigatus*, pendant 15 heures, a montré une augmentation significative de la réponse inflammatoire des CEB pré-stimulées par la flagelline, donc une réponse de type *training* (**Figure 31**). Les résultats de ce contrôle positif étaient attendus et nous ont permis de valider les conditions utilisées lors de l'extraction de l'ADN et de l'ARN.

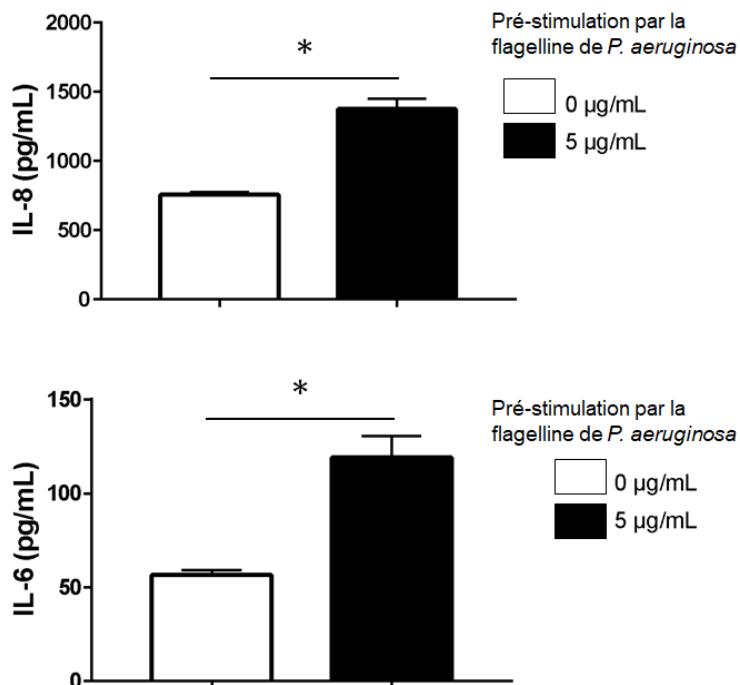


Figure 31 : Synthèse d'IL-8 (en haut) et IL-6 (en bas) suite à une infection par *A. fumigatus*, de CEB pré-stimulées ou non par la flagelline. Les résultats sont exprimés après soustraction des valeurs obtenues pour les conditions non stimulées. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM d'un triplicat, * $p<0,05$; (test de Mann-Whitney).

b. Partie 1 : Analyse du génome complet

i. Analyse différentielle de l'ATAC-seq

L'analyse de l'ATAC-seq a permis d'identifier, sous forme de pics de *reads*, environ 30 000 loci différenciellement accessibles (DA), selon les conditions étudiées. Nous avons défini des groupes de pics en fonction des comparaisons (**Figure 32**). Nous nous sommes focalisés sur :

- un groupe de loci dont l'accessibilité, modulée par l'exposition des cellules à la flagelline, persiste au cours du temps (groupe « *Memory Flagellin* »),
- un groupe correspondant aux pics modulés au cours du temps, indépendamment de la flagelline (groupe « *Control* »),
- un groupe correspondant aux pics modulés dans toutes les conditions (groupe « *Common* »).

De manière plus détaillée, le groupe *Control* comprend les pics DA communs entre J6F vs J0 et entre J6 vs J0 ($n=8015$) et les pics DA communs entre J2F vs J0 et entre J2 vs J0 ($n=171$). Ce groupe *Control* est considéré comme le contrôle négatif de l'analyse car les pics inclus sont modulés à la fois à J2 et J6, avec ou sans pré-stimulation par la flagelline. Le groupe *Memory Flagellin* comprend les 608 pics DA communs entre J2F vs J0 et entre J6F vs J0. Ce groupe de pics, modulés exclusivement par la flagelline, représentant 2% de l'ensemble des pics, témoigne des modifications épigénétiques induites par la flagelline. Le groupe *Common* inclut les pics DA communs à tous les temps et à toutes les conditions (2155 pics) et les pics *Unique*, les pics DA à un seul temps, avec ou sans flagelline, par rapport à J0

(8899 à J6F, 6475 à J6, 601 à J2F et 241 à J2). Les pics du groupe *Background* sont des pics modulés dans les autres comparaisons (2696 pics).

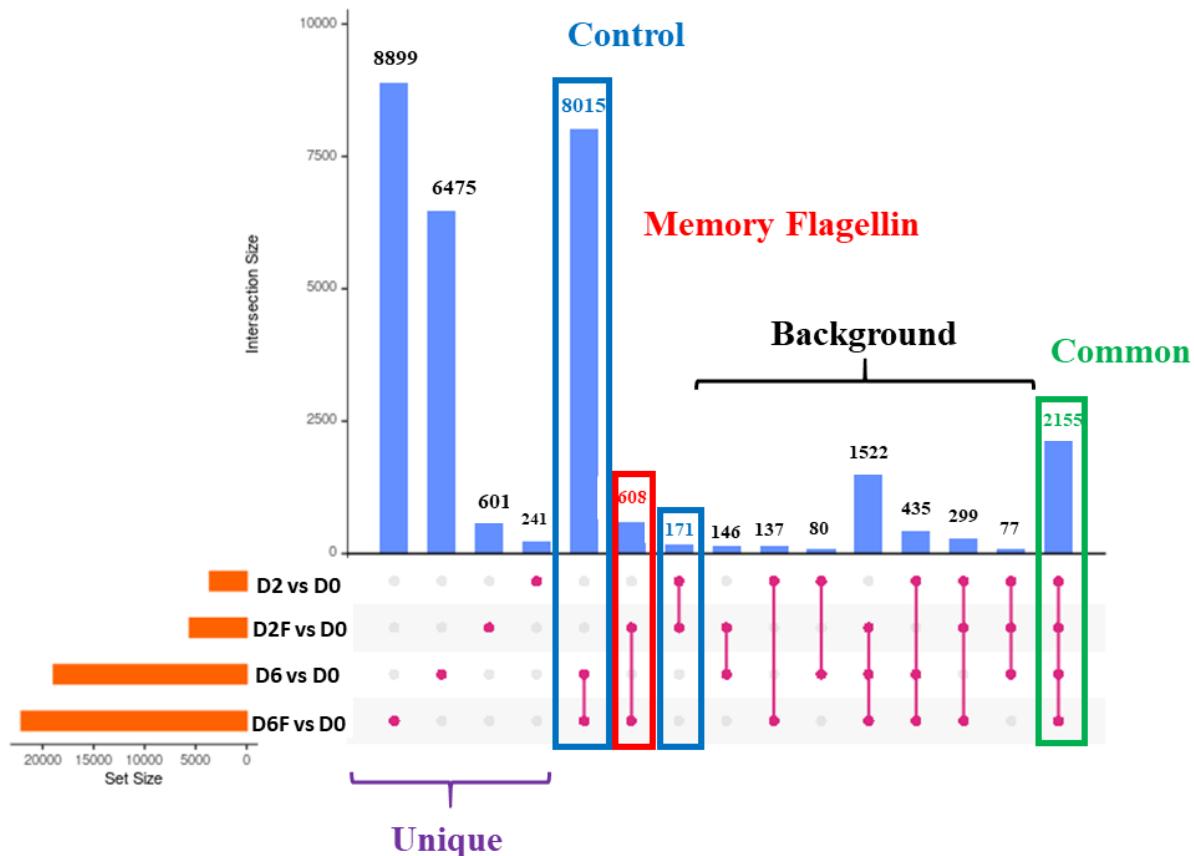


Figure 32 : Upset plot représentant les pics différemment accessibles (DA) entre J2 (D2) ou J6 (D6) versus (vs) J0 (D0), avec ou sans pré-stimulation par la flagelline (F). Les chiffres au-dessus des histogrammes correspondent au nombre de pics communs pour chaque comparaison, schématisée sous les histogrammes. • : pics exclusivement présents à cette comparaison, / : pics communs entre les 2 conditions. Les pics DA sont ensuite classés comme suit : groupe « Memory Flagellin », DA uniquement lors de la stimulation à la flagelline à la fois à J2F et J6F par rapport à J0 (608 pics, rectangle rouge) ; groupe « Control », pics DA indépendamment de la pré-stimulation par la flagelline, à J2 et J2F plus J6 et J6F, par rapport à J0 (8015 + 171 = 8186 pics, rectangles bleus) ; groupe « Common », pics DA communs à tous les temps et à toutes les conditions (2155 pics, rectangle vert) ; groupe « Unique », pics DA exprimés à une seule comparaison, avec ou sans flagelline (8899 à J6F, 6475 à J6, 601 à J2F et 241 à J2, accolade violette) ; le groupe « Background » regroupant les pics DA dans les autres comparaisons (2696 pics, accolade noire).

Le groupe des 80 pics correspondants à ceux communs entre les comparaisons J2 vs J0 et J6 vs J0 aurait été idéalement utilisé comme groupe *Control* mais il contient trop peu de pics pour être exploité seul et être comparé au groupe *Memory Flagellin*. Nous l'avons donc inclus dans le groupe *Background* qui correspond aux comparaisons qui n'ont pas de signification biologique pour répondre à notre problématique.

Le profil d'accessibilité des 608 pics du groupe *Memory Flagellin* et des 8186 pics du groupe *Control* dans les différentes conditions étudiées (temps et pré-stimulation ou non par la flagelline) sont représentés par les boxplots de la **Figure 33**. Les pics *Memory Flagellin* (**Figure 33A**) et *Control* (**Figure 33B**) ont été regroupés en 5 clusters, numérotés de 1 à 5, en fonction du profil de l'évolution

de leur accessibilité entre J0, J2 et J6. Chaque *cluster* a donc un profil propre d'évolution d'accessibilité de J0 à J6, en présence ou non de flagelline (+ ou – *Flagellin*). Excepté pour le *cluster* 1, on observe que les pics *Memory Flagellin* ont des profils d'accessibilité qui diffèrent en fonction de la présence ou non de flagelline alors que ceux des pics *Control* ne sont pas modifiés. Cette observation était attendue, néanmoins, le profil d'évolution des pics *Memory Flagellin* n'est pas le même dans tous les clusters. Ainsi, le changement d'accessibilité induit par la flagelline (+ *Flagellin*) entre J0 et J2, est maintenu à J6 (*cluster* 3) voire renforcé (*clusters* 2, 4 et 5), contrairement aux conditions sans flagelline (- *Flagellin*). Ce phénomène n'est pas observé avec les pics du groupe *Control* (**Figure 33B**). Cette observation suggère un effet persistant de la flagelline sur les modifications de l'accessibilité de la chromatine qui pourrait être impliqué dans l'effet mémoire qu'elle induit.

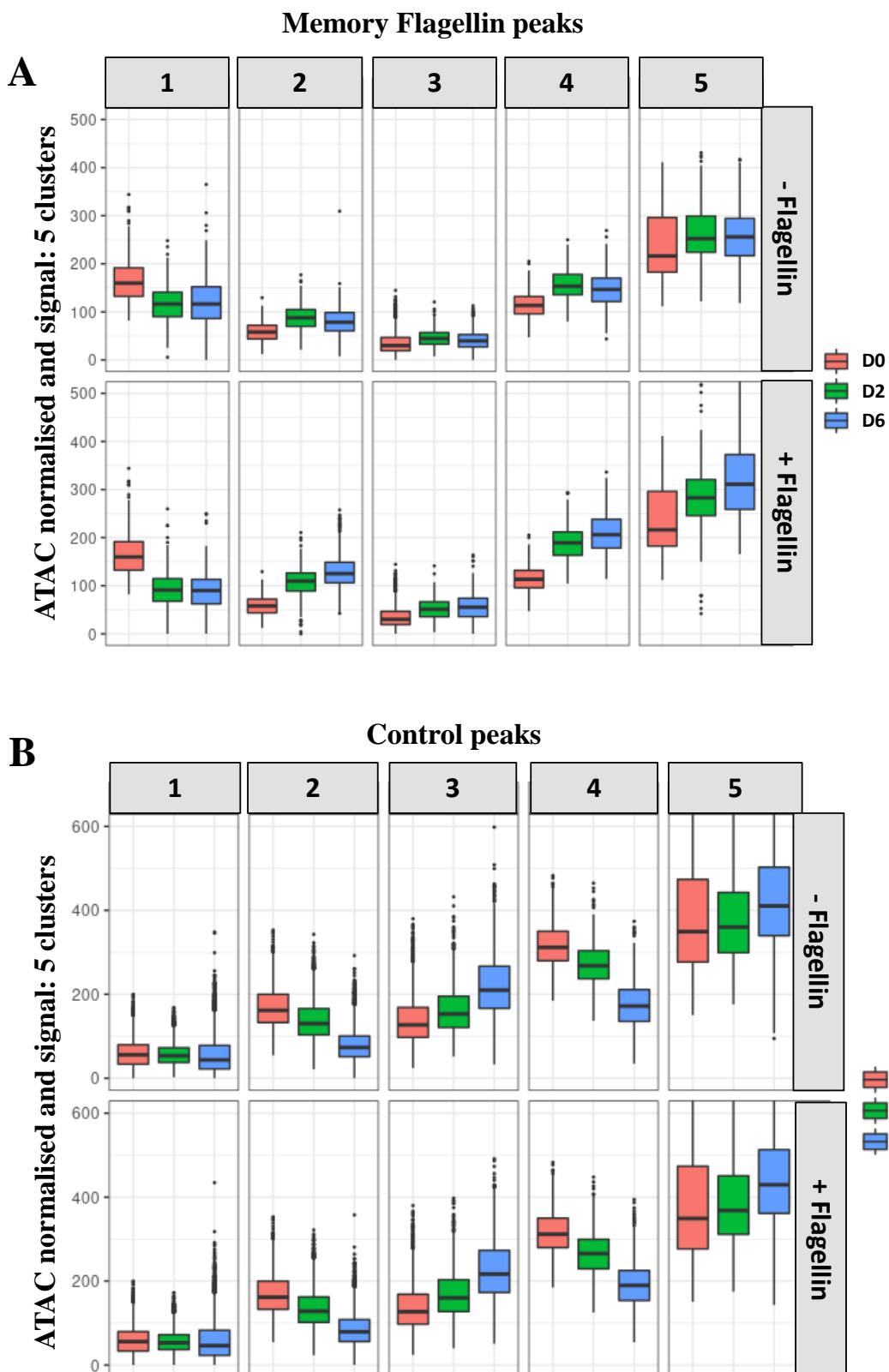


Figure 33 : Profils d'accessibilité des pics Memory Flagellin (A) et Control (B), au cours du temps avec (+ Flagellin) ou sans (- Flagellin) pré-stimulation par la flagelline. Les pics Memory Flagellin et Control sont regroupés en 5 clusters, numérotés de 1 à 5, chaque cluster ayant un profil d'évolution de l'accessibilité propre (euclidean distance et Ward method). Les profils d'accessibilité normalisés des pics de chaque cluster sont représentés par 3 boxplots, rouge pour J0, vert pour J2 et bleu pour J6, afin de pouvoir comparer la dynamique d'accessibilité. Plus la médiane d'accessibilité normalisée est haute au sein d'un boxplot, plus les pics de ce cluster sont accessibles à ce temps et cette condition.

ii. Description globale du transcriptome

De façon globale, l'analyse du transcriptome montre que la pré-exposition des CEB à la flagelline n'induit pas une forte augmentation du nombre de gènes modulés par rapport aux CEB n'ayant pas été exposées à la flagelline. Ainsi, à J2 vs J0, le nombre de gènes significativement modulés est moins important en présence de flagelline (6472 gènes) qu'en son absence (7045 gènes). A J6 vs J0, le nombre de gènes significativement modulés augmente en présence de flagelline avec 9038 gènes et 7538 pour les cellules non pré-stimulées (**Tableau 7**).

	D2 vs D0	D2F vs D0	D6 vs D0	D6F vs D0
Up	3513	3293	3819	4059
Down	3532	3179	3719	4979
Total	7045	6472	7538	9038

Tableau 7 : Analyse du nombre de gènes différemment exprimés entre les cellules épithéliales bronchiques pré-stimulées (J2F et J6F) ou non par la flagelline (J2 et J6) par rapport à J0. p<0,05.

En parallèle de l'analyse globale des données issues de l'ATAC-seq, celles du *microarray* ont été étudiées avec le même objectif, à savoir l'identification d'ensembles de gènes dont l'expression est modulée spécifiquement par la flagelline et persiste au cours du temps. Pour cela nous avons effectué une analyse fonctionnelle à l'aide de la base de données des ensembles de gènes REACTOME, représentant des voies ou des processus biologiques. De la même manière que pour l'analyse des pics de l'ATAC-seq, nous avons divisé ces ensembles de gènes en 3 catégories et les avons nommés en utilisant la même terminologie. Ainsi, le groupe *Gene Set Memory Flagellin* contient les ensembles de gènes modulés par l'exposition des CEB à la flagelline (comparaisons J2F et/ou J6F vs J0), le groupe *Gene Set Control* contenant les ensembles de gènes modulés sans pré-stimulation (comparaisons J2 et J6 vs J0) et le groupe *Gene Set Common*, les ensembles de gènes modulés avec et sans pré-stimulation (**Figure 34A**). Nous avons identifié 54 ensembles de gènes dans le groupe *Gene Set Memory Flagellin*. Nous avons effectué une analyse d'enrichissement des ensembles de gènes pour quantifier leur score d'enrichissement normalisé (NES) qui reflète le degré de sur- (NES > 0) ou sous-représentation (NES < 0) d'un ensemble de gènes donné parmi la totalité. Au sein des 54 ensembles de gènes du groupe *Gene Set Memory Flagellin*, les 14 ensembles ayant un score d'enrichissement le plus élevé sont représentés sur la **Figure 34B**. Dans ces 14 ensembles, il a été observé qu'une majorité était impliquée dans les voies de l'inflammation, comme les familles *chemokine_receptors_bind_chemokines*, *traf6-mediated_NF_KB_activation*, ou encore *nod1_2_signaling_pathway* et *cytokine_signaling_in immune_system*.

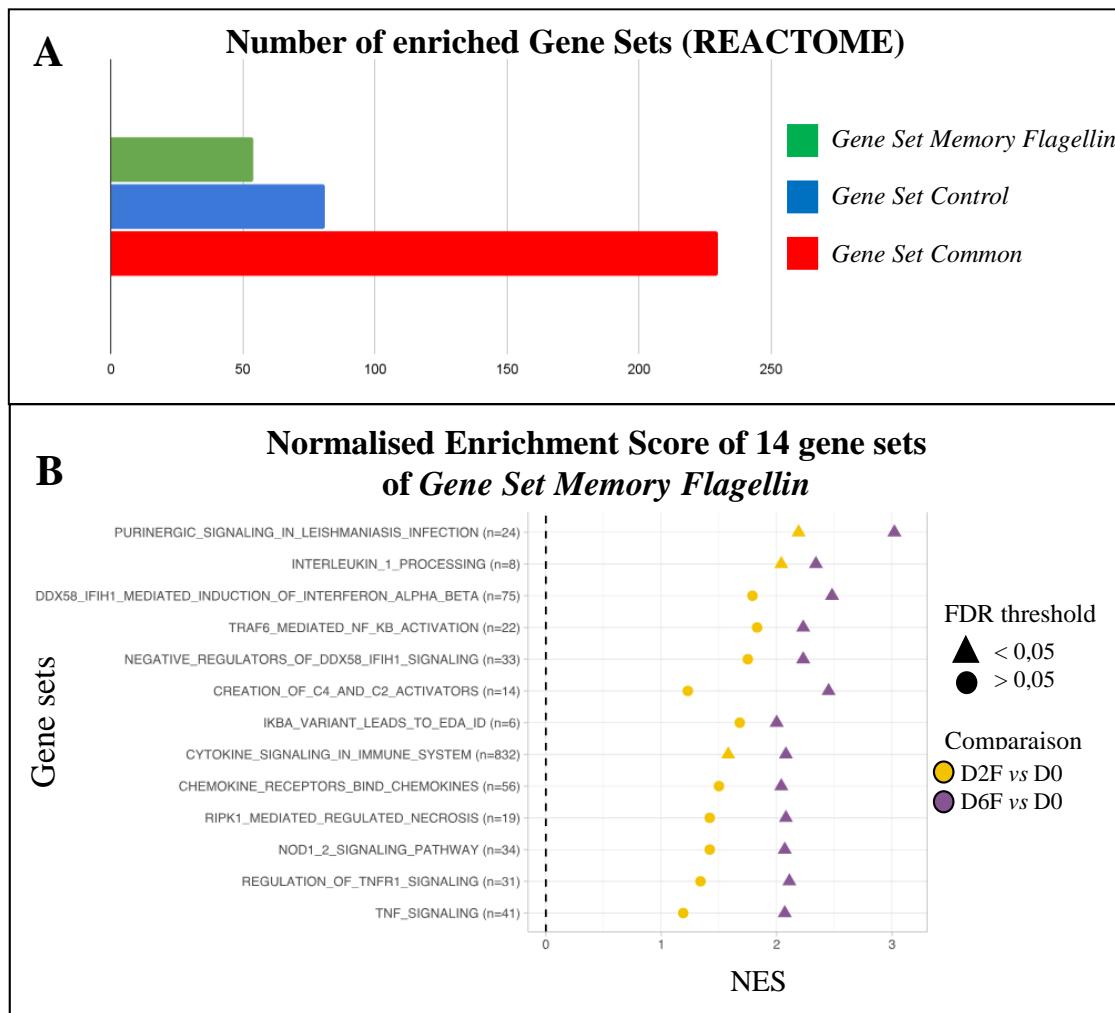


Figure 34 : Analyse fonctionnelle des données transcriptomiques par analyse « gene set enrichment analysis » (GSEA) avec la base de données REACTOME. Les ensembles de gènes enrichis sont identifiés par analyse de l'expression différentielle entre les conditions pré-stimulées ou non par rapport à J0. A : nombre d'ensembles de gènes (ou gene sets) significativement enrichis uniquement dans les conditions pré-stimulées (vert), non stimulées (bleu) ou dans les deux conditions (rouge). B : Représentation des scores d'enrichissement des 14 ensembles de gènes les plus enrichis, J2F vs J0 (D2F vs D0) en jaune ou J6F vs J0 (D6F vs D0) en violet, un FDR < 0,05 (triangle) étant considéré comme significatif. NES : normalized enrichment score, FDR : false discovery rate.

Une autre observation concerne cette fois le groupe *Gene Set Common* dont les ensembles de gènes appartiennent en majorité à des voies impliquant le métabolisme de base des cellules. Ainsi, on trouve des groupes tels que *cell_cycle*, *chromosome_maintenance* ou *cellular_senescence* (données non illustrées). Ceci est un point rassurant dans nos analyses montrant que la pré-stimulation par la flagelline ne semble pas avoir d'impact sur le métabolisme « de base » des cellules, comme les voies impliquées dans la division ou la multiplication cellulaire.

iii. Association entre les données épigénétiques et le transcriptome

Afin d'identifier les mécanismes épigénétiques impliqués dans la modulation des gènes au cours de la mémoire induite par la flagelline dans les CEB, nous avons associé les 54 ensembles de gènes *Gene Set Memory Flagellin* identifiés dans l'analyse transcriptomique aux 608 pics *Memory Flagellin* identifiés dans l'ATAC-seq. En effet, nous avons émis l'hypothèse que les phénomènes liés à la mémoire induite

par la pré-exposition des CEB à la flagelline étaient trop complexes pour n'impliquer que quelques gènes mais plutôt des ensembles de gènes liés par une voie biologique.

Pour associer les données épigénétiques et transcriptomiques, nous avons recherché la proportion de pics *Memory Flagellin* dans chaque catégorie des ensembles de gènes *Gene Set Memory Flagellin*, *Gene Set Control*, et *Gene Set Common* (**Figure 35A**). La même étude a été faite avec les pics *Control* pour vérifier que cette proportion était différente (**Figure 35B**). La distribution des pics a été recherchée dans tous les ensembles de gènes (*all*), dans les ensembles de gènes modulés uniquement à J6F vs J0 (*D6*) et ceux modulés à J2F et J6F vs J0 (*D2 and D6*). Les pics *Memory Flagellin* et *Control* représentent respectivement 2 % et 27 % de l'ensemble des pics différemment accessibles. Leur distribution théorique est représentée sur les graphiques par une ligne verticale en pointillée. Sur le graphique de gauche de la **Figure 35A**, on observe un épaulement de la courbe (flèche noire) dans la distribution des pics *Memory Flagellin* correspondant à une plus forte proportion de ces pics uniquement dans les ensembles de gènes *Gene Set Memory Flagellin*. On observe le même type d'épaulement mais plus prononcé pour les ensembles de gènes *Gene Set Memory Flagellin* modulés uniquement entre J2F et/ou J6F vs J0 (flèches noires sur les graphiques du milieu et de droite en **Figure 35A**). Cet enrichissement n'est pas observé pour les pics *Control*, puisque les courbes des 3 catégories d'ensemble de gènes se superposent (**Figure 35B**).

Ainsi nous avons pu associer des ensembles de gènes du groupe *Gene Set Memory Flagellin* avec des pics *Memory Flagellin*. Nous montrons ainsi une relation entre les changements d'accessibilité des pics *Memory Flagellin* avec des modulations d'expression d'ensembles de gènes *Gene Set Memory Flagellin*, indiquant que les effets de la flagelline sur l'accessibilité de la chromatine ont un impact sur l'expression de gènes.

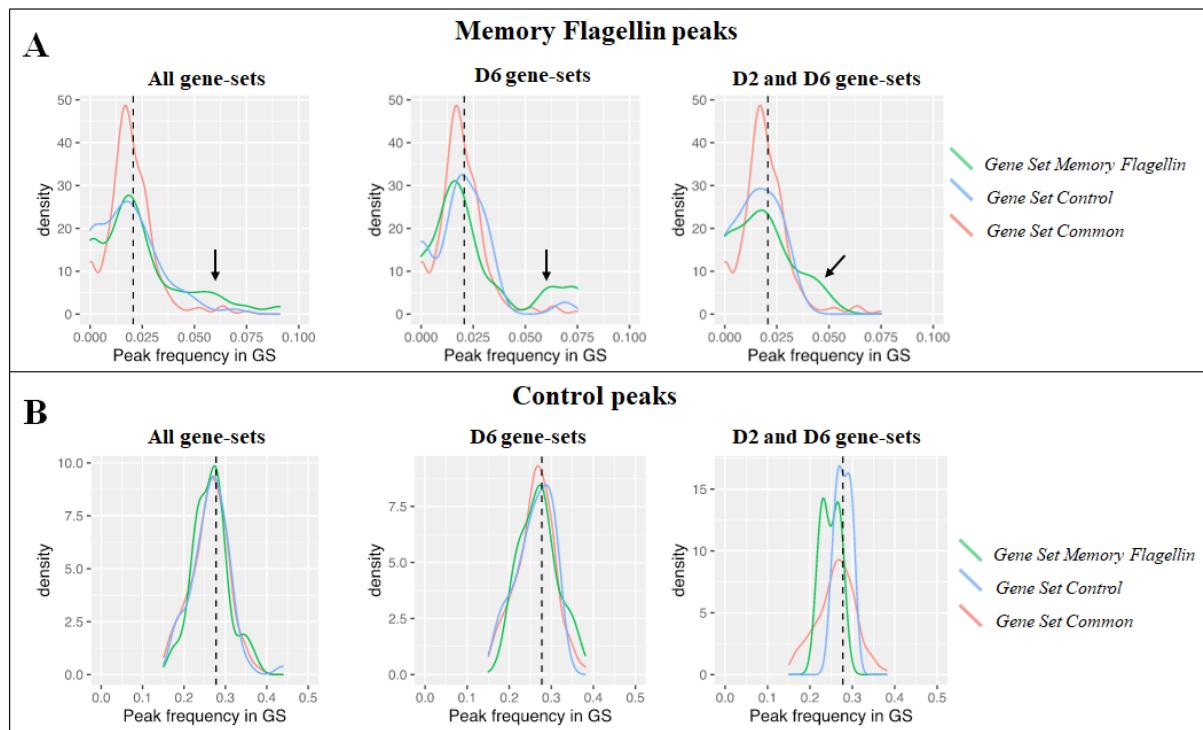


Figure 35 : Distribution de la proportion des pics Memory Flagellin (A) ou Control (B) parmi chaque catégorie d'ensemble de gènes enrichis. Les associations ensembles de gènes et pics sont prédites à l'aide de la méthode T-Gene de la suite MEME. La distribution de fréquence des pics est calculée dans les différents ensembles de gènes (Gene Set Memory Flagellin en vert, Gene Set Control en bleu, ou Gene Set Common en rouge) et est représentée pour : tous les ensembles de gènes (panneaux à gauche), les ensembles de gènes différentiellement modulés à J6F uniquement (panneaux du milieu) ou les ensembles de gènes différentiellement modulés à J6F et J2F vs J0 (panneaux à droite). Les flèches noires indiquent une distribution de fréquence des pics Memory Flagellin plus forte dans les ensembles Gene Set Memory Flagellin uniquement. Les lignes pointillées correspondent à la fréquence théorique des pics Memory Flagellin (2 %) et Control (27 %) à l'échelle du génome entier. GS : gene set.

iv. Caractérisation de l'activité des facteurs de transcription

Nous avons ensuite réalisé une analyse de *footprinting* permettant de prédire l'activité des facteurs de transcription (FT) associée à une condition particulière. L'utilisation d'un outil de recherche de sites de liaison prédis permet d'associer les loci accessibles de la chromatine aux sites de liaison connus d'un FT. La représentation par un *scatter plot* des résultats de cette analyse nous a permis d'identifier des FT actifs (points rouges dont le score d'activité est $> 0,5$) ou inactifs (points rouges dont le score d'activité est $< -0,5$) en présence de flagelline. La **Figure 36A** illustre l'activité des FT aux conditions J2F vs J0 (*scatter plot* du haut) ou J6F vs J0 (*scatter plot* du bas).

Nous avons ensuite analysé l'activité des FT au sein des pics *Memory Flagellin*. Nous avons alors identifié 26 FT actifs (5 à J6F vs J0 et 1 commun à J2F vs J0 et J6F vs J0) (**Figure 36B**) et 24 FT inactifs (19 à J6F vs J0 et 5 communs à J2F vs J0 et J6F vs J0) (**Figure 36C**) spécifiques de la pré-stimulation par la flagelline, schématisés par les encadrés orange. La liste de ces FT est illustrée dans le **Tableau 8**. On trouve dans cette liste le FT FOSL1::JUND prédit comme actif à J6F mais aussi inactif à ce même temps. Ceci suggère que FOSL1::JUND est impliqué dans la modulation de l'expression de gènes *up* et *down*-régulés à J6F.

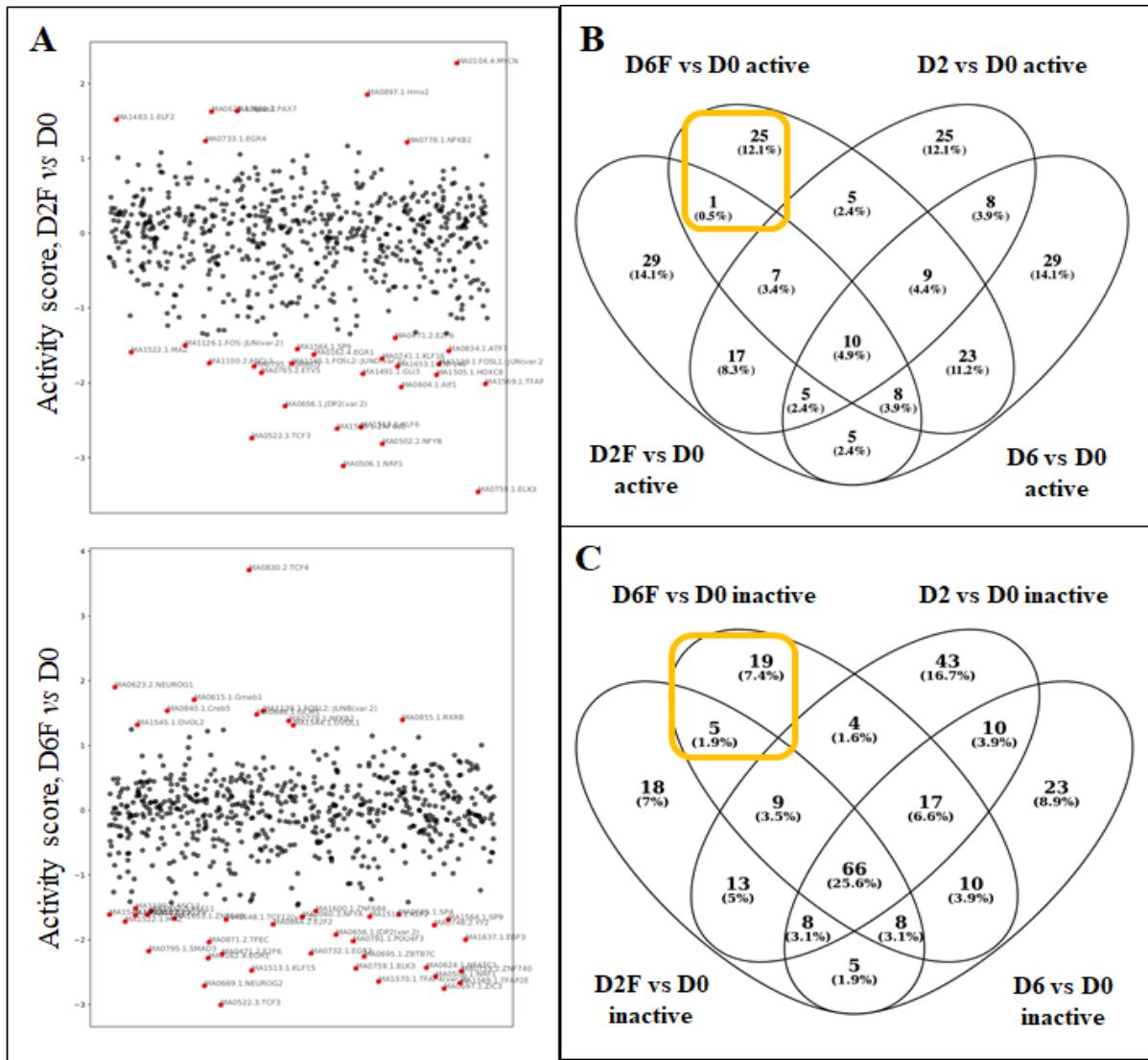


Figure 36 : Analyse de l'activité des facteurs de transcription (FT) au cours du temps et en fonction de la pré-stimulation. A : Scatter plot des scores d'activité des FT estimés par analyse de footprinting, entre J2F et J0 (haut), et J6F et J0 (bas). L'axe des ordonnées représente les différences d'activité des FT. Les points rouges représentent les FT ayant des valeurs d'activité différentiellement significative. B : Diagramme de Venn représentant les FT actifs (B) ou inactifs (C) dans les pics Memory Flagellin pour les comparaisons en conditions pré-stimulées ou non. Toutes les comparaisons ont été faites par rapport à J0. Les encadrés orange représentent le nombre de FT actifs (C) ou inactifs (C) exclusivement en présence de flagelline.

Il existe donc des FT dont l'activité, modulée par la pré-stimulation avec la flagelline, se maintient entre J2 et J6. Les FT dont l'activité n'est différente qu'à J6F vs J0 ont aussi été pris en compte car il est probable que cette activité reste liée à la pré-stimulation par la flagelline survenue 4 jours plus tôt. Cette analyse de l'activité des FT suggère que la pré-stimulation par la flagelline induit un remaniement durable de leur activité.

FT actifs à J6F	FT actifs à J2F et J6F	FT inactifs à J6F	FT inactifs à J2F et J6F
HOXC13	DBP	MAFA	RHOXF1
HOXB6		FOSL1::JUND	FOS::JUN
HOXD3		NFYA	KLF11
LMX1B		GFI1	TFAP2C
HOXD8		NR1H4::RXRA	TFAP4
HOXA4		PPARD	
PKNOX1		ZBTB33	
RXRB		SOX21	
POU3F3		Zic2	
TCF21		TEF	
Spz1		OSR2	
RORA		SOX18	
NFIX		NHLH1	
Hmx1		TFAP2C	
BHLHE23		HNF4A	
NR1H2::RXRA		BARHL2	
ISX		TBX2	
FOSL1::JUND		RARA	
HAND2		FOSB::JUNB	
TBP			
NR2C1			
NFIB			
ATF3			
STAT1::STAT2			
FOXB1			

Tableau 8 : Liste des facteurs de transcription (FT) actifs ou inactifs strictement en présence de flagelline, à J6F vs J0 ou en communs à J2F et J6F vs J0.

En conclusion de cette analyse du génome entier, nous avons identifié, par ATAC-seq, 608 pics différentiellement accessibles à J2 et qui le restent à J6 dans les CEB exposées à la flagelline. L'ensemble de ces 608 pics résulte bien de modifications épigénétiques induites par l'exposition des CEB à la flagelline et perdurent dans le temps. Grâce à l'analyse transcriptomique, nous avons pu associer ces 608 pics à 54 ensembles de gènes modulés exclusivement dans les CEB exposées à la flagelline. L'association des facteurs de transcription impliqués dans la modulation de ces gènes nous donne des informations supplémentaires sur les mécanismes impliqués dans la mémoire des CEB induite par la flagelline. La suite de l'analyse de l'ensemble de ces données va nous permettre d'identifier les familles de gènes spécifiquement modulées par les loci rendus différentiellement accessibles par la flagelline et les facteurs de transcription impliqués dans la modulation de ces familles de gènes. Ces analyses sont actuellement en cours de réalisation.

c. Partie 2 : Analyse gènes spécifiques

En parallèle, nous avons cherché à identifier des gènes cibles par une approche, non plus appuyée par la bioinformatique, mais plus axée sur leurs potentiels effets biologiques. Pour cela, nous avons recherché les gènes différentiellement exprimés aux comparaisons J2F vs J0 et J6F vs J0. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que ces gènes pouvaient être impliqués dans la mémoire induite par la pré-stimulation des CEB par la flagelline. Nous avons sélectionné une liste de gènes correspondants à ceux strictement commun entre J2F vs J0 et J6F vs J0, soit 86 gènes différentiellement sur-exprimés (*Up*) et 235 gènes différentiellement sous-exprimés (*Down*) (encadrés blancs sur le diagramme de Venn, **Figure 37**). Ces deux ensembles regroupent les gènes modulés, à la fois à J2 et à J6, par la flagelline. Nous avons aussi émis l'hypothèse que les gènes différentiellement modulés exclusivement à J6F vs J0 pouvaient être impliqués dans le phénomène de mémoire immunitaire des CEB (327 *up* et 1239 *down*). Il est en effet possible que leur modulation soit indétectable à J2F vs J0 par *microarray* et qu'elle évolue au cours du temps jusqu'à J6. Ainsi, nous avons identifié 1887 (86 + 327 + 235 + 1239) gènes strictement modulés lors d'une pré-stimulation par la flagelline.

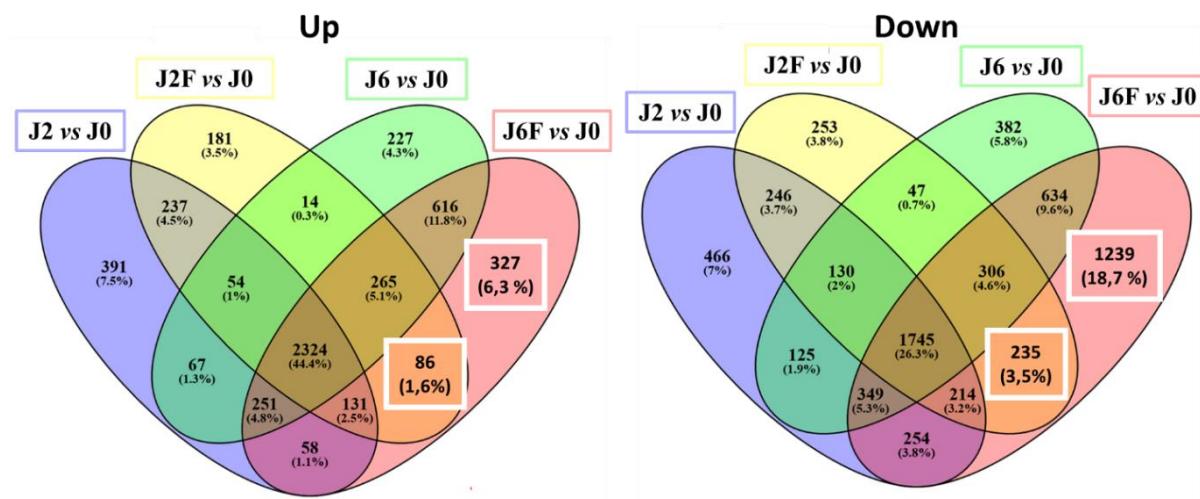


Figure 37 : Diagramme de Venn des gènes différentiellement exprimés en fonction des comparaisons étudiées, avec les gènes différentiellement surexprimés (à gauche « up ») et les gènes différentiellement sous-exprimés (à droite « down ») ($p<0,05$). J2F et J6F correspondent aux gènes modulés dans les CEB pré-stimulées par la flagelline à J2 et à J6. Les diagrammes de Venn ont été générés avec le logiciel VENNY (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

Nous avons ensuite croisé les gènes prédits comme étant associés aux 608 pics *Memory Flagellin* avec ces 1887 gènes spécifiquement modulés par la flagelline. Le but de cette analyse était d'identifier, parmi les gènes du transcriptome modulés par la flagelline, ceux qui pouvaient être associés à un pic identifié par ATAC-seq. Cette analyse nous a permis d'identifier très peu de gènes (n=31) communs à l'analyse des pics de l'ATAC-seq et du transcriptome (**Figure 38**).

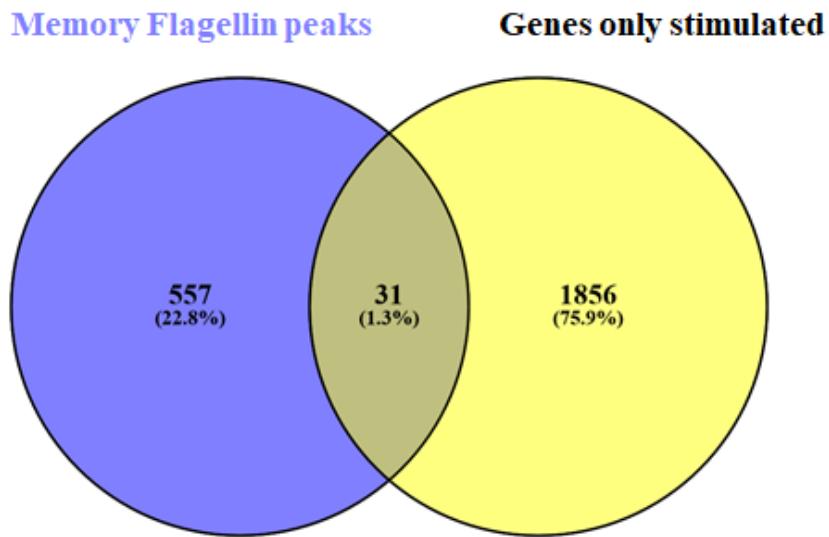


Figure 38 : Diagramme de Venn croisant les gènes prédis comme étant associés aux 608 pics Memory Flagellin (bleu) et les 1887 gènes spécifiquement modulés par la flagelline issus des données du transcriptome (jaune). Le diagramme de Venn a été générés avec le logiciel VENNY (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)

Bien que ces résultats ne soient pas statistiquement robustes, nous avons malgré tout poursuivi cette analyse, considérant que les résultats obtenus pourraient être informatifs.

Nous avons sélectionné, parmi les 31 gènes identifiés, ceux dont la sur-expression ou sous-expression était corrélée avec l'état de condensation de la chromatine, à savoir, respectivement, un gain ou une perte d'accessibilité. Ainsi les gènes *up*-régulés sélectionnés ont été associés à des pics présents correspondant à des zones de chromatine accessibles. À l'inverse, les gènes *down*-régulés sélectionnés ont été associés à des zones de chromatine inaccessibles. Cette sélection a permis d'identifier 15 gènes dont la modulation d'expression était corrélée avec les changements d'accessibilité de la chromatine. Ainsi, 8 gènes *down*-régulés par la flagelline étaient associés à des pics montrant une perte d'accessibilité de la chromatine et 7 gènes *up*-régulés étaient associés à des pics montrant un gain d'accessibilité. Enfin, nous avons recherché les FT prédis pour se lier aux loci associés aux 15 gènes d'intérêt et estimé leur score d'activité dans la condition de pré-stimulation par la flagelline. Parmi les 15 gènes que nous avions pu corrélérer aux pics, il a été possible de relier seulement 3 gènes différemment *up*-régulés, avec 13 facteurs de transcription actifs et dont les domaines de liaison prédis correspondent à ces 3 loci accessibles (**Tableau 9**).

Gènes	Description	Transcriptome		Epigénome		
		FC (J6F vs J0)	log2FC (J2F vs J0)	log2FC (J6F vs J0)	Coordonnées du pic	Facteurs de transcription
ME3	Malic enzyme 3	1.40	0.90	1.16	11_86644223_86644788	BATF3 JUNB_D FOXA1 HmX1_X3
CXCL6	C-X-C motif chemokine ligand 6	1.62	0.94	1.25	4_73816749_73817467	FOXB1
CTSS	Cathepsin S	1.90	1.51	2.02	1_150764633_150765235	BATF3 CEBPA_D_G POU3F1 NFIL3 POU2F1

Tableau 9 : Croisement des listes de gènes, de pics Memory Flagellin et de facteurs de transcription spécifiquement modulés par la flagelline. Pour chaque comparaison, le FC représente l'expression différentielle du gène (FC<0 down-régulé, FC>0 up-régulé), le log2FC représente l'accès du pic (log2FC<0 = perte d'accès, log2FC>0 = gain d'accès). Les coordonnées du pic sur le génome sont précisées. p<0.05. FC = fold change.

Parmi les 13 FT actifs obtenus (dernière colonne, **Tableau 9**), il apparaît que 3 appartiennent à la famille des CCAAT *enhancer binding protein* (CEBP) (alpha, delta, et gamma) et que 3 sont des sous-unités du facteur de transcription *activator protein-1* (AP-1), à savoir JUNB, JUND, et BATF3. La famille de FT CEBP, dont il existe 6 isoformes, est notamment impliquée dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des cytokines (Borger, Black, et Roth 2002). D'autre part, l'activation d'AP-1 au niveau pulmonaire est associée à l'induction de la réponse inflammatoire aiguë (Guo et al. 2002). Il est donc possible que l'augmentation de l'activité de ces FT à J2F et J6F vs J0 puisse être impliquée dans la reprogrammation des CEB après une pré-stimulation par la flagelline, et donc au phénomène de mémoire.

4. Conclusion

Pour conclure, l'analyse du génome entier, réalisée en collaboration avec deux bio-informatrices de l'Institut Pasteur, nous a permis de montrer que la pré-stimulation des CEB à la flagelline induit des modifications épigénétiques et transcriptomiques qui se maintiennent dans le temps, jusqu'à 6 jours après la pré-stimulation. Ces observations appuient le rôle de l'épigénétique dans le phénomène de mémoire immunitaire innée des CEB. Ainsi dans ces conditions, 608 pics sont trouvés différemment accessibles à J2 et le restent jusqu'à J6, 54 ensembles de gènes voient leur expression modulée et l'activité de 50 facteurs de transcription est modulée de façon spécifique. L'analyse croisée de l'ensemble de ces résultats montre une plus forte proportion de pics *Memory Flagellin* pour certains ensembles *Gene Set Memory Flagellin* et l'implication de facteurs de transcription.

Dans la seconde analyse (analyse gènes spécifiques), réalisée sans l'aide d'outils bio-informatiques, nous ne sommes parvenus à relier que 31 gènes différemment exprimés uniquement en présence de flagelline avec les loci issus des 608 pics identifiés dans l'analyse du génome entier. Parmi ces 31 gènes, 3 voient leur expression transcriptomique et leur profil épigénétique concorder, et sont associés à des

FT actifs. Bien que basée sur un nombre réduit de gènes différentiellement exprimés et de loci différentiellement accessibles, cette analyse biologique pourra nous orienter sur de futurs axes de recherche à mener pour identifier précisément l'origine de la mémoire immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques.

Bien que nous n'ayons pas encore identifié précisément un mécanisme permettant de relier les modifications épigénétiques et l'expression des ensembles de gènes à l'origine de la mémoire immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques, nous avons néanmoins montré que la pré-stimulation par la flagelline induit des remaniements persistants et spécifiques de l'accessibilité de la chromatine ainsi que des changements d'expression d'ensembles de gènes impliqués dans des voies de signalisation cellulaire.

Discussion

L'immunité des vertébrés est déterminée par une interaction complexe entre les barrières physiques et chimiques (épithéliums et substances antimicrobiennes), des facteurs humoraux et différents types cellulaires, qui réagissent à l'exposition permanente à divers stimuli internes et externes. On classe ces réponses immunitaires en deux systèmes ; l'immunité innée et l'immunité adaptative. Cette dichotomie a évolué et le dogme définissant le système inné comme non spécifique et incapable de s'adapter ou de développer une mémoire immunologique a été remis en cause.

Les cellules épithéliales bronchiques (CEB) représentent la première ligne de défense immunitaire au niveau des voies aériennes inférieures. A l'instar de ce qui a été montré pour les macrophages mais aussi d'autres types de cellules épithéliales, nous avons émis l'hypothèse que les CEB pouvaient développer une mémoire à la suite d'un premier contact avec un pathogène. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'exposition de CEB à un composant bactérien, la flagelline de *Pseudomonas aeruginosa*, modifiait leur réponse inflammatoire, quantifiée par la synthèse d'IL-8 et d'IL-6, à un stimulus secondaire induit par une infection bactérienne ou fongique. Ainsi, tout comme les monocytes/macrophages, les CEB sont capables de mémoriser un premier stimulus. Nous avons testé plusieurs combinaisons de composants microbiens lors des pré-stimulations/stimulations et notamment celles utilisées dans les études s'intéressant à la mémoire des monocytes/macrophages, comme l'effet du β -glucane (sucre de paroi fongique) et du LPS de *E. coli*. Cependant, contrairement aux macrophages, les CEB en contact avec le β -glucane de *C. albicans* ne produisent ni IL-8 ni IL-6, quelles que soient les concentrations de β -glucane utilisées (1 μ g/mL à 1 mg/mL). Malgré ce résultat, nous avons fait l'hypothèse que la pré-stimulation par ce PAMP pouvait activer d'autres voies et induire des modifications dans la réponse inflammatoire induite à distance par différents composés microbiens. Nous avons observé que, contrairement à ce qui avait été montré avec les macrophages, la pré-stimulation des CEB par le β -glucane ou par le LPS de *E. coli* n'entraînait aucun effet de mémoire (ni *training*, ni tolérance) sur la synthèse d'IL-8 et d'IL-6 et ce quel que soit le second stimulus. Il a été montré que la voie Dectine 1/Raf-1 était nécessaire à l'induction de l'effet de *training* dans les macrophages (Quintin et al. 2012), or l'expression de Dectine 1 (récepteur du β -glucane) dans les CEB, reste controversée. Même si d'autres récepteurs au β -glucane ont été décrits, tels que le lactosylceramide (Evans et al. 2005, 20), le *complement receptor 3* (CR3 ; CD11b/CD18) et TLR2/TLR6, la très faible expression de Dectine 1 par les CEB primaires et de la lignée BEAS-2B (données d'expression non illustrées) pourrait expliquer leur absence de réponse au β -glucane. Cependant, tout comme ce qui avait été décrit avec les macrophages (Ifrim et al. 2014), nous avons observé que la pré-stimulation par la flagelline de *P. aeruginosa* entraînait une diminution de la réponse inflammatoire lors d'un second contact avec le LPS de *E. coli*. Ce phénomène pourrait être en partie expliqué par la diminution d'expression de TLR4, récepteur au LPS des bactéries Gram négatif, dans les cellules pré-stimulées par

la flagelline. Ce phénomène de tolérance, observé avec une diminution de l'IL-6 et l'IL-8, n'est à l'inverse pas noté lors d'une seconde stimulation induite par le LPS de *P. aeruginosa*. Ceci peut être expliqué par le fait que le LPS de *P. aeruginosa* soit reconnu par TLR4 mais également par TLR2 (Erridge et al. 2004), dont l'expression n'est pas impactée par la pré-stimulation par la flagelline. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la modulation de l'expression de TLR4 par la flagelline ait un rôle dans la modulation de la réponse secondaire au LPS de *E. coli*. De plus, nous avons observé que l'exposition des CEB à la flagelline induisait un phénomène de tolérance lors d'un second contact avec la flagelline, mais aussi après infection par *Stenotrophomonas maltophilia* et *P. aeruginosa*, des bactéries Gram négatif flagellées (Bigot et al. 2019) (schéma récapitulatif **Figure 39**).

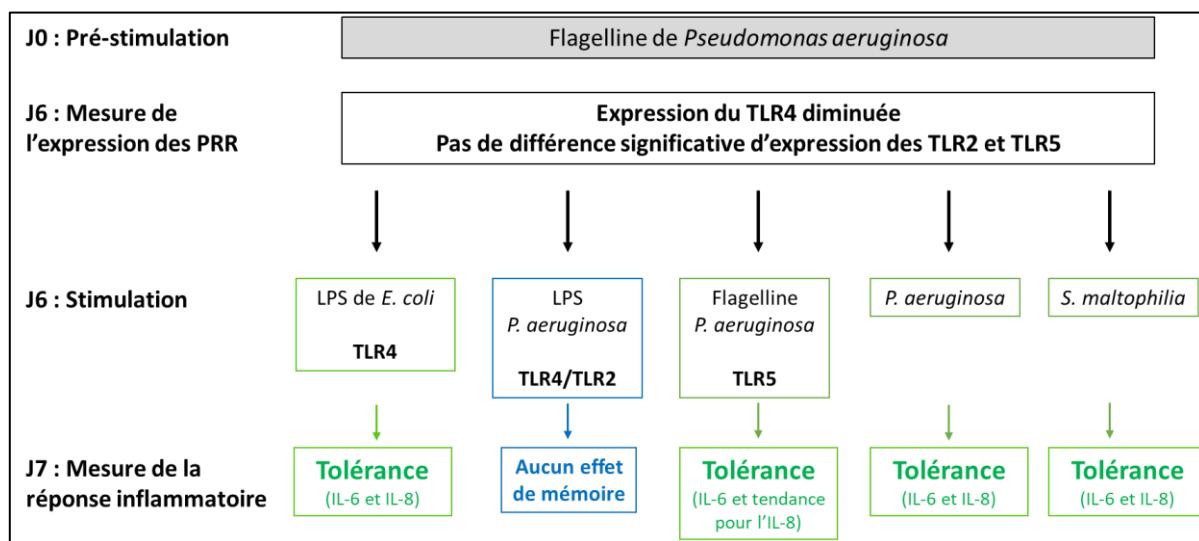


Figure 39 : Schéma récapitulatif des effets de la pré-stimulation par la flagelline sur des stimulations secondaires avec le LPS d'*E. coli* ou de *P. aeruginosa*, la flagelline de *P. aeruginosa* et les bactéries *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* sur la synthèse d'IL-8 et d'IL-6.

En conclusion de cet ensemble d'observations, il semble que la pré-exposition des CEB à la flagelline de *P. aeruginosa* induise une reprogrammation de l'expression des acteurs impliqués dans la reconnaissance du LPS d'*E. coli* mais aussi de la flagelline constituant principal du flagelle des bactéries *S. maltophilia* et *P. aeruginosa*.

La stimulation de TLR intracellulaires induit également la mémoire immunitaire innée des CEB. Afin de mimer des infections bactériennes ou virales, nous avons utilisé l'ODN CpG, constitué d'oligonucléotides synthétiques riches en motifs CpG. L'ODN CpG est reconnu par TLR9, un récepteur endosomal à l'ADN viral ou bactérien riche en motifs CpG hypométhylés. Le poly(I:C), structurellement similaire à l'ARN double brin présent dans certains virus et reconnu par le TLR3 également endosomal, a aussi été utilisé pour mimer des infections virales. Lorsque les CEB sont pré-stimulées par de fortes concentrations d'ODN CpG, nous avons mesuré une réponse de type tolérance au poly(I:C). La tolérance induite par l'ODN CpG avait aussi été notée par Ifrim et al., dans leur étude sur les macrophages, à la seule différence que les variations n'étaient pas significatives, et que l'effet de tolérance semblait inhérent à toutes les concentrations utilisées d'ODN CpG (Ifrim et al. 2014). Ainsi, une première

infection bactérienne ou virale, activant les CEB *via* TLR9, entraînerait une reprogrammation des CEB induisant une diminution de la réponse inflammatoire lors d'une seconde infection virale, impliquant TLR3. Différentes études ont montré que l'ADN CpG rendait les macrophages réfractaires à une stimulation ultérieure avec des composants bactériens. Parmi celles-ci, Yeo *et al.* ont observé que la stimulation pendant 24 heures d'une lignée de macrophages murins par l'ADN CpG induisait une hyperréactivité des cellules en réponse à une seconde stimulation avec de l'ADN CpG mais aussi avec le LPS (Yeo et al. 2003). La pré-exposition des cellules n'induit pas de différence d'expression de TLR4 ou TLR9, mais une diminution progressive, entre 0 et 24 heures suivant la stimulation, de l'ARNm d'IRAK1, une kinase impliquée dans la voie de signalisation des TLR, et sa disparition protéique à 24 heures. Bien que le temps entre la pré-stimulation et la stimulation n'ait été, dans cette étude, que d'une heure et qu'on ne peut parler ici de mémoire innée, ceci suggère que IRAK1 pourrait être impliqué dans la reprogrammation des macrophages. Ainsi, l'*endotoxin tolerance* observée de longue date avec le LPS et les macrophages, pourrait être étendue à d'autres PAMP, comme l'ADN CpG ou encore la flagelline, et à d'autres types cellulaires comme les CEB.

Le résultat le plus notable de notre étude *proof-of-concept* est sans doute l'existence d'une réponse inflammatoire accentuée des CEB vis-à-vis de spores aspergillaires après un premier contact avec la flagelline de *P. aeruginosa*. Ce contexte évoque d'emblée la situation observée chez les patients atteints de mucoviscidose chez qui ces deux pathogènes peuvent être isolés simultanément ou séquentiellement. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la pré-stimulation par la flagelline entraînait, dans nos conditions expérimentales, trois types de réponses inflammatoires différentes des CEB à un second stimulus. Ces réponses sont dépendantes de la concentration de flagelline utilisée pendant la pré-stimulation mais aussi du type d'agoniste utilisé lors de la stimulation à J6. Ainsi, on observe *i*) aucun effet mémoire après stimulation avec le LPS de *P. aeruginosa*, le Pam3CSK4, agoniste de TLR2, ou le poly(I:C) *ii*) une réponse de type *training* après stimulation avec *A. fumigatus*, *iii*) une réponse de type tolérance après stimulation avec le LPS de *E. coli*, la flagelline ou les bactéries *S. maltophilia* et *P. aeruginosa*. Ces résultats montrent que les différentes réponses mémoire liées à la pré-exposition des CEB à la flagelline ne sont pas dues à la reprogrammation épigénétique des gènes codant pour l'IL-8 et l'IL-6, puisque dans le premier cas leur synthèse reste inchangée, dans le second elle est augmentée et, dans le dernier, diminuée. On peut émettre l'hypothèse que la flagelline va exercer son action sur la modulation d'expression de récepteurs, comme nous l'avons observé pour le TLR4, de voies de signalisation impliqués dans la reconnaissance des PAMP utilisés lors de la seconde stimulation, ou sur l'expression de répresseurs. Dans les combinaisons n'induisant aucun effet mémoire, il est possible que la synthèse d'IL-8 et d'IL-6 ne soit pas le paramètre impacté par la mémoire et que d'autres voies d'activation puissent être modulées.

Contrairement aux macrophages, les CEB ont la capacité de proliférer ce qui physiologiquement permet le maintien de l'intégrité de l'épithélium lors d'agressions tissulaires. Au cours de notre étude,

nous avons travaillé avec des cellules épithéliales, en culture immergée, présentant ainsi un phénotype de cellules basales. En effet, ces conditions de culture ne permettent pas leur différenciation en cellules ciliées ou sécrétrices de mucus contrairement aux conditions de culture en interface air-liquide (Stewart et al. 2012). Dans nos conditions expérimentales, les cellules ont été ensemencées à J-1 à une concentration faible permettant l'obtention d'un tapis à confluence à J6. Ainsi, à J2, l'ensemble des cellules analysées ont toutes été en contact avec la flagelline, alors qu'à J6, 70% des cellules n'ont pas été en contact avec ce PAMP. Comme les conditions de réalisation de l'ATAC-seq sont basées sur l'analyse d'un nombre équivalent de cellules à J0, J2 et J6, on s'affranchit de biais liés au nombre de cellules par puits, différent à chaque condition, et les résultats de cette analyse sont donc bien liés à l'exposition à la flagelline. Dans notre modèle, on peut émettre l'hypothèse que les phénomènes qui participent à la mémoire des CEB soient transmis aux cellules filles lors de leur multiplication. Cette hypothèse est appuyée par le travail de Naik *et al.* qui ont montré que les cellules épithéliales matures de la peau héritaient de la mémoire inflammatoire des cellules progénitrices résidantes de la couche basale (Naik et al. 2017). L'étude de la durée de la mémoire des cellules épithéliales bronchiques constitue aussi une perspective importante de notre analyse. Le temps relativement court entre la pré-stimulation et la stimulation, dans le modèle d'Ifrim *et al* avec les macrophages et dans notre modèle, est une limite à l'étude de la mémoire. L'utilisation de cellules épithéliales bronchiques primaires (Epithelix Sarl®), cultivées en immersion et capables de rester plusieurs jours à confluence sans dommage, contrairement à la lignée BEAS-2B, pourrait permettre d'allonger le temps entre les deux stimulations et d'étudier la persistance de la mémoire sur plus d'une semaine.

Au cours de la réparation cellulaire qui intervient après des lésions liées à des agressions infectieuses ou inflammatoires, les cellules épithéliales basales vont se différencier et permettre la reconstruction d'un épithélium bronchique pseudostratifié, comprenant majoritairement des cellules sécrétrices de mucus, des cellules ciliées et des cellules basales. Ainsi, l'analyse de la transmission de la mémoire après la pré-exposition à la flagelline durant les deux premiers jours du processus de différenciation de cellules épithéliales bronchiques primaires, cultivées à l'interface air-liquide, serait un modèle intéressant à développer et à étudier. Il pourrait permettre, d'une part, de valider dans un modèle *ex-vivo* la mémoire immunitaire innée des CEB différenciées et d'autre part, d'étudier la transmission des modifications épigénétiques, impliquées dans la mémoire innée, au cours de la différenciation. Ceci est un aspect important dans le contexte des maladies pulmonaires chroniques comme la mucoviscidose ou encore la BPCO, au cours desquelles la répétition des infections pulmonaires endommage continuellement l'épithélium respiratoire. Dans ce contexte, nous avons montré que les CEB étaient capables de reconnaître, d'interagir et de développer une réponse inflammatoire et antifongique vis-à-vis d'espèces fongiques fréquemment retrouvées dans les voies aériennes, notamment des patients atteints de mucoviscidose (Bigot *et al.*, 2021, en révision). L'exacerbation de la réponse inflammatoire, observée après infection par *A. fumigatus* de CEB pré-exposées à la flagelline, a pu être étendue à *Aspergillus flavus*, *C. albicans* et *Scedosporium apiospermum* des champignons colonisant les voies aériennes des

patients atteints de mucoviscidose ou de BPCO. Ces résultats suggèrent que la flagelline pourrait induire des modifications épigénétiques rendant plus ou moins permissive l'expression de gènes, de PRR ou de voies de signalisation, modifiant ainsi la reconnaissance et la réponse cellulaire à une espèce fongique donnée. Parmi les données du transcriptome réalisé, nous avons observé que le gène de la pentraxine 3 (PTX3), était spécifiquement surexprimé en présence de flagelline à J2 et à J6. Le rôle dans la défense innée anti-aspergillaire de ce PRR sécrété est caractérisé par sa capacité à se fixer aux spores d'*A. fumigatus*. La PTX3 agit ainsi comme une opsonine facilitant la reconnaissance des spores par les cellules et leur phagocytose par les macrophages (Garlanda et al. 2002). Dans notre modèle, la surexpression de la PTX3 par la flagelline pourrait faciliter l'interaction des CEB avec *A. fumigatus* et ainsi participer à l'augmentation de la réponse inflammatoire des CEB au contact du champignon. Bien que nos observations sur l'étude de la mémoire innée des CEB, vis-à-vis d'autres espèces fongiques, nécessitent sans doute d'être élargies à un nombre plus important de souches pour certaines espèces, l'utilisation de la flagelline en tant que modulateur de l'inflammation lors d'infections fongiques pulmonaires peut être envisagée. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse qu'une exposition à la flagelline de *P. aeruginosa* entraînerait une « protection » vis-à-vis de ces espèces fongiques, en « boostant » la production de cytokines pro-inflammatoires permettant le recrutement des PNN sur le site infectieux et donc une éradication plus efficace et rapide de l'infection fongique. On sait aussi que les phénazines produites par *P. aeruginosa*, dont la pyocyanine, ont des effets inhibiteurs sur la croissance de certains champignons comme *A. fumigatus* ou *C. albicans* (Kerr et al. 1999; Briard et al. 2015). Il serait intéressant de tester l'effet antifongique des phénazines associé à l'effet pro-inflammatoire lié à la pré-exposition à la flagelline, sur des CEB infectées avec des spores fongiques ou des levures. Cependant, dans le contexte de la mucoviscidose ou de la BPCO, l'utilisation de flagelline comme activateur de la réponse inflammatoire pourrait également être délétère et participer au contexte déjà très inflammatoire des bronches de ces patients (O'Sullivan et Freedman 2009).

Ce rôle pro-inflammatoire de la flagelline a déjà été utilisé notamment en vaccinologie. Plusieurs études se sont intéressées à l'utilisation de la flagelline comme adjuvant de vaccin en raison de sa capacité à stimuler la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, notamment par les cellules dendritiques, les cellules NK, et les cellules épithéliales, étape essentielle à l'activation et au développement d'une réponse immunitaire adaptative spécifique (Hajam et al. 2017). Cependant, il serait important d'identifier précisément les voies de signalisation impliquées dans les CEB par la pré-stimulation par la flagelline et responsables de leur reprogrammation. En effet, nous avons montré que l'incubation des cellules avec un anticorps bloquant de TLR5, pendant les 2 jours de pré-stimulation avec la flagelline, inhibait l'effet de *training* observé lors de l'infection secondaire avec *A. fumigatus* mais ne semblait pas modifier la réponse de type tolérance suite à la stimulation avec le LPS de *E. Coli*. Ainsi, les voies de signalisation de TLR5 ne semblent impliquées que dans le *training* vis-à-vis d'*A. fumigatus*. Il a été montré que la flagelline pouvait pénétrer dans les cellules et être reconnue par les récepteurs intracellulaires NLRC4 (ou IPAF) et NAIP, exprimés par les CEB, activant ainsi

l'inflamasome (Kay et al. 2020; Y. Zhao et al. 2011; Vinzing et al. 2008). On peut ainsi supposer que les deux types de réponses induites par la flagelline sur les CEB, d'une part la tolérance au LPS d'*E. coli* et d'autre part le *training* suite à une infection par *A. fumigatus*, soient expliquées par la stimulation de deux voies de signalisation différentes ; NAIP-NLRC4 et TLR5 respectivement. L'utilisation de siARN ciblant spécifiquement NAIP et NLRC4 sur le protocole de tolérance flagelline/LPS *E. coli* nous permettrait de répondre à cette question.

L'inflammation chronique et les infections jouent un rôle majeur dans la détérioration progressive de la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, la modulation de la mémoire immunitaire innée, dans ce contexte, pourrait ainsi ouvrir de nouvelles possibilités thérapeutiques. Cependant, il serait important avant tout d'étudier l'impact des mutations du *CFTR*, notamment F508del la plus commune, sur la mémoire innée des CEB. Cette analyse est une autre perspective de ce projet. Pour cela, les protocoles utilisés pourront être conduits en utilisant des cellules bronchiques de patients atteints de mucoviscidose, cultivées en immersion ou en interface air-liquide, fournies par la société Epithélix®.

A l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, nous avons montré que la modulation de la réponse des CEB était bien liée à une régulation épigénétique (Bigot et al. 2019), confirmant ainsi la capacité des CEB à développer une mémoire immunologique. Pour aller plus loin dans la compréhension des processus intracellulaires liés à cette mémoire induite par la flagelline, nous avons caractérisé les régions accessibles de la chromatine par ATAC-seq et analysé parallèlement l'expression des ARN messagers par *microarray*. Notre but était ainsi d'identifier les modifications de condensation de la chromatine induites par l'exposition des cellules à la flagelline et de corrélérer les modifications identifiées avec la modulation de l'expression des gènes.

L'analyse des données issues de l'ATAC-seq nous a permis d'identifier 608 pics, regroupés sous le terme *Memory Flagellin*, communs exclusivement à J2F vs J0 et J6F vs J0, impliquant que l'accessibilité de ces régions de la chromatine soit modulée spécifiquement par la pré-stimulation par la flagelline et se maintient jusqu'à J6. De plus, l'analyse des profils de ces pics au cours du temps a montré que le changement d'accessibilité induit par la flagelline entre J0 et J2 est identique ou accentué à J6. Ces observations soutiennent l'existence d'une mémoire car, même après l'élimination de la flagelline et les lavages des cellules à J2, les modulations d'accessibilité sont encore présentes ou s'intensifient 4 jours plus tard. En corrélant les données de l'ATAC-seq et du transcriptome, nous avons montré une relation entre les changements d'accessibilité des loci *Memory Flagellin* et l'expression d'ensembles de gènes retrouvés modulés par la flagelline à la fois à J2 et J6 ou à J6 seulement, regroupés sous le terme de *Gene Set Memory Flagellin*.

Bien que notre analyse « gènes spécifiques » soit statistiquement moins robuste que l'analyse « génome entier » car basée sur un nombre réduit de gènes différentiellement exprimés et de loci différentiellement accessibles, nous avons pu identifier 13 facteurs de transcription actifs dont les domaines de liaison

correspondent à des loci accessibles et des gènes surexprimés en présence de flagelline. De manière intéressante, l'analyse "génome entier" et "gènes spécifiques" nous a permis d'identifier des sous-unités du facteur de transcription AP-1 dans les résultats issus du *footprinting* de ces deux analyses, à savoir JUN, FOS, et ATF. Il a été montré que plusieurs sous-unités d'AP-1 étaient impliquées dans les voies liées à l'inflammation et que la dérégulation de leur expression était impliquée dans diverses pathologies inflammatoires ou cancéreuses, principalement des lymphomes (Garces de los Fayos Alonso et al. 2018). La recherche de l'implication des sous-unités de ce facteur de transcription dans la modulation de l'expression des ensembles de gènes impliqués dans la mémoire immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques va être entreprise. Nous pourrons cibler AP-1, en utilisant des anticorps dirigés contre les différentes sous-unités pour valider, par méthode ChIP-PCR, leur présence au niveau des loci des familles de gènes identifiées dans notre étude, dans les CEB exposées à la flagelline. Une fois que l'ensemble des loci cibles auront été identifiés (des loci difféntiellement accessibles reliés à des gènes difféntiellement exprimés et à des facteurs de transcription dont l'activité est modulée par la flagelline), nous pourrons cibler des marques d'histones connues comme modulant l'accessibilité de la chromatine, telles que H3K4me3 ou H3K27Ac, ou des facteurs de transcription, pour visualiser par méthode ChIP-PCR, s'ils sont spécifiquement présents au niveau de ces loci et démontrer ainsi leur implication dans la mémoire innée des CEB.

D'autres mécanismes épigénétiques pourraient être impliqués dans la mémoire des CEB. Ainsi, bien que cela n'ait jamais été clairement démontré, les microARN possèdent des propriétés compatibles avec le maintien de cette mémoire. En effet, les microARN sont très stables et peuvent être recyclés après avoir reconnu leurs cibles et maintenir ainsi leur action. Par conséquent, après une première activation transcriptionnelle induite par un stimulus, les microARN peuvent continuer leur activité même après suppression du stimulus. Enfin leur sécrétion peut permettre un transfert d'informations aux cellules voisines, non exposées au stimulus primaire, modulant ainsi de façon transitoire les réponses des autres cellules du microenvironnement (Monticelli et Natoli 2013). Parmi les microARN dont l'expression est induite par des stimuli inflammatoires et dans de nombreux types cellulaires, on peut citer les miR-146a et miR-155. L'induction de premier dépend du facteur de transcription NF-κB et agit en inhibant l'action de TRAF6 et IRAK1, deux protéines impliquées dans les voies d'activation des TLR et de NF-κB et donc dans les réponses inflammatoires (Taganov et al. 2006). De plus, une étude a montré que des souris *miR-146a-/-* deviennent très réactives à une stimulation par le LPS, ce qui se manifeste par un taux sérique de TNF α , d'IL-1 β et d'IL-6 significativement supérieur à celui de souris *wild type* et un taux de survie de 10%, 60 h post-injection contre 80% pour les souris *wild type* (Boldin et al. 2011). MiR-146a limiterait donc l'activation néfaste de NF-κB en réponse à une stimulation aiguë. Le miR-155 est quant à lui associé à l'hyperactivation des cellules myéloïdes, probablement due à l'inhibition de l'expression de l'inositol phosphatase, SHIP1, une enzyme régulant négativement la kinase Akt, impliquée dans l'activation de NF-κB (O'Connell et al. 2009). Ces deux microARN pourraient donc constituer des microARN "mémoires" impliqués dans l'initiation et le maintien d'une reprogrammation cellulaire

déclenchée par des signaux extracellulaires et donc potentiellement impliqués dans la mémoire innée. Une étude du MiRNome des CEB, pré-stimulées ou non par la flagelline et aux différents temps J0, J2 et J6, permettrait d'identifier les microARN modulés par la pré-stimulation et pouvant être impliqués dans la mémoire cellulaire.

Les données présentées dans ce mémoire et la poursuite de ce projet pourraient avoir plusieurs implications intéressantes en médecine humaine, bien qu'encore lointaines. L'identification des mécanismes, qui déterminent les destins fonctionnels des cellules somatiques, pourrait conduire au développement de nouvelles thérapeutiques préventives capables de moduler la mémoire afin d'induire des réponses inflammatoires plus adaptées. Selon ces contextes, l'induction d'une mémoire de type *training* permettrait d'augmenter la réponse inflammatoire chez les patients immunodéprimés, alors que son inhibition ou l'induction d'une tolérance inhiberait une inflammation exacerbée chez les patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques comme la mucoviscidose.

Parmi les effets bénéfiques de la modulation de la mémoire de l'immunité innée sur la santé, pouvant constituer une thérapeutique intéressante à développer, on peut évidemment citer la protection contre les réinfections. Sur la base des effets non spécifiques de la vaccination par le BCG et des résultats d'une étude montrant que ce vaccin réduisait la virémie du virus de la fièvre jaune, effet corrélé avec l'augmentation de la synthèse de cytokines (Arts et al. 2018), l'hypothèse que la mémoire de l'immunité innée pourrait être un outil pour réduire la susceptibilité des patients à risque de développer une pneumonie sévère due au SARS-CoV-2 a récemment été émise. La défaillance respiratoire, à l'origine de la mortalité de ces patients, est caractérisée par une production massive de molécules inflammatoires au niveau pulmonaire, « l'orage cytokinique ». La réponse inflammatoire des cellules épithéliales des voies aériennes peut donc participer à l'aggravation des symptômes et une altération de la structure de la barrière épithéliale (Chua et al. 2020). La modulation de mémoire innée pourrait avoir un intérêt thérapeutique en oncologie avec l'observation d'effets anticancéreux de certains composants microbiens induisant du *training*. Par exemple, il a été démontré que le BCG avait des effets antitumoraux et il est déjà utilisé pour le traitement du cancer de la vessie en instillation intra-vésicale (Kawai et al. 2013). Cette capacité antitumorale du BCG, ainsi que sa capacité à induire du *training*, serait dépendante de l'autophagie ce qui expliquerait que les patients qui présentent des polymorphismes sur les gènes *autophagy related genes* ou *ATG*, sont non répondants à la thérapie au BCG et ont plus de risque de rechutes (Buffen et al. 2014). De même, la thérapie anticancéreuse par β -glucane en association avec des anticorps monoclonaux, comme le Pemrolizumab (anticorps monoclonal dirigé contre la protéine *programmed cell death-1* et utilisé pour le traitement du mélanome) fait l'objet de nombreux essais cliniques aux États-Unis selon la base <https://clinicaltrials.gov/>. Il apparaît que le β -glucane agirait comme un adjuvant en déclenchant des mécanismes d'élimination des tumeurs à médiation cellulaire, non déclenchés par l'anticorps monoclonal seul (Vetvicka et al. 2019). Les résultats de certains essais cliniques montrent que l'association augmente significativement le taux de réponse globale des patients

atteints par rapport aux médicaments seuls. Ces effets du BCG et β -glucane pourraient être expliqués par l'induction de la mémoire de l'immunité innée et ses effets adjuvants sur les cellules effectrices du système immunitaire (Netea, Joosten, et Meer 2017).

Cependant, l'activation du système immunitaire est une arme à double tranchant. Le *training* pourrait aussi contribuer à l'hyper-inflammation et jouer un rôle dans la pathogenèse et la progression des maladies inflammatoires chroniques (van der Heijden et al. 2017). Parmi celles-ci, l'athérosclérose est une inflammation vasculaire chronique dans laquelle le système immunitaire inné joue un rôle central. Une interaction complexe entre les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules immunitaires circulantes crée un microenvironnement pro-inflammatoire au niveau de la paroi vasculaire qui favorise la formation d'une plaque d'athérome. Dans ce processus, les cellules inflammatoires les plus abondantes sont les monocytes et les macrophages. Ainsi la stimulation de ces cellules par les lipoprotéines oxydées de faible densité, les oxLDL, induit un changement de phénotype caractérisé par une augmentation d'expression des récepteurs *scavenger* CD36 et SR-A, conduisant à une formation accrue de cellules spumeuses, une production amplifiée de cytokines proinflammatoires et à l'expression de métalloprotéases matricielles. Les macrophages, ainsi reprogrammés, amplifient l'inflammation favorisant le développement, et la progression de la plaque athéromateuse (Bekkering et al. 2021). Il est donc important de noter que, outre les PAMP, le *training* peut être induit par des stimuli endogènes, comme les oxLDL. En plus des macrophages, la reprogrammation des cellules épithéliales pourrait aussi avoir des effets néfastes. Les cellules basales du tractus respiratoire supérieur semblent avoir un rôle de réservoir de cellules mémoires à l'exposition à un environnement inflammatoire impactant la composition cellulaire et propageant la maladie. En effet, une étude a comparé le profil d'expression des cellules de l'épithélium nasal de patients sains et atteints de polypes nasaux (Ordovas-Montanes et al. 2018). Les polypes nasaux sont le résultat d'une inflammation sévère d'origine allergique due à une activation persistante de l'immunité de type 2, caractérisée par la synthèse d'IL-4 et d'IL-13 par les lymphocytes T helper 2. Les auteurs ont observé une réduction globale de la diversité cellulaire au sein des polypes, caractérisée par une hyperplasie des cellules basales et une réduction des autres types cellulaires. De plus, les cellules basales issues des polypes et cultivées *ex vivo* sont bloquées dans un état indifférencié, et présentent des modifications épigénétiques et transcriptomiques, notamment une surexpression d'un ensemble de gènes, connus pour être sensibles à l'IL-4 et IL-13. L'exposition de cellules basales de polypes, 5 semaines après leur mise en culture, à l'IL-4 et IL-13 induit une surexpression de ces mêmes gènes montrant que les cellules conservent une mémoire intrinsèque de l'exposition à ces deux cytokines (Ordovas-Montanes et al. 2018). Un parallèle peut être fait avec la mucoviscidose caractérisée par une hyper-inflammation chronique des voies respiratoires en particulier des bronches. Il est possible que ce phénomène de mémoire de l'immunité innée des CEB puisse être en partie à l'origine de poussées inflammatoires responsables de la détérioration progressive des fonctions pulmonaires des patients. On peut alors imaginer que cette hyper-inflammation au niveau

bronchique puisse être modulée par des doses appropriées de PAMP induisant une tolérance immunitaire ou des inhibiteurs des voies dont dépend la reprogrammation des CEB en phénotype *training*.

En conclusion, nous avons montré que les cellules épithéliales bronchiques qui sont, comme les macrophages, des cellules immunitaires, étaient capables de moduler leur réponse suite à un contact avec des agonistes microbiens et d'être reprogrammées de façon prolongée. Les mécanismes moléculaires de la mémoire immunitaire innée chez les vertébrés n'ont été jusqu'à présent que partiellement décrits. La poursuite de l'analyse de nos données va nous permettre d'identifier des acteurs impliqués à la fois dans le *training* et la tolérance induits par l'exposition des CEB à la flagelline et donc responsable de la mémoire de l'immunité innée des CEB. Cette étape est nécessaire pour envisager son éventuel contrôle dans le cadre de la prise en charge de pathologie pulmonaire à composante inflammatoire.

Annexes

I- Annexe 1 : Rôle des cellules épithéliales bronchiques dans la réponse immune pulmonaire anti-aspergillaire

A l'occasion d'un topic développé par *Frontiers in Immunology* et axé sur les "*Immune Responses of the Mucosal Epithelium in Chronic Lung Diseases*" j'ai soumis, durant ma deuxième année de thèse, une revue de la littérature sur la réponse immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques contre *Aspergillus fumigatus*, un champignon filamenteux pathogène opportuniste. Cette revue regroupe les données concernant les différents processus moléculaires et les différents types d'interaction impliqués au cours de l'infection des cellules épithéliales bronchiques par *A. fumigatus*.

Cette revue a été publiée en mai 2020.



Bronchial Epithelial Cells on the Front Line to Fight Lung Infection-Causing *Aspergillus fumigatus*

Jeanne Bigot¹, Loïc Guillot², Juliette Guitard¹, Manon Ruffin², Harriet Corvol³, Viviane Balloy^{2+†} and Christophe Hennequin^{1+†}

¹ Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service de Parasitologie-Mycologie, Paris, France, ² Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, France,

³ Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Hôpital Trousseau, Service de Pneumologie Pédiatrique, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Paul W. Bland,
University of Gothenburg, Sweden

Reviewed by:

Paul King,
Monash University, Australia
Zhengxiang He,
Icahn School of Medicine at Mount
Sinai, United States

*Correspondence:

Viviane Balloy
viviane.balloy@inserm.fr
Christophe Hennequin
christophe.hennequin-sat@aphp.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to
Mucosal Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 25 February 2020

Accepted: 30 April 2020

Published: 22 May 2020

Citation:

Bigot J, Guillot L, Guitard J, Ruffin M, Corvol H, Balloy V and Hennequin C (2020) Bronchial Epithelial Cells on the Front Line to Fight Lung Infection-Causing *Aspergillus fumigatus*. *Front. Immunol.* 11:1041.
doi: 10.3389/fimmu.2020.01041

Aspergillus fumigatus is an environmental filamentous fungus that can be pathogenic for humans, wherein it is responsible for a large variety of clinical forms ranging from allergic diseases to life-threatening disseminated infections. The contamination occurs by inhalation of conidia present in the air, and the first encounter of this fungus in the human host is most likely with the bronchial epithelial cells. Although alveolar macrophages have been widely studied in the *Aspergillus*-lung interaction, increasing evidence suggests that bronchial epithelium plays a key role in responding to the fungus. This review focuses on the innate immune response of the bronchial epithelial cells against *A. fumigatus*, the predominant pathogenic species. We have also detailed the molecular interactants and the effects of the different modes of interaction between these cells and the fungus.

Keywords: bronchial epithelial cells, *Aspergillus fumigatus*, innate immunity, lung infection, mucociliary machinery

INTRODUCTION

Aspergillus spp. are saprophytic filamentous fungi capable of colonizing different ecological habitats. They are usually isolated from soils, decaying organic matters, and plants but are also present in the air and indoor environments (1). *Aspergillus* spores, or so-called conidia, represent the disseminating form of the fungus that spreads through the air. These conidia are produced through asexual reproduction by differentiated fungal cells called phialides, which are themselves carried on a conidiophore. Conidia remain "dormant" or metabolically inactive until they encounter favorable environmental conditions. In this case, the conidia swell, germinate to produce hyphae that grow into a mycelium that harbor conidiophores, and then form conidia (2).

Aspergillus genus encompasses several hundred of species (3). *Aspergillus fumigatus* is by far the most frequent pathogenic species, responsible for about 90% of the cases of *Aspergillus* diseases, followed by *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, and *Aspergillus nidulans* (3, 4). Indeed, *A. fumigatus* is the predominant fungal species isolated from the ambient air able to grow at 37°C, the human body temperature.

Humans inhale around a few hundred conidia daily (5). Due to their small size (2- to 3-μm diameter) they can reach the lower respiratory tract (4) but, in most of cases, this phenomenon does not lead to any symptoms thanks to their evacuation by the mucociliary machinery of the tracheobronchial epithelium. However, depending on the immune status of the host, this contamination can be followed by a wide spectrum of manifestations (1). Concisely,

immunocompromised patients are at risk for invasive infection, so-called invasive pulmonary aspergillosis (IPA) and patients with pre-formed lung cavity (typically following previous pulmonary tuberculosis) are prone to chronic pulmonary aspergillosis, of which aspergilloma is one of the main presentations. Finally, patients with altered mucociliary clearance, such as cystic fibrosis (CF) patients, may be colonized which can turn, in patients with exacerbated immune response, into allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA).

The essential role of neutrophils and monocytes in anti-*Aspergillus* immunity has been emphasized by the high rate of incidence of *Aspergillus* invasive infection in patients with quantitative (neutropenia) or qualitative (corticosteroid therapy, chronic granulomatous disease) deficiency of these cells (6–8). However, the role of the bronchial epithelium should not be underestimated as it represents the first physical and biological barrier preventing fungal implantation.

While studies looking at the interactions between *Aspergillus* and leukocytes (alveolar macrophages and recruited neutrophils) are numerous (6, 9–11), data on the role of bronchial epithelial cells (BECs) in anti-*Aspergillus* defense are still limited. Yet, BECs seem to play a crucial role in the innate immune response against *Aspergillus* particularly in preventing the bronchial colonization. The high prevalence of *Aspergillus* bronchial colonization in patients suffering from CF (12, 13), a disease characterized by the thickening of the bronchial mucus, highlights this phenomenon. Bronchial *Aspergillus* colonization, whose role in the subsequent development of IPA is still debated, may have deleterious consequences as it is the starting point of *Aspergillus* bronchitis and immuno-allergic forms (14, 15). In CF patients, while remaining superficial, bronchial colonization is associated with the occurrence of bronchial exacerbations, a decline in lung function, and ABPA with a prevalence ranging between 1 and 15% (16). Fungal sensitization to *Aspergillus* antigens may also occur in allergic patients (17) but the role of the bronchial epithelium in these diseases won't be analyzed in this review.

Thanks to experimental studies, there is increasing knowledge on the interactions between the different morphotypes of *A. fumigatus* and BECs. This review aims to decipher these interactions at the molecular level and their effect on anti-*Aspergillus* immunity.

STUDY MODELS OF THE INTERACTION BETWEEN ASPERGILLUS FUMIGATUS AND BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS

The respiratory tract is lined by epithelial cells whose types vary according to the anatomic structure of the airways. Trachea,

Abbreviations: BECs, Bronchial epithelial cells; IPA, Invasive pulmonary aspergillosis; CF, Cystic fibrosis; PCD, Primary ciliary dyskinesia; ABPA, Allergic bronchopulmonary aspergillosis; ALI, Air-liquid interface; DHN, Dihydroxyxanthophthaleine; HBE cells, papilloma virus-immortalized bronchial epithelial cell line; PAMPs, Pathogen-associated molecular patterns; PRRs, Pathogen recognition receptors; IL-1Ra, Interleukin-1 receptor antagonist; NLRP3, NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing 3; ROS, Reactive oxygen species; IL, Interleukin; AMPs, Antimicrobial peptides; hBD, Human β-defensins; NAGase, N-Acetyl-β-d-glucosaminidase.

bronchi, and bronchioles are lined by the pseudostratified epithelium, while type I and II pneumocytes constitute the alveolar epithelium. At the bronchial level, the pseudostratified epithelium is mostly composed of ciliated, secretory, and basal cells from which the first two derive.

To understand the interactions between *Aspergillus* and BECs, different cell lines (immortalized or tumor) have been commonly used. Among the most popular bronchial cell lines used and commercially available, we can cite BEAS-2B and 16HBE, both isolated from normal human bronchial epithelium and secondarily immortalized through transfection of a replication-defective SV40 plasmid (18, 19). NCI-H292 cells derive from a lymph node metastasis sample of a pulmonary mucoepidermoid carcinoma. But other respiratory cell lines are occasionally used in some studies. All these cell lines have major advantages such as easy to maintain (cultured in simple and inexpensive culture media), capable of growing at high densities, and exhibiting an extended life span (20). However, these cells represent only one donor, and many cellular processes are deregulated due to immortalization. Refinement of the model consists of the use of commercially available primary bronchial cells that are free from any genetic modification and whose physiological functions are intact. However, before they are used, those cells must undergo antibiotic, antifungal, and growth factor treatment. Usually, these cells have a limited life span with limited proliferation capacity and are more difficult to culture than cell lines requiring more complex, specialized, and expensive cell culture media. Irrespective of the cell type, cells are usually cultured under submerged conditions, i.e., in flat-bottom plastic wells filled with culture medium, that hamper cells to differentiate. To better mimic physiological conditions, air-liquid interface cell culture (ALI) systems have been developed (21). In this case, primary BECs and also some cell lines such as 16HBE, differentiate until they develop the mucociliary phenotype characteristic of a pseudostratified epithelium and express mucins (20). Basal surface is therefore in contact with the liquid medium and the apical part of the cellular layer is exposed to the air. Obtaining this type of differentiated epithelium is time-consuming and requires specific technical skills but such cell culture systems mimic the required *in vivo* conditions in the best way.

Different approaches can be used to mimic an *Aspergillus* infection. *Aspergillus*, mostly in the form of dormant conidia can be inoculated in cell culture supernatants and then recovered after defined incubation intervals to measure the parameters of interest (such as cytokine level, cytotoxicity, etc.). In these conditions, *A. fumigatus* hyphae are usually obtained after 15 h of incubation. Killed (UV or irradiated for example) resting, swollen conidia and hyphae have also been used as inoculum. Differences between experimental protocols, especially the use of different multiplicity of infection, likely far from reality, could explain some discrepancies in the results obtained in different studies.

In addition to *in vitro* models, *in vivo* models of *Aspergillus* infection have already been used. Mice, rats or rabbits are the animals the most commonly used. They are immunosuppressed or not, and infected with *A. fumigatus* through inhalation of conidia administered either intranasal or *via* intratracheal route. In addition to the measurements of mortality rate and/or fungal

load in the lungs, more precise descriptions of the immune response have also been reported, looking at the immune cells recruitment or inflammatory response (22). *In vivo* models have the considerable advantage of most closely imitate lung infection and immunity as a whole, however, there is a paucity of *in vivo* models (conditional and inducible transgenic mice targeting bronchial/airway epithelial cells) allowing the study of BECs against *Aspergillus* challenge specifically.

ANTI-ASPERGILLUS PHYSICOCHEMICAL ACTIVITY EXHIBITED BY THE BRONCHIAL EPITHELIUM

Inhaled conidia first face the physical barriers of the upper airways that include the mouth, nose, larynx, and pharynx. Mucociliary clearance from the nasal walls and mechanical defenses such as coughing and sneezing help eliminate most of the inhaled particles. If the conidia pass these first barriers, they then arrive in the lower airways consisting of the trachea that divided into two-stem bronchial tubes, which in turn are subdivided into several smaller bronchial tubes, followed by bronchioles that end with the alveoli. The bronchial epithelium participates in the clearance of inhaled conidia to prevent their germination and growth locally. Secretory cells, including serous and goblet cells, together with submucosal glands, participate in the formation of mucus, which protects the epithelium from the inhaled particles. Basically, the mucus traps the inhaled particles, which are then actively transported by the beating of the cilia to the oropharynx where they are swallowed or expectorated. Under healthy conditions, mucus is composed of 97% water and 3% of mucins, non-mucin proteins, salts, lipids, and cellular debris (23). Mucins, namely MUC5AC and MUC5B, are the major macromolecular constituents of the mucus. They are large glycoproteins with serine-/threonine-rich domains linked

by their hydroxyl side groups to sugar chains forming a polymeric gel that ensure the properties of the mucus (24). Ciliated cells also play a fundamental role in the elimination of particles engulfed in the mucus because they mechanize the movement of the mucus blanket (25). The role of these physicochemical barriers associated with the bronchial epithelium can be better understood in patients suffering from CF or primary ciliary dyskinesia (PCD) in whom mucus properties and/or ciliary beating are impaired. Hence, CF patients are frequently colonized by *A. fumigatus* (14), and a similar trend has been noticed in patients with PCD (26). This machinery can also be altered by pathogens. Indeed, mycotoxins secreted by *A. fumigatus*, damage epithelial cells and inhibit ciliary beating (27). Among those toxins, gliotoxin has been extensively studied because it is the most abundant one produced by *A. fumigatus* and it exhibits immunosuppressive properties that have been described extensively in a previously reported review (28).

RECOGNITION OF ASPERGILLUS FUMIGATUS BY BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS

Schematically, the interaction between *Aspergillus fumigatus* and the BECs leads to three main types of cellular response: internalization, synthesis of cytokines/chemokines and release of bioactive molecules potentially active against *Aspergillus*. Specific interactions between *A. fumigatus* and BECs require close contact between the fungus and the cell-surface ligands. Fungal cell-wall polysaccharides and, to a lesser extent, some proteins or the genetic material (ADN or ARN) act as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). They are sensed through pathogen recognition receptors (PRRs), several of which but not all, have been identified in BECs (5) (Table 1).

TABLE 1 | Pattern recognition receptors (PRRs) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) involved in the recognition of *Aspergillus fumigatus* by bronchial epithelial cells and the consequences of their activation.

PRRs	<i>A. fumigatus</i> PAMPs	Cellular study model	Role in Anti- <i>Aspergillus</i> immunity on BECs	References
Dectin-1	β-D-Glucan	HBE cells	Internalization Pro-inflammatory cytokines and chemokines release Inflammasome activation ROS generation	(29)
TLR2	β-D-Glucan	HBE cells	IL-6 and IL-8 release Increase in Dectin-1 expression	(29)
MR	Mannose-rich polysaccharides		Not elicited	
Unknown	FleA (conidia)	BEAS-2B cells	IL-8 synthesis Inhibition of <i>Aspergillus fumigatus</i> germination of extracellular conidia Binding of conidia to mucins and to macrophages	(30–32)
TLR3	dsRNA (resting conidia)	Primary human BECs	Release of inflammatory mediators, interferon (IFN)- β and IFN- γ -inducible protein (IP)-10	(33)
TLR4	Unknown		Not elicited	(34, 35)
TLR9	Hypomethylated DNA		Not elicited	(34, 35)
Pentraxin 3	Galactomannan		Not elicited	(36)

BECs, Bronchial epithelial cells; IL, Interleukin; dsRNA, double stranded RNA; ROS, Reactive oxygen species; HBE cells, Papilloma virus-immortalized bronchial epithelial cell line.

A. fumigatus cell wall encompasses an inner and outer layer whose composition varies along with the fungus' life cycle (Figure 1). The outer part of the conidial surface is composed of hydrophobic RodA proteins that conceal an underlying fungal pigment, dihydroxynaphthalene (DHN) melanin (37). This outer layer plays a key role in conidial dispersion, their protection against external stress factors such as desiccation, physical damage, drugs, and UV radiation. They also mask the epitopes present in the underlying layer by inhibiting their recognition by the host's innate immune system (38–40). Whereas, dormant conidia are described as immunologically inert, the FleA lectin, a fucose-binding lectin expressed on their surface (30, 41), has been shown to mediate their binding both to the airway mucins produced by the epithelial cells and also to macrophages (31). Moreover, stimulation of BEAS-2B cells by FleA has been reported to lead to an increase in interleukin (IL)-8 synthesis and contributed to the inflammatory response (30). Thus, FleA acts as a PAMP-like molecule whose cellular ligands remain to be identified.

Under favorable conditions, the dormant conidia become metabolically active and ensue an increased intracellular osmotic pressure followed by water uptake and isodiametric growth (42). The resulting swollen conidia lose their rodlet layer by proteolytic degradation, and consequently, their hydrophobicity. This phenomenon is associated with a rupture of the melanin layer by a still-unknown mechanism (43). Then, the swollen conidia grow in a polarized way that leads to the formation of a germ tube. At this stage, the melanin layer is disrupted but the inner layer of the cell wall remains unchanged and participates in hyphal formation. The hyphae are mainly composed of galactosaminogalactan (GAG) that allows adhesion of the filaments to various biotic or abiotic surfaces (44, 45). Recent

studies have also shown that GAG, expressed during conidial germination, exhibits a possible anti-inflammatory effect. Indeed, GAG induces the release of the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), a potent anti-inflammatory cytokine that blocks IL-1 signaling (46), by macrophages and neutrophils. Furthermore, in a mouse model of aspergillosis, treatment by GAG before and during intranasally induced *A. fumigatus* infection inhibits neutrophil infiltration in the lung at the site of infection (6, 44, 46).

Regardless of the *A. fumigatus* morphotype, the inner layer, the so-called fibrillary core, is continuously composed of branched β -(1, 3)-glucan/ β -(1, 4)-glucan, chitin, galactomannan, and α -(1, 3)-glucan (43). A few studies have shown that, as already demonstrated for macrophages and digestive epithelial cells (47), Dectin-1 is a major but not the unique receptor for β -glucan on a papilloma virus-immortalized BEC cell line (HBE cells) (29). Dectin-1 is a transmembrane receptor and member of the C-type lectin receptor family (11). The role of Dectin-1 in the immune response against *A. fumigatus* has been highlighted in different *in vivo* studies. For example, immunocompetent mice lacking Dectin-1 are more sensitive to intratracheal challenge with *A. fumigatus* than control mice (48). In humans, mutations in Dectin-1 are associated with increased susceptibility to IPA (49). It has also been shown that immunocompromised mice, transfected to upregulate Dectin-1 expression in airway epithelial cells, have a lower fungal burden, an increase in the recruitment of neutrophils into the lungs and a greater survival rate in response to intratracheal injection of *A. fumigatus* conidia compared to the controls (50). After ligation of β -glucan to Dectin-1, two distinct signaling pathways are activated through the spleen tyrosine kinase (SYK)-caspase recruitment domain-containing protein 9 (CARD9) or through RAF-1 (51). These pathways act synergistically to induce nuclear factor- κ B

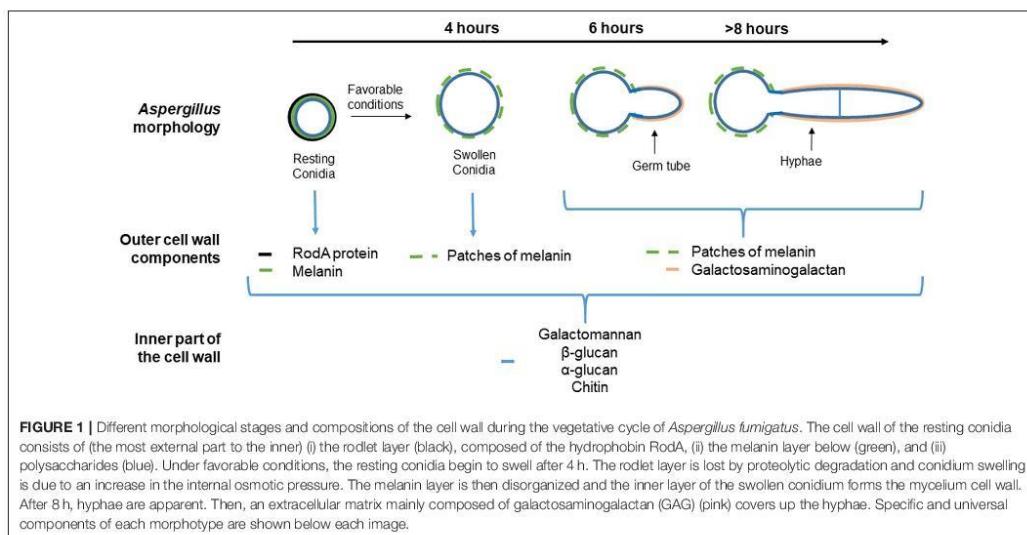


FIGURE 1 | Different morphological stages and compositions of the cell wall during the vegetative cycle of *Aspergillus fumigatus*. The cell wall of the resting conidia consists of (the most external part to the inner) (i) the rodlet layer (black), composed of the hydrophobic RodA, (ii) the melanin layer below (green), and (iii) polysaccharides (blue). Under favorable conditions, the resting conidia begin to swell after 4 h. The rodlet layer is lost by proteolytic degradation and conidium swelling is due to an increase in the internal osmotic pressure. The melanin layer is then disorganized and the inner layer of the swollen conidium forms the mycelium cell wall. After 8 h, hyphae are apparent. Then, an extracellular matrix mainly composed of galactosaminogalactan (GAG) (pink) covers up the hyphae. Specific and universal components of each morphotype are shown below each image.

activation and pro-inflammatory gene expression (52). The SYK-CARD9 pathway also activates the NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome, which results in the proteolytic activation of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 by caspase 1. The role of *A. fumigatus* antigens in this activation cascade has been demonstrated by Jeong et al. They showed that sensitized mice intratracheally challenged with *A. fumigatus* crude antigens displayed an increased in immunofluorescence intensities of NLRP3 and caspase-1 in lung tissue, particularly in epithelial cell layers, leading to an increase in IL1- β concentration in the lung tissue (53). Similar results were obtained by using an *in vitro* model utilizing primary human BECs stimulated with the same *A. fumigatus* antigens (53). The mannose receptor (MR) is another C-type lectin receptor involved in fungal, and notably *Aspergillus* conidia, recognition and is expressed by 16HBE cells and primary BECs (54). The MR recognizes carbohydrates rich in mannose typically produced by many microorganisms including fungi (55) but its immune-specific role against *A. fumigatus* in association with BECs has not been investigated.

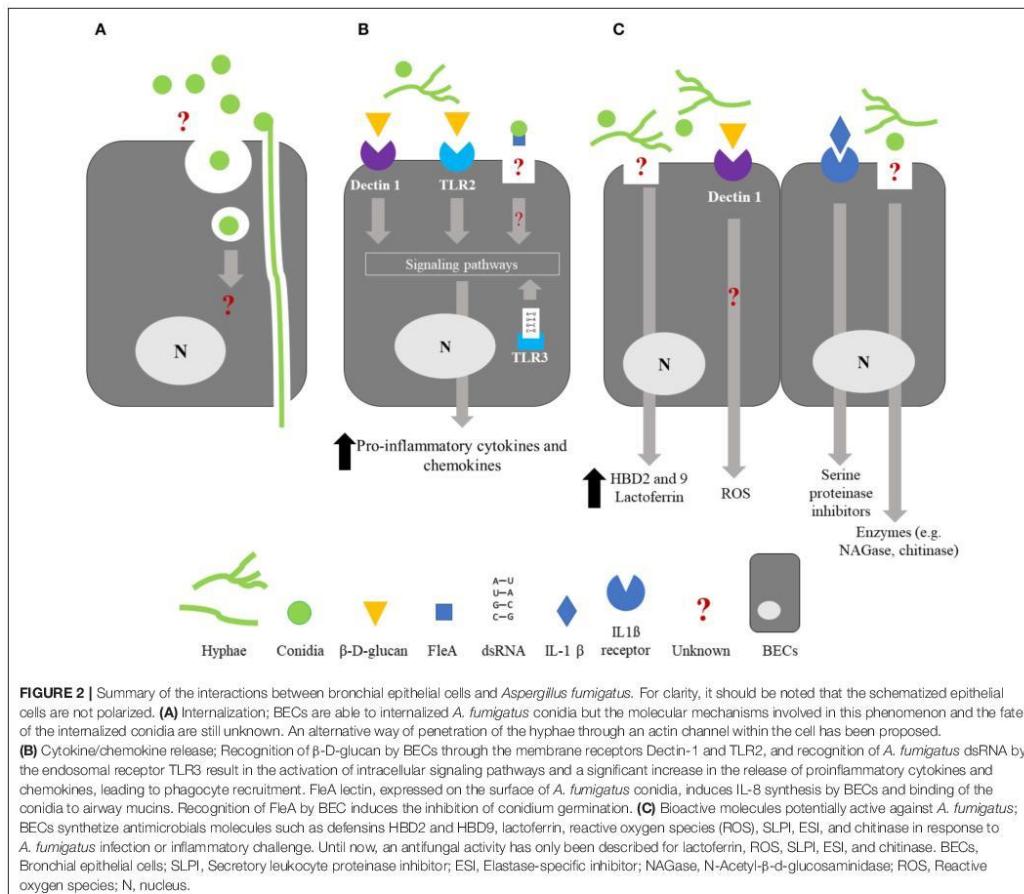
Toll-like receptors (TLRs) are another family of conserved PRRs (56). So far 10 different TLRs have been identified and described. TLR2, TLR4, and TLR9 are the main molecules involved in sensing fungal components (11, 57, 58). These receptors possess extracellular leucine-rich repeat ligand-binding domains and a conserved intracellular toll/IL-1R (TIR) signaling domain that induces specific signaling cascades through intracellular TIR containing adaptors such as MyD88. Interestingly, the expression of the 10 TLRs has been detected by reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction in two independent studies using human primary BECs (34, 35). Using a silencing method, it has been demonstrated that TLR2, in a heterodimer form with TLR1 or TLR6, is required for the expression of Dectin-1 by HBE cells in response to *A. fumigatus* infection (29). Moreover, blocking TLR2 with antibodies results in the inhibition of the release of IL-6 and IL-8 by BEAS-2B cells infected with *A. fumigatus* hyphal fragments (59). Certain polymorphisms in TLR4, receptor for the bacterial lipopolysaccharide, are clearly associated with increased susceptibility to invasive aspergillosis (60). TLR4 expressed by mouse macrophages, recognizes *A. fumigatus* conidia and hyphae and induces the release of pro-inflammatory molecules. However, after blocking TLR4 with a specific monoclonal antibody, Oya et al. failed to detect any significant change in the levels of IL-6 and IL-8 released by BEAS-2B cells infected with X-ray-treated hyphal fragments of *A. fumigatus* (59). Hypomethylated DNA, the natural ligand of TLR9, has been extracted in *A. fumigatus* hyphae (61). In murine model of invasive aspergillosis, Leiva-Juarez et al. revealed that therapeutic stimulation of lung epithelial defenses by inhalation of a synergistic combination of TLR 2/6 and TLR9 agonists robustly protects against the development of *A. fumigatus* lung infection despite the profound immune dysfunction (62). TLR9 is expressed by BECs (16HBE cells) (63) but its role in response to *Aspergillus* challenge remains to be investigated in the context of these cells. TLR3 is localized onto endosomal membranes and recognizes double-stranded (ds)RNA. It is

primarily involved in the recognition of viruses but has also been implicated in the recognition of *A. fumigatus* dsRNA of resting conidia (33). In this study, the infection by *Aspergillus* of human primary BECs cultivated either in submerged or in ALI culture system, induced the release of inflammatory mediators, notably interferon- β and interferon- γ -inducible protein-10, through TLR3 signaling. Interestingly, this induction is internalization dependent, as demonstrated by the use of an actin-polymerization inhibitor and observed only with killed resting conidia (heat- or UV light-inactivated).

Finally, pentraxin 3, a soluble PRR, plays a key role in the recognition, uptake, and killing of *Aspergillus* conidia by macrophages and dendritic cells through binding to galactomannan (64). This molecule can act as an opsonizing factor for activating the complement system and subsequent phagocytosis by macrophages (65). Pentraxin 3 is secreted by both human primary bronchial and BEAS-2B cells but, again, its precise role in these cell types has yet to be determined (36).

INTERNALIZATION OF ASPERGILLUS FUMIGATUS CONIDIA BY BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS

The alveolar epithelial cell line A549 has been extensively used to study conidia internalization by non-professional phagocytic cells (66–68). Wasylka and Moore described that internalized conidia fused with lysosomes and colocalized with lysosomal protein (Lysosomal-associated membrane protein 1 and CD63). Nonetheless, a significant percentage of internalized conidia persist and germinate in A549 epithelial cells. Little is known about the internalization by BECs and conflicting results have been published (Figure 2A). First, Paris et al., showed by microscopic observations that rabbit tracheal epithelial cells were able to internalize *A. fumigatus* conidia after 6 h of incubation and that conidia were enclosed in membrane-bound vacuoles (69). Then, other studies reported that the conidia of *A. fumigatus* were taken up *in vitro* by a human bronchial epithelial cell line cultured in monolayers (70, 71). Indeed, Clark et al. observed the internalization of 10 to 20% of the conidia in contact with BEAS-2B cells at 6 and 9 h after challenge. In comparison, 70% of conidia in contact with macrophages were internalized after 1 h incubation (71). A 41% internalization rate has also been reported with 16HBE cells after 6 h incubation (70). Overall, these results contrast with those from other studies that have considered the internalization by BECs a very minor phenomenon. By using a model of primary BECs grown in ALI culture system, Toor et al. showed that only 1% of the bound conidia were internalized 6 h after exposure (72). Similarly, Fernandes et al. were unable to demonstrate any case of internalization using primary BECs cultured in ALI (73). However, these authors described the formation, within the cell, of an actin tunnel not altering the viability of the penetrated cells (Figure 2A). The authors suggested that this event could explain the penetration of the hyphae into the underlying



parenchyma leading to the development of invasive infection in immunocompromised patients (73). It is noteworthy that the internalization of conidia by BECs was not seen 18 h after an intratracheal challenge in an immunosuppressed mouse model (74). The molecular mechanism(s) involved in the internalization of *Aspergillus* conidia by BECs remains incompletely understood. Adhesion of conidia onto BECs induces actin polymerization (75), a phenomenon dependent on the activity of the human actin reorganization complex 2 and 3, regulated by Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting proteins (76). Using the BEAS-2B cell line, Clark et al. identified 7 host markers—caveolin, flotillin-2, RAB5C, RAB8B, RAB7A, 2xFYVE, and FAPP1—that consistently localized around the internalized conidia (71).

Even if the internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by BECs is a rare event, however, it could represent a starting point of invasive forms in immunosuppressed patients. The

fate of the internalized conidia is still unknown and one can postulate that some of them remain quiescent within the cells until they reactivate, thanks to iatrogenic immunosuppression (77). This could explain the breakthrough of some invasive aspergillosis cases occurring in immunocompromised patients otherwise protected from contamination from the ambient air using a high-efficiency particulate air filter chamber (78).

SYNTHESIS AND RELEASE OF BIOACTIVE MOLECULES BY BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS INFECTED WITH ASPERGILLUS FUMIGATUS

Cytokine/Chemokine Synthesis

One of the most studied consequences of PAMP/PRR interaction is the induction of cytokine/chemokine synthesis. Several studies

have shown that infection of BECs with *Aspergillus fumigatus* leads to the release of pro-inflammatory cytokines, mostly IL-6, IL-8, or tumor necrosis factor- α provided that the infection time is more than 6 h and allows conidia germination (79–81) (Figure 2B). Hence, after 6 h of incubation, expression (mRNA) of not only tumor necrosis factor- α and IL-8 but also granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) in HBE cells exposed to *A. fumigatus* conidia, is significantly increased by 8 to 14 times in regards to non-infected cells (29). Similarly, BEAS-2B cells release an increased amount of IL-8, 8 h after having been infected with *A. fumigatus* conidia, at a time corresponding to the hyphal formation (79) (Figure 1). In contrast, IL-8 synthesis was not triggered 15 h post-infection in BEAS-2B cells infected with a mutant strain of *A. fumigatus* unable to germinate (79). Considering the differences in the cell-wall content between the conidial and hyphal stages, these observations strongly suggest a role for some parietal molecules in masking resting conidia, avoiding their recognition by the BECs. RodA hydrophobin, whose masking role toward immune cells has been mentioned above, could be involved but, to the best of our knowledge, this hiding role toward BECs has never been checked.

Inflammatory mediators act synergistically to establish an organized and regulated host response against *Aspergillus fumigatus*. For example, IL-8, also known as CXCL-8, is a chemokine exhibiting a pleiotropic effect on neutrophils: strong chemotactic influence, degranulation of lysosomes with release of enzymes within the phagosome, production of reactive oxygen species (ROS), and increased expression of adhesion molecules (82). GM-CSF acts both as a hematopoietic growth factor favoring the proliferation and differentiation of myeloid cells into mature cells such as neutrophils and macrophages, and as an enhancer of the antimicrobial functions of those cells. Very recently, our group demonstrated that the inflammatory response of BEAS-2B cells and human primary BECs against *A. fumigatus* could be reprogrammed after the first contact with a microbial ligand, in this case *Pseudomonas aeruginosa* flagellin (81). Pre-stimulation with this TLR5 ligand led to a significantly enhanced release of two proinflammatory cytokines, IL-6 and IL-8, after an *A. fumigatus* challenge. This is comparable to the phenomenon called trained immunity or innate immune memory that has been largely studied using monocytes/macrophages (83–85).

Molecules Potentially Active Against *Aspergillus fumigatus*

Antimicrobial peptides (AMPs) are cationic small-peptide chains that exhibit antimicrobial activity against a variety of pathogens including fungi (86). Although membrane permeabilization is the main mechanism of action of AMPs against pathogens, additional mechanisms have been described including inhibition of macromolecular synthesis (87). Under basal conditions, BECs release a number of AMPs or proteins, some of which exhibit potential antifungal activity (Figure 2C).

The defensin family, divided into three classes (α -, β -, and θ -defensins), includes broad-spectrum antimicrobial peptides that are evolutionarily conserved across the living world (88).

Human β -defensins are a characteristic of epithelial tissues and present a constitutive expression in primary human BECs (89). Human β -defensin 2 and human β -defensin 9 are reported to be highly expressed by BECs (HBE and 16HBE cells) exposed to different morphotypes of *A. fumigatus* (29, 90). Lactoferrin is a protein synthesized and released by 16HBE cells (91). Interestingly, according to Lupetti et al., a synthetic peptide based on the human lactoferrin sequence but containing only the first cationic domain is one of the most potent antimicrobial peptides against *A. fumigatus* hyphae and conidia *in vitro* (92). Lactoferrin can also act by reducing the toxic effect on host cells (cytotoxicity, oxidation level, and DNA damage) of aflatoxin, a mycotoxin synthesized by *Aspergillus* (93). Secretory leukocyte proteinase inhibitor (SPLI), also called anti-leukoprotease or mucus proteinase inhibitor, and elastase-specific inhibitor (or elafin and trappin-2) are two serine proteinase inhibitors constitutively secreted from the airway epithelium (94). Both are secreted by BECs in response to pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β (95, 96). Different biological functions have been reported for these molecules: protection of the lungs against the damage induced by neutrophil serine proteases and also antimicrobial activity notably against fungi like *A. fumigatus* (97, 98). However, these proteins are not considered as AMPs because their size, 11.7 and 9.9 kDa for SPLI and elastase-specific inhibitor respectively, are too large to be classified as peptides.

Interestingly, BEAS-2B and HBE cells are also able to produce ROS (29, 99). In their study on BECs challenged with *A. fumigatus*, Sun et al. showed that conidia induced ROS generation in a Dectin-1-dependent manner after 6 h of infection (29). ROS are known to be produced by neutrophils thanks to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase produced in response to germinating *A. fumigatus* challenge (100, 101). They are released from granules either into phagosomes or into the extracellular environment, inducing damage to *Aspergillus* (6). But until now, the precise role of ROS produced by BECs in antifungal activity remains undetermined.

The study of the secretome of BEAS-2B cells infected with *A. fumigatus* also gave more insight into the role of some molecules that may possibly act against the fungal infection (102). Among the most significant results, Fekkar et al. found the release of lysosomal enzymes such as N-Acetyl- β -d-glucosaminidase, cathepsin B, and cathepsin D. N-Acetyl- β -d-glucosaminidase is responsible for the hydrolysis of glycosidic bonds. Cathepsin B and D, members of the lysosomal cysteine protease family, are known to acidify the phagosome of macrophages but their role in BECs has not been determined yet. Chitinase, a member of N-Acetyl- β -d-glucosaminidase, degrades the major fungal-wall component chitin and as such could play a role in the control of *Aspergillus* infection (103, 104).

At this time, not all the active molecules may have been described. Recently, Richard et al. reported that BEAS-2B cells prevent the germination of conidia without internalization but failed to demonstrate the role of any soluble compound present in the supernatants of infected cells (32). This antifungal activity of BECs is fungistatic and occurs via a mechanism that is phosphoinositide 3-kinase dependent. The same kind

of observation was made by Clark et al. who found that after infecting BEAS-2B cells with *A. fumigatus* conidia, a large subset of conidia is rendered metabolically inactive, as measured with the metabolic marker FUN-1, while not being internalized by the cells (71).

CONCLUSION

The evidence of BECs playing an important role in the innate immunity-based defense mechanism against *Aspergillus fumigatus* is now growing. Recent studies have been able to demonstrate that, in addition to the production of mucus and ciliary beating that allow the clearance of the conidia, BECs are directly involved in an immune response against *A. fumigatus* through the recognition of fungal cell-wall components, mainly polysaccharides, by cellular ligands such as Dectin-1 or TLRs. There is a consensus for a pro-inflammatory response by BECs stimulated by *A. fumigatus*. However, additional studies are needed to better decipher BECs response. Studies focused on the internalization of the conidia by BECs reported divergent results according to the study model. This warrants further studies to clarify this point such as the investigation of the fate of the internalized

conidia that could play a role in the future development of invasive aspergillosis. Different types of AMPs are also produced by BECs, some of them being active directly or indirectly against *Aspergillus*, making these molecules appealing for new therapeutic approaches. Overall, the bronchial epithelium appears as a suitable target for novel therapeutic strategies aiming to restore barrier integrity and to enhance defenses against inhaled pathogens.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JB, VB, and CH: drafting of the manuscript. JB, VB, CH, LG, JG, MR, and HC: revision of the manuscript.

FUNDING

VB received grants from Vaincre la mucoviscidose RF20170501940 and RF20190502450.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to dedicate this paper in the honor of their deceased colleague and friend, Michel Chignard.

REFERENCES

- Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev.* (2019) 33:e00140-18. doi: 10.1128/CMR.00140-18
- Samsom RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* (2014) 78:141–73. doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.004
- Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb Biotechnol.* (2017) 10:296–322. doi: 10.1111/1751-7915.12367
- Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* (1999) 12:310–50. doi: 10.1128/CMR.12.2.310
- van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol.* (2017) 15:661–74. doi: 10.1038/nrmicro.2017.90
- Cunha C, Kurzai O, Löfler J, Aversa F, Romani L, Carvalho A. Neutrophil responses to aspergillosis: new roles for old players. *Mycopathologia.* (2014) 178:887–93. doi: 10.1007/s11046-014-9796-7
- Ballyo Y, Huerre M, Latgé JP, Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* (2005) 73:494–503. doi: 10.1128/IAI.73.1.494-503.2003
- Nawada R, Amitani R, Tanaka E, Niimi A, Suzuki K, Murayama T, et al. Murine model of invasive pulmonary aspergillosis following an earlier stage, noninvasive *Aspergillus* infection. *J Clin Microbiol.* (1996) 34:1433–9. doi: 10.1128/JCM.34.6.1433-1439.1996
- Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boletti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, et al. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun.* (2003) 71:891–903. doi: 10.1128/IAI.71.2.891-903.2003
- Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prévost MC, Gougerot-Pocidalo MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun.* (2003) 71:3034–42. doi: 10.1128/IAI.71.6.3034-3042.2003
- Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* (2011) 11:275–88. doi: 10.1038/nri2939
- Brandt C, Roehmel J, Rickerts V, Melichar V, Niemann N, Schwarz C. *Aspergillus* bronchitis in patients with cystic fibrosis. *Mycopathologia.* (2018) 183:61–9. doi: 10.1007/s11046-017-0190-0
- Zhao J, Cheng W, He X, Liu Y. The Co-colonization prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathog.* (2018) 125:122–28. doi: 10.1016/j.micpath.2018.09.010
- Armstead J, Morris J, Denning DW. Multi-country estimate of different manifestations of aspergillosis in cystic fibrosis. *PLoS ONE.* (2014) 9:e98502. doi: 10.1371/journal.pone.0098502
- Gago S, Denning DW, Bowyer P. Pathophysiological aspects of *Aspergillus* colonization in disease. *Med Mycol.* (2019) 57(Suppl. 2):S219–27. doi: 10.1093/mmy/myy076
- Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutson AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis—state of the art: cystic fibrosis foundation consensus conference. *Clin Infect Dis.* (2003) 37(Suppl. 3):S225–64. doi: 10.1086/376525
- Agarwal R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest.* (2009) 135:805–26. doi: 10.1378/chest.08-2586
- Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JE, Su RT, et al. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* (1988) 48:1904–9.
- Gruenert DC, Basbaum CB, Welsh MJ, Li M, Finkbeiner WE, Nadel JA. Characterization of human tracheal epithelial cells transformed by an origin-defective Simian virus 40. *Proceedings Natl Acad Sci USA.* (1988) 85:5951–5. doi: 10.1073/pnas.85.16.5951
- Hiemstra PS, Grootenhuis G, van der Does AM, Krul CAM, Kooter IM. Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: lessons learned and future directions. *Toxicology In Vitro.* (2018) 47:137–46. doi: 10.1016/j.tiv.2017.11.005
- Gray TE, Guzman K, Davis CW, Abdullah LH, Nettesheim P. Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (1996) 14:104–12. doi: 10.1165/ajrcmb.14.1.8534481
- Desoubeaux G, Cray C. Rodent models of invasive aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus*: still a long path toward standardization.

- Front Microbiol. (2017) 8:841. doi: 10.3389/fmicb.2017.00841
23. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med.* (2010) 363:2233–47. doi: 10.1056/NEJMra0910061
24. Cowley AC, Thornton DJ, Denning DW, Horsley A. Aspergillosis and the role of mucins in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* (2017) 52:548–55. doi: 10.1002/ppul.23618
25. Yaghi A, Dolovich MB. Airway epithelial cell cilia and obstructive lung disease. *Cells.* (2016) 5:40. doi: 10.3390/cells5040040
26. Sehgal IS, Dhooria S, Bal A, Agarwal R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in an adult with Kartagener syndrome. *BMJ Case Rep.* (2015) 2015:bcr.2015-211493. doi: 10.1136/bcr-2015-211493
27. Chotirmall SH, Mirkovic B, Lavelle GM, McElvaney NG. Immuno-evasive *Aspergillus* virulence factors. *Mycopathologia.* (2014) 178:363–70. doi: 10.1007/s1046-014-9768-y
28. Arias M, Santiago I, Vidal-Garcia M, Redrado S, Lanuza P, Comas I, et al. Preparations for invasion: modulation of host lung immunity during pulmonary aspergillosis by gliotoxin and other fungal secondary metabolites. *Front Immunol.* (2018) 9:2549. doi: 10.3389/fimmu.2018.02549
29. Sun WK, Lu X, Li X, Sun QY, Su X, Song Y, et al. Dectin-1 is inducible and plays a crucial role in *Aspergillus*-induced innate immune responses in human bronchial epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (2012) 31:2755–64. doi: 10.1007/s10096-012-1624-8
30. Houser J, Komarek J, Kostlanova N, Cioci G, Varrot A, Kerr SC, et al. A soluble fucose-specific lectin from *Aspergillus fumigatus* conidia - structure, specificity and possible role in fungal pathogenicity. *PLoS ONE.* (2013) 8:e83077. doi: 10.1371/journal.pone.0083077
31. Kerr SC, Fischer GJ, Sinha M, McCabe P, Palmer JM, Choera T, et al. FleA expression in *Aspergillus fumigatus* is recognized by fucosylated structures on mucins and macrophages to prevent lung infection. *PLoS Pathog.* (2016) 12:e1005555. doi: 10.1371/journal.ppat.1005555
32. Richard N, Marti L, Varrot A, Guillot L, Guitard J, Hennequin C, et al. Human bronchial epithelial cells inhibit *Aspergillus fumigatus* germination of extracellular conidia via FleA recognition. *Sci Rep.* (2018) 8:15699. doi: 10.1038/s41598-018-33902-0
33. Beisswenger C, Hess C, Bals R. *Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon- β signalling in respiratory epithelial cells. *Eur Respir J.* (2012) 39:411–8. doi: 10.1183/09031936.00096110
34. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2004) 31:358–64. doi: 10.1165/rccm.2003-0388OC
35. Mayer AK, Muehmer M, Mages J, Gueinzius K, Hess C, Heeg K, et al. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* (2007) 178:3134–42. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.3134
36. Han B, Mura M, Andrade CF, Okutani D, Lodyga M, dos Santos CC, et al. TNF α -induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. *J Immunol.* (2005) 175:8303–11. doi: 10.4049/jimmunol.175.12.8303
37. Baltussen TJH, Zoll J, Verweij PE, Melchers WJG. Molecular mechanisms of conidial germination in *Aspergillus* spp. *Microbiol Mol Biol Rev.* (2020) 84:e00049-19. doi: 10.1128/MMBR.00049-19
38. Bayry J, Beaussart A, Dufrêne YF, Sharma M, Bansal K, Kniemeyer O, et al. Surface structure characterization of *Aspergillus fumigatus* conidia mutated in the melanin synthesis pathway and their human cellular immune response. *Infect Immun.* (2014) 82:3141–53. doi: 10.1128/IAI.01726-14
39. Valsecchi I, Dupres V, Stephen-Victor E, Guijarro JL, Gibbons J, Beau R, et al. Role of hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*. *J Fungi.* (2018) 4:2. doi: 10.3390/jof4010002
40. Aimananda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature.* (2009) 460:1117–21. doi: 10.1038/nature08264
41. Kubota S, Ishimaru T, Tamada S, Bernard EM, Perlin DS, Armstrong D. Molecular characterization of AfuFleA, an L-fucose-specific lectin from *Aspergillus fumigatus*. *J Infect Chemother.* (2013) 19:1021–8. doi: 10.1007/s10156-013-0614-9
42. Taubitz A, Bauer B, Heesemann J, Ebel F. Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Curr Microbiol.* (2007) 54:354. doi: 10.1007/s00284-006-0413-y
43. Latgé JP, Beauvais A, Chamios G. The cell wall of the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: biosynthesis, organization, immune response, and virulence. *Annu Rev Microbiol.* (2017) 71:99–116. doi: 10.1146/annurev-micro-030117-020406
44. Fontaine T, Delangle A, Simenel C, Coddeville B, van Vliet SJ, van Kooyk Y, et al. Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* (2011) 7:e1002372. doi: 10.1371/journal.ppat.1002372
45. Gravelat FN, Beauvais A, Liu H, Lee MJ, Snarr BD, Chen D, et al. *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal β -glucan from the immune system. *PLoS Pathog.* (2013) 9:e1003575. doi: 10.1371/journal.ppat.1003575
46. Gresnigt MS, Bozza S, Becker KL, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, van der Berg WB, et al. A polysaccharide virulence factor from *Aspergillus fumigatus* elicits anti-inflammatory effects through induction of interleukin-1 receptor antagonist. *PLoS Pathog.* (2014) 10:e1003936. doi: 10.1371/journal.ppat.1003936
47. Goyal S, Castrillón-Betancur JC, Klaila E, Slevogt H. The interaction of human pathogenic fungi with C-type lectin receptors. *Front Immunol.* (2018) 9:1261. doi: 10.3389/fimmu.2018.01261
48. Werner JL, Metz AE, Horn D, Schoeb TR, Hewitt MM, Schwiebert LM, et al. Requisite role for the Dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol.* (2009) 182:4938–45. doi: 10.4049/jimmunol.0804250
49. Sainz J, Lupiáñez CB, Segura-Catena J, Vazquez L, Ríos R, Oyonarte S, et al. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary aspergillosis infection. *PLoS ONE.* (2012) 7:e32273. doi: 10.1371/journal.pone.0032273
50. Liu ZC, Wang M, Sun WK, Xia D, Tan MM, Ding Y, et al. Up-regulation of Dectin-1 in airway epithelial cells promotes mice defense against invasive pulmonary aspergillosis. *Int J Clin Exp Med.* (2015) 8:17489–97.
51. Drummond RA, Brown GD. The role of dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr Opin Microbiol.* (2011) 14:392–9. doi: 10.1016/j.mib.2011.07.001
52. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol.* (2009) 9:465–79. doi: 10.1038/nri2569
53. Jeong JS, Lee KB, Kim SR, Kim DI, Park HJ, Lee HK, et al. Airway epithelial phosphoinositide 3-kinase- δ contributes to the modulation of fungi-induced innate immune response. *Thorax.* (2018) 73:758–68. doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-210326
54. Michael CE, Waters CM, LeMessurier KS, Samarasringhe AE, Song CY, Malik KU, et al. Airway epithelial repair by a prebiotic mannan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Immunol Res.* (2017) 2017:8903982. doi: 10.1155/2017/8903982
55. Gazi U, Martinez-Pomares L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology.* (2009) 214:554–61. doi: 10.1016/j.imbio.2008.11.004
56. De Nardo D. Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine.* (2015) 74:181–9. doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.025
57. Balloy M, Si-Tahar M, Takeuchi O, Philippe B, Nahori MA, Tanguy M, et al. Involvement of toll-like receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* (2005) 73:5420–5. doi: 10.1128/IAI.73.9.5420-5425.2005
58. Chignard M, Balloy V, Sallenave JM, Si-Tahar M. Role of toll-like receptors in lung innate defense against invasive aspergillosis. Distinct impact in immunocompetent and immunocompromized hosts. *Clin Immunol.* (2007) 124:238–43. doi: 10.1016/j.clim.2007.05.004
59. Oya E, Becher R, Ekeren L, Afanou AKJ, Øvrevik J, Holme JA. Pro-Inflammatory responses in human bronchial epithelial cells induced by spores and hyphal fragments of common damp indoor molds. *Int J Environ Res Public Health.* (2019) 16:1085. doi: 10.3390/ijerph16061085
60. Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis

- in stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* (2008) 359:1766–77. doi: 10.1056/NEJMoa0802629
61. Ramirez-Ortiz ZG, Specht CA, Wang JP, Lee CK, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, et al. Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. *Infect Immun.* (2008) 76:2123–9. doi: 10.1128/IAI.00047-08
 62. Leiva-Juárez MM, Ware HH, Kulkarni VV, Zweidler-McKay PA, Tuvin MJ, Evans SE. Inducible epithelial resistance protects mice against leukemia-associated pneumonia. *Blood.* (2016) 128:982–92. doi: 10.1182/blood-2016-03-708511
 63. Greene CM, Carroll TP, Smith SG, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, et al. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol.* (2005) 174:1638–46. doi: 10.4049/jimmunol.174.3.1638
 64. Garofalo C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature.* (2002) 420:182–6. doi: 10.1038/nature01195
 65. Bozza S, Campo S, Arseni B, Inforzato A, Ragnar L, Bottazzi B, et al. PTX3 binds MD-2 and promotes TRIF-dependent immune protection in aspergillosis. *J Immunol.* (2014) 193:2340–8. doi: 10.4049/jimmunol.1400814
 66. Wasylska JA, Moore MM. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. *J Cell Sci.* (2003) 116:1579–87. doi: 10.1242/jcs.00329
 67. DeHart DJ, Agwu DE, Julian NC, Washburn RG. Binding and germination of *Aspergillus fumigatus* conidia on cultured A549 pneumocytes. *J Infect Dis.* (1997) 175:146–50. doi: 10.1093/infdis/175.1.146
 68. Zhang Z, Liu R, Noordhoek JA, Kauffman HF. Interaction of airway epithelial cells (A549) with spores and mycelium of *Aspergillus fumigatus*. *J Infect.* (2005) 51:375–82. doi: 10.1016/j.jinf.2004.12.012
 69. Paris S, Boisvieux-Ulrich E, Crestani B, Houcine O, Taramelli D, Lombardi L, et al. Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infect Immun.* (1997) 65:1510–14. doi: 10.1128/IAI.65.4.1510-1514.1997
 70. Gomez P, Hackett TL, Moore MM, Knight DA, Tebbutt SJ. Functional genomics of human bronchial epithelial cells directly interacting with conidia of *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics.* (2010) 11:358. doi: 10.1186/1471-2161-11-358
 71. Clark HR, Powell AB, Simmons KA, Ayubi T, Kale SD. Endocytic markers associated with the internalization and processing of *Aspergillus fumigatus* conidia by BEAS-2B cells. *mSphere.* (2019) 4:e00663-18. doi: 10.1128/mSphere.00663-18
 72. Toor A, Culibrk L, Singhera GK, Moon KM, Prudova A, Foster LJ, et al. Transcriptomic and proteomic host response to *Aspergillus fumigatus* conidia in an air-liquid interface model of human bronchial epithelium. *PLoS ONE.* (2018) 13:e0209652. doi: 10.1371/journal.pone.0209652
 73. Fernandes J, Hamidi F, Leborgne R, Bear R, Castier Y, Mordant P, et al. Penetration of the human pulmonary epithelium by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Infect Dis.* (2018) 218:1306–13. doi: 10.1093/infdis/jiy298
 74. Ramaert B, Jouviron G, de Chaumont F, Garcia-Hermoso D, Szczepaniak C, Renaudat C, et al. Absence of fungal spore internalization by bronchial epithelium in mouse models evidenced by new bioimaging approach and transmission electron microscopy. *Am J Pathol.* (2015) 185:2421–30. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.04.027
 75. Croft CA, Culibrk L, Moore MM, Tebbutt SJ. Interactions of *Aspergillus fumigatus* conidia with airway epithelial cells: a critical review. *Front Microbiol.* (2016) 7:472. doi: 10.3389/fmicb.2016.00472
 76. Culibrk L, Croft CA, Too A, Yang SJ, Singhera GK, Dorschel DR, et al. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* by human bronchial epithelial cells is mediated by the Arp2/3 complex and WIPF2. *Front Cell Infect Microbiol.* (2019) 9:16. doi: 10.3389/fcimb.2019.00016
 77. Amitani R, Kawanami R. Interaction of *Aspergillus* with human respiratory mucosa: a study with organ culture model. *Med Mycol.* (2009) 47(Suppl. 1):S127–31. doi: 10.1080/13693780802558959
 78. Roilides E, Simitopoulou M. Local innate host response and filamentous fungi in patients with cystic fibrosis. *Med Mycol.* (2010) 48:S22–31. doi: 10.3109/13693786.2010.511286
 79. Balloy V, Sallenave JM, Wu Y, Touqui L, Latgé JP, Si-Tahar M, et al. *Aspergillus fumigatus*-induced interleukin-8 synthesis by respiratory epithelial cells is controlled by the phosphatidylinositol 3-kinase, P38 MAPK, and ERK1/2 pathways and not by the toll-like receptor-MyD88 pathway. *J Biol Chem.* (2008) 283:30513–21. doi: 10.1074/jbc.M803149200
 80. Tomee JF, Wierenga AT, Hiemstra PS, Kauffman HK. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J Infect Dis.* (1997) 176:300–3. doi: 10.1086/517272
 81. Bigot J, Guillot L, Guitard J, Ruffin M, Corvol H, Chignard M, et al. Respiratory epithelial cells can remember infection: a proof of concept study. *J Infect Dis.* (2019) 221:1000–5. doi: 10.1093/infdis/jiz569
 82. Balloy V, Chignard M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* (2009) 11:919–27. doi: 10.1016/j.micinf.2009.07.002
 83. Ifrim DC, Quintin J, Joosten LAB, Jacobs C, Jansen T, Jacobs L, et al. Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. *Clin Vaccine Immunol.* (2014) 21:534–45. doi: 10.1128/CVI.00688-13
 84. Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe.* (2011) 9:355–61. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.006
 85. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science.* (2016) 352:aaf1098. doi: 10.1126/science.aaf1098
 86. Kang HK, Kim C, Seo CH, Park Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J Microbiol.* (2017) 55:1–12. doi: 10.1007/s12275-017-6452-1
 87. Sierra JM, Fuster E, Rabanal F, Vinuesa T, Viñas M. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opin Biol Ther.* (2017) 17:663–76. doi: 10.1080/14712598.2017.1315402
 88. Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol.* (1997) 34:343–54.
 89. Arnason JW, Murphy JC, Kooi C, Wiehler S, Traves SL, Shelford C, et al. Human β-defensin-2 production upon viral and bacterial co-infection is attenuated in COPD. *PLoS ONE.* (2017) 12:e0175963. doi: 10.1371/journal.pone.0175963
 90. Alekseeva L, Huet D, Féminéa F, Mouyna I, Abdelouahab M, Cagna A, et al. Inducible expression of beta defensins by human respiratory epithelial cells exposed to *Aspergillus fumigatus* organisms. *BMC Microbiol.* (2009) 9:33. doi: 10.1186/1471-2180-9-33
 91. van den Berghe M, Jonker MR, Miller-Larsson A, Postma DS, Heijink I. H. Effects of fluticasone propionate and budesonide on the expression of immune defense genes in bronchial epithelial cells. *Pulmon Pharmacol Ther.* (2018) 50:47–56. doi: 10.1016/j.pupt.2018.04.002
 92. Lupetti A, van Dissel JT, Brouwer CR, Nibbering PH. Human antimicrobial peptides' antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (2008) 27:1125–9. doi: 10.1007/s10096-008-0553-z
 93. Zheng N, Zhang H, Li S, Wang J, Liu J, Ren H, et al. Lactoferrin inhibits aflatoxin B1- and aflatoxin M1-induced cytotoxicity and DNA damage in Caco-2, HEK, Hep-G2, SK-N-SH cells. *Toxicol.* (2018) 150:77–85. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.04.017
 94. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM, SLPI and Elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci.* (2006) 110:21–35. doi: 10.1042/CS20050115
 95. Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (1994) 11:733–41. doi: 10.1165/ajrcmb.11.67946401
 96. Sallenave JM. Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2010) 42:635–43. doi: 10.1165/rcmb.2010-0095RT
 97. Baranger K, Zani ML, Chandenier J, Dallet-Choisy S, Moreau T. The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (Pre-Elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *FEBS J.* (2008) 275:2008–20. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06355.x

98. Tomee JF, Hiemstra PS, Heinzle-Wieland R, Kauffman HF. Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *J Infect Dis.* (1997) 176:740–7. doi: 10.1086/514098
99. Chan TK, Tan WSD, Peh HY, Wong WSF. Aeroallergens induce reactive oxygen species production and DNA damage and dampen antioxidant responses in bronchial epithelial cells. *J Immunol.* (2017) 199:39–47. doi: 10.4049/jimmunol.1600657
100. Imbert S, Bresler P, Boissonnas A, Gauthier L, Souchet L, Uzunov M, et al. Calcineurin inhibitors impair neutrophil activity against *Aspergillus fumigatus* in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Allergy Clin Immunol.* (2016) 138:860–8. doi: 10.1016/j.jaci.2016.02.026
101. Chotirmall SH, Al-Alawi M, Mirkovic B, Lavelle G, Logan PM, Greene CM, et al. *Aspergillus*-associated airway disease, inflammation, and the innate immune response. *Biomed Res Int.* (2013) 2013:723129. doi: 10.1155/2013/723129
102. Fekkar A, Balloy V, Pionneau C, Marinach-Patrice C, Chignard M, Mazier D. Secretome of human bronchial epithelial cells in response to the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* analyzed by differential in-gel electrophoresis. *J Infect Dis.* (2012) 205:1163–72. doi: 10.1093/infdis/jis031
103. Karamanos Y. Endo-N-Acetyl- β -D-glucosaminidases and their potential substrates : structure/function relationships. *Res Microbiol.* (1997) 148:661–71. doi: 10.1016/S0923-2508(97)80065-5
104. Chen L, Shen Z, Wu J. Expression, purification and *in vitro* antifungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains. *Clin Exp Dermatol.* (2009) 34:55–60. doi: 10.1111/j.1365-2230.2008.03092.x

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Bigot, Guillot, Guitard, Ruffin, Corvol, Balloy and Hennequin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II- Annexe 2 : Etude de l'impact de la pré-infection des cellules épithéliales respiratoires par *Pseudomonas aeruginosa* sur le risque de développer une forme sévère de COVID-19

1. Contexte scientifique et objectifs

La pandémie de COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) est causée par un coronavirus, le SARS-CoV-2 (*syndrome acute respiratory syndrome-coronavirus 2*), et met en péril la santé de la population mondiale. A la date du 24 avril 2021, le SARS-CoV-2 a infecté plus de 145 millions de personnes dans le monde et entraîné environ 3 millions de décès (<https://covid19.who.int>). La défaillance respiratoire, à l'origine de la mortalité chez les patients atteints de COVID-19, est caractérisée par une production massive de molécules inflammatoires et une altération de la structure de la barrière épithéliale au niveau pulmonaire. Le SARS-CoV-2 infecte l'hôte *via* le récepteur ACE2 (récepteur à l'*Angiotensin-Converting Enzyme 2*) et les protéases TMPRSS2 (*transmembrane protease serine 2*) et FURIN, exprimés par les cellules épithéliales respiratoires. La réponse inflammatoire des cellules épithéliales peut faciliter la résolution de l'infection au SARS-CoV-2, cependant, si elle est dérégulée par une pathologie sous-jacente, elle peut participer à l'aggravation des symptômes. Chez les patients atteints de pathologies respiratoires chroniques, comme la mucoviscidose (CF), les infections bactériennes pré-existantes et la présence d'un épithélium respiratoire fragilisé pourraient favoriser la survenue d'infection au SARS-CoV-2 et/ou être un facteur de risque d'augmentation de la sévérité de la COVID-19. La fonction pulmonaire des patients CF se détériore au cours de leur vie suite aux exacerbations pulmonaires, souvent dues à des infections à *P. aeruginosa*. En effet, *P. aeruginosa* est l'une des bactéries les plus couramment isolées dans les crachats de patients CF et les cellules épithéliales des voies aériennes jouent un rôle essentiel dans la défense antimicrobienne. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle l'état infectieux sous-jacent des patients CF pourrait contribuer à déréguler la réponse à l'infection au SARS-CoV-2.

Notre objectif était donc de déterminer si une pré-infection à *P. aeruginosa* affecte la réponse des cellules épithéliales bronchiques au SARS-CoV-2.

2. Résultats

Nos expériences montrent que la bactérie *P. aeruginosa* et la flagelline, une protéine constituant le flagelle et décrite comme l'un des plus importants facteurs de virulence de la bactérie, sont capables d'augmenter l'expression de la protéine TMPRSS2 dans les cellules épithéliales bronchiques, en particulier celles des patients atteint de mucoviscidose, par l'activation du TLR5 et de p38. Cette augmentation de TMPRSS2 s'accompagne d'une augmentation de l'infectivité des cellules par le SARS-CoV-2. Ces résultats suggèrent qu'une pré-infection à *P. aeruginosa* pourrait augmenter la

susceptibilité des cellules à être infectées par le SARS-CoV-2. Ces résultats ont été soumis en avril 2021 dans *Cell Discovery*.

Flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* modulates SARS-CoV-2 infectivity in CF airway epithelial cells by increasing TMPRSS2 expression

Manon Ruffin^{1*}, Jeanne Bigot^{1,2*}, Claire Calmel¹, Julia Mercier¹, Andrés Pizzorno³, Manuel Rosa-Calatrava³, Harriet Corvol^{1,4}, Viviane Balloy¹, Olivier Terrier³ and Loïc Guillot^{1#}

¹Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France

²Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

³CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Team VirPath, Université de Lyon, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, 69007 Lyon, France

⁴Pneumologie Pédiatrique, APHP, Hôpital Trousseau, Paris, France

*These authors contributed equally to this work as co-first authors.

#Corresponding author: L. Guillot, Inserm UMR S 938, CRSA, Bât. Kourilsky, 34 Rue Crozatier, 75012 Paris, France

Tel.: +33 149 284 682

E-mail: loic.guillot@inserm.fr

Abstract

In the coronavirus disease 2019 (COVID-19) health crisis, one major challenge is to identify the susceptibility factors of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) in order to adapt the recommendations for populations, as well as to reduce the risk of COVID-19 development in the most vulnerable people, especially patients with chronic respiratory diseases such as cystic fibrosis (CF). Airway epithelial cells (AECs) play a critical role in the modulation of both immune responses and COVID-19 severity. SARS-CoV-2 infects the airway through the receptor angiotensin-converting enzyme 2, and a host protease, transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2), plays a major role in SARS-CoV-2 infectivity. Here, we show that the main component of *Pseudomonas aeruginosa* flagella, the protein flagellin, increases TMPRSS2 expression in AECs, particularly in patients with deficiency of the ion channel CF transmembrane conductance regulator, through activation of Toll-like receptor-5 and p38. Notably, this upregulation of TMPRSS2 expression is associated with an increased level of SARS-CoV-2 infection. Considering the urgency of the COVID-19 health crisis, this result is of major clinical significance for CF patients, who are frequently infected with and colonized by *P. aeruginosa* during the course of CF and might develop COVID-19.

Introduction

As of April 01, 2021, the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus (CoV)-2, has infected nearly 128 million people globally and led to >2.79 million deaths (<https://covid19.who.int>). In this health crisis, one of the major challenges is to identify the susceptibility factors of the infecting virus in order to adapt public health recommendations and to reduce the risk of getting COVID-19, particularly in the case of the most vulnerable people: patients with common chronic respiratory diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease, and patients with less common or rare chronic respiratory diseases such as cystic fibrosis (CF). Given their lung impairments, patients with chronic respiratory diseases can reasonably be expected to face an elevated risk of developing severe COVID-19, but the magnitude of this risk remains uncertain¹. Together with clinical follow-up studies conducted to more accurately estimate the disease risk of these patients, basic research on the pathophysiology of SARS-CoV-2 infection should provide critical insights into how COVID-19 affects patients with respiratory diseases.

The aforementioned COVID-19 development in patients is particularly relevant in the case of people with CF (pwCF). CF is caused by variants in the gene *CFTR* (CF transmembrane conductance regulator), with the most frequent variant being F508del, which leads to aberrant function of airway epithelial cells (AECs). During the course of CF, the lungs of the patients are inflamed and chronically infected by various pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa*, the most prevalent pathogen². The most recent multinational report identified 181 cases of pwCF infected by SARS-CoV-2, and recorded 7 deaths³; among the 181 pwCF, 82% were symptomatic, 47% were hospitalized, and 51% showed airway infection by *P. aeruginosa*. AECs play a critical role in the regulation of both the immune response and the severity of COVID-19⁴. Notably, several studies examining SARS-CoV-2 cellular tropism have demonstrated that ciliated and secretory cells are the major targets of infection⁴⁻⁸. SARS-CoV-2 infects the airway mainly through the cell-surface receptor angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2), and two specific host proteases, TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2) and FURIN, have been shown to play a major role in SARS-CoV-2 infectivity⁹⁻¹³.

Here, we show that the main component of *P. aeruginosa* flagella, the protein flagellin (*Pa-F*), upregulates TMPRSS2 expression in AECs, particularly in patients deficient for *CFTR*, through Toll-

like receptor-5 (TLR5) and p38 activation. Importantly, this enhanced TMPRSS2 expression is associated with an increase in the level of SARS-CoV-2 infection.

Results

ACE2, FURIN, and TMPRSS2 expression in CF and non-CF primary human AECs (hAECs) upon *P. aeruginosa* infection

We first examined *ACE2*, *FURIN*, and *TMPRSS2* expression from a previous transcriptomic study performed using primary hAECs; the cells were isolated from control (non-CF) donors and pwCF homozygous for the *CFTR* F508del variant, and were infected by *P. aeruginosa*¹⁴. At baseline (time 0 h), similar *ACE2* and *FURIN* mRNA expression levels were observed in non-CF and CF primary hAECs (Fig. 1a), whereas *TMPRSS2* expression was significantly higher in CF primary hAECs (Fig. 1a, b). Importantly, *P. aeruginosa* infection increased *TMPRSS2* mRNA expression over time in CF but not non-CF primary hAECs (Fig. 1a, b), whereas the infection did not affect *ACE2* and *FURIN* expression (Fig. 1a).

Because the most critical proinflammatory factor from *P. aeruginosa* present in the sputum of pwCF is flagellin¹⁵, we next exposed CF primary hAECs to flagellin; treatment with flagellin increased the mRNA level of *TMPRSS2* without increasing that of *ACE2* (Fig. 1c) or *FURIN* (not illustrated). This effect was observed in both non-CF and CF primary hAECs, although in both groups, the level of induction varied considerably between individuals.

ACE2, FURIN, and TMPRSS2 expression in CFTR-sufficient and -deficient Calu-3 cells exposed to *P. aeruginosa* flagellin

To investigate the mechanism underlying the aforementioned increase in *TMPRSS2* expression and to eliminate the interindividual variability, we sought to identify AEC lines expressing detectable levels of *ACE2* and *TMPRSS2* mRNA and protein. Thus, we measured *ACE2* and *TMPRSS2* expression in the AEC lines Calu-3, Beas-2B, and 16HBE (Fig. 1d), which revealed that Calu-3 cells expressed higher mRNA levels of *ACE2* and *TMPRSS2* relative to the other cell lines, and that *ACE2*

protein was detected only in Calu-3 cells. These results agree with the documented higher ability of SARS-CoV-2 to replicate in Calu-3 cells than in Beas-2B cells¹⁰. Thus, we hereafter used the Calu-3 cell line, specifically isogenic *CFTR*-sufficient and *CFTR*-deficient Calu-3 cells.

In accord with what was observed in CF primary hAECs, we found that exposure of Calu-3 cells to *P. aeruginosa* flagellin (*Pa*-F) significantly increased *TMPRSS2* mRNA expression (Fig. 2a) without affecting the transcript levels of *ACE2* (Supplementary Fig. 1a) and *FURIN* (not illustrated). This increase in *TMPRSS2* expression was more notable in Calu-3 cells deficient for *CFTR* (Calu-3-*CFTR*-KD) than in Calu-3 cells sufficient for *CFTR* (Calu-3-*CFTR*-WT) (Fig. 2a), and the *TMPRSS2* upregulation was also detected at the protein level (Fig. 2b). Moreover, we showed that the upregulation of *TMPRSS2* expression depended on TLR5 signaling (Fig. 2c). As expected, flagellin induced the synthesis of the proinflammatory cytokines interleukin (IL)-8 and IL-6 (Supplementary Fig. 1b, c) both in Calu-3-*CFTR*-WT and Calu-3-*CFTR*-KD cells, and this inflammatory response was relatively higher in the Calu-3-*CFTR*-KD cells, which agrees with previous work showing that CF epithelial cells exhibit an enhanced inflammatory response to flagellin¹⁶.

To ascertain whether the observed effect of flagellin is specific to the bacterial source of the protein, we used ultrapure flagellin isolated from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*St*-F) in our assays, which revealed that *St*-F induced similar *TMPRSS2* expression in Calu-3 cells as did flagellin isolated from *P. aeruginosa* (Fig. 2d). By contrast, recombinant flagellins (standard or vaccigradeTM) from *S. Typhimurium* did not affect the expression (Fig. 2d).

Flagellin is known to activate the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway¹⁷; thus, we tested the involvement of this pathway in the observed *TMPRSS2* induction. When a p38 inhibitor was used, flagellin-induced *TMPRSS2* expression was diminished in Calu-3-*CFTR*-KD cells (Fig. 2e) and primary hAECs (Fig. 2f). Furthermore, an inhibitor of nuclear factor-kappa B (NF-κB) also reduced the *TMPRSS2* induction by flagellin. Accordingly, the results of western blotting confirmed that flagellin stimulated p38 phosphorylation as well as NF-κB activation (Fig. 2g). Moreover, as shown previously¹⁷, we further observed that this NF-κB activation depended on p38 activity (Fig. 2g).

To determine whether *TMPRSS2* induction was restricted to the lung epithelium, we examined the flagellin effect in an intestinal cell line, Caco-2/TC7. Our results showed that flagellins from *P. aeruginosa* and *S. typhimurium*, which were able to induce IL-8 production (Supplementary Fig. 2a), exerted no effect on *TMPRSS2* expression in these cells (Supplementary Fig. 2b).

Influence of *TMPRSS2* induction by *P. aeruginosa* flagellin on SARS-CoV-2 infectivity in CFTR-sufficient and -deficient Calu-3 cells

Lastly, we investigated whether *TMPRSS2* induction by flagellin influences SARS-CoV-2 infectivity. After infection with SARS-CoV-2, the intracellular *nsp14* viral mRNA level was increased, and this level was significantly higher in Calu-3-CFTR-KD than -CFTR-WT cells and was even more notably elevated when the cells were pre-stimulated with flagellin (Fig. 3a, left). By contrast, the extracellular *nsp14* viral mRNA level, measured in the apical supernatant of AECs as a surrogate for viral production, was significantly lower in Calu-3-CFTR-KD cells than in Calu-3-CFTR-WT cells (Fig. 3a, right). Whereas pre-stimulation with flagellin did not affect viral-particle release in Calu-3-CFTR-WT cells, a lower, albeit not statistically significant, level of *nsp14* mRNA was measured at the apical side of Calu-3-CFTR-KD cells pre-stimulated with flagellin.

Discussion

In this study, we showed that exposure of AECs to flagellin from *P. aeruginosa* induces an increase in TMPRSS2 expression, which is dependent on TLR5 and p38 MAPK activation. Notably, prior exposure of AECs to flagellin results in increased infectivity of SARS-CoV-2 (illustrated in Fig. 3b).

We found that *TMPRSS2* is highly expressed in hAECs from pwCF as compared with the level in controls. Although the hAECs were isolated from a limited number of pwCF, this observation agrees with previous results obtained using excised lungs, where RNA *in situ* hybridization revealed that TMPRSS2 expression was higher in pwCF than in non-CF patients⁷. We also observed that flagellin from *P. aeruginosa* increases TMPRSS2 expression in primary bronchial cells from both pwCF and controls. The variability of the flagellin-elicited response in the two groups is likely due to the effect of several donor-related factors, such as sex, age, and CF clinical history in the case of pwCF. An age-related increase in TLR5 expression and sensing has been observed in human monocytes¹⁸. Moreover, the single-nucleotide polymorphism *TLR5* c.1174C>T, which is common in the general population¹⁹¹⁹ and generates a variant that acts as a modifier gene in CF²⁰, might also contribute to this variability.

To elucidate the specific contribution of CFTR in the level of TMPRSS2 induction by flagellin, we used isogenic Calu-3-*CFTR*-WT and Calu-3-*CFTR*-KD cells. We found that TMPRSS2 is highly induced in Calu-3-*CFTR*-KD cells, and we further confirmed previous observations indicating that CFTR-deficient bronchial cells show an elevated inflammatory response to flagellin, characterized by increased levels of IL-8 and IL-6¹⁶. Flagellin is known to activate TLR5 and downstream p38 and NF-κB in Calu-3 cells¹⁷. Confirming these results, TMPRSS2 induction by flagellin was found here to depend on p38 and NF-κB, both in Calu-3 cells and primary CF hAECs. Interestingly, a recent phosphoproteomic study in Vero-6 cells revealed that SARS-CoV-2 stimulates the p38 pathway, and that pharmacological inhibition of p38 shows antiviral efficacy²¹. Thus, this study and our results here suggest that inhibiting the p38 pathway could represent a potential COVID-19 therapy.

The increase in intracellular viral mRNA levels in CF cells exposed to flagellin, which indicates an elevated level of infection, is likely the result of the upregulated expression of TMPRSS2. Accordingly, TMPRSS2 inhibition by using the serine-protease inhibitor camostat mesylate is sufficient

for preventing infection with SARS-CoV-2¹⁰. Intriguingly, we observed a lower level of viral particles at the apical side of CF cells as compared with the levels in non-CF cells; this could be the result of an increased host-defense capacity of CF cells against viral infection, or a delay in the kinetics of virus release. Future studies specifically investigating infection kinetics, viral-particle release, and the resulting antiviral response (production of IL-6, Type I/III interferon) should facilitate definitive assessment of whether prior exposure to flagellin induces either a protective or damaging effect after SARS-CoV-2 infection of CF cells.

Further investigations conducted using primary cells differentiated at the air-liquid interface will be necessary to specifically characterize the response of CF bronchial epithelial cells. Nevertheless, the model used here is relevant. As noted in the introduction section, secretory cells are infected by SARS-CoV-2; this was demonstrated in previous studies conducted using single-cell RNA-seq, either ex vivo with lung biopsies of patients infected with SARS-CoV-2⁴, or in vitro with a reconstituted epithelium at the air-liquid interface^{6,8}. Calu-3 cells differentiated at the air-liquid interface present the characteristics of secretory cells (mucus production) and express naturally (i.e., without exogenous overexpression) the required proteins (ACE2, TMPRSS2) for infection by SARS-CoV-2, which is not the case with the other epithelial cell lines tested in this study.

Several studies have delineated the antiviral capacity endowed by flagellin against other respiratory viruses, including influenza A²². Furthermore, flagellin was recently suggested to be capable of modulating the innate immune response and thereby eliminating SARS-CoV-2 and resolving COVID-19²³. Accordingly, the use of recombinant flagellin as an adjuvant in vaccine development has been considered²⁴. However, we observed here that recombinant flagellin (standard or vaccigradeTM) from *S. Typhimurium* did not affect *TMPRSS2* expression. Thus, although these data were obtained in vitro, it is likely based on the aforementioned finding that pathogen-targeting vaccines developed using recombinant flagellin as an adjuvant will not produce negative effects in the case of concomitant exposure to SARS-CoV-2. Moreover, the observed upregulation of *TMPRSS2* expression induced by flagellin appears specific to the lung epithelium, because the effect was not replicated in Caco-2/TC7 cells, which are epithelial cells of intestinal origin.

The question of whether CF patients face an increased risk of developing a severe form of COVID-19 is a topical one and a source of discussion²⁵. Clinical follow-up results obtained to date indicate that pwCF, both adults^{26,27} and children²⁸, do not show an elevated risk of developing severe COVID-19 as compared with the general population. However, pwCF with advanced CF disease (associated with older age, CF-related diabetes, lower lung function, having received an organ transplant) might develop a severe clinical course^{26,27}. In a recent French study, we compared the baseline clinical characteristics of 31 pwCF infected by SARS-CoV-2 during the first wave of the pandemic to that of the overall French CF population ($n = 6,913$; >90% of all French CF cases)²⁹. The pwCF with COVID-19 were found to be older and more frequently chronically colonized with *P. aeruginosa*²⁹. However, considering the small number of patients, these results must be interpreted with caution. Thus, whether the risk of developing severe COVID-19 is increased in pwCF because of their *P. aeruginosa* infection remains unresolved and will require further meta-analysis performed using international cohorts.

In conclusion, we have shown that exposure of CF AECs to flagellin from *P. aeruginosa* can enhance SARS-CoV-2 infectivity. Further clinical follow-up studies and in vitro experimental investigations into the mechanisms associated with the specific host response of CF cells to SARS-CoV-2 infection should help elucidate this matter and provide insights for future clinical care.

Material and methods

Reagents

Ultrapure flagellin from *P. aeruginosa* (tlrl-pafla) and ultrapure (tlrl-epstfla), recombinant (tlrl-flic), and vaccigrade (vac-fla) flagellin from *S. Typhimurium* were from Invivogen (San Diego, CA, USA). Anti-TLR5 antibody and NF-κB inhibitor (BAY 11-7082) were from Invivogen. DMSO and p38 inhibitor (SB203580) were from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

Cell culture

Calu-3 cells (ATCC HTB-55TM/Lot: 62657853) and Calu-3-CFTR-WT and Calu-3-CFTR-KD cells (generously provided by Prof. Marc Chanson, University of Geneva, Switzerland) were cultured and differentiated at the air-liquid interface in MEM-Glutamax (Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Eurobio, Les Ulis, France) and 1% non-essential amino acids, 10 mmol/L HEPES (pH 7.2-7.5), 1% sodium pyruvate, and 1% antibiotics (all from Gibco), as previously described³⁰; the cells were differentiated in Transwell® dishes (12 mm; 3460, Corning, Kennebunk, ME, USA). Primary human bronchial epithelial cells (source characteristics listed in Table 1) were cultured as recommended by the manufacturer by using hAEC complete culture medium (Epithelix, Geneva, Switzerland). Beas-2B cells (CRL-9609TM/Lot: 59227035) were cultured in F12 medium supplemented with 10% FCS, 10 mmol/L HEPES, and 1% antibiotics. 16HBE14o- cells were generously supplied by Pr. Dieter Gruenert (originator) and Dr. Beate Illek (provider) from the University of California San Francisco (UCSF); the cells were cultured in MEM-Glutamax supplemented with 10% FCS and 1% antibiotics, as recommended by the provider. Caco-2/TC7 cell line, a clonal population established from human colon carcinoma Caco-2 cells at late passage³¹, were generously provided by Dr. Véronique Carrière (Sorbonne Université/Centre de recherche St-Antoine); the cells were cultured in high-glucose DMEM-Glutamax (Gibco) supplemented with 20% FCS, 1% non-essential amino acids, and 1% antibiotics.

Reverse transcription (RT)-qPCR

Human RNA was isolated using a NucleoSpin RNA/miRNA kit (Macherey Nagel, Duren, Germany). RT was performed using a high-capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time qPCR was performed by using an ABI QS3 with a Sensifast Probe Lo-Rox Kit (Bio-

technofix, Guiberville, France), TaqMan probes for *ACE2* (Hs01085333_m1), *TMPRSS2* (Hs00237175_m1), *FURIN* (Hs00965485_g1), and *GAPDH* (Hs00237175_m1), and a cDNA template. For relative quantification, the expression level of target genes was normalized to the expression of *GAPDH* relative to the reference group (specified in the figure legends) used as a calibrator and was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

SARS-CoV-2 infection and viral quantification

Fully differentiated Calu-3 cells grown at the air-liquid interface were infected with SARS-CoV-2 (strain BetaCoV/France/IDF0571/2020; accession ID EPI_ISL_411218) at a multiplicity of infection of 1, as previously described³². Viral quantification through RT-qPCR targeting of ORF1b-nsp14 was performed as described³².

Western blotting

Total proteins were extracted using RIPA buffer (Euromedex, Souffelweyersheim, France), and then equal amounts of proteins were reduced, size-separated on 12% stain-free precast SDS-polyacrylamide gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and transferred to nitrocellulose membranes by using an iBlot2 apparatus (Thermo Fisher Scientific). The membranes were blocked in 5% milk in TBS-Tween 0.1% and incubated with specific primary antibodies overnight at 4°C; the antibodies were against ACE2 (AF933, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; 1:200), phospho- and total p38 (9211 and 9212, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 1:2,000), phospho- and total NF-κB p65 (3039 and 8242, Cell Signaling Technology; 1:2,000), and β-actin (A2228, Sigma-Aldrich; 1:5,000). The blots were exposed to horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Cell Signaling Technology, 7074; 1:10,000) and anti-goat (A27104, Thermo Fisher Scientific; 1:2,000) secondary antibodies, and bound antibodies were detected using Clarity chemiluminescent substrate (Bio-Rad). Images were recorded using a Fujifilm LAS-3000 bioimaging system (Stamford, CT, USA).

Immunofluorescence

After various treatments, Calu-3 grown at the air-liquid interface were rinsed with PBS and fixed with ice-cold 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized for 10 min with 0.1% Triton X-100 in PBS, and then washed with PBS and incubated in a blocking solution (PBS + 5% BSA) for 1 h. Next, the cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against TMPRSS2 (14437-1-AP,

Thermo Fisher Scientific; 1:100) and ACE2 (AF933, R&D Systems; 1:60) in PBS supplemented with 1% BSA, and on the following day, the cells were washed (3×5 min) with PBS and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies, anti-rabbit Alexa 488 (4412, Cell Signaling Technology, 1:2,000) and anti-goat Alexa 488 (A11078, Thermo Fisher Scientific, 1:2,000). After staining with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), coverslips were mounted and sealed with ProLong diamond mounting medium (Thermo Fisher Scientific). Fluorescence microscopy was performed using an Olympus BX43 fluorescence microscope (Hamburg, Germany).

ELISA

Concentrations of human IL-8 and IL-6 in cell supernatants were measured using ELISA kits (DY208 and DY206, R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. The substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine was from Cell Signaling Technology.

Statistical analysis

Differences among groups were assessed for statistical significance by using Prism 9.00 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), as indicated in the figure legends. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Ethics

This project was approved (Opinion number 20-688) by the Inserm Institutional Review Board (IRB00003888, IORG0003254, FWA00005831).

Data availability

RNAseq data used here are from a transcriptomic study¹⁴ which RNAseq raw datafiles are available in the European Nucleotide Archive (ENA) (primary accession number PRJEB9292). <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB9292>.

Acknowledgments

L.G. received a grant from the Faculté de Médecine Sorbonne Université (AAP COVID19). We thank Prof. Marc Chanson (University of Geneva) for generously providing Calu-3-CFTR-WT and Calu-3-CFTR-KD cells ³⁰, Prof. Dieter Gruenert and Dr. Beate Illek (University of California San Francisco (UCSF)) for 16HBE14o- cells, and Dr. Véronique Carrière (Sorbonne Université/Centre de recherche St-Antoine) for Caco-2/TC7 cell line.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Author contributions

L.G., V.B., M.R., and J.B. designed experiments; M.R., J.B., C.C., V.B., O.T., A.P., J.M., and L.G. conducted the experiments; L.G. wrote the manuscript; M.R., J.B., V.B., M.R.C., and H.C. critically revised the manuscript.

Supplementary information accompanies the manuscript on the *Cell Discovery* website (<http://www.nature.com/celldisc>).

Table 1 Characteristics of donors of bronchial epithelial cells.

Group	Reference	Origin	Sex	Age	CFTR variant	Smoker	Used in
WT	02AB077201F2	Caucasian	Male	63	-	No	Fig. 1c
	02AB68001F2	Caucasian	Female	71	-	No	Fig. 1c
	02AB67101	Caucasian	Male	72	-	No	Fig. 1c
	02AB0839.01	Caucasian	Male	54	-	No	Fig. 1c
CF	CFAB43703	Unknown	Male	27	F508del/F508del	No	Fig. 1c
	CFAB60901	Unknown	Female	21	F508del/F508del	No	Fig. 1c
	CFAB45202	Unknown	Male	32	F508del/F508del	No	Fig. 1c, 1f, 1g (left)
	CFAB064901	Unknown	Female	37	F508del/1717-1G>A	No	Fig. 1g (right)

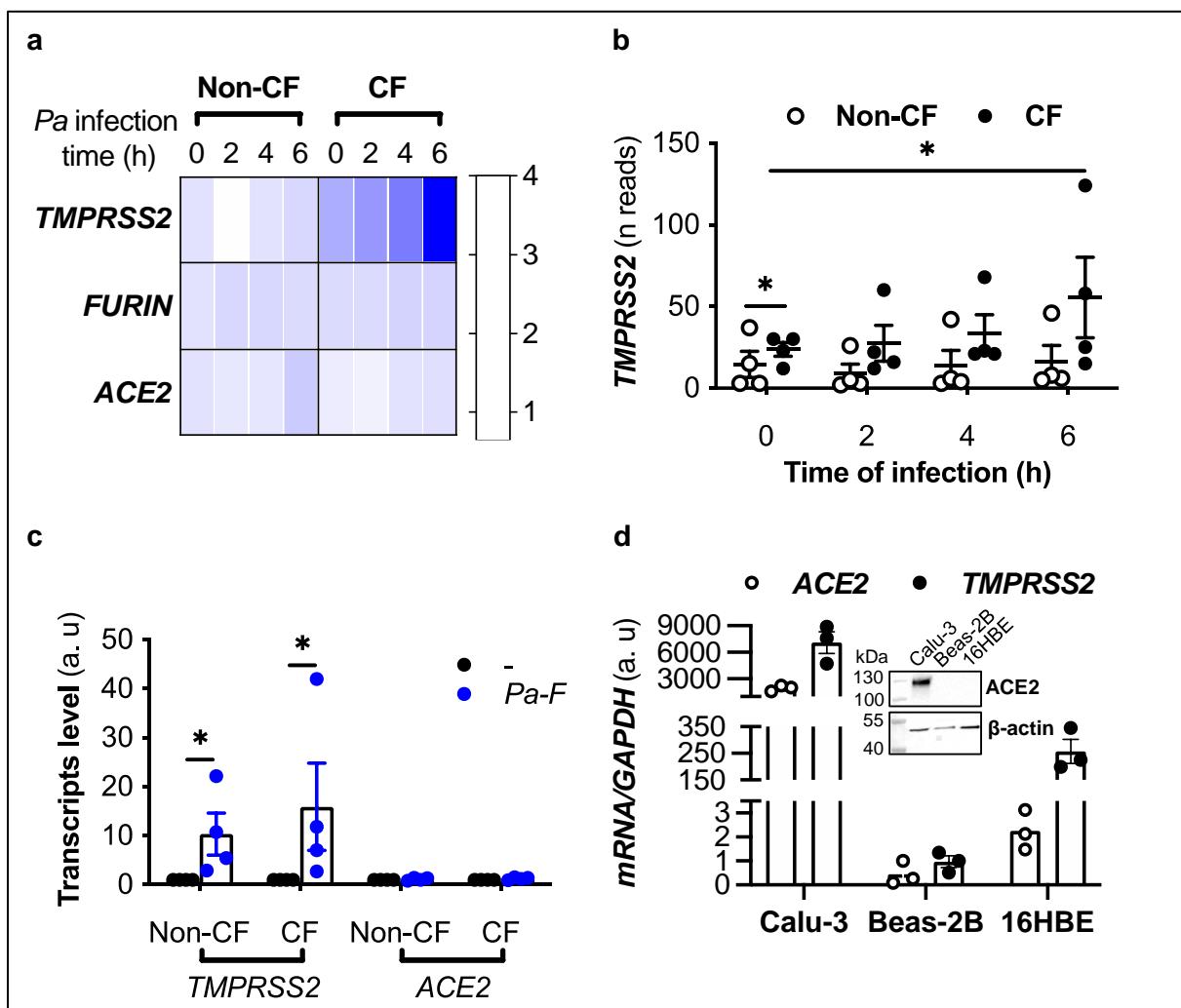


Fig. 1 Effect of *P. aeruginosa* infection on ACE2, TMPRSS2, and FURIN expression in primary hAECs. Heatmap of ACE2, TMPRSS2, and FURIN expression (fold-change) (a) and kinetics of TMPRSS2 expression (shown in reads) (b) in primary hAECs isolated from non-CF and CF patients and infected with *P. aeruginosa* (multiplicity of infection = 0.25) (RNA-seq data extracted from a previous study¹⁴) (non-CF vs. CF at T0, *PadjBH = 1.76×10^{-3} ; 0 h vs 6 h in CF, *PadjBH = 0.048). c ACE2 and TMPRSS2 mRNA expression in submerged CF primary hAECs stimulated with control medium (reference group) or Pa-F (50 ng/mL) for 6 h. d ACE2 and TMPRSS2 mRNA expression in submerged cultures of Calu-3, Beas-2B (reference group), and 16HBE14o- cell lines ($n = 3$, ANOVA with Dunnett's multiple-comparison test, ***P < 0.001). GAPDH, housekeeping gene. Representative western blot (with 20 µg of protein) showing ACE2 and β-actin protein expression in submerged cultures of Calu-3, Beas-2B, and 16HBE14o- cell lines.

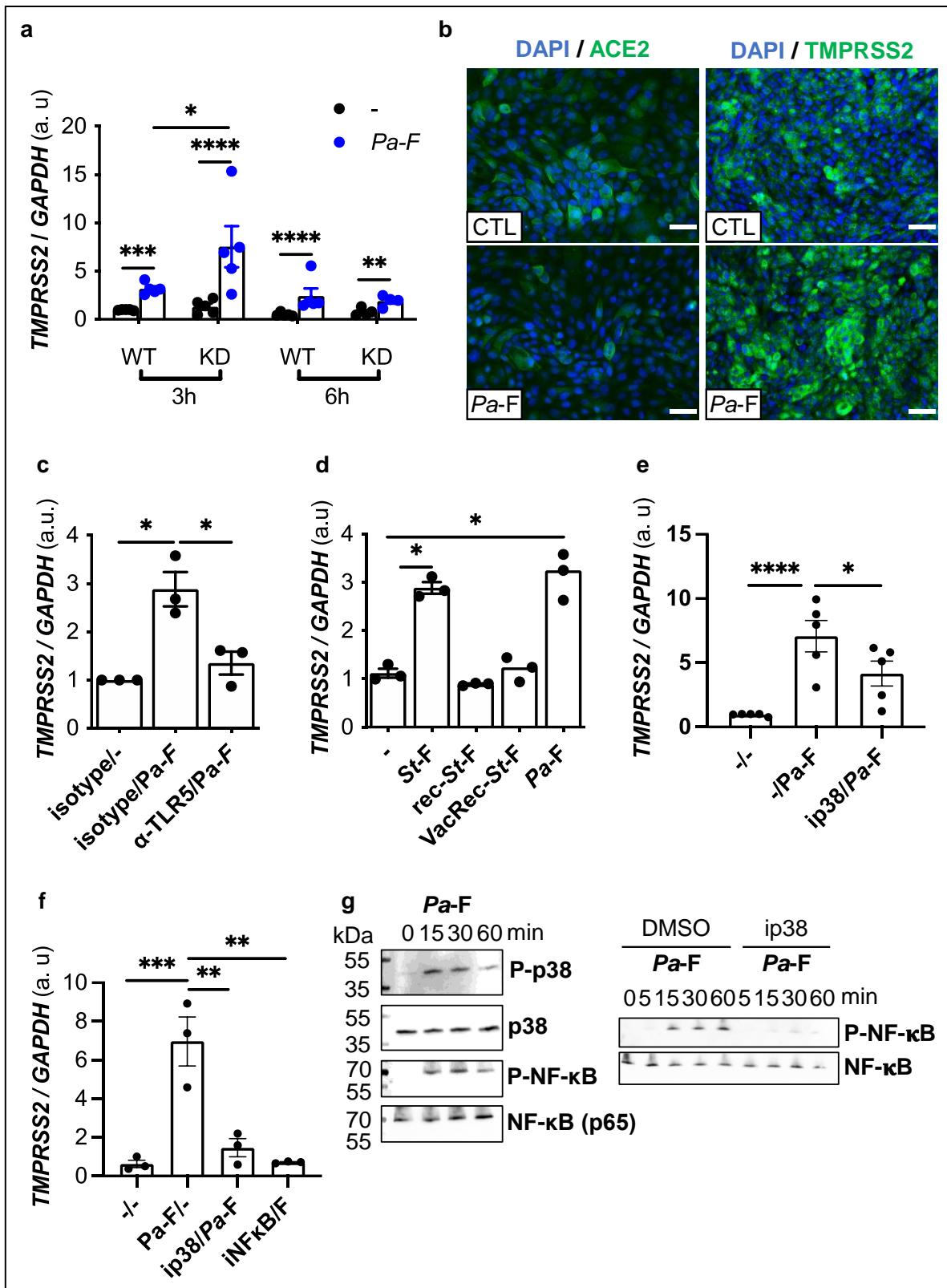


Fig. 2 Effect of *P. aeruginosa* flagellin on ACE2, FURIN, and TMPRSS2 expression in CFTR-deficient Calu-3 cells. a TMPRSS2 mRNA expression (relative to that of housekeeping gene *GAPDH*) in Calu-3-CFTR-WT (reference group) and -CFTR-KD cells grown at the air-liquid interface and either not stimulated (-) or stimulated for 3 or 6 h with *P. aeruginosa* flagellin (*Pa-F*, Invivogen, 50 ng/mL) ($n = 5$, ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). **b** Immunofluorescence analysis of TMPRSS2 and ACE2 protein expression in Calu-3 cells (ATCC) grown at the air-liquid interface and stimulated with *Pa-F* for 18 h; scale bar, 40 μ m. **c**

TMPRSS2 mRNA expression (relative to that of housekeeping gene *GAPDH*) in Calu-3-CFTR-KD cells grown at the air-liquid interface and incubated for 1 h with isotype control or anti-TLR5 antibody (10 µg/mL) and then either not stimulated or stimulated for 6 h with *Pa*-F (50 ng/mL) ($n = 3$, ANOVA with Dunnett's multiple-comparison test, $*P < 0.05$). **d** *TMPRSS2* mRNA expression in Calu-3 cells grown at the air-liquid interface and either not stimulated or stimulated for 6 h with 50 ng/mL ultrapure flagellin from *S. typhimurium* (*St*)-F, recombinant *St*-F, vaccigrade *St*-F, or *Pa*-F ($n = 3$, ANOVA with Dunnett's multiple-comparison test, $*P < 0.05$). *TMPRSS2* mRNA expression in Calu-3 cells grown at the air-liquid interface (**e**) or in primary CF hAECs (**f**) that were preincubated for 1 h with 20 µmol/L p38 or 20 µmol/L NF-κB inhibitor and then stimulated for 6 h with 50 ng/mL *Pa*-F in the presence of the inhibitor. ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test, $*P < 0.05$, $****P < 0.0001$. **g** Western blot (with 10 µg of protein) of phospho- and total p38 and phospho- and total NF-κB in primary hAECs stimulated with 50 ng/mL *Pa*-F.

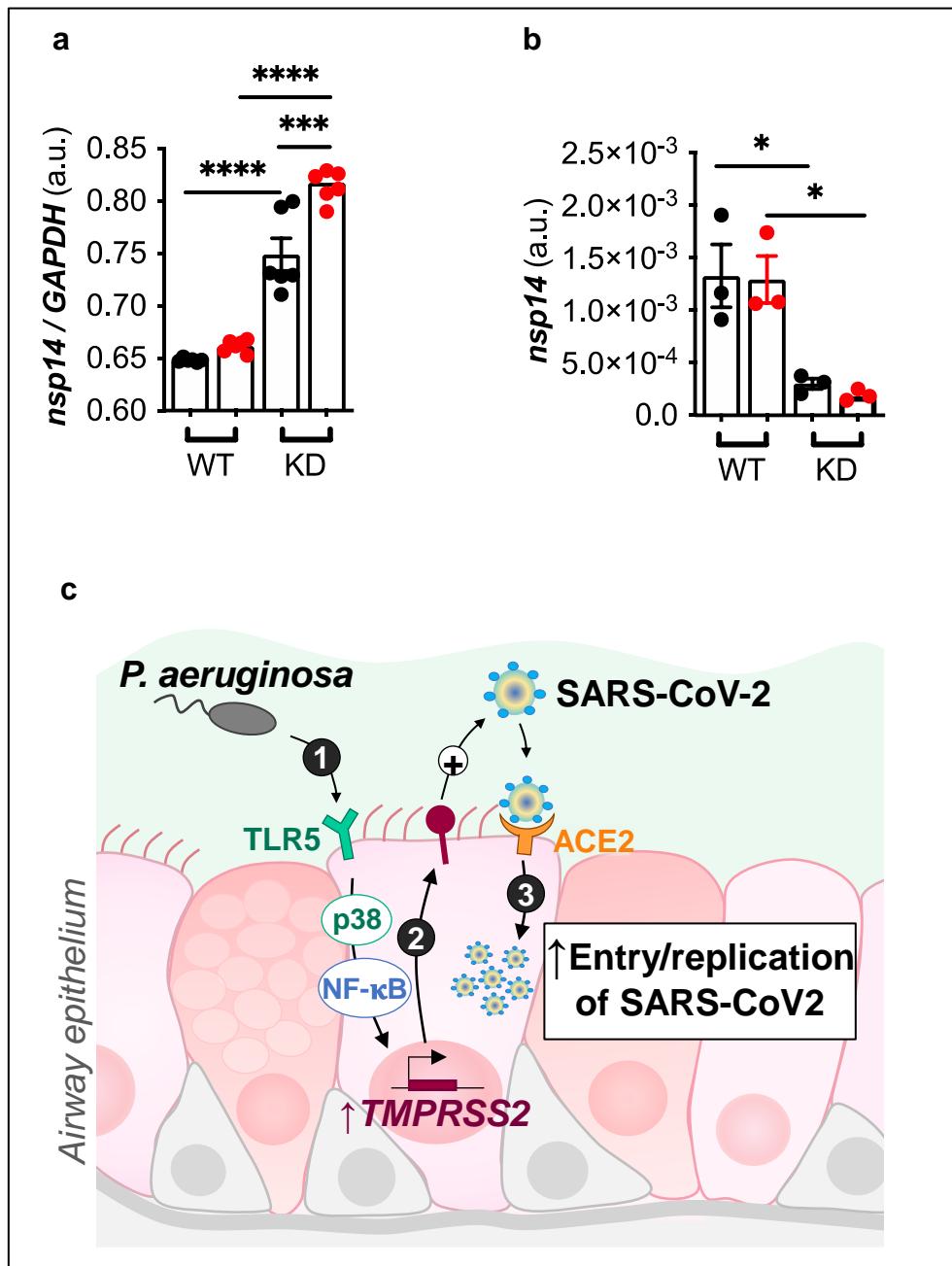
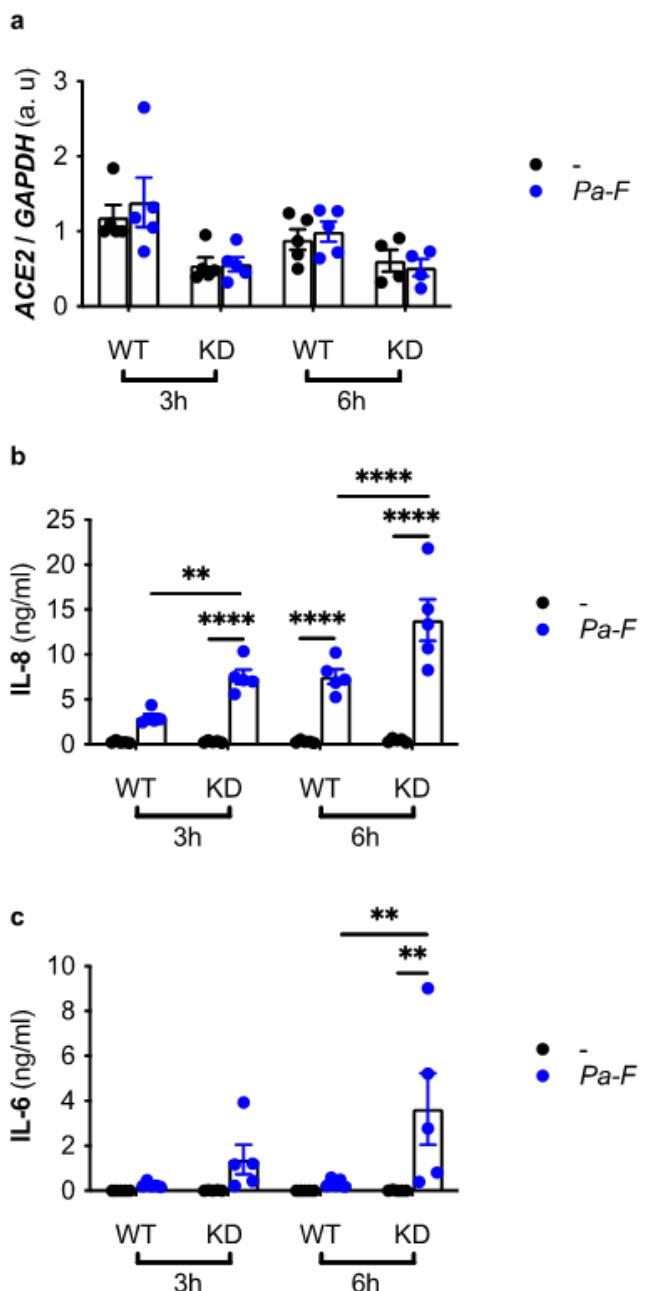
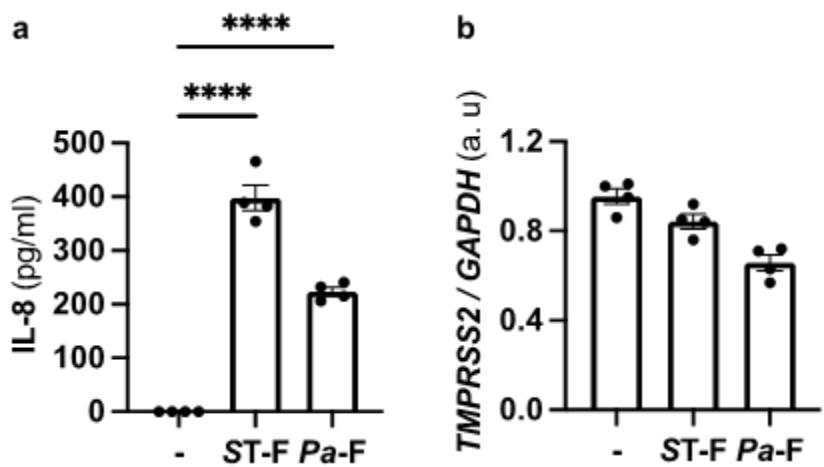


Fig. 3 Effect of TMPRSS2 induction by *P. aeruginosa* flagellin on SARS-CoV-2 infectivity in CFTR-deficient Calu-3 cells. **a** Intracellular *nsp14*/GAPDH (left) and **b** apical (supernatant) *nsp14* (right) mRNA expression in Calu-3-CFTR-WT (reference group) and -CFTR-KD cells grown at the air-liquid interface and either not stimulated (-) or stimulated for 16 h with *Pa*-F (50 ng/mL), and then infected for 24 with SARS-CoV-2 (multiplicity of infection = 1) ($n = 3$, ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test, $*P < 0.05$, $****P < 0.001$). **c** Schematic illustrating how stimulation by *P. aeruginosa* flagellin could influence SARS-CoV2 infectivity in CF AECs by increasing TMPRSS2 expression.



Supplementary Fig. 1 Effect of *P. aeruginosa* flagellin on ACE2 expression and cytokine production in Calu-3 cells. **a** ACE2 mRNA expression in Calu-3-CFTR-WT (reference group) and -CFTR-KD cells grown at the air-liquid interface and either not stimulated (-) or stimulated for 3 or 6 h with *P. aeruginosa* flagellin (Pa-F, 50 ng/mL) ($n = 5$, ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test). Production of IL-8 **(b)** and IL-6 **(c)** by Calu-3-CFTR-WT and -CFTR-KD cells grown at the air-liquid interface and either not stimulated or stimulated for 3 or 6 h with Pa-F (50 ng/mL) ($n = 5$, ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$).



Supplementary Fig. 2 Effect of flagellins on *TMPRSS2* expression and IL-8 production in Caco-2/TC7 cells. *TMPRSS2* mRNA expression (a) and IL-8 production (b) in Caco-2/TC7 cells stimulated for 6 h with 50 ng/mL *Pa-F* or *St-F*. ANOVA with Dunnett's multiple-comparison test, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

References

- 1 To, T. et al. A Global Respiratory Perspective on the COVID-19 Pandemic: Commentary and Action Proposals. *Eur Respir J*, doi:10.1183/13993003.01704-2020 (2020).
- 2 Elborn, J. S. Cystic fibrosis. *Lancet* 388, 2519-2531, doi:10.1016/S0140-6736(16)00576-6 (2016).
- 3 McClenaghan, E. et al. *Journal of Cystic Fibrosis* (2020).
- 4 Chua, R. L. et al. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol*, doi:10.1038/s41587-020-0602-4 (2020).
- 5 Zhu, N. et al. Morphogenesis and cytopathic effect of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelial cells. *Nat Commun* 11, 3910, doi:10.1038/s41467-020-17796-z (2020).
- 6 Ravindra, N. G. et al. Single-cell longitudinal analysis of SARS-CoV-2 infection in human bronchial epithelial cells. *bioRxiv*, doi:10.1101/2020.05.06.081695 (2020).
- 7 Hou, Y. J. et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell* 182, 429-446 e414, doi:10.1016/j.cell.2020.05.042 (2020).
- 8 Fiege, J. K. et al. Single cell resolution of SARS-CoV-2 tropism, antiviral responses, and susceptibility to therapies in primary human airway epithelium. *bioRxiv*, doi:10.1101/2020.10.19.343954 (2020).
- 9 Coutard, B. et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res* 176, 104742, doi:10.1016/j.antiviral.2020.104742 (2020).
- 10 Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, doi:10.1016/j.cell.2020.02.052 (2020).
- 11 Walls, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, doi:10.1016/j.cell.2020.02.058 (2020).
- 12 Yan, R. et al. Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, doi:10.1126/science.abb2762 (2020).
- 13 Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270-273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7 (2020).
- 14 Balloy, V. et al. Normal and Cystic Fibrosis Human Bronchial Epithelial Cells Infected with *Pseudomonas aeruginosa* Exhibit Distinct Gene Activation Patterns. *PLoS One* 10, e0140979, doi:10.1371/journal.pone.0140979 (2015).
- 15 Balloy, V. et al. Flagellin concentrations in expectorations from cystic fibrosis patients. *BMC Pulm Med* 14, 100, doi:10.1186/1471-2466-14-100 (2014).
- 16 Blohmke, C. J. et al. Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease. *J Immunol* 180, 7764-7773, doi:10.4049/jimmunol.180.11.7764 (2008).
- 17 Illek, B. et al. Flagellin-stimulated Cl⁻ secretion and innate immune responses in airway epithelia: role for p38. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295, L531-542, doi:10.1152/ajplung.90292.2008 (2008).
- 18 Qian, F. et al. Age-associated elevation in TLR5 leads to increased inflammatory responses in the elderly. *Aging Cell* 11, 104-110, doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00759.x (2012).
- 19 Hawn, T. R. et al. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 198, 1563-1572, doi:10.1084/jem.20031220 (2003).
- 20 Blohmke, C. J. et al. TLR5 as an anti-inflammatory target and modifier gene in cystic fibrosis. *J Immunol* 185, 7731-7738, doi:10.4049/jimmunol.1001513 (2010).
- 21 Bouhaddou, M. et al. The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell* 182, 685-712 e619, doi:10.1016/j.cell.2020.06.034 (2020).
- 22 Georgel, A. F. et al. Toll-like receptor 5 agonist flagellin reduces influenza A virus replication independently of type I interferon and interleukin 22 and improves antiviral efficacy of oseltamivir. *Antiviral Res* 168, 28-35, doi:10.1016/j.antiviral.2019.05.002 (2019).
- 23 Golonka, R. M. et al. Harnessing innate immunity to eliminate SARS-CoV-2 and ameliorate COVID-19 disease. *Physiol Genomics* 52, 217-221, doi:10.1152/physiolgenomics.00033.2020 (2020).
- 24 Cui, B. et al. Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 17, 335-349, doi:10.1080/14760584.2018.1457443 (2018).

- 25 Peckham, D., McDermott, M. F., Savic, S. & Mehta, A. COVID-19 meets Cystic Fibrosis: for better or worse? *Genes Immun* 21, 260-262, doi:10.1038/s41435-020-0103-y (2020).
- 26 Cosgriff, R. et al. A multinational report to characterise SARS-CoV-2 infection in people with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 19, 355-358, doi:10.1016/j.jcf.2020.04.012 (2020).
- 27 McClenaghan, E. et al. The global impact of SARS-CoV-2 in 181 people with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 19, 868-871, doi:10.1016/j.jcf.2020.10.003 (2020).
- 28 Bain, R. et al. Clinical characteristics of SARS-CoV-2 infection in children with cystic fibrosis: An international observational study. *J Cyst Fibros* 20, 25-30, doi:10.1016/j.jcf.2020.11.021 (2021).
- 29 Corvol, H. d. M., S.; Lemonnier, L.; Kemgang, A.; Reynaud Gaubert, M.; Chiron, R.; Dalphin, M.-L.; Durieu, I.; Dubus, J.-C.; Houdouin, V.; Prevotat, A.; Ramel, S.; Revillion, M.; Weiss, L.; Guillot, L.; Boelle, P.-Y.; Burgel, P.-R., on behalf the French Cystic Fibrosis Reference Network Study Group; . First Wave of COVID-19 in French Patients with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Med.* 9, 3624 (2020).
- 30 Bellec, J. et al. CFTR inactivation by lentiviral vector-mediated RNA interference and CRISPR-Cas9 genome editing in human airway epithelial cells. *Curr Gene Ther* 15, 447-459, doi:10.2174/1566523215666150812115939 (2015).
- 31 Chantret, I. et al. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* 107 (Pt 1), 213-225 (1994).
- 32 Pizzorno, A. et al. Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia. *Cell Rep Med* 1, 100059, doi:10.1016/j.xcrm.2020.100059 (2020).

III- Annexe 3 : Revue des connaissances sur le rôle de SLC6A14 dans la physiopathologie pulmonaire et gastrointestinale des patients atteints de mucoviscidose

La mucoviscidose est causée par des mutations du gène codant pour la protéine *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, un canal chlorure exprimé de manière ubiquitaire à la surface de nombreux épithélia. Les symptômes cliniques touchent donc différents organes tels que le foie, le pancréas et l'intestin, mais les complications pulmonaires sont la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose.

Bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, on observe une diversité phénotypique considérable chez les patients porteurs de variants identiques du gène *CFTR*. En plus des facteurs environnementaux, des études faites chez des jumeaux ont révélé que des gènes dits « modificateurs », situés en dehors du locus de *CFTR*, sont impliqués dans cette variabilité interindividuelle. Parmi ceux-ci, mon équipe d'accueil s'intéresse au gène *solute carrier family 6 member 14*, ou *SLC6A14*, un transporteur d'acides aminés, et étudie les mécanismes biologiques expliquant l'impact des différents variants de *SLC6A14* sur le phénotype pulmonaire des patients CF.

Cette revue, publiée en 2020 dans *Cellular and Molecular Life Sciences*, se concentre sur le rôle de *SLC6A14* dans le contexte de la mucoviscidose, en particulier dans la physiopathologie pulmonaire et gastro-intestinale.



Update on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and physiopathology: focus on cystic fibrosis

Manon Ruffin¹ · Julia Mercier¹ · Claire Calmel¹ · Julie Mésinèle¹ · Jeanne Bigot¹ · Erika N. Sutanto^{2,3} · Anthony Kicic^{2,3,4,5} · Harriet Corvol^{1,6} · Loïc Guillot¹

Received: 28 November 2019 / Revised: 24 January 2020 / Accepted: 17 February 2020 / Published online: 12 March 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

The solute carrier family 6 member 14 (SLC6A14) protein imports and concentrates all neutral amino acids as well as the two cationic acids lysine and arginine into the cytoplasm of different cell types. Primarily described as involved in several cancer and colonic diseases physiopathological mechanisms, the *SLC6A14* gene has been more recently identified as a genetic modifier of cystic fibrosis (CF) disease severity. It was indeed shown to have a pleiotropic effect, modulating meconium ileus occurrence, lung disease severity, and precocity of *P. aeruginosa* airway infection. The biological mechanisms explaining the impact of SLC6A14 on intestinal and lung phenotypes of CF patients are starting to be elucidated. This review focuses on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and physiopathology, especially its involvement in the pathophysiology of CF disease.

Keywords ATB^{0,+} · Amino acid transporter · CFTR · Nitric oxide · Pulmonary · Intestine

Introduction

Cystic fibrosis (CF), the most common lethal autosomal recessive genetic disease in Caucasians, is caused by variants in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator (*CFTR*), a chloride channel expressed ubiquitously within epithelia [1–3].

Symptoms can occur as early as birth with meconium ileus (MI), a severe neonatal intestinal obstruction affecting around 15% of CF neonates. This is followed by manifestations of the disease in other organs such as the liver, the pancreas, and the intestine, with lung complications as the main cause of morbidity and mortality in CF patients. In the lungs, absence or dysfunction of CFTR proteins results in altered salt and water transport through the airway epithelium leading to an altered mucociliary clearance, progressive colonization with different pathogens, exacerbation of inflammation, and lung tissue damage. Among the multitude of pathogens colonizing the CF lungs, *Pseudomonas aeruginosa* is the most common and life-threatening pathogen. Indeed, *P. aeruginosa* chronic lung colonization has been associated with a more severe lung disease and reduced survival [4].

Although CF is a monogenic disease, considerable phenotypic diversity is observed in patients carrying identical *CFTR* variants [5–7]. In addition to environmental factors, twins and siblings' studies have revealed that genetic modifiers outside the *CFTR* locus are involved in this interindividual variability [5]. It is expected that these modifier genes account for 50% of the lung function variation. The current

Manon Ruffin and Julia Mercier have contributed equally to this work as co-first authors.

✉ Harriet Corvol
harriet.corvol@aphp.fr

- ¹ Sorbonne Université, INSERM UMR S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France
- ² Telethon Kids Institute, University of Western Australia, Nedlands, WA, Australia
- ³ School of Public Health, Curtin University, Bentley, WA, Australia
- ⁴ Centre for Cell Therapy and Regenerative Medicine, Medical School, The University of Western Australia, Nedlands, WA, Australia
- ⁵ Department of Respiratory and Sleep Medicine, Perth Children's Hospital, Nedlands, WA, Australia
- ⁶ Pneumologie Pédiatrique, APHP, Hôpital Trousseau, Paris, France

challenge is to identify these variants and determine how they contribute to the severity of the disease by performing in vitro/in vivo functional studies. Among the several modifier genes identified thus far, the solute carrier family 6 member 14 (*SLC6A14*, also known as *ATB^{0,+}*) has been shown to have pleiotropic effect in CF [8–14]. It was first identified as a modifier of MI occurrence [14], and then associated with lung disease and age at first *P. aeruginosa* infection [8, 10]. *SLC6A14*, the protein encoded by this gene, belongs to the solute carrier family 6 and uses the energy provided by Na⁺ and Cl⁻ gradients to import and concentrate all neutral amino acids as well as the two cationic acids lysine and arginine into the cytoplasm of different cell types. Besides the genotype/phenotype associations, the biological mechanisms explaining the impact of *SLC6A14* on intestinal and lung phenotypes of CF patients are beginning to be elucidated as evidenced by recent studies [15–17]. This review focuses on *SLC6A14* in the context of CF, especially its involvement in the pathophysiology of CF lung and gastrointestinal disease.

SLC6A14 expression and regulation in the lung and gastrointestinal tract

SLC6A14 gene is located on chromosome X and was cloned in 1999 from a mammary gland cDNA library [18]. This gene produces two transcripts (ENST00000598581.3 and ENST00000463626.1) but only one codes for a protein (ENSG0000087916.7) which is comprised of 642 amino acids with an expected molecular weight of 72 kDa. *SLC6A14* is a plasma membrane protein belonging to the solute carrier 6 (SLC6) family which contains 21 human proteins based on the similarity in their amino acid sequences [19]. Although no structural studies have been conducted on *SLC6A14* specifically, crystal structure and structural studies on others members of the SLC6 family, as well as topological domain analysis (<https://uniprot.org/uniprot/Q9UN76>) suggest that *SLC6A14* N- and C-terminal domains are cytoplasmic and that the sequence includes 12 putative transmembrane domains and 1 large extracellular domain between transmembrane domains 3 and 4 [19]. In the endoplasmic reticulum, the quality control of *SLC6A14* folding involves interactions with the heat shock proteins HSP70 and HSP90 [20]. *SLC6A14* trafficking from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus depends on its interaction with the cargo-recognizing protein SEC24 isoform C and the coatomer II (COPII) complex [21]. Further studies are needed to fully understand the mechanisms allowing *SLC6A14* trafficking to the plasma membrane.

SLC6A14 mRNA was initially shown to be expressed mainly in the lung, fetal lung, trachea, and salivary gland [18]. Microarray and RNA-sequencing data obtained from Expression Atlas public resource confirm that *SLC6A14*

is predominantly expressed in human and mouse lung tissue (Table 1). However, *SLC6A14* is also detected albeit in extremely low levels in gastrointestinal tissues including intestine and colon.

SLC6A14 expression and regulation in the lung

Before *SLC6A14* mRNA and protein were identified in the human lung, Galietta et al. demonstrated the presence of a Na⁺-dependent amino acid transport at the apical membrane of bronchial epithelial cells isolated from CF or non-CF subjects [32]. Upon showing that *SLC6A14* mRNA was strongly expressed in the human lung and trachea compared to other organs [18], Sloan et al. also showed that *SLC6A14* protein was expressed in membrane fractions of human airway and distal lung samples from normal, emphysema, and CF patients [33]. Interestingly, the authors pointed out differences in the molecular mass of *SLC6A14* protein detected either in the airways or in the distal lung, which was due to alternative splicing or posttranslational modification. Several studies have also shown expression of *SLC6A14* in various cell lines of either airway or distal epithelial cell origin, as well as in primary bronchial epithelial cells (Table 2). In the alveolar A549 cell line, *SLC6A14* protein was either detected or absent according to the study considered [34, 35]. Di Paola et al. observed that primary cells from individuals with CF or healthy donors showed a similar mRNA level for *SLC6A14* [17], suggesting that *CFTR* pathogenic variants had no impact on *SLC6A14* mRNA expression. Interestingly, a recent study using single RNA sequencing revealed that *SLC6A14* expression was reduced in alveolar type II cells from idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients compared to controls [36]. Via single-cell analysis, the authors also showed that *SLC6A14* was expressed in basal, club cells, and alveolar type 2 cells.

In vitro, Gorrieri et al. observed that *SLC6A14* transcripts were enhanced in bronchial epithelial cells exposed to interleukin-4 [39]. In the human glandular bronchial epithelial cell line Calu-3 and in primary human bronchial epithelial cells, flagellin or lipopolysaccharide from *P. aeruginosa* exposures increase the expression of *SLC6A14* mRNA [17]. Finally, in relation to CF, a study using HEK-293 cells over-expressing *SLC6A14* showed that *SLC6A14* protein expression was reduced by suprapharmacological concentrations of Vx-770, a *CFTR* potentiator [40].

SLC6A14 expression and regulation in the gastrointestinal tract

In the human gastrointestinal tract, *SLC6A14* appears to be heterogeneously expressed (Table 3). Sloan et al. first detected *SLC6A14* mRNA in the stomach, although its levels were significantly lower than those observed in lung samples

Table 1 *SLC6A14* transcript expression in human (A) and mouse (B) (Modified from: Expression Atlas; <https://www.ebi.ac.uk>)

Study	Lung	Stomach	Salivary glands	Breast	Lower leg skin	Prostate gland	Uterine bladder	Vagina	Skin	Thymus	Kidney	Other olfactory epithelium	Associated references
<i>RNA-seq of coding RNA of 19 human tissues from fetuses with congenital defects (NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium)</i>					0								[23]
<i>RNA-seq of coding RNA from tissue samples of 122 human individuals representing 32 different tissues (Irene's Lab)</i>	63	28	11	7	4	6	4	3	2	2	1	1	N/A
<i>Strand-specific RNA-seq of 13 human tissues (Michael Snyder's lab for the ENCODE project)</i>	42										0	0	adult [24]
<i>Illumina Body Map</i>	23				6		2				0	0	N/A [25-27]
<i>RNA-seq from 53 human tissue samples (Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project)</i>	14	30	0		1	6	1	0	5	5	2	2	N/A [28]
B. Mouse													
Study	Lungs	Teses	Vomeronasal organ	Skin	Kidney	Strain	Sex	Age					Associated references
<i>RNA-seq of the olfactory system of newborn mice</i>				35		32			C57BL/6J		mixed	newborn	N/A
<i>RNA-seq of mouse DBA/2J x C57BL/6J</i>	124						0,5		DBA/2J x C57BL/6J		N/A	adult	[29]
<i>Mammalian Kressmann C57Bl/6 mouse</i>	3					0,6			C57BL/6 and wild-type captured in Spain		mixed	adult	[30]
<i>Transcription profiling by high throughput sequencing of mouse brain, liver and the whole testis (Santoni et al.)</i>	81	6	21		0	0	C57BL/6				male	adult	[31]
<i>Strand-specific RNA-seq of nine mouse tissues</i>	87						C57BL/6				male	adult	[32]
<i>Strand-specific RNA-seq of nine mouse tissues</i>	77					0	DBA/2J				N/A	N/A	N/A
<i>Strand-specific RNA-seq of nine mouse tissues</i>	58					0	CD1				N/A	N/A	N/A
						0	C57BL/6				N/A	N/A	N/A

Numbers refer as transcripts per million, the gradation of blue illustrates the abundance of the transcript *SLC6A14*

Table 2 Expression of SLC6A14 at the mRNA and protein levels in the human respiratory tract

Sample	Tissue/cell types	mRNA	Protein	Ref
Tissues	Lung tissue samples		Expressed (WB)	[33]
Cell lines	Calu-3	Expressed (qPCR)	–	[37]
	NCI-H69	Expressed (qPCR)	–	[38]
	A549, BEAS-2B	Barely detectable (qPCR)	Undetected (WB)	[34]
	Calu-3, NCI-H441	Expressed (qPCR)	Expressed (WB)	[34]
	Calu-3, CFBE41o-	Expressed (qPCR)	–	[17]
	A549	–	Expressed (WB)	[35]
Primary cells	Alveolar type 2 cells isolated from control and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) lung tissue	Expressed. Reduced in IPF cells (scRNAseq, qPCR)	–	[36]
	Bronchial epithelial cells isolated from posttransplant tissue from healthy donors and CF patients	Expressed (qPCR)	–	[17]

Calu-3 human lung adenocarcinoma cell line, *NCI-H69* and *A549* human lung carcinoma cell line, *BEAS-2B* human bronchial epithelial cell line from a normal subject, *NCI-H441* human lung papillary adenocarcinoma cell line, *CFBE41o-* human cystic fibrosis bronchial epithelial cell line, – not studied, qPCR quantitative polymerase chain reaction, WB Western blot

Table 3 Expression of SLC6A14 at the mRNA and protein level in human gastrointestinal tract

Sample	Tissues/cell types	mRNA	Protein	Ref
Tissues	Intestinal epithelium (cholera patients)	Expressed	Expressed (IHC)	[42]
	Gastrointestinal tissues	Expressed	–	[43, 46]
Cell lines	Caco-2	Expressed	–	[42]
		Undetectable	–	[43]
		–	Expressed (WB & IF)	[44]
		Not expressed (PCR)	Not expressed (WB)	[16]
	CCD841, HT29, HCT116, HT29, LS174T	–	Expressed (WB)	[44]

Caco-2, *HT29* and *LS174T* human adenocarcinoma colorectal epithelial cell lines, *CCD841* normal human colon epithelial cell line, *HCT116* human colon epithelial cell line from colorectal carcinoma, *HT29* and *LS174T* human epithelial cell lines from colon adenocarcinoma (– not studied, WB Western blot, IF immunofluorescence, IHC immunohistochemistry)

[18]. Two studies then detected *SLC6A14* transcripts in mucosal biopsies from duodenum and rectum, respectively [41, 42]. Finally, Anderson et al. compared the expression of *SLC6A14* mRNA throughout the gastrointestinal tract and showed that stomach, duodenum, and descending colon expressed high levels of *SLC6A14* transcripts, while low levels were found in jejunum, ileum, ascending colon, and transverse colon [43]. Conflicting results have been obtained on the expression of *SLC6A14* in the human colon epithelial cell line Caco-2, reporting either some or no *SLC6A14* transcripts or protein [16, 42–44]. Interestingly, in mice, *SLC6A14* mRNA expression is negligible in the ileum of control animals, but is strongly induced in epithelial ileal cells of CF mice [45].

In vitro, it has been showed that *SLC6A14* expression may be modulated by several factors including toxins, bacterial constituents, and proinflammatory cytokines. Indeed,

Flach et al. showed that *SLC6A14* mRNA levels are significantly increased after 18 h of stimulation with cholera toxin in Caco-2 cells [42]. Other molecules have also been shown to regulate *SLC6A14* expression. For example, in porcine intestinal cells, Wang et al. showed that *SLC6A14* mRNA was increased by L-tryptophan [47]. Ikpa et al. also showed that antibiotic treatment of CF mice induces an important reduction of *SLC6A14* transcripts in ileal epithelial cells [45].

Genetic association studies in CF

Given the diversity of phenotypic severity in CF patients with the same causal *CFTR* variants, several genetic studies have been conducted to identify CF modifier genes. Among the identified loci, one locus on chromosome X, near the

Table 4 Genetic associations tested between *SLC6A14* variants and digestive and pulmonary manifestations in CF patients

rs ID (Alleles)	MAF	Variant localization	Association with	Number of CF patients	Cohort/patients characteristics	Ref
rs7879546 (T/C)	0.41	Intergenic	Lung disease severity	6365	Mean age: 19.5 years; PI (99.8%); F508del homozygotes (65%)	[8]
rs5905376 (C/A)	0.23	Intergenic	Lung disease severity			
rs5952223 (C/T)	0.23	Intergenic	Lung disease severity			
rs12839137 (G/A)	0.12	Intergenic	Presence of meconium ileus	6135	Two independent cohorts (patients with two severe <i>CFTR</i> mutations): 3,763 North American (F508del homozygotes 71.4%) and 2,372 French (> 6 years old) and American patients	[14]
			No association with pediatric lung disease severity	815	Mean age of lung function measurements: 12.63 years; F508del homozygotes: 62.3%	[10]
			No association with age of first infection by <i>P. aeruginosa</i>	730	Median age at first detection of positive <i>P. aeruginosa</i> culture: 5.55 years; F508del homozygotes: 61%	
			No association with early exocrine pancreatic disease	126	Median age of the first available IRT measurement: 0.36 years; F508del homozygotes: 60.3%	
			No association with early exocrine pancreatic damage	111	Patients from Colorado, median age at IRT measurement: 2 days; F508del homozygotes: 56%	[11]
rs5905283 (A/C)	0.47	Intergenic (2 KB Upstream Variant)	Presence of meconium ileus	6,135	Two independent cohorts (patients with two severe <i>CFTR</i> mutations): 3,763 North American (F508del homozygotes 71.4%) and 2,372 French (> 6 years old) and American patients	[14]
			Pediatric lung disease severity	815	Mean age of lung function measurements: 12.63 years; F508del homozygotes: 62.3%	[10]
			No association with age of first infection by <i>P. aeruginosa</i>	730	Median age at first detection of positive <i>P. aeruginosa</i> culture: 5.55 years; F508del homozygotes: 61%	
			No association with early exocrine pancreatic phenotypes	126	Median age of the first available IRT measurement: 0.36 years; F508del homozygotes: 60.3%	
			No association with early exocrine pancreatic damage	111	Patients from Colorado, median age at IRT measurement: 2 days; F508del homozygotes: 56%	[11]
rs3788766 (G/A)	0.36	Regulatory region	Presence of meconium ileus	6,135	Two independent cohorts (patients with two severe <i>CFTR</i> mutations): 3,763 North American (F508del homozygotes 71.4%) and 2,372 French (> 6 years old) and American patients	[14]
			Pediatric lung disease severity	815	Mean age of lung function measurements: 12.63 years; F508del homozygotes: 62.3%	[10]
			Age of first infection by <i>P. aeruginosa</i>	730	Median age at first detection of positive <i>P. aeruginosa</i> culture: 5.55 years; F508del homozygotes: 61%	
			No association with early exocrine pancreatic phenotypes	126	Median age of the first available IRT measurement: 0.36 years; F508del homozygotes: 60.3%	
			No association with early exocrine pancreatic damage	111	Patients from Colorado, median age at IRT measurement: 2 days; F508del homozygotes: 56%	[11]
			Early pulmonary symptoms	79	Brazilian patients	[12]
			<i>P. aeruginosa</i> infection	83		
			Presence of meconium ileus	6,770	Patients with two severe <i>CFTR</i> mutations associated with PI; F508del homozygotes: 64.2%	[9]
rs12710568 (G/C)	0.31	Regulatory region	Presence of meconium ileus	6,770	Patients with two severe <i>CFTR</i> mutations associated with PI; F508del homozygotes: 64.2%	[9]
rs5905177 (C/T)	0.35	<i>SLC6A14</i> intron	Presence of meconium ileus			

Chromosomal position (forward strand); minor allele in the European population, Minor allele Frequency (MAF), data were collected from Ensembl, 1000 Genomes, European population. IRT immunoreactive trypsinogen, PI pancreatic insufficiency

SLC6A14 gene, was associated with a variability in the severity of CF clinical manifestations including lung disease severity/pulmonary infections or presence of MI/onset of digestive symptoms (Table 4). Linkage disequilibrium pattern of the different genetic variants studies in this review is shown in Fig. 1.

The initial evidence showing that *SLC6A14* may be a modifier gene in CF has been described by Sun et al. in a “genome wide association study” (GWAS) involving 6135 CF patients [14]. This study identified a significant association between susceptibility to MI and three *SLC6A14* genetic variants (rs12839137, rs5905283, and rs3788766).

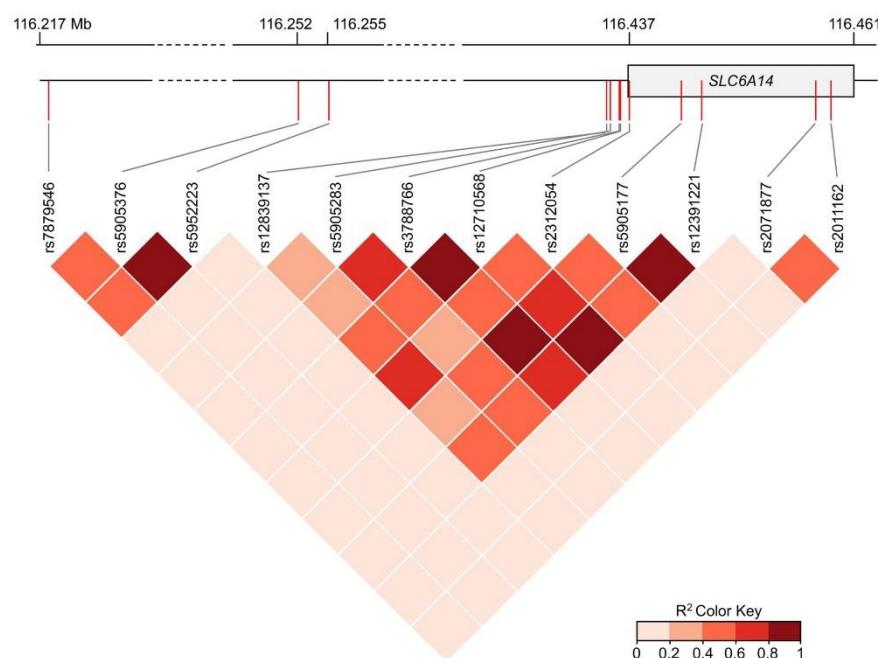


Fig. 1 Linkage disequilibrium (LD) pattern of the twelve *SLC6A14* genetic variants studied. The dark red squares indicate pairs in strong LD. R^2 are from <https://ldlink.nci.nih.gov>

In a study involving more than 6700 CF patients from the International CF Gene Modifier Consortium, Gong et al. recently replicated the association between susceptibility to MI and rs3788766 [9]. This study also identified an association between MI susceptibility and two new variants (rs12710568 and rs5905177) located within the *SLC6A14* regulatory region and *SLC6A14* intron, respectively. Several groups performed sex-specific association analysis based on the fact that *SLC6A14* gene is located within the region associated with random X-inactivation [9, 14]. Interestingly, they found higher odd ratios in male than in female only for genetic variants associated with susceptibility to MI.

Li et al. further assessed the association of MI risk alleles of *SLC6A14* with other CF co-morbidities, such as the lung disease severity and age at first *P. aeruginosa* infection [10]. Their study involved 815 CF Canadian pediatric patients who were genotyped for the following *SLC6A14* variants: rs12839137, rs5905283, and rs3788766. Among the variants studied, rs5905283 and rs3788766 risk alleles were associated with pediatric lung disease severity; whilst rs3788766 variant was associated with age at first *P. aeruginosa*

infection, as confirmed later in a smaller cohort [12]. In 2015, a GWAS involving 6,365 patients confirmed that *SLC6A14* modifies the severity of the lung disease in CF [8]. Indeed, the authors found a significant association between genotypes of three *SLC6A14* intergenic variants (rs7879546, rs5905376, and rs5952223) and the lung disease severity.

Gong et al. recently integrated GWAS and tissue-specific gene expression data to determine whether modifier loci on chromosome X (encompassing *SLC6A14*) influence *SLC6A14* mRNA expression levels in different tissues [9]. This kind of analysis indicates whether eQTL (expression quantitative trait loci) colocalize with loci associated with CF phenotypes that may indicate the existence of a genetic regulator. Their results showed that *SLC6A14* mRNA expression in CF nasal epithelia and in the pancreas colocalize with the lung disease and MI-associated variants, respectively, suggesting that each locus impacts *SLC6A14* expression with tissue specificity. Besides, neither association between *SLC6A14* genetic variants and early exocrine pancreatic phenotype nor immunoreactive trypsin levels at birth have been found [10, 11].

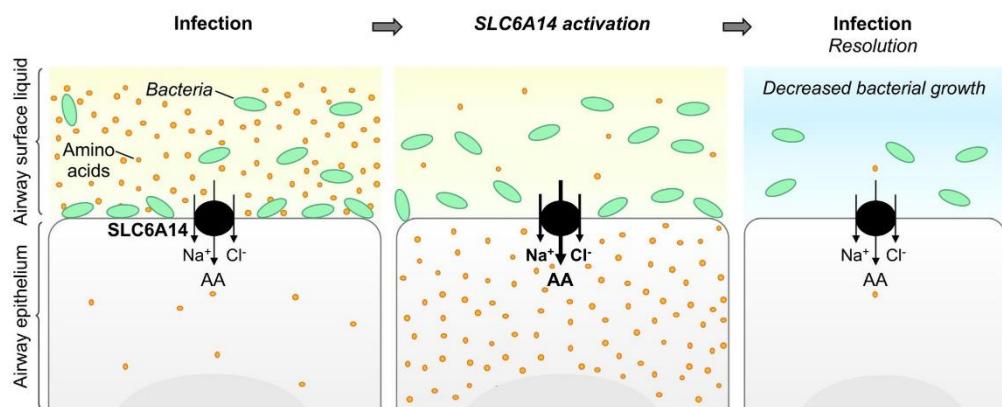


Fig. 2 Proposed mechanism of the role of SLC6A14 in the host response against *P. aeruginosa*. AA amino acids, Na^+ sodium ions, Cl^- chloride ions

Putative biological roles of SLC6A14 in CF

Several studies showed that SLC6A14 plays a primary role as an amino acid transporter in various epithelial cells and models [32, 48–52]. Taken together, SLC6A14 expression data in human and genetic studies suggest that SLC6A14 may have an important role in the lung and intestinal pathophysiology of CF patients (see Parts 1 and 2).

SLC6A14 function in the lung

In the lung, it was first suggested that the apical transport of amino acid in the airway epithelial cells may play an important role in infection resolution [32] as pathogens need amino acids to proliferate into the airways. The authors suggested that amino acid transporter at the apical membrane may be activated following infection to rapidly decrease the amino acid concentration of the airway surface liquid (ASL) (Fig. 2). This phenomenon could then help to fight against infections. This hypothesis is supported by the unique characteristics of SLC6A14 allowing it to strongly concentrate all essential amino acids into the cytoplasm of epithelial cells.

As SLC6A14 genetic variants have been associated with age at first acquisition of *P. aeruginosa* in CF patients, Di Paola et al. sought to determine how SLC6A14 might impact the airways colonization by these bacteria [17]. They suggested that exposure to *P. aeruginosa* increased SLC6A14 mRNA expression, inducing a decrease in amino acid concentration in the ASL that resulted in a decrease in *P. aeruginosa* attachment to the airway epithelial cells rather than a reduced viability of planktonic *P. aeruginosa*. Indeed, they

found that purified flagellin from *P. aeruginosa* enhanced SLC6A14 mRNA expression and SLC6A14-dependent arginine import in Calu-3 cells and in primary airway epithelial cells from non-CF and CF patients. Moreover, they showed that pharmacological inhibition of SLC6A14 increased *P. aeruginosa* attachment in non-CF primary airway epithelial cells and slightly in the bronchial epithelial cell line CFBE41o-.

Ahmadi et al. recently reported that arginine transport through SLC6A14 increased F508del-CFTR Cl^- efflux in CF airway epithelial cells stimulated with or without a CFTR corrector, lumacaftor [15]. They also observed that this increase in CFTR function induced an increase in the ASL height and that the potentiation of F508del-CFTR channel function in CF cells induced by SLC6A14 arginine uptake occurred via the nitric oxide (NO) signaling pathway (Fig. 3). Finally, they suggested that SLC6A14 activation may be considered as a complement therapy to CFTR correction and potentiation in CF patients.

SLC6A14 function in the gastrointestinal tract

Ahmadi et al. also conducted another study to determine the biological function of SLC6A14 in the murine gastrointestinal tract [16]. They first demonstrated that SLC6A14 is a major apical amino acid transporter in the murine colon. Indeed, *Slc6a14(-/-)* mice exhibited almost 75% reduction in apical arginine transport compared to WT mice. In CF mice, they observed that *Slc6a14* disruption induced a reduction in weight gain and BMI post-weaning and worsen the intestinal phenotype, i.e., decreased F508del-CFTR-mediated fluid secretion. They also highlighted that SLC6A14 does not seem to affect

Fig. 3 Relationships between SLC6A14, F508del-CFTR, and nitric oxide signaling pathway. *CF* cystic fibrosis, *ASL* airway surface liquid, *AA* amino acids, Na^+ sodium ions, Cl^- chloride ions, HCO_3^- bicarbonate ions, *iNOS* inducible NO synthetase, *NO* nitric oxide

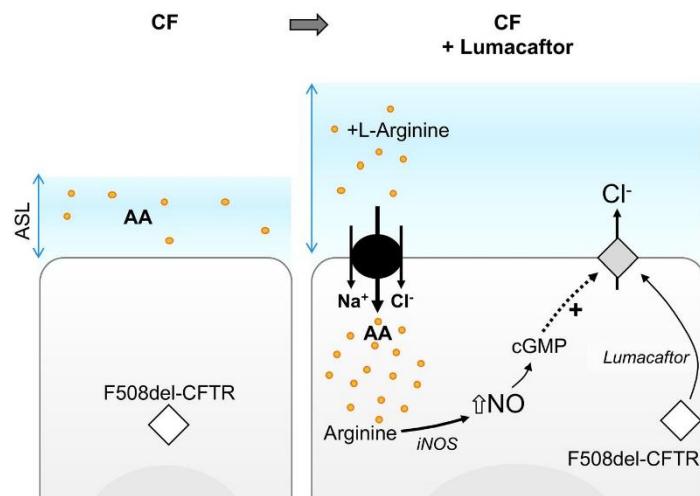


Table 5 Expression of SLC6A14 in other diseases

Disease	SLC6A14 expression	Methods	Ref
Cancer	Cervical	Up-regulated	[54]
	Colorectal	Up-regulated	[55]
	Pancreatic	Up-regulated	[56, 57]
	Breast (ER +)	Up-regulated	[58]
Colonic diseases	Crohn's disease	Up-regulated	[46]
	Ulcerative colitis	Up-regulated	[41, 59, 60]
	Long vs. short duration of ulcerative colitis	Down-regulated	[61]
	Ischemic or infectious colitis	Up-regulated	[60]
Cholera	Acute vs. convalescence phase	Up-regulated	[42]
IPF	IPF	Down-regulated	[36]
	IPF vs. NSIP	Up-regulated	[62]

ER+ estrogen receptor-positive, *IPF* idiopathic pulmonary fibrosis, *NSIP* non-specific interstitial pneumonia. If not specifically mentioned, the expression of SLC6A14 is relative to control patients. *IF* immunofluorescence, *IH* immunohistochemistry, *HIS* hybridization in situ, *PCR* polymerase chain reaction, *WB* western blot

the processing or stability of F508del-CFTR neither co-immunoprecipitated with F508del-CFTR in an F508del-CFTR BHK over-expression system, which led them to investigate intracellular signaling such as NO synthesis. They observed that SLC6A14 inhibition impaired arginine uptake by intestinal epithelial cells inducing both a decrease in NO production and cGMP regulation of F508del-CFTR. These results suggest that an increase in SLC6A14 activity may enhance NO production and F508del-CFTR residual activity in CF tissues. However,

it is not known whether these mechanisms are conserved in humans.

It has to be emphasized that in the lung or the intestine, functional studies were conducted with either over-expression (plasmid) or inhibition experiments (siRNA) of the whole gene. The role of the specific genetic variants identified in genetic studies (see Part entitled "Genetic association studies in CF") is not yet known and further elucidation is warranted.

Table 6 Genetic associations tested between *SLC6A14* variants and diseases

rs ID (alleles)	MAF	Variant localization	Association with	Number of patients/cohort characteristics	Ref
rs2312054 (A/T)	0.21	<i>SLC6A14</i> intron	Food intake	344 children, age 7–8 years	[70]
rs12391221 (C/A)	0.30	<i>SLC6A14</i> intron	Food intake	344 children, age 7–8 years	[70]
rs2071877 (C/T)	0.30	<i>SLC6A14</i> intron	Obesity	1267 obese adults and 649 lean controls (French)	[71]
			Adiposity	344 children, age 7–8 years	[70]
rs2011162 (C/G)	0.45	<i>SLC6A14</i> exon 14; 3'UTR	Obesity	Two independent cohorts: 117 obese and 182 controls (Finnish); 837 obese and 968 controls (Finnish and Swedish)	[72]
			Obesity	1267 obese adults and 649 lean controls (French)	[71]
			Reduced fat oxidation in women	722 obese subjects of white European origin (541 women, 181 men), age 20–25 years	[73]
			Male infertility	370 infertile men and 241 fertile controls (Macedonian and Slovenian)	[74]
rs2312054(A)/ rs2071877(C)/ rs2011162(G) haplotype			Male infertility	370 infertile men and 241 fertile controls (Macedonian and Slovenian)	[74]

Chromosomal position (forward strand); Alleles (Minor), Minor allele Frequency (MAF), data were collected from Ensembl, 1000 Genomes, European population

***SLC6A14* in non-CF diseases**

***SLC6A14* expression in other diseases**

SLC6A14 expression has been shown to be differentially up-regulated in several pathological contexts (Table 5), especially in cancer and colonic diseases (reviewed in [53]).

Cancer

SLC6A14 is significantly upregulated in tissues from cervical [54], colorectal [55], pancreatic [56, 57], and estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer [58]. In ER+ breast cancer, high expression of *SLC6A14* mRNA has been correlated with a better survival among patients [63]. Using a mouse model of spontaneous breast cancer, Babu et al. showed that its development and progression was significantly decreased when the mice were crossed with *Slc6a14*^{-/-} mice [64]. The molecular mechanisms associated with these up- or down-regulations are largely unknown. *SLC6A14* expression was shown to be regulated by estrogen [58] which explains its specific increased expression in ER+ but not in ER- breast cancer. Also, inverse expression patterns of *SLC6A14* mRNA and the microRNA (miR)-23a [65, 66] were found suggesting its regulatory effect. However, no functional studies (using miR mimic or inhibitors) confirmed miR-23a involvement in *SLC6A14* expression regulation. In contrast, inverse correlation of miR-23b-3p [67] and *SLC6A14* expression was recently confirmed. Functional studies have shown that the downregulation of *SLC6A14* observed in endocrine therapy (ER + breast cancer standard

of care)-resistant cells is associated with an increase of miR-23b-3p [63].

Colonic diseases

SLC6A14 mRNA levels are significantly higher in colonic mucosal specimens obtained from patients with Crohn's disease compared to controls [46]. *SLC6A14* expression was also increased in rectal and colonic biopsies from patients with ulcerative colitis or infectious/ischemic colitis compared to controls, suggesting that *SLC6A14* upregulation might be the result of the inflammatory context rather than a specific pathophysiological consequence of the ulcerative colitis [41, 59, 60, 68]. Low et al. further observed that *SLC6A14* was down-regulated in colonic biopsies from patients with long-duration of ulcerative colitis compared with patients with short duration [61]. In rats, D'Argenio et al. showed that experimental colitis induced a marked decrease in *SLC6A14* transcript expression in the colon [69]. Finally, Kou et al. found that colon cancer cell lines over-expressed *SLC6A14* compared to normal colon cells [44].

Idiopathic pulmonary fibrosis

SLC6A14 has been found to be downregulated in alveolar-type II cells of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients [36], while it is overexpressed in specimens from explanted lungs of patients with non-specific interstitial pneumonia compared to specimens from IPF patients [62].

Infectious diseases

SLC6A14 mRNA levels have been shown to be increased in biopsies of duodenum collected during the acute phase of cholera compared to biopsies collected during convalescence phase [42].

Genetic associations studies in other diseases

Four additional *SLC6A14* genetic variants have been associated with phenotypic variability in other diseases than CF (Table 6).

SLC6A14 genetic variants have been associated with obesity in different populations (Table 6). In a candidate gene analysis, later replicated in an independent cohort, Suviołakht et al. found significant differences in *SLC6A14* rs2011162 genetic variant allele frequencies between obese and non-obese subjects [72]. Another study suggested an association between the rs2011162 and fat oxidation in women which may be, when not adapted to fat intake, responsible to weight gain over time [73]. Finally, in a French family cohort study comprising of 1,267 obese adults and 649 lean control subjects, Durand et al. found a significant association between rs2011162 and fat oxidation in women which may be, when not adapted to fat intake, responsible to weight gain over time [73]. Finally, in a French family cohort study comprising of 1,267 obese adults and 649 lean control subjects, Durand et al. found a significant association between rs2011162 genetic variant and obesity. They observed that the risk allele was associated with higher body fat and modified perception of hunger and satiety in adult women with moderate obesity and in obese girls [71]. Durand et al. also identified an association between *SLC6A14* rs2071877 genetic variant and obesity in a French cohort [71]. This variant has also been associated with sum of triceps and subscapular skinfolds thickness, an objective measure of adiposity, in boys 7–8 of age [70]. Finally, Miranda et al. also found evidences of associations between two other genetic variants, rs2312054 and rs12391221, and several parameters used to assess the food intake in children [70].

SLC6A14 genetic variants have been also associated with male infertility. Indeed, Noveški et al. found that rs2011162 alone and rs2011162(G)/rs2071877(C)/rs2312054(A) haplotype were differently distributed among fertile and infertile groups in their cohort [74]. As rs2011162 is located within the 3'UTR region of *SLC6A14*, they investigated the possible consequences of this genetic variation on the RNA secondary structure. They found a significant structural effect of this genetic variant that may result in a differential mRNA expression depending on the allele.

It was recently shown that *SLC6A14* expression quantitative trait loci (eQTL) from nasal epithelial cells and pancreas tissues coincide with lung disease and meconium ileus-associated variants, respectively, supporting an important role for *SLC6A14* variants in CF [9]. However, whether in CF or other diseases, the functional in vitro/in vivo consequences of identified *SLC6A14* genetic variants on *SLC6A14* protein expression and/or function have never been studied. This gap

in knowledge needs to be addressed to better understand the molecular mechanisms by which *SLC6A14* affect phenotypes or diseases. *SLC6A14* genetic variants described in this review are located in the non-coding region either intergenic or located in the regulatory region (promoter), introns, or in the 3'UTR region of *SLC6A14*, and, subsequently, do not modify the amino acid sequence of *SLC6A14* protein. However, these variants may have multiple effects not only on *SLC6A14*, but also on nearby and/or distant genes. For example, genetic variants located in the promoter may affect transcriptional activity by altering transcription factor binding. Other functional consequences of these SNPs have to be studied including DNA methylation and histone modifications, alternative splicing, conformation and stability of mRNA as well as structure, expression level, and function of proteins. Even if bioinformatic tools may predict functional consequences of genetic variants, downstream in vitro/in vivo experimental studies will also be necessary. Successfully used for several complex traits, genome-editing technologies may also be used to create isogenic cell lines with specific alleles to assess their functionality including chromatin structure, transcription factor binding, gene and protein expression, and specific cellular assays [75]. Furthermore, as previously mentioned, in addition to the impact of genetic variants, *SLC6A14* expression can be regulated by environmental factors (inflammatory molecules, pathogens, and pharmacological treatments) and possibly age (fetal vs. adult, Table 1). Thus, the development of different experimental models to identify the causality of *SLC6A14* expression and function variability over the course of disease progression will be a major challenge.

Conclusion

SLC6A14 seems to be predominantly expressed in epithelial cells of the human lung and to a lesser extent in the human gastrointestinal epithelium. Importantly, *SLC6A14* expression profiles appear to be different between human and mice, suggesting that studies investigating the biological roles of this protein in murine models may not directly correlate with findings obtained in human models. Several groups have observed that *SLC6A14* levels are up- or down-regulated in pathological conditions; however, the mechanisms involved in these dysregulations have mostly not been elucidated. Moreover, some studies have demonstrated that inflammatory mediators and pathogen molecules may impact *SLC6A14* expression.

Furthermore, genetic studies highlight that *SLC6A14* genetic variants modulate the severity of digestive and pulmonary diseases in CF patients. The biological function of this pleiotropic modifier gene is not fully explained and

the biological direct consequences of identified variants in genetic studies remained to be clarified. However, some recent studies suggest that SLC6A14 may play an important role in the response to respiratory infection and fluid secretion related to CFTR. Thus, SLC6A14 may be a potential therapeutic target to improve anti-infective response and CFTR function and/or correction in CF patients in a personalized way.

Acknowledgements The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project was supported by the Common Fund of the Office of the Director of the National Institutes of Health, and by NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, and NINDS. The data described in this manuscript were obtained from the GTEx Portal on 12/18/2018.

Funding LG received a grant from the French cystic fibrosis non-profit organization Vaincre la mucoviscidose (RF20180502243) and a PHC (Programme Hubert Curien) PHC FASIC 2017. MR received a postdoctoral fellowship from the French cystic fibrosis non-profit organization Vaincre la mucoviscidose (RF20180502243).

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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence 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 licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245(4922):1073–1080. <https://doi.org/10.1126/science.2570460>
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245(4922):1066–1073
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245(4922):1059–1065. <https://doi.org/10.1126/science.2772657>
- Kerem E, Viviani L, Zolin A, MacNeill S, Hatzigorou E et al (2014) Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the ECFS patient registry. *Eur Respir J* 43(1):125–133. <https://doi.org/10.1183/09031936.00166412>
- Cutting GR (2015) Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 16(1):45–56. <https://doi.org/10.1038/nrg3849>
- Guillot L, Beucher J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A et al (2014) Lung disease modifier genes in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 52:83–93. <https://doi.org/10.1016/j.biocell.2014.02.011>
- McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML (2003) Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 361(9370):1671–1676. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13368-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13368-5)
- Corvol H, Blackman SM, Boelle PY, Gallins PJ, Pace RG et al (2015) Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun* 6:3832. <https://doi.org/10.1038/ncomms9382>
- Gong J, Wang F, Xiao B, Panjwani N, Lin F et al (2019) Genetic association and transcriptome integration identify contributing genes and tissues at cystic fibrosis modifier loci. *PLoS Genet* 15(2):e1008007. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008007>
- Li W, Soave D, Miller MR, Keenan K, Lin F et al (2014) Unraveling the complex genetic model for cystic fibrosis: pleiotropic effects of modifier genes on early cystic fibrosis-related morbidities. *Hum Genet* 133(2):151–161. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1363-7>
- Miller MR, Soave D, Li W, Gong J, Pace RG et al (2015) Variants in solute carrier SLC26A9 modify prenatal exocrine pancreatic damage in cystic fibrosis. *J Pediatr* 166(5):1152–1157. [https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.01.044\(e1156\)](https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.01.044(e1156)
- Pereira SV, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL (2017) Association of clinical severity of cystic fibrosis with variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1 and SLC9A3). *Gene* 629:117–126. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.068>
- Pereira SVN, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL (2018) Interaction among variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1, and SLC9A3) and CFTR mutations with clinical markers of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 53(7):888–900. <https://doi.org/10.1002/ppul.24005>
- Sun L, Rommens JM, Corvol H, Li W, Li X et al (2012) Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 44(5):562–569. <https://doi.org/10.1038/ng.2221>
- Ahmadi S, Wu YS, Li M, Ip W, Lloyd-Kuzik A et al (2019) Augmentation of CFTR function in human bronchial epithelial cells via SLC6A14-dependent amino acid uptake: implications for treatment of cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. <https://doi.org/10.1165/crmb.2019.00940C>
- Ahmadi S, Xia S, Wu YS, DiPaola M, Kissoon R et al (2018) SLC6A14, an amino acid transporter, modifies the primary CF defect in fluid secretion. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/elife.37963>
- DiPaola M, Park AJ, Ahmadi S, Roach EJ, Wu YS et al (2017) SLC6A14 is a genetic modifier of cystic fibrosis that regulates *Pseudomonas aeruginosa* attachment to human bronchial epithelial cells. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.02073-17>
- Sloan JL, Mager S (1999) Cloning and functional expression of a human Na(+) and Cl(-)-dependent neutral and cationic amino acid transporter B(0+). *J Biol Chem* 274(34):23740–23745. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23740>
- Pramod AB, Foster J, Carvelli L, Henry LK (2013) SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol Aspects Med* 34(2–3):197–219. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.002>
- Rogala-Kozierska K, Samluk L (1866) Nalecz KA (2019) Amino acid transporter SLC6A14 depends on heat shock protein HSP90 in trafficking to the cell surface. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 10:1544–1555. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2019.07.009>
- Kovalchuk V, Samluk L, Juraszek B, Jurkiewicz-Trzaska D, Sucic S et al (1866) (2019) Trafficking of the amino acid transporter B(0+)(SLC6A14) to the plasma membrane involves an exclusive interaction with SEC24C for its exit from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2:252–263. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2018.11.005>
- Roadmap Epigenomics C, Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M et al (2015) Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518(7539):317–330. <https://doi.org/10.1038/nature14248>

23. Lin S, Lin Y, Nery JR, Urich MA, Breschi A et al (2014) Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(48):17224–17229. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413624111>
24. Asmann YW, Necela BM, Kalari KR, Hossain A, Baker TR et al (2012) Detection of redundant fusion transcripts as biomarkers or disease-specific therapeutic targets in breast cancer. *Cancer Res* 72(8):1921–1928. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3142>
25. Barbosa-Morais NL, Irimia M, Pan Q, Xiong HY, Guerousov S et al (2012) The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science* 338(6114):1587–1593. <https://doi.org/10.1126/science.1230612>
26. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S et al (2012) The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 22(9):1775–1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
27. Consortium GT (2015) Human genomics. The genotype-tissue expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science* 348(6235):648–660. <https://doi.org/10.1126/science.1262110>
28. Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, White MA, Wong K et al (2011) Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature* 477(7364):289–294. <https://doi.org/10.1038/nature10413>
29. Brawand D, Soumilon M, Necsulea A, Julien P, Csardi G et al (2011) The evolution of gene expression levels in mammalian organs. *Nature* 478(7369):343–348. <https://doi.org/10.1038/nature10532>
30. Huntley MA, Lou M, Goldstein LD, Lawrence M, Dijkgraaf GJ et al (2016) Complex regulation of ADAR-mediated RNA-editing across tissues. *BMC Genomics* 17:61. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2291-9>
31. Soumilon M, Necsulea A, Weier M, Brawand D, Zhang X et al (2013) Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. *Cell Rep* 3(6):2179–2190. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.031>
32. Galietta LJ, Musante L, Romio L, Caruso U, Fantasia A et al (1998) An electrogenic amino acid transporter in the apical membrane of cultured human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 275(5):L917–923. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.275.5.L917>
33. Sloan JL, Grubb BR, Mager S (2003) Expression of the amino acid transporter ATB 0+ in lung: possible role in luminal protein removal. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(1):L39–49. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00164.2002>
34. Ingoglia F, Visigalli R, Rotoli BM, Barilli A, Riccardi B et al (1858) Functional activity of L-carnitine transporters in human airway epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2:210–219. <https://doi.org/10.1016/j.bbapm.2015.11.013>
35. Luo Q, Yang B, Tao W, Li J, Kou L et al (2017) ATB0(+) transporter-mediated targeting delivery to human lung cancer cells via aspartate-modified docetaxel-loading stealth liposomes. *Biomater Sci* 5(2):295–304. <https://doi.org/10.1039/c6bm00788k>
36. Xu Y, Mizuno T, Sridharan A, Du Y, Guo M et al (2016) Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight* 1(20):e90558. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90558>
37. Rotoli BM, Bussolati O, Sala R, Gazzola GC, Dall'Asta V (2005) The transport of cationic amino acids in human airway cells: expression of system y+L activity and transepithelial delivery of NOS inhibitors. *FASEB J* 19(7):810–812. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2924fjc>
38. Muller A, Chiotellis A, Keller C, Ametamey SM, Schibli R et al (2014) Imaging tumour ATB0,+ transport activity by PET with the cationic amino acid O-2((2-[18F]fluoroethyl)methyl-amino)ethyltyrosine. *Mol Imaging Biol* 16(3):412–420. <https://doi.org/10.1007/s11307-013-0711-2>
39. Gorrieri G, Scudieri P, Caci E, Schiavon M, Tomati V et al (2016) Goblet cell hyperplasia requires high bicarbonate transport to support mucin release. *Sci Rep* 6:36016. <https://doi.org/10.1038/srep36016>
40. Chin S, Hung M, Won A, Wu YS, Ahmadi S et al (2018) Lipophilicity of the cystic fibrosis drug, Ivacaftor (VX-770), and its destabilizing effect on the major CF-causing mutation: F508del. *Mol Pharmacol* 94(2):917–925. <https://doi.org/10.1124/mol.118.112177>
41. Eriksson A, Flach CF, Lindgren A, Kvifors E, Lange S (2008) Five mucosal transcripts of interest in ulcerative colitis identified by quantitative real-time PCR: a prospective study. *BMC Gastroenterol* 8:34. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-8-34>
42. Flach CF, Qadri F, Bhuiyan TR, Alam NH, Jennische E et al (2007) Differential expression of intestinal membrane transporters in cholera patients. *FEBS Lett* 581(17):3183–3188. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.001>
43. Anderson CM, Howard A, Walters JR, Ganapathy V, Thwaites DT (2009) Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H+-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na+- and Cl(-)-dependent TauT (SLC6A6). *J Physiol* 587(Pt 4):731–744. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.164228>
44. Kou L, Yao Q, Sivaprakasam S, Luo Q, Sun Y et al (2017) Dual targeting of L-carnitine-conjugated nanoparticles to OCTN2 and ATB(0,+) to deliver chemotherapeutic agents for colon cancer therapy. *Drug Deliv* 24(1):1338–1349. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1377316>
45. Ikpa PT, Meijse KF, Nieuwenhuijze NDA, Dulla K, de Jonge HR et al (2019) Transcriptome analysis of the distal small intestine of Cftr null mice. *Genomics*. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.06.028>
46. Eriksson A, Jennische E, Flach CF, Jorge A, Lange S (2008) Real-time PCR quantification analysis of five mucosal transcripts in patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20(4):290–296. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3282f3557c>
47. Wang H, Ji Y, Wu G, Sun K, Sun Y et al (2015) L-Tryptophan activates mammalian target of rapamycin and enhances expression of tight junction proteins in intestinal porcine epithelial cells. *J Nutr* 145(6):1156–1162. <https://doi.org/10.3945/jn.114.209817>
48. Anderson CM, Ganapathy V, Thwaites DT (2008) Human solute carrier SLC6A14 is the beta-alanine carrier. *J Physiol* 586(17):4061–4067. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154500>
49. Jain-Vakkalagadda B, Pal D, Gunda S, Nashed Y, Ganapathy V et al (2004) Identification of a Na+-dependent cationic and neutral amino acid transporter, B(0,+), in human and rabbit cornea. *Mol Pharm* 1(5):338–346
50. Kekuda R, Torres-Zamorano V, Fei YJ, Prasad PD, Li HW et al (1997) Molecular and functional characterization of intestinal Na(+)-dependent neutral amino acid transporter B0. *Am J Physiol* 272(6 Pt 1):G1463–1472. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.6.G1463>
51. Uchiyama T, Fujita T, Gukasyan HJ, Kim KJ, Borok Z et al (2008) Functional characterization and cloning of amino acid transporter B(0,+) (ATB(0,+)) in primary cultured rat pneumocytes. *J Cell Physiol* 214(3):645–654. <https://doi.org/10.1002/jcp.21254>
52. Ugawa S, Sunouchi Y, Ueda T, Takahashi E, Saishin Y et al (2001) Characterization of a mouse colonic system B(0+) amino acid transporter related to amino acid absorption in colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(2):G365–370. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.2.G365>
53. Sikder MOF, Yang S, Ganapathy V, Bhutia YD (2017) The Na(+)Cl(-)-coupled, broad-specific, amino acid transporter SLC6A14

- (ATB(0,+)): emerging roles in multiple diseases and therapeutic potential for treatment and diagnosis. *AAPS J* 20(1):12. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0164-7>
54. Gupta N, Prasad PD, Ghamande S, Moore-Martin P, Herdman AV et al (2006) Up-regulation of the amino acid transporter ATB(0,+) (SLC6A14) in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 100(1):8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.08.016>
 55. Gupta N, Miyauchi S, Martindale RG, Herdman AV, Podolsky R et al (2005) Upregulation of the amino acid transporter ATB(0,+) (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans. *Biochim Biophys Acta* 1741(1–2):215–223. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2005.04.002>
 56. Coonthakandaswamy V, Cao S, Xu Y, Prasad PD, Singh PK et al (2016) Amino acid transporter SLC6A14 is a novel and effective drug target for pancreatic cancer. *Br J Pharmacol* 173(23):3292–3306. <https://doi.org/10.1111/bph.13616>
 57. Penheiter AR, Erdogan S, Murphy SJ, Hart SN, Felipe Lima J et al (2015) Transcriptomic and immunohistochemical profiling of SLC6A14 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biomed Res Int* 2015:593572. <https://doi.org/10.1155/2015/593572>
 58. Karunakaran S, Ramachandran S, Coonthakandaswamy V, Elangovan S, Babu E et al (2011) SLC6A14 (ATB0,+) protein, a highly concentrative and broad specific amino acid transporter, is a novel and effective drug target for treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *J Biol Chem* 286(36):31830–31838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229518>
 59. Flach CF, Eriksson A, Jennische E, Lange S, Gunnerek C et al (2006) Detection of elafin as a candidate biomarker for ulcerative colitis by whole-genome microarray screening. *Inflamm Bowel Dis* 12(9):837–842. <https://doi.org/10.1097/01.mii.0000232469.23574.11>
 60. Van der Goten J, Vanhove W, Lemaire K, Van Lommel L, Machiels K et al (2014) Integrated miRNA and mRNA expression profiling in inflamed colon of patients with ulcerative colitis. *PLoS ONE* 9(12):e116117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116117>
 61. Low END, Mokhtar NM, Wong Z, Raja Ali RA (2019) Colonic mucosal transcriptomic changes in patients with long-duration ulcerative colitis revealed colitis-associated cancer pathways. *J Crohns Colitis* 13(6):755–763. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz002>
 62. Cecchini MJ, Hosein K, Howlett CJ, Joseph M, Mura M (2018) Comprehensive gene expression profiling identifies distinct and overlapping transcriptional profiles in non-specific interstitial pneumonia and idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 19(1):153. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0857-1>
 63. Bacci M, Lorito N, Ippolito L, Ramazzotti M, Luti S et al (2019) Reprogramming of amino acid transporters to support aspartate and glutamate dependency sustains endocrine resistance in breast cancer. *Cell Rep* 28(1):104–118. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.010>
 64. Babu E, Bhutia YD, Ramachandran S, Gnanaprakasam JP, Prasad PD et al (2015) Deletion of the amino acid transporter Slc6a14 suppresses tumour growth in spontaneous mouse models of breast cancer. *Biochem J* 469(1):17–23. <https://doi.org/10.1042/BJ20150437>
 65. Li XH, Qu JQ, Yi H, Zhang PF, Yi HM et al (2014) Integrated analysis of differential miRNA and mRNA expression profiles in human radioresistant and radiosensitive nasopharyngeal carcinoma cells. *PLoS ONE* 9(1):e87767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087767>
 66. Zhu M, Wang N, Tsao SW, Yuen MF, Feng Y et al (2011) Up-regulation of microRNAs, miR21 and miR23a in human liver cancer cells treated with *Coptidis rhizoma* aqueous extract. *Exp Ther Med* 2(1):27–32. <https://doi.org/10.3892/etm.2010.164>
 67. Bisognin A, Sales G, Coppo A, Bortoluzzi S, Romualdi C (2012) MAGIA(2): from miRNA and genes expression data integrative analysis to microRNA-transcription factor mixed regulatory circuits (2012 update). *Nucleic Acids Res* 40(Web Server issue):W13–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gks460>
 68. Yanai H, Ben-Shachar S, Baram L, Elad H, Gitstein G et al (2015) Gene expression alterations in ulcerative colitis patients after restorative proctocolectomy extend to the small bowel proximal to the pouch. *Gut* 64(5):756–764. <https://doi.org/10.1136/gutjnlg-2014-307387>
 69. D'Argenio G, Calvani M, Casamassimi A, Petillo O, Margarucci S et al (2006) Experimental colitis: decreased Octn2 and Atb0+ expression in rat colonocytes induces carnitine depletion that is reversible by carnitine-loaded liposomes. *FASEB J* 20(14):2544–2546. <https://doi.org/10.1096/fj.06-5950fje>
 70. Miranda RC, Vetter SB, Genro JP, Campagnolo PD, Mattevi VS et al (2015) SLC6A14 and 5-HT2C polymorphisms are associated with food intake and nutritional status in children. *Clin Biochem* 48(18):1277–1282. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.07.003>
 71. Durand E, Boutin P, Meyre D, Charles MA, Clement K et al (2004) Polymorphisms in the amino acid transporter solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter) member 14 gene contribute to polygenic obesity in French Caucasians. *Diabetes* 53(9):2483–2486. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.9.2483>
 72. Suviolahti E, Oksanen LJ, Ohman M, Cantor RM, Ridderstrale M et al (2003) The SLC6A14 gene shows evidence of association with obesity. *J Clin Invest* 112(11):1762–1772. <https://doi.org/10.1172/JCI17491>
 73. Corpeleijn E, Petersen L, Holst C, Saris WH, Astrup A et al (2010) Obesity-related polymorphisms and their associations with the ability to regulate fat oxidation in obese Europeans: the NUGENOB study. *Obesity (Silver Spring)* 18(7):1369–1377. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.377>
 74. Noveski P, Mircevska M, Plaseski T, Peterlin B, Plaseska-Karanfilska D (2014) Study of three single nucleotide polymorphisms in the SLC6A14 gene in association with male infertility. *Balkan J Med Genet* 17(2):61–66. <https://doi.org/10.2478/bjmg-2014-0075>
 75. Smith AJP, Deloukas P, Munroc PB (2018) Emerging applications of genome-editing technology to examine functionality of GWAS-associated variants for complex traits. *Physiol Genomics* 50(7):510–522. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00028.2018>

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

IV- Annexe 4 : Valorisations

1. Communications orales et affichées

2021

J. Bigot, L. Guillot, J. Guitard, H. Corvol, M. Chignard, C. Hennequin et V. Balloy « Mémoire de l'immunité innée chez les cellules épithéliales bronchiques : impact sur la réponse inflammatoire aux infections fongiques rencontrées chez les patients atteints de mucoviscidose », 2eme journée des Jeunes Chercheuses et Jeunes Chercheurs en Mycologie Médicale, Société française de Mycologie Médicale (SFMM), 27 janvier 2021. **Communication orale**, Webinar.

2020

J. Bigot, L. Guillot, J. Guitard, M. Ruffin, H. Corvol, M. Chignard, C. Hennequin et V. Balloy, « La mémoire immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques », Colloque français des jeunes chercheurs de l'association « Vaincre la Mucoviscidose », 14 février 2020, Institut Pasteur, Paris, France. **Poster n°20**.

J. Bigot, R. Legendre, M. Ruffin, L. Guillot, J. Guitard, H. Corvol, C. Chica, M. Chignard, C. Hennequin et V. Balloy « La mémoire immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques », Journées de la recherche respiratoire (J2R), 16 octobre 2020. **Communication orale**, Webinar.

2019

J. Bigot, J. Guitard, C. Hennequin, H. Corvol, L. Guillot, M. Chignard, V. Balloy « Mémoire de l'immunité innée des cellules épithéliales bronchiques : impact sur la réponse inflammatoire aux infections fongiques rencontrées chez les patients atteints de mucoviscidose ». Colloque français des jeunes chercheurs de l'association « Vaincre la Mucoviscidose », 26 février 2019, Institut Pasteur, Paris, France. **Poster n°17**.

J. Bigot, J. Guitard, L. Guillot, H. Corvol, M. Chignard, C. Hennequin, V. Balloy, « Respiratory epithelial cells can remember infection » 16th European Cystic Fibrosis Society Basic Science conference, 27-30 mars 2019, Dubrovnik, Croatie. **Poster n°72**.

J. Bigot, L. Guillot, J. Guitard, H. Corvol, M. Chignard, C. Hennequin, V. Balloy, « La mémoire immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques », 15^e séminaire annuel du centre de recherche Saint-Antoine, 22-23 novembre 2019, Lieusaint, France. **Communication orale**.

2018

J. Bigot, J. Guitard, C. Hennequin, H. Corvol, M. Chignard, V. Balloy « Mémoire immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques : application à une infection par *Aspergillus fumigatus* ». Journées de Recherche Respiratoires, 12-13 octobre 2018, Marseille, France. **Poster n°60**.

J. Bigot, J. Guitard, C. Hennequin, H. Corvol, M. Chignard, V. Balloy « Mémoire immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques : application à une infection par *Aspergillus fumigatus* » 14e séminaire annuel du centre de recherche Saint-Antoine, 15-16 novembre 2018, Montvillargenne, France.

Poster.

2. Publications

a. Publiées

Bigot J., Guillot L., Guitard J., Ruffin M., Corvol H., Chignard M., Hennequin C., & Balloy V., “*Respiratory Epithelial Cells Can Remember Infection: A Proof of Concept Study*” *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 221, Issue 6, 15 March 2020, Pages 1000–1005, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz569>.

Bigot J., Guillot L., Guitard J., Corvol H., Balloy V., & Hennequin C., “*Bronchial epithelial cells: on the front line to fight Aspergillus fumigatus against lung invasion*”, *Frontiers in Immunology*, 2020, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01041>

Ruffin M., Mercier J., Calmel C., Mésinèle J., **Bigot J.**, Sutanto E. N., Kicic A., Corvol H., & Guillot L., “*Update on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and physiopathology: focus on cystic fibrosis*”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, p. 1-13, <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03487-x>.

b. En révision

Bigot J., Guillot L., Guitard J., Velaissamy S., Thorez S., Corvol H., Balloy V. & Hennequin C., “*Innate immune memory of bronchial epithelial cells applied to fungal agents commonly colonizing bronchial airways of Cystic Fibrosis patients*”, *Front. Cell. Infect. Microbiol. - Fungal Pathogenesis, Fungal Respiratory Infections in Cystic Fibrosis*.

Ruffin M., **Bigot J.**, Calmel C., Mercier J., Pizzorno A., Rosa-Calatrava M., Corvol H., Balloy V., Terrier O. & Guillot L., “*Flagellin from Pseudomonas aeruginosa modulates SARS-CoV-2 infectivity in CF airway epithelial cells by increasing TMPRSS2 expression*”, avril 2021, *Cell Discovery*.

3. Prix

- Assistance Publique - Hôpitaux de Paris : obtention de la Médaille d’argent de l’APHP 2020-2021, support financier pour un an de temps de recherche à temps complet,
- Obtention d’un financement de l’association « Vaincre la Mucoviscidose » pour une troisième année de thèse d’Université (refusé),
- Obtention de la bourse du « Fond d’Etude et de Recherche du Corps Médical » (FERCM) 2020-2021 (refusée),

- Travel grant pour la participation FEBS advanced practical course, du 16 au 22 février 2020, à Jena (Allemagne).
- Travel Award: Basic Science, 27-30 march 2019, Dubrovnik, (Croatia).
- Prix du meilleur poster : colloque français des jeunes chercheurs de l'association "Vaincre la Mucoviscidose", 26 février 2019, Institut Pasteur, Paris, (France).
- Assistance Public - Hôpitaux de Paris : support financier pour un an consacré à la recherche fondamentale, 2017 – 2018.

4. Formations non obligatoires dans le cadre du parcours doctoral

Au cours de ces trois années, j'ai pu suivre plusieurs formations organisées par différentes structures :

- Innate Immunity, cours en ligne de l'Institut Pasteur, 4 novembre 2019 au 6 janvier 2020.
- State of the art alternative infection models to study molecular mechanisms of human fungal infections, 16-22 février 2020, à Jena (Allemagne).
- Initiation au traitement des données de génomique obtenues par séquençage à haut débit, École de bioinformatique. Inserm, 4-9 octobre 2020, Roscoff.

Bibliographie

« 2017 Patient Registry Annual Data Report ». 2017, 96.

Aaby, Peter, Adam Roth, Henrik Ravn, Bitiguida Mutna Napirna, Amabelia Rodrigues, Ida Maria Lisse, Lone Stensballe, et al. 2011. « Randomized Trial of BCG Vaccination at Birth to Low-Birth-Weight Children: Beneficial Nonspecific Effects in the Neonatal Period? » *The Journal of Infectious Diseases* 204 (2): 245-52. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir240>.

Adam, D., J. -M. Perotin, F. Lebargy, P. Birembaut, G. Deslée, et C. Coraux. 2014. « Régénération de l'épithélium des voies aériennes ». *Revue des Maladies Respiratoires* 31 (4): 300-311. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2013.11.001>.

Adib-Conquy, M., et J. -M. Cavaillon. 2012. « Réponse inflammatoire et anti-inflammatoire de l'hôte au cours du sepsis ». *Pathologie Biologie* 60 (5): 306-13. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.011>.

Allard, Benoit, Alice Panariti, et James G. Martin. 2018. « Alveolar Macrophages in the Resolution of Inflammation, Tissue Repair, and Tolerance to Infection ». *Frontiers in Immunology* 9 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01777>.

Aratani, Yasuaki. 2018. « Myeloperoxidase: Its Role for Host Defense, Inflammation, and Neutrophil Function ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 640 (février): 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>.

Armstead, Joanne, Julie Morris, et David W. Denning. 2014. « Multi-Country Estimate of Different Manifestations of Aspergillosis in Cystic Fibrosis ». *PLOS ONE* 9 (6): e98502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098502>.

Armstrong, David, Keith Grimwood, John B. Carlin, Rosemary Carzino, Jeremy Hull, Anthony Olinsky, et Peter D. Phelan. 1998. « Severe Viral Respiratory Infections in Infants with Cystic Fibrosis ». *Pediatric Pulmonology* 26 (6): 371-79. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0496\(199812\)26:6<371::AID-PPUL1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0496(199812)26:6<371::AID-PPUL1>3.0.CO;2-N).

Arnold, Danielle E., et Jennifer R. Heimall. 2017. « A Review of Chronic Granulomatous Disease ». *Advances in Therapy* 34 (12): 2543-57. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0636-2>.

Arts, Rob J. W., Simone J. C. F. M. Moorlag, Boris Novakovic, Yang Li, Shuang-Yin Wang, Marije Oosting, Vinod Kumar, et al. 2018. « BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity ». *Cell Host & Microbe* 23 (1): 89-100.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.010>.

Arts, Rob J.W., Boris Novakovic, Rob ter Horst, Agostinho Carvalho, Siroon Bekkering, Ekta Lachmandas, Fernando Rodrigues, et al. 2016. « Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity ». *Cell metabolism* 24 (6): 807-19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.008>.

Asner, Sandra, Valerie Waters, Melinda Solomon, Yvonne Yau, Susan E. Richardson, Hartmut Grasemann, Farhad Gharabaghi, et Dat Tran. 2012. « Role of respiratory viruses in pulmonary exacerbations in children with cystic fibrosis ». *Journal of Cystic Fibrosis* 11 (5): 433-39. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.04.006>.

Balloy, Viviane, et Michel Chignard. 2009. « The Innate Immune Response to Aspergillus Fumigatus ». *Microbes and Infection* 11 (12): 919-27. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.07.002>.

Bals, Robert. 2000. « Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection ». *Respiratory Research* 1 (3): 141-50. <https://doi.org/10.1186/rr25>.

Bansil, Rama, et Bradley S. Turner. 2018. « The Biology of Mucus: Composition, Synthesis and Organization ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Technological strategies to overcome the mucus barrier in mucosal drug delivery, 124 (janvier): 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.023>.

Baxter, Caroline G., Caroline B. Moore, Andrew M. Jones, A. Kevin Webb, et David W. Denning. 2013. « IgE-Mediated Immune Responses and Airway Detection of Aspergillus and Candida in Adult Cystic Fibrosis ». *Chest* 143 (5): 1351-57. <https://doi.org/10.1378/chest.12-1363>.

Becher, Burkhard, Sonia Tugues, et Melanie Greter. 2016. « GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation ». *Immunity* 45 (5): 963-73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.026>.

Beisswenger, C., C. Hess, et R. Bals. 2012. « Aspergillus Fumigatus Conidia Induce Interferon- β Signalling in Respiratory Epithelial Cells ». *European Respiratory Journal* 39 (2): 411-18. <https://doi.org/10.1183/09031936.00096110>.

Bekkering, Siroon, Jorge Domínguez-Andrés, Leo A.B. Joosten, Niels P. Riksen, et Mihai G. Netea. 2021. « Trained Immunity: Reprogramming Innate Immunity in Health and Disease ». *Annual Review of Immunology*, février. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102119-073855>.

Bellanger, Anne-Pauline. 2010. « Etude des interactions initiales entre moisissures et cellules épithéliales respiratoires dans les pathologies fongiques infectieuses (aspergillose invasive) et immuno-allergiques (pneumopathies d'hypersensibilité) ». Thesis, Besançon. <http://www.theses.fr/2010BESA0006>.

Benjamini, Yoav, et Yosef Hochberg. 1995. « Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing ». *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57 (1): 289-300.

Benn, Christine S., Mihai G. Netea, Liisa K. Selin, et Peter Aaby. 2013. « A Small Jab – a Big Effect: Nonspecific Immunomodulation by Vaccines ». *Trends in Immunology* 34 (9): 431-39. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.004>.

Bidula, Stefan, Darren W. Sexton, et Silke Schelenz. 2019. « Ficolins and the Recognition of Pathogenic Microorganisms: An Overview of the Innate Immune Response and Contribution of Single Nucleotide Polymorphisms ». *Journal of Immunology Research* 2019 (février). <https://doi.org/10.1155/2019/3205072>.

Bidula, Stefan, Darren W. Sexton, Matthew Yates, Alireza Abdolrasouli, Anand Shah, Russell Wallis, Anna Reed, Darius Armstrong-James, et Silke Schelenz. 2015. « H-ficolin binds Aspergillus fumigatus leading to activation of the lectin complement pathway and modulation of lung epithelial immune responses ». *Immunology* 146 (2): 281-91. <https://doi.org/10.1111/imm.12501>.

Bigot, Jeanne, Loïc Guillot, Juliette Guitard, Manon Ruffin, Harriet Corvol, Viviane Balloy, et Christophe Hennequin. 2020. « Bronchial Epithelial Cells on the Front Line to Fight Lung Infection-Causing Aspergillus fumigatus ». *Frontiers in Immunology* 11 (mai). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01041>.

Bigot, Jeanne, Loic Guillot, Juliette Guitard, Manon Ruffin, Harriet Corvol, Michel Chignard, Christophe Hennequin, et Viviane Balloy. 2019. « Respiratory Epithelial Cells Can Remember Infection: A Proof of Concept Study ». *The Journal of Infectious Diseases*, novembre, jiz569. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz569>.

- Billard, Lisa, Rozenn Le Berre, Léa Pilorgé, Christopher Payan, Geneviève Héry-Arnaud, et Sophie Vallet. 2017. « Viruses in cystic fibrosis patients' airways ». *Critical Reviews in Microbiology* 43 (6): 690-708. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1297763>.
- Bistoni, F, A Vecchiarelli, E Cenci, P Puccetti, P Marconi, et A Cassone. 1986. « Evidence for macrophage-mediated protection against lethal Candida albicans infection. » *Infection and Immunity* 51 (2): 668-74.
- Bistoni, F., G. Verducci, S. Perito, A. Vecchiarelli, P. Puccetti, P. Marconi, et A. Cassone. 1988. « Immunomodulation by a Low-Virulence, Agerminative Variant of Candida Albicans. Further Evidence for Macrophage Activation as One of the Effector Mechanisms of Nonspecific Anti-Infectious Protection ». *Journal of Medical and Veterinary Mycology: Bi-Monthly Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 26 (5): 285-99. <https://doi.org/10.1080/02681218880000401>.
- Bogdan, Christian. 2015. « Nitric Oxide Synthase in Innate and Adaptive Immunity: An Update ». *Trends in Immunology* 36 (3): 161-78. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.01.003>.
- Borger, Peter, Judith L. Black, et Michael Roth. 2002. « Asthma and the CCAAT-Enhancer Binding Proteins: A Holistic View on Airway Inflammation and Remodeling ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110 (6): 841-46. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.130047>.
- Branchett, William J., et Clare M. Lloyd. 2019. « Regulatory cytokine function in the respiratory tract ». *Mucosal Immunology* 12 (3): 589-600. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0158-0>.
- Brandt, Claudia, Jobst Roehmel, Volker Rickerts, Volker Melichar, Nadja Niemann, et Carsten Schwarz. 2018. « Aspergillus Bronchitis in Patients with Cystic Fibrosis ». *Mycopathologia* 183 (1): 61-69. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0190-0>.
- Briard, Benoit, Perrine Bomme, Beatrix E. Lechner, Gaëtan L. A. Mislin, Virginie Lair, Marie-Christine Prévost, Jean-Paul Latgé, Hubertus Haas, et Anne Beauvais. 2015. « Pseudomonas aeruginosa manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner Aspergillus fumigatus via phenazines ». *Scientific Reports* 5 (février). <https://doi.org/10.1038/srep08220>.
- Brieger, Katharine, Stefania Schiavone, Francis J. Miller Jr., et Karl-Heinz Krause. 2012. « Reactive Oxygen Species: From Health to Disease ». *Swiss Medical Weekly* 142 (3334). <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>.
- Brinkmann, Volker, et Arturo Zychlinsky. 2012. « Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? » *The Journal of Cell Biology* 198 (5): 773-83. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203170>.
- Brown, Rebecca L., et Thomas B. Clarke. 2017. « The regulation of host defences to infection by the microbiota ». *Immunology* 150 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1111/imm.12634>.
- Budden, Kurtis F, Shakti D Shukla, Saima Firdous Rehman, Kate L Bowerman, Simon Keely, Philip Hugenholtz, Darius P H Armstrong-James, et al. 2019. « Functional Effects of the Microbiota in Chronic Respiratory Disease ». *The Lancet Respiratory Medicine* 7 (10): 907-20. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30510-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30510-1).
- Buenrostro, Jason, Beijing Wu, Howard Chang, et William Greenleaf. 2015. « ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide ». *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* 109 (janvier): 21.29.1-21.29.9. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2129s109>.
- Buffen, Kathrin, Marije Oosting, Jessica Quintin, Aylwin Ng, Johanneke Kleinnijenhuis, Vinod Kumar, Esther van de Vosse, et al. 2014. « Autophagy Controls BCG-Induced Trained Immunity and the

Response to Intravesical BCG Therapy for Bladder Cancer ». *PLoS Pathogens* 10 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004485>.

Bustamante-Marin, Ximena M., et Lawrence E. Ostrowski. 2017. « Cilia and Mucociliary Clearance ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028241>.

Casals, Cristina, María A. Campanero-Rhodes, Belén García-Fojeda, et Dolores Solís. 2018. « The Role of Collectins and Galectins in Lung Innate Immune Defense ». *Frontiers in Immunology* 9 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01998>.

Cavaillon, Jean-Marc, et Minou Adib-Conquy. 2006. « Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis ». *Critical Care* 10 (5): 233. <https://doi.org/10.1186/cc5055>.

Cheng, Shih-Chin, Jessica Quintin, Robert A. Cramer, Kelly M. Shepardson, Sadia Saeed, Vinod Kumar, Evangelos J Giamarellos-Bourboulis, et al. 2014. « mTOR/HIF1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity ». *Science (New York, N.Y.)* 345 (6204): 1250684. <https://doi.org/10.1126/science.1250684>.

Chester, Kenneth S. 1933. « The Problem of Acquired Physiological Immunity in Plants ». *The Quarterly Review of Biology* 8 (3): 275-324. <https://doi.org/10.1086/394440>.

Chua, Robert Lorenz, Soeren Lukassen, Saskia Trump, Bianca P. Hennig, Daniel Wendisch, Fabian Pott, Olivia Debnath, et al. 2020. « COVID-19 Severity Correlates with Airway Epithelium–Immune Cell Interactions Identified by Single-Cell Analysis ». *Nature Biotechnology* 38 (8): 970-79. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0602-4>.

Clark, Helen R., Allison B. Powell, Kelsey A. Simmons, Tariq Ayubi, et Shiv D. Kale. 2019. « Endocytic Markers Associated with the Internalization and Processing of Aspergillus fumigatus Conidia by BEAS-2B Cells ». *mSphere* 4 (1). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00663-18>.

Coburn, Bryan, Pauline W. Wang, Julio Diaz Caballero, Shawn T. Clark, Vijaya Brahma, Sylva Donaldson, Yu Zhang, et al. 2015. « Lung Microbiota across Age and Disease Stage in Cystic Fibrosis ». *Scientific Reports* 5 (mai): 10241. <https://doi.org/10.1038/srep10241>.

Cong, Jingjing, et Haiming Wei. 2019. « Natural Killer Cells in the Lungs ». *Frontiers in Immunology* 10 (juin). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01416>.

Conrath, Uwe. 2006. « Systemic Acquired Resistance ». *Plant Signaling & Behavior* 1 (4): 179-84.

Cooper, Megan A., Julie M. Elliott, Peter A. Keyel, Liping Yang, Javier A. Carrero, et Wayne M. Yokoyama. 2009. « Cytokine-induced memory-like natural killer cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (6): 1915-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813192106>.

Coraux, Christelle, Rodolphe Hajj, Pierre Lesimple, et Edith Puchelle. 2005. « Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire ». *médecine/sciences* 21 (12): 1063-69. <https://doi.org/10.1051/medsci/200521121063>.

Coron, Noémie, Marc Pihet, Emilie Fréalle, Yolande Lemeille, Claudine Pinel, Hervé Pelloux, Gilles Gargala, et al. 2018. « Toward the Standardization of Mycological Examination of Sputum Samples in Cystic Fibrosis: Results from a French Multicenter Prospective Study ». *Mycopathologia* 183 (1): 101-17. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0173-1>.

Cortez, Karoll J., Emmanuel Roilides, Flavio Quiroz-Telles, Joseph Meletiadis, Charalampos Antachopoulos, Tena Knudsen, Wendy Buchanan, et al. 2008. « Infections Caused by *Scedosporium* spp. ». *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1): 157-97. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-07>.

Cowley, Abigail C., David J. Thornton, David W. Denning, et Alexander Horsley. 2017. « Aspergillosis and the role of mucins in cystic fibrosis ». *Pediatric Pulmonology* 52 (4): 548-55. <https://doi.org/10.1002/ppul.23618>.

Darling, Katharine E. A., Ann Dewar, et Thomas J. Evans. 2004. « Role of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Internalization of Pseudomonas Aeruginosa by Polarized Respiratory Epithelial Cells ». *Cellular Microbiology* 6 (6): 521-33. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00380.x>.

Decramer, Marc, Wim Janssens, et Marc Miravitles. 2012. « Chronic obstructive pulmonary disease ». *Lancet (London, England)* 379 (9823): 1341-51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60968-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60968-9).

Demouveaux, Bastien, Valérie Gouyer, Mylène Magnien, Ségolène Plet, Frédéric Gottrand, Tetsuharu Narita, et Jean-Luc Desseyn. 2018. « La structure des mucines conditionne les propriétés viscoélastiques des gels de mucus ». *médecine/sciences* 34 (10): 806-12. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018206>.

Dempsey, Alan, et Andrew G. Bowie. 2015. « Innate Immune Recognition of DNA: A Recent History ». *Virology*, 60th Anniversary Issue, 479-480 (mai): 146-52. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.013>.

Denning, David W., Jacques Cadanel, Catherine Beigelman-Aubry, Florence Ader, Arunaloke Chakrabarti, Stijn Blot, Andrew J. Ullmann, George Dimopoulos, et Christoph Lange. 2016. « Chronic Pulmonary Aspergillosis: Rationale and Clinical Guidelines for Diagnosis and Management ». *European Respiratory Journal* 47 (1): 45-68. <https://doi.org/10.1183/13993003.00583-2015>.

Diamond, G., D. Legarda, et L. K. Ryan. 2000. « The Innate Immune Response of the Respiratory Epithelium ». *Immunological Reviews* 173 (février): 27-38.

Dickson, Robert P., Fernando J. Martinez, et Gary B. Huffnagle. 2014. « The Role of the Microbiome in Exacerbations of Chronic Lung Diseases ». *Lancet* 384 (9944): 691-702. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61136-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61136-3).

Drummond, Rebecca A., Luis M. Franco, et Michail S. Lionakis. 2018. « Human CARD9: A Critical Molecule of Fungal Immune Surveillance ». *Frontiers in Immunology* 9 (août). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01836>.

Dryden, Matthew. 2018. « Reactive Oxygen Species: A Novel Antimicrobial ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 51 (3): 299-303. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.08.029>.

Dumas, Alexia, Lucie Bernard, Yannick Poquet, Geanncarlo Lugo-Villarino, et Olivier Neyrolles. 2018. « The Role of the Lung Microbiota and the Gut–Lung Axis in Respiratory Infectious Diseases ». *Cellular Microbiology* 20 (12): e12966. <https://doi.org/10.1111/cmi.12966>.

Dupont, Magali, Alice Ouachée, Juliette Royer, et Corinne Dupuy. 2016. « NADPH oxydase - Agent double dans l'inflammation ? » *médecine/sciences* 32 (10): 833-35. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163210014>.

Durrant, W. E., et X. Dong. 2004. « Systemic Acquired Resistance ». *Annual Review of Phytopathology* 42 (1): 185-209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>.

Eisen, Damon P. 2010. « Mannose-Binding Lectin Deficiency and Respiratory Tract Infection ». *Journal of Innate Immunity* 2 (2): 114-22. <https://doi.org/10.1159/000228159>.

El-Osta, Assam, Daniella Brasacchio, Dachun Yao, Alessandro Pocai, Peter L. Jones, Robert G. Roeder, Mark E. Cooper, et Michael Brownlee. 2008. « Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (10): 2409-17. <https://doi.org/10.1084/jem.20081188>.

Engel, Tobias G. P., Lydie Slabbers, Carmen de Jong, Willem J. G. Melchers, Ferry Hagen, Paul E. Verweij, Peter Merkus, et Jacques F. Meis. 2018. « Prevalence and Diversity of Filamentous Fungi in the Airways of Cystic Fibrosis Patients – A Dutch, Multicentre Study ». *Journal of Cystic Fibrosis* 0 (0). <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.11.012>.

Erridge, Clett, Alison Pridmore, Adrian Eley, John Stewart, et Ian R. Poxton. 2004. « Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via Toll-like receptor 2 ». *Journal of Medical Microbiology* 53 (8): 735-40. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45598-0>.

Escobar, Luis E., Alvaro Molina-Cruz, et Carolina Barillas-Mury. 2020. « BCG Vaccine Protection from Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (30): 17720-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008410117>.

Esin, S., C. Counoupas, A. Aulicino, F. L. Brancatisano, G. Maisetta, D. Bottai, M. Di Luca, W. Florio, M. Campa, et G. Batoni. 2013. « Interaction of *Mycobacterium Tuberculosis* Cell Wall Components with the Human Natural Killer Cell Receptors NKp44 and Toll-Like Receptor 2 ». *Scandinavian Journal of Immunology* 77 (6): 460-69. <https://doi.org/10.1111/sji.12052>.

Evans, Scott E., Peter Y. Hahn, Frances McCann, Theodore J. Kottom, Zvezdana Vuk Pavlovic', et Andrew H. Limper. 2005. « Pneumocystis Cell Wall β -Glucans Stimulate Alveolar Epithelial Cell Chemokine Generation through Nuclear Factor- κ B-Dependent Mechanisms ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 32 (6): 490-97. <https://doi.org/10.1165/rccb.2004-0300OC>.

Fahy, John V., et Burton F. Dickey. 2010. « Airway Mucus Function and Dysfunction ». *The New England journal of medicine* 363 (23): 2233-47. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0910061>.

Fernandes, Julien, Fatima Hamidi, Remi Leborgne, Remi Beau, Yves Castier, Pierre Mordant, Amira Boukkerou, Jean Paul Latgé, et Marina Pretolani. 2018. « Penetration of the Human Pulmonary Epithelium by *Aspergillus Fumigatus* Hyphae ». *The Journal of Infectious Diseases* 218 (8): 1306-13. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy298>.

Ferwerda, Bart, Gerben Ferwerda, Theo S. Plantinga, Janet A. Willment, Annemiek B. van Spriel, Hanka Venselaar, Clara C. Elbers, et al. 2009. « Human Dectin-1 Deficiency and Mucocutaneous Fungal Infections ». *The New England journal of medicine* 361 (18): 1760-67. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0901053>.

Foster, Simmie L., Diana C. Hargreaves, et Ruslan Medzhitov. 2007. « Gene-Specific Control of Inflammation by TLR-Induced Chromatin Modifications ». *Nature* 447 (7147): 972-78. <https://doi.org/10.1038/nature05836>.

Freudenberg, M A, et C Galanos. 1988. « Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages ». *Infection and Immunity* 56 (5): 1352-57.

Gago, Sara, David W. Denning, et Paul Bowyer. 2019. « Pathophysiological Aspects of *Aspergillus* Colonization in Disease ». *Medical Mycology* 57 (Supplement_2): S219-27. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy076>.

Gao, Nan, Ashok Kumar, Hui Guo, Xinyi Wu, Michelle Wheater, et Fu-Shin X. Yu. 2011. « Topical Flagellin-Mediated Innate Defense against *Candida albicans* Keratitis ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (6): 3074-82. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5928>.

Garces de los Fayos Alonso, Ines, Huan-Chang Liang, Suzanne D. Turner, Sabine Lagger, Olaf Merkel, et Lukas Kenner. 2018. « The Role of Activator Protein-1 (AP-1) Family Members in CD30-Positive Lymphomas ». *Cancers* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/cancers10040093>.

- Gardiner, Donald M., Paul Waring, et Barbara J. Howlett. 2005. « The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis ». *Microbiology* 151 (4): 1021-32. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27847-0>.
- Garlanda, Cecilia, Emilio Hirsch, Silvia Bozza, Antonietta Salustri, Marika De Acetis, Rachele Nota, Alessia Maccagno, et al. 2002. « Non-Redundant Role of the Long Pentraxin PTX3 in Anti-Fungal Innate Immune Response ». *Nature* 420 (6912): 182-86. <https://doi.org/10.1038/nature01195>.
- Gileles-Hillel, Alex, David Shoseyov, Itzhack Polacheck, Maya Korem, Eitan Kerem, et Malena Cohen-Cymberknoh. 2015. « Association of Chronic Candida Albicans Respiratory Infection with a More Severe Lung Disease in Patients with Cystic Fibrosis: Candida Albicans in CF Lung Disease ». *Pediatric Pulmonology* 50 (11): 1082-89. <https://doi.org/10.1002/ppul.23302>.
- Girardin, Stephen E., Ivo G. Boneca, Jérôme Viala, Mathias Chamaillard, Agnès Labigne, Gilles Thomas, Dana J. Philpott, et Philippe J. Sansonetti. 2003. « Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (11): 8869-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200>.
- Gj, Koelwyn, Corr Em, Erbay E, et Moore Kj. 2018. « Regulation of Macrophage Immunometabolism in Atherosclerosis ». *Nature Immunology* 19 (6): 526-37. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0113-3>.
- Gomez, Pol, Tillie L Hackett, Margo M Moore, Darryl A Knight, et Scott J Tebbutt. 2010. « Functional genomics of human bronchial epithelial cells directly interacting with conidia of Aspergillus fumigatus ». *BMC Genomics* 11 (juin): 358. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-358>.
- Grasemann, Hartmut, et Felix Ratjen. 2013. « Early lung disease in cystic fibrosis ». *The Lancet Respiratory Medicine* 1 (2): 148-57. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70026-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70026-2).
- Greene, Catherine M., Tomás P. Carroll, Stephen G. J. Smith, Clifford C. Taggart, James Devaney, Siobhan Griffin, Shane J. O'Neill, et Noel G. McElvaney. 2005. « TLR-Induced Inflammation in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells ». *The Journal of Immunology* 174 (3): 1638-46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.3.1638>.
- Guillot, Loïc, Viviane Balloy, Francis X. McCormack, Douglas T. Golenbock, Michel Chignard, et Mustapha Si-Tahar. 2002. « Cutting Edge: The Immunostimulatory Activity of the Lung Surfactant Protein-A Involves Toll-Like Receptor 4 ». *The Journal of Immunology* 168 (12): 5989-92. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.5989>.
- Guillot, Loïc, Ronan Le Goffic, Sarah Bloch, Nicolas Escriou, Shizuo Akira, Michel Chignard, et Mustapha Si-Tahar. 2005. « Involvement of Toll-like Receptor 3 in the Immune Response of Lung Epithelial Cells to Double-Stranded RNA and Influenza A Virus* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (7): 5571-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410592200>.
- Guillot, Loïc, Samir Medjane, Karine Le-Barillec, Viviane Balloy, Claire Danel, Michel Chignard, et Mustapha Si-Tahar. 2004. « Response of Human Pulmonary Epithelial Cells to Lipopolysaccharide Involves Toll-like Receptor 4 (TLR4)-Dependent Signaling Pathways: Evidence for an Intracellular Compartmentalization of TLR4 ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (4): 2712-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305790200>.
- Guo, Ren-Feng, Alex B. Lentsch, J. Vidya Sarma, Lei Sun, Niels C. Riedemann, Shannon D. McClintock, Stephanie R. McGuire, Nico Van Rooijen, et Peter A. Ward. 2002. « Activator Protein-1 Activation in Acute Lung Injury ». *The American Journal of Pathology* 161 (1): 275-82.
- Hajam, Irshad A, Pervaiz A Dar, Imam Shahnawaz, Juan Carlos Jaume, et John Hwa Lee. 2017. « Bacterial flagellin—a potent immunomodulatory agent ». *Experimental & Molecular Medicine* 49 (9): e373. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.172>.

Hamon, Melanie A., et Jessica Quintin. 2016. « Innate immune memory in mammals ». *Seminars in Immunology*, SI: Innate Immune Memory, 28 (4): 351-58. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.003>.

Han, Bing, Marco Mura, Cristiano F. Andrade, Daisuke Okutani, Monika Lodyga, Claudia C. dos Santos, Shaf Keshavjee, Michael Matthay, et Mingyao Liu. 2005. « TNF α -Induced Long Pentraxin PTX3 Expression in Human Lung Epithelial Cells via JNK ». *The Journal of Immunology* 175 (12): 8303-11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8303>.

Han, SeungHye, et Rama K. Mallampalli. 2015. « The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections ». *Annals of the American Thoracic Society* 12 (5): 765-74. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201411-507FR>.

Hartl, Dominik, Rabindra Tirouvanziam, Julie Laval, Catherine M. Greene, David Habiels, Lokesh Sharma, Ali Önder Yildirim, Charles S. Dela Cruz, et Cory M. Hogaboam. 2018. « Innate Immunity of the Lung: From Basic Mechanisms to Translational Medicine ». *Journal of Innate Immunity* 10 (5-6): 487-501. <https://doi.org/10.1159/000487057>.

Hatziagorou, Elpis, Thomas J. Walsh, John N. Tsanakas, et Emmanuel Roilides. 2009. « Aspergillus and the paediatric lung ». *Paediatric Respiratory Reviews* 10 (4): 178-85. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2009.06.006>.

Heijden, Charlotte D.C.C. van der, Marlies P. Noz, Leo A.B. Joosten, Mihai G. Netea, Niels P. Riksen, et Samuel T. Keating. 2017. « Epigenetics and Trained Immunity ». *Antioxidants & Redox Signaling*, octobre. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7310>.

Hensbergen, Vincent P. van, Yongzheng Wu, Nina M. van Sorge, et Lhousseine Touqui. 2020. « Type IIA Secreted Phospholipase A2 in Host Defense against Bacterial Infections ». *Trends in Immunology* 41 (4): 313-26. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.02.003>.

Hewitt, Richard, Hugo Farne, Andrew Ritchie, Emma Luke, Sebastian L. Johnston, et Patrick Mallia. 2016. « The role of viral infections in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and asthma ». *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 10 (2): 158-74. <https://doi.org/10.1177/1753465815618113>.

Hiemstra, Pieter S., Gimano D. Amatngalim, Anne M. van der Does, et Christian Taube. 2016. « Antimicrobial Peptides and Innate Lung Defenses: Role in Infectious and Noninfectious Lung Diseases and Therapeutic Applications ». *Chest* 149 (2): 545-51. <https://doi.org/10.1378/chest.15-1353>.

Hilty, Markus, Conor Burke, Helder Pedro, Paul Cardenas, Andy Bush, Cara Bossley, Jane Davies, et al. 2010. « Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways ». *PLoS ONE* 5 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008578>.

Hoffmann, Elke, Oliver Dittrich-Breiholz, Helmut Holtmann, et Michael Kracht. 2002. « Multiple Control of Interleukin-8 Gene Expression ». *Journal of Leukocyte Biology* 72 (5): 847-55. <https://doi.org/10.1189/jlb.72.5.847>.

Ifrim, D. C., J. Quintin, L. A. B. Joosten, C. Jacobs, T. Jansen, L. Jacobs, N. A. R. Gow, D. L. Williams, J. W. M. van der Meer, et M. G. Netea. 2014. « Trained Immunity or Tolerance: Opposing Functional Programs Induced in Human Monocytes after Engagement of Various Pattern Recognition Receptors ». *Clinical and Vaccine Immunology* 21 (4): 534-45. <https://doi.org/10.1128/CVI.00688-13>.

Invernizzi, Rachele, Clare M. Lloyd, et Philip L. Molyneaux. 2020. « Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs ». *Immunology*, avril. <https://doi.org/10.1111/imm.13195>.

Joshi, Nikita, James M. Walter, et Alexander V. Misharin. 2018. « Alveolar Macrophages ». *Cellular Immunology* 330: 86-90. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.005>.

Jouan, Y., M. Si-Tahar, et A. Guillon. 2017. « Immunité de la muqueuse respiratoire : physiologie et implications en réanimation ». *Médecine Intensive Réanimation* 26 (1): 11-20. <https://doi.org/10.1007/s13546-016-1245-9>.

Kaufmann, Eva, Joaquin Sanz, Jonathan L. Dunn, Nargis Khan, Laura E. Mendonça, Alain Pacis, Fanny Tzelepis, et al. 2018. « BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis ». *Cell* 172 (1): 176-190.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.031>.

Kawai, Koji, Jun Miyazaki, Akira Joraku, Hiroyuki Nishiyama, et Hideyuki Akaza. 2013. « Bacillus Calmette–Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: Current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine ». *Cancer Science* 104 (1): 22-27. <https://doi.org/10.1111/cas.12075>.

Kay, Callum, Runli Wang, Max Kirkby, et Si Ming Man. 2020. « Molecular Mechanisms Activating the NAIP-NLRc4 Inflammasome: Implications in Infectious Disease, Autoinflammation, and Cancer ». *Immunological Reviews* 297 (1): 67-82. <https://doi.org/10.1111/imr.12906>.

Kerr, J R, G W Taylor, A Rutman, N Høiby, P J Cole, et R Wilson. 1999. « Pseudomonas aeruginosa pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. » *Journal of Clinical Pathology* 52 (5): 385-87.

Khoo, Ui-Soon, Kelvin Y. K. Chan, Vera S. F. Chan, et C. L. Steve Lin. 2008. « DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 86 (8): 861-74. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0350-2>.

Kim, Young Keun, Jeon-Soo Shin, et Moon H. Nahm. 2016. « NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases ». *Yonsei Medical Journal* 57 (1): 5-14. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.5>.

King, Jill, Shan F. Brunel, et Adilia Warris. 2016. « Aspergillus infections in cystic fibrosis ». *Journal of Infection, Hot Topics In Infection And Immunity In Children*, 72 (juillet): S50-55. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.04.022>.

King, Jill, Stefanie S. V. Henriet, et Adilia Warris. 2016. « Aspergillosis in Chronic Granulomatous Disease ». *Journal of Fungi* 2 (2). <https://doi.org/10.3390/jof2020015>.

Kleinnijenhuis, Johanneke, Jessica Quintin, Frank Preijers, Leo A. B. Joosten, Daniela C. Ifrim, Sadia Saeed, Cor Jacobs, et al. 2012. « Bacille Calmette-Guérin Induces NOD2-Dependent Nonspecific Protection from Reinfection via Epigenetic Reprogramming of Monocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (43): 17537-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202870109>.

Kobayashi, Koichi, Lorraine D. Hernandez, Jorge E. Galán, Charles A. Janeway, Ruslan Medzhitov, et Richard A. Flavell. 2002. « IRAK-M Is a Negative Regulator of Toll-like Receptor Signaling ». *Cell* 110 (2): 191-202. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00827-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00827-9).

Kopf, Manfred, Christoph Schneider, et Samuel P. Nobs. 2015. « The Development and Function of Lung-Resident Macrophages and Dendritic Cells ». *Nature Immunology* 16 (1): 36-44. <https://doi.org/10.1038/ni.3052>.

Kunkel, Steven L., Theodore Standiford, Keita Kasahara, et Robert M. Strieter. 1991. « Interleukin-8 (IL-8): The Major Neutrophil Chemotactic Factor in the Lung ». *Experimental Lung Research* 17 (1): 17-23. <https://doi.org/10.3109/01902149109063278>.

Kurtz, Joachim. 2005. « Specific memory within innate immune systems ». *Trends in Immunology* 26 (4): 186-92. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001>.

Lambrecht, B. N., J-, B. Prins, et H. C. Hoogsteden. 2001. « Lung Dendritic Cells and Host Immunity to Infection ». *European Respiratory Journal* 18 (4): 692-704.

Landt, Stephen G., Georgi K. Marinov, Anshul Kundaje, Pouya Kheradpour, Florencia Pauli, Serafim Batzoglou, Bradley E. Bernstein, et al. 2012. « ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia ». *Genome Research* 22 (9): 1813-31. <https://doi.org/10.1101/gr.136184.111>.

Langmead, Ben, et Steven L Salzberg. 2012. « Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 ». *Nature methods* 9 (4): 357-59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.

Lauchó-Contreras, Maria E., Francesca Polverino, Yohannes Tesfaigzi, Aprile Pilon, Bartolome R. Celli, et Caroline A. Owen. 2016. « Club Cell Protein 16 (CC16) Augmentation: A Potential Disease-modifying Approach for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) ». *Expert opinion on therapeutic targets* 20 (7): 869-83. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1139084>.

Lawrence, Michael, Wolfgang Huber, Hervé Pagès, Patrick Aboyoun, Marc Carlson, Robert Gentleman, Martin T. Morgan, et Vincent J. Carey. 2013. « Software for Computing and Annotating Genomic Ranges ». *PLoS Computational Biology* 9 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003118>.

Lee, Chun Geun, Carla A. Da Silva, Charles S. Dela Cruz, Farida Ahangari, Bing Ma, Min-Jong Kang, Chuan-Hua He, Seyedtaghi Takyar, et Jack A. Elias. 2011. « Role of Chitin and Chitinase/Chitinase-Like Proteins in Inflammation, Tissue Remodeling, and Injury ». *Annual review of physiology* 73. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142250>.

Lewis, Russell E., Nathan P. Wiederhold, Michail S. Lionakis, Randall A. Prince, et Dimitrios P. Kontoyiannis. 2005. « Frequency and Species Distribution of Gliotoxin-Producing Aspergillus Isolates Recovered from Patients at a Tertiary-Care Cancer Center ». *Journal of Clinical Microbiology* 43 (12): 6120-22. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.6120-6122.2005>.

Li, Zhijian, Marcel H. Schulz, Thomas Look, Matthias Begemann, Martin Zenke, et Ivan G. Costa. 2019. « Identification of transcription factor binding sites using ATAC-seq ». *Genome Biology* 20 (février). <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1642-2>.

Liao, Yang, Gordon K. Smyth, et Wei Shi. 2014. « featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features ». *Bioinformatics* 30 (7): 923-30. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.

Liu, Cui-Cui, Yi Miao, Rui-Lin Chen, Yong-Qing Zhang, Hua Wu, Shu-Mei Yang, et Li-qun Shang. 2021. « STIM1 Mediates IAV-Induced Inflammation of Lung Epithelial Cells by Regulating NLRP3 and Inflammasome Activation via Targeting MiR-223 ». *Life Sciences* 266 (février): 118845. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118845>.

Liu, Tie Fu, Vidula T. Vachharajani, Barbara K. Yoza, et Charles E. McCall. 2012. « NAD+-dependent Sirtuin 1 and 6 Proteins Coordinate a Switch from Glucose to Fatty Acid Oxidation during the Acute Inflammatory Response ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (31): 25758-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362343>.

Lopes, Livia Cristina L., Mariana Ingrid D. da Silva, Vera Carolina B. Bittencourt, Rodrigo T. Figueiredo, Rodrigo Rollin-Pinheiro, Guilherme L. Sasaki, Marcelo T. Bozza, Philip A. J. Gorin, et Eliana Barreto-Bergter. 2011. « Glycoconjugates and Polysaccharides from the Scedosporium/Pseudallescheria Boydii Complex: Structural Characterisation, Involvement in Cell Differentiation, Cell Recognition and Virulence ». *Mycoses* 54 (s3): 28-36. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02105.x>.

López-Collazo, Eduardo, et Carlos del Fresno. 2013. « Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences ». *Critical Care* 17 (6): 242. <https://doi.org/10.1186/cc13110>.

Love, Michael I., Wolfgang Huber, et Simon Anders. 2014. « Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 ». *Genome Biology* 15 (12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.

Lu, Xiuyuan, Masahiro Nagata, et Sho Yamasaki. 2018. « Mincle: 20 years of a versatile sensor of insults ». *International Immunology* 30 (6): 233-39. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy028>.

Ma, Jonathan, Bruce K. Rubin, et Judith A. Voynow. 2018. « Mucins, Mucus, and Goblet Cells ». *CHEST* 154 (1): 169-76. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.008>.

Mayr, A. 2004. « Taking Advantage of the Positive Side-Effects of Smallpox Vaccination ». *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 51 (5): 199-201. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00763.x>.

Michael, Christie F., Christopher M. Waters, Kim S. LeMessurier, Amali E. Samarasinghe, Chi Y. Song, Kafait U. Malik, et D. Betty Lew. 2017. « Airway Epithelial Repair by a Prebiotic Mannan Derived from *Saccharomyces cerevisiae* ». *Journal of Immunology Research* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8903982>.

Moret, Yannick, et Michael T Siva-Jothy. 2003. « Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270 (1532): 2475-80. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2511>.

Motta, Vinicius, Fraser Soares, Tian Sun, et Dana J. Philpott. 2015. « NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels ». *Physiological Reviews* 95 (1): 149-78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2014>.

Muehlstedt, Steven G., Mark Lyte, et Jorge L. Rodriguez. 2002. « Increased IL-10 Production and HLA-DR Suppression in the Lungs of Injured Patients Precede the Development of Nosocomial Pneumonia ». *Shock* 17 (6): 443-50.

Murugaiah, Valarmathy, Anthony G. Tsolaki, et Uday Kishore. 2020. « Collectins: Innate Immune Pattern Recognition Molecules ». *Lectin in Host Defense Against Microbial Infections* 1204 (mars): 75-127. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1580-4_4.

Muthig, Michaela, Alexandra Hebestreit, Uwe Ziegler, Marc Seidler, et Frank-Michael C. Müller. 2010. « Persistence of Candida Species in the Respiratory Tract of Cystic Fibrosis Patients ». *Medical Mycology* 48 (1): 56-63. <https://doi.org/10.3109/13693780802716532>.

Naeem, Ahmed, Sachchida N. Rai, et Louisdon Pierre. 2020. « Histology, Alveolar Macrophages ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513313/>.

Naik, Shruti, Samantha B. Larsen, Nicholas C. Gomez, Kirill Alaverdyan, Ataman Sendoel, Shaopeng Yuan, Lisa Polak, Anita Kulukian, Sophia Chai, et Elaine Fuchs. 2017. « Inflammatory Memory Sensitizes Skin Epithelial Stem Cells to Tissue Damage ». *Nature* 550 (7677): 475-80. <https://doi.org/10.1038/nature24271>.

Netea, Mihai G., Leo A. B. Joosten, et Jos W. M. van der Meer. 2017. « Hypothesis: Stimulation of Trained Immunity as Adjunctive Immunotherapy in Cancer ». *Journal of Leukocyte Biology* 102 (6): 1323-32. <https://doi.org/10.1189/jlb.5RI0217-064RR>.

Netea, Mihai G., Leo A.B. Joosten, Eicke Latz, Kingston H.G. Mills, Gioacchino Natoli, Hendrik G. Stunnenberg, Luke A.J. O'Neill, et Ramnik J. Xavier. 2016. « Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease ». *Science (New York, N.Y.)* 352 (6284): aaf1098. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1098>.

Netea, Mihai G., Jessica Quintin, et Jos W. M. van der Meer. 2011. « Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense ». *Cell Host & Microbe* 9 (5): 355-61. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>.

Neumann, Ariane, Lena Völlger, Evelien T.M. Berends, E. Margo Molhoek, Daphne A.C. Stapels, Marika Midon, Ana Friães, et al. 2014. « Novel Role of the Antimicrobial Peptide LL-37 in the Protection of Neutrophil Extracellular Traps against Degradation by Bacterial Nucleases ». *Journal of Innate Immunity* 6 (6): 860-68. <https://doi.org/10.1159/000363699>.

Nguyen, Giang T., Erin R. Green, et Joan Mecsas. 2017. « Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>.

Nguyen, Huy A., Murugesan V. S. Rajaram, Douglas A. Meyer, et Larry S. Schlesinger. 2012. « Pulmonary surfactant protein A and surfactant lipids upregulate IRAK-M, a negative regulator of TLR-mediated inflammation in human macrophages ». *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 303 (7): L608-16. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00067.2012>.

Nguyen, Linh D. N., Eric Viscogliosi, et Laurence Delhaes. 2015. « The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome ». *Frontiers in Microbiology* 6 (février). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00089>.

O'Neill, Luke A. J., Douglas Golenbock, et Andrew G. Bowie. 2013. « The History of Toll-like Receptors — Redefining Innate Immunity ». *Nature Reviews Immunology* 13 (6): 453-60. <https://doi.org/10.1038/nri3446>.

Opitz, Bastian, Vincent van Laak, Julia Eitel, et Norbert Suttorp. 2010. « Innate Immune Recognition in Infectious and Noninfectious Diseases of the Lung ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181 (12): 1294-1309. <https://doi.org/10.1164/rccm.200909-1427SO>.

Ordovas-Montanes, Jose, Semir Beyaz, Seth Rakoff-Nahoum, et Alex K. Shalek. 2020. « Distribution and storage of inflammatory memory in barrier tissues ». *Nature reviews Immunology* 20 (5): 308-20. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0263-z>.

Ordovas-Montanes, Jose, Daniel F. Dwyer, Sarah K. Nyquist, Kathleen M. Buchheit, Marko Vukovic, Chaarushena Deb, Marc H. Wadsworth, et al. 2018. « Allergic inflammatory memory in human respiratory epithelial progenitor cells ». *Nature* 560 (7720): 649-54. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0449-8>.

O'Sullivan, Brian P, et Steven D Freedman. 2009. « Cystic Fibrosis ». *The Lancet* 373 (9678): 1891-1904. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60327-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60327-5).

Palomino, Diana Carolina Torres, et Luciana Cavalheiro Marti. 2015. « Chemokines and immunity ». *Einstein* 13 (3): 469-73. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>.

Pang, Min, Yangyang Yuan, Dong Wang, Ting Li, Dan Wang, Xiaohong Shi, Min Guo, et al. 2017. « Recombinant CC16 protein inhibits the production of pro-inflammatory cytokines via NF-κB and p38 MAPK pathways in LPS-activated RAW264.7 macrophages ». *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 49 (5): 435-43. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx020>.

Paris, S, E Boisvieux-Ulrich, B Crestani, O Houcine, D Taramelli, L Lombardi, et J P Latgé. 1997. « Internalization of Aspergillus Fumigatus Conidia by Epithelial and Endothelial Cells. » *Infection and Immunity* 65 (4): 1510-14. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.4.1510-1514.1997>.

Perrin, Sandrine, Cyril Firmo, Sophie Lemoine, Stéphane Le Crom, et Laurent Jourdren. 2017. « Aozan: an automated post-sequencing data-processing pipeline ». *Bioinformatics* 33 (14): 2212-13. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx154>.

Pham, Christine T. N. 2006. « Neutrophil Serine Proteases: Specific Regulators of Inflammation ». *Nature Reviews Immunology* 6 (7): 541-50. <https://doi.org/10.1038/nri1841>.

Pier, Gerald B., Martha Grout, Tanweer S. Zaidi, John C. Olsen, Larry G. Johnson, James R. Yankaskas, et Joanna B. Goldberg. 1996. « Role of Mutant CFTR in Hypersusceptibility of Cystic Fibrosis Patients to Lung Infections ». *Science (New York, N.Y.)* 271 (5245): 64-67.

Pilette, C., Y. Ouadrhiri, V. Godding, J.-P. Vaerman, et Y. Sibille. 2001. « Lung Mucosal Immunity: Immunoglobulin-A Revisited ». *European Respiratory Journal* 18 (3): 571-88.

Pinkerton, James W., Richard Y. Kim, Avril A. B. Robertson, Jeremy A. Hirota, Lisa G. Wood, Darryl A. Knight, Matthew A. Cooper, Luke A. J. O'Neill, Jay C. Horvat, et Philip M. Hansbro. 2017. « Inflammasomes in the Lung ». *Molecular Immunology*, Inflammasomes, 86 (juin): 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.01.014>.

Przysucha, Natalia, Katarzyna Górska, et Rafal Krenke. 2020. « Chitinases and Chitinase-Like Proteins in Obstructive Lung Diseases – Current Concepts and Potential Applications ». *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 15 (avril): 885-99. <https://doi.org/10.2147/COPD.S236640>.

Quintin, Jessica, Sadia Saeed, Joost H.A. Martens, Evangelos J. Giamarellos-Bourboulis, Daniela C. Ifrim, Colin Logie, Liesbeth Jacobs, et al. 2012. « Candida albicans Infection Affords Protection against Reinfection via Functional Reprogramming of Monocytes ». *Cell host & microbe* 12 (2). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.006>.

Rasid, Orhan, Christine Chevalier, Tiphaine Marie-Noelle Camarasa, Catherine Fitting, Jean-Marc Cavaillon, et Melanie Anne Hamon. 2019. « H3K4me1 Supports Memory-like NK Cells Induced by Systemic Inflammation ». *Cell Reports* 29 (12): 3933-3945. e3.

Reddy, K. V. R., R. D. Yedery, et C. Aranha. 2004. « Antimicrobial peptides: premises and promises ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 24 (6): 536-47. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>.

« Registre et muco en chiffres ». 2015. Vaincre la Mucoviscidose. 4 février 2015. <http://www.vaincrelamuco.org/face-la-mucoviscidose/registre-et-muco-en-chiffres>.

Reihill, James A., John E. Moore, J. Stuart Elborn, et Madeleine Ennis. 2011. « Effect of Aspergillus Fumigatus and Candida Albicans on Pro-Inflammatory Response in Cystic Fibrosis Epithelium ». *Journal of Cystic Fibrosis* 10 (6): 401-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2011.06.006>.

Ren, Clement L., Margaret Rosenfeld, Oscar H. Mayer, Stephanie D. Davis, Margaret Kloster, Robert G. Castile, Peter W. Hiatt, et al. 2012. « Analysis of the Associations between Lung Function and Clinical Features in Preschool Children with Cystic Fibrosis ». *Pediatric Pulmonology* 47 (6): 574-81. <https://doi.org/10.1002/ppul.21590>.

Richard, Nicolas, Léa Marti, Annabelle Varrot, Loïc Guillot, Juliette Guitard, Christophe Hennequin, Anne Imberty, Harriet Corvol, Michel Chignard, et Viviane Balloy. 2018. « Human Bronchial Epithelial Cells Inhibit Aspergillus fumigatus Germination of Extracellular Conidia via FleA Recognition ». *Scientific Reports* 8 (octobre). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33902-0>.

Riches, David W. H., et Thomas R. Martin. 2018. « Overview of Innate Lung Immunity and Inflammation ». In *Lung Innate Immunity and Inflammation: Methods and Protocols*, édité par Scott Alper et William J. Janssen, 17-30. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8570-8_2.

Roach, Jared C., Gustavo Glusman, Lee Rowen, Amardeep Kaur, Maureen K. Purcell, Kelly D. Smith, Leroy E. Hood, et Alan Aderem. 2005. « The Evolution of Vertebrate Toll-like Receptors ». <https://doi.org/10.1007/bf02730510>.

Proceedings of the National Academy of Sciences 102 (27): 9577-82.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0502272102>.

Rodrigues, Janneth, Fábio André Brayner, Luiz Carlos Alves, Rajnikant Dixit, et Carolina Barillas-Mury. 2010. « Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes ». *Science (New York, N.Y.)* 329 (5997): 1353-55. <https://doi.org/10.1126/science.1190689>.

Romani, Luigina. 2011. « Immunity to Fungal Infections ». *Nature Reviews Immunology* 11 (4): 275-88. <https://doi.org/10.1038/nri2939>.

Rose, Mary Callaghan, et Judith A. Voynow. 2006. « Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease ». *Physiological Reviews* 86 (1): 245-78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2005>.

Saeed, Sadia, Jessica Quintin, Hindrik H.D. Kerstens, Nagesha A Rao, Ali Aghajanirefah, Filomena Matarese, Shih-Chin Cheng, et al. 2014. « Epigenetic programming during monocyte to macrophage differentiation and trained innate immunity ». *Science (New York, N.Y.)* 345 (6204): 1251086. <https://doi.org/10.1126/science.1251086>.

Sallenave, Jean-Michel. 2010. « Secretory Leukocyte Protease Inhibitor and Elafin/Trappin-2 ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 42 (6): 635-43. <https://doi.org/10.1165/rmcb.2010-0095RT>.

Schaedel, C., I. de Monestrol, L. Hjelte, M. Johannesson, R. Kornfält, A. Lindblad, B. Strandvik, L. Wahlgren, et L. Holmberg. 2002. « Predictors of Deterioration of Lung Function in Cystic Fibrosis* ». *Pediatric Pulmonology* 33 (6): 483-91. <https://doi.org/10.1002/ppul.10100>.

Scheller, Jürgen, Athena Chalaris, Dirk Schmidt-Arras, et Stefan Rose-John. 2011. « The Pro- and Anti-Inflammatory Properties of the Cytokine Interleukin-6 ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Including the Special Section: 11th European Symposium on Calcium, 1813 (5): 878-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>.

Schmid-Hempel, Paul. 2004. « Evolutionary ecology of insect immune defenses ». *Annual Review of Entomology* 50 (1): 529-51. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420>.

Schuijt, Tim J, Jacqueline M Lankelma, Brendon P Scicluna, Felipe de Sousa e Melo, Joris J T H Roelofs, J Daan de Boer, Arjan J Hoogendijk, et al. 2016. « The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia ». *Gut* 65 (4): 575-83. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309728>.

Sethi, Sanjay, et Timothy F. Murphy. 2009. « Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease ». *Review-article.* [Http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1056/NEJMra0800353](http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1056/NEJMra0800353). Massachusetts Medical Society. World. 17 juillet 2009. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0800353>.

Shahi, M, SA Ayatollahi Mousavi, M Nabili, M Aliyali, S Khodavaisy, et H Badali. 2015. « Aspergillus colonization in patients with chronic obstructive pulmonary disease ». *Current Medical Mycology* 1 (3): 45-51. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.1.3.45>.

Shiokawa, Moe, Sho Yamasaki, et Shinobu Saijo. 2017. « C-Type Lectin Receptors in Anti-Fungal Immunity ». *Current Opinion in Microbiology*, Host-microbe interactions: fungi * Host-microbe interactions: parasites, 40 (décembre): 123-30. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.004>.

Sierra, Josep M., Ester Fusté, Francesc Rabanal, Teresa Vinuesa, et Miguel Viñas. 2017. « An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 17 (6): 663-76. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315402>.

Singh, A., A. Ralhan, C. Schwarz, D. Hartl, et A. Hector. 2018. « Fungal Pathogens in CF Airways: Leave or Treat? » *Mycopathologia* 183 (1): 119-37. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0184-y>.

Slesiona, Silvia, Markus Gressler, Michael Mihlan, Christoph Zaehle, Martin Schaller, Dagmar Barz, Bernhard Hube, Ilse D. Jacobsen, et Matthias Brock. 2012. « Persistence versus Escape: Aspergillus terreus and Aspergillus fumigatus Employ Different Strategies during Interactions with Macrophages ». *PLoS ONE* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031223>.

Smole, Ursula, Bernhard Kratzer, et Winfried F. Pickl. 2020. « Soluble pattern recognition molecules: Guardians and regulators of homeostasis at airway mucosal surfaces ». *European Journal of Immunology* 50 (5): 624-42. <https://doi.org/10.1002/eji.201847811>.

Spina, D. 1998. « Epithelium Smooth Muscle Regulation and Interactions ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158 (supplement_2): S141-45. https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac100a.

Steven J., Van Dyken, et Locksley Richard M. 2018. « Chitins and Chitinase Activity in Airway Diseases ». *The Journal of allergy and clinical immunology* 142 (2): 364-69. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.06.017>.

Sun, W.-K., X. Lu, X. Li, Q.-Y. Sun, X. Su, Y. Song, H.-M. Sun, et Y. Shi. 2012. « Dectin-1 Is Inducible and Plays a Crucial Role in Aspergillus-Induced Innate Immune Responses in Human Bronchial Epithelial Cells ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31 (10): 2755-64. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1624-8>.

Tanaka, Toshio, Masashi Narazaki, et Tadamitsu Kishimoto. 2014. « IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (10): a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.

Tang, Juan, Guoxin Lin, Wallace Y. Langdon, Lijian Tao, et Jian Zhang. 2018. « Regulation of C-Type Lectin Receptor-Mediated Antifungal Immunity ». *Frontiers in Immunology* 9 (février). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00123>.

Tartey, Sarang, et Osamu Takeuchi. 2017. « Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells ». *International Reviews of Immunology* 36 (2): 57-73. <https://doi.org/10.1080/08830185.2016.1261318>.

Tecle, Tesfaldet, Shweta Tripathi, et Kevan L. Hartshorn. 2010. « Review: Defensins and Cathelicidins in Lung Immunity ». *Innate Immunity* 16 (3): 151-59. <https://doi.org/10.1177/1753425910365734>.

Toews, G. B. 2001. « Cytokines and the Lung ». *European Respiratory Journal* 18 (34 suppl): 3s-17s. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.00266001>.

Toor, Amreen, Luka Culibrk, Gurpreet K. Singhera, Kyung-Mee Moon, Anna Prudova, Leonard J. Foster, Margo M. Moore, Delbert R. Dorscheid, et Scott J. Tebbutt. 2018. « Transcriptomic and proteomic host response to Aspergillus fumigatus conidia in an air-liquid interface model of human bronchial epithelium ». *PLoS ONE* 13 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209652>.

Tribouley, J., J. Tribouley-Duret, et M. Appriou. 1978. « [Effect of Bacillus Callmette Guerin (BCG) on the receptivity of nude mice to Schistosoma mansoni] ». *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales* 172 (5): 902-4.

Tsai, Pei-Wen, Yin-Lien Cheng, Wen-Ping Hsieh, et Chung-Yu Lan. 2014. « Responses of Candida Albicans to the Human Antimicrobial Peptide LL-37 ». *Journal of Microbiology* 52 (7): 581-89. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3630-2>.

Vetvicka, Vaclav, Luca Vannucci, Petr Sima, et Josef Richter. 2019. « Beta Glucan: Supplement or Drug? From Laboratory to Clinical Trials ». *Molecules* 24 (7). <https://doi.org/10.3390/molecules24071251>.

Vilcinskas, A., et M. Wedde. 1997. « Inhibition of Beauveria bassiana Proteases and Fungal Development by Inducible Protease Inhibitors in the Haemolymph of Galleria mellonella Larvae ». *Biocontrol Science and Technology* 7 (4): 591-602. <https://doi.org/10.1080/09583159730640>.

Villiers, C. 1995. « C3, protéine du complément: une molécule aux multiples capacités. » *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN: 0767-0974]*, 1995, Vol. 11, N° 10; p.1419-29. <https://doi.org/10.4267/10608/2323>.

Vinzing, Maya, Julia Eitel, Juliane Lippmann, Andreas C. Hocke, Janine Zahlten, Hortense Slevogt, Philippe Dje N'Guessan, et al. 2008. « NAIP and Ipaf Control Legionella Pneumophila Replication in Human Cells ». *The Journal of Immunology* 180 (10): 6808-15. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6808>.

Wang, Jian, Fengqi Li, et Zhigang Tian. 2017. « Role of microbiota on lung homeostasis and diseases ». *Science China. Life Sciences* 60 (12): 1407-15. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9151-1>.

Watson, Alastair, Maximillian J.S. Phipps, Howard W. Clark, Chris-Kriton Skylaris, et Jens Madsen. 2018. « Surfactant Proteins A and D: Trimerized Innate Immunity Proteins with an Affinity for Viral Fusion Proteins ». *Journal of Innate Immunity* 11 (1): 13-28. <https://doi.org/10.1159/000492974>.

Whitsett, Jeffrey A, et Theresa Alenghat. 2014. « Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity ». *Nature immunology* 16 (1): 27-35. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>.

Winkelmann, A., et T. Noack. 2010. « The Clara Cell: A “Third Reich Eponym”? » *European Respiratory Journal* 36 (4): 722-27. <https://doi.org/10.1183/09031936.00146609>.

Xu, Baolin, Andrea Janicova, Jan Tilmann Vollrath, Philipp Störmann, Lukas Martin, Ingo Marzi, Sebastian Wutzler, Frank Hildebrand, Sabrina Ehnert, et Borna Relja. 2019. « Club cell protein 16 in sera from trauma patients modulates neutrophil migration and functionality via CXCR1 and CXCR2 ». *Molecular Medicine* 25 (octobre). <https://doi.org/10.1186/s10020-019-0115-0>.

Yáñez, Alberto, Nargess Hassanzadeh-Kiabi, Madelena Y. Ng, Javier Megías, Aparna Subramanian, George Y. Liu, David M. Underhill, M. Luisa Gil, et Helen S. Goodridge. 2013. « Detection of a TLR2 Agonist by Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Impacts the Function of the Macrophages They Produce ». *European Journal of Immunology* 43 (8): 2114-25. <https://doi.org/10.1002/eji.201343403>.

Yeo, Seon-Ju, Jae-Geun Yoon, Soon-Cheol Hong, et Ae-Kyung Yi. 2003. « CpG DNA Induces Self and Cross-Hyporesponsiveness of RAW264.7 Cells in Response to CpG DNA and Lipopolysaccharide: Alterations in IL-1 Receptor-Associated Kinase Expression ». *The Journal of Immunology* 170 (2): 1052-61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.2.1052>.

Zhang, Jun-Ming, et Jianxiong An. 2007. « Cytokines, Inflammation and Pain ». *International anesthesiology clinics* 45 (2): 27-37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>.

Zhang, Yong, Tao Liu, Clifford A Meyer, Jérôme Eeckhoute, David S Johnson, Bradley E Bernstein, Chad Nusbaum, et al. 2008. « Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS) ». *Genome Biology* 9 (9): R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>.

Zhao, Jingming, Wei Cheng, Xigang He, et Yanli Liu. 2018. « The Co-Colonization Prevalence of *Pseudomonas Aeruginosa* and *Aspergillus Fumigatus* in Cystic Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Microbial Pathogenesis* 125 (décembre): 122-28. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.010>.

Zhao, Yue, Jieling Yang, Jianjin Shi, Yi-Nan Gong, Qiuhe Lu, Hao Xu, Liping Liu, et Feng Shao. 2011. « The NLRC4 Inflammasome Receptors for Bacterial Flagellin and Type III Secretion Apparatus ». *Nature* 477 (7366): 596-600. <https://doi.org/10.1038/nature10510>.

Ziatabar, Sally, Jennifer Zepf, Sushama Rich, Ben T. Danielson, Paul I. Bollyky, et Robert Stern. 2018. « Chitin, Chitinases, and Chitin Lectins: Emerging Roles in Human Pathophysiology ». *Pathophysiology* 25 (4): 253-62. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2018.02.005>.

Abstract

Bronchial epithelial cells (BEC) have essential role in innate immune defense, particularly in inflammatory and anti-infectious processes. These functions are impaired in cystic fibrosis (CF), a genetic disease responsible for changes in the properties of pulmonary mucus, which is associated with chronic infections by various microbial agents, viruses, bacteria and fungi. Innate immune memory, described in hematopoietic cells, is the capacity to memorize a first stimulation and to react in an exacerbated or reduced way, during a second contact with pathogen. This memory requires a reprogramming of cellular functions through epigenetic mechanisms such as chromatin remodeling, modifications of gene transcription, and cellular metabolism.

The objective of this thesis was to study this mechanism in BEC and its molecular mechanisms. We showed that BEC pre-exposed to a first stimulus, such as *Pseudomonas aeruginosa* flagellin, were able to modulate their inflammatory response to a second stimulation occurring several days later. Analysis of ATAC-seq and microarray data showed that flagellin specifically induced persistent modulations of chromatin condensation associated with differential gene sets expression and transcription factor activity. The study of the role of transcription factors will allow us to focus our research on the molecular mechanisms at the origin of this memory

Understanding the intracellular processes related to the innate immune memory of bronchial epithelial cells could open new therapeutic avenues to modulate the innate immune response during polymicrobial infections found in CF patients.

Keywords: innate immunity, bronchial epithelial cells, innate immune memory, lung inflammation, epigenetic

Résumé

Le rôle des cellules épithéliales bronchiques (CEB) est essentiel dans la défense immunitaire innée notamment dans les processus inflammatoires et anti-infectieux. Ces fonctions sont défaillantes dans la mucoviscidose (CF), une maladie génétique responsable de modifications des propriétés du mucus pulmonaire, qui est associée à des infections chroniques par divers agents microbiens, virus, bactéries et champignons. La mémoire immunitaire innée, décrite dans les cellules hématopoïétiques, est la capacité de ces cellules à mémoriser une première stimulation et de réagir de manière exacerbée ou au contraire réduite, lors d'un second contact avec un pathogène. Cette mémoire nécessite une reprogrammation des fonctions cellulaires par des mécanismes épigénétiques tels que le remodelage de la chromatine, des modifications de la transcription des gènes, et du métabolisme cellulaire.

L'objectif de cette thèse était de rechercher un mécanisme de type mémoire de l'immunité dans les CEB puis d'en étudier les mécanismes moléculaires. Nous avons montré que les CEB pré-exposées à un premier stimulus, comme la flagelline de *Pseudomonas aeruginosa*, étaient capables de moduler leur réponse inflammatoire à une seconde stimulation survenant à distance. L'analyse des données obtenues par ATAC-seq et *microarray*, nous a permis de montrer que la flagelline induisait de façon spécifique et persistante des modulations de la condensation de la chromatine associées à l'expression différentielle d'ensemble de gènes et à l'activité de facteurs de transcription. L'étude du rôle des facteurs de transcription va nous permettre d'orienter nos recherches sur des mécanismes moléculaires à l'origine de cette mémoire.

La compréhension des processus intracellulaires liés à la mémoire immunitaire innée des cellules épithéliales bronchiques, pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques visant à moduler la réponse immunitaire innée lors des infections polymicrobiennes retrouvées chez les patients CF.

Mot clés : immunité innée, cellules épithéliales bronchiques, mémoire de l'immunité innée, inflammation pulmonaire, épigénétique