

Université de Lille II - Droit et Santé
Ecole Doctorale Biologie Santé



THÈSE

Pour l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE II
Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Adeline BARTHELEMY

Le 11 Mars 2016

**Rôle des cellules T Natural Killer invariantes (iNKT)
dans la surinfection bactérienne de la Grippe**

Devant le jury composé de :

M. le Professeur **Philippe DELANNOY**

M. le Docteur **Ronan LE GOFFIC**

Mme le Docteur **Maria LEITE-DE- MORAES**

M. le Docteur **Andreas WACK**

M. le Docteur **François TROTTEIN**

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude aux membres de mon jury, le Professeur **Philippe Delannoy** pour avoir accepté de présider ce jury de thèse, les Docteurs **Maria Leite-de-Moraes** et **Ronan Le Goffic** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et le Docteur **Andreas Wack** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse aussi mes remerciements aux membres de mon comité de suivi de thèse, le Docteur **Joël Pestel** et le Docteur **Thierry Jouault** pour leurs remarques et suggestions ayant grandement contribué au développement de ma thèse

Je remercie le Docteur **François Trottein** de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire dès le Master 2 Recherche et de m'avoir confié cet ambitieux projet. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ces 4.5 années.

Un immense merci à **Josette Fontaine** et une profonde reconnaissance pour tout ce que tu m'as apporté, que ce soit du point de vue scientifique ou sur le plan humain. Tu as beaucoup contribué à la bonne réalisation de ce projet et ton départ aura été un coup dur dans cette dernière ligne droite. Tu as toujours été disponible pour moi, que ce soit pour me rassurer lors de mes nombreux moments de doute, ou pour « faire la fête » lors de l'annonce de bonnes nouvelles. Tu étais là pour me prêter main forte lors de lourdes manip et pour répondre à mes questions. Les heures passées en P2 ne se comptent pas et resteront gravées dans ma mémoire (ainsi que tes petites comptines). Mille mercis pour ces quatre années de bonne humeur que j'ai pu passer avec toi !

Stoyan, si tu n'avais pas été là je ne pense pas que j'en serai là non plus. Tu m'as permis de travailler sur ton projet de thèse, tu m'as accueillie, encadrée, soutenue. Tu sais combien je te suis redevable pour mon année de Master 2, je le suis encore plus pour ma thèse. Merci d'avoir su faire de moi une personne « calme » et sûre d'elle au laboratoire.

Je remercie également les Docteurs **Christelle Faveeuw** et **Christophe Paget** pour tout ce qu'ils m'ont apporté ces dernières années. Vous m'avez apporté une aide précieuse que ce soit dans les manip, les techniques que j'ai dû apprendre ou développer, dans l'écriture de ma thèse ou tout simplement dans le soutien moral dans les moments difficiles.

Mes remerciements s'adressent également à **Camille** et **Riti**, mes premières co-bureau et amies qui ont fait de cet endroit de travail un endroit de confidences et de bien-être. Tous ces moments partagés avec vous sont précieux à mes yeux.

Merci à **Manu**, et **Valentin** (mon stagiaire en or), mes derniers co-bureau, pour votre aide sur mes présentations, pour votre bonne humeur, votre amitié et surtout pour ne jamais vous être plaint de mon caractère pas toujours facile. Ne changez pas les gars !

Asma, **Daphnée**, merci de faire partie de ma vie au laboratoire et à l'extérieur. Merci également pour votre soutien et votre aide durant les manips. Merci de votre bonne humeur.

Je remercie également **Marie-Josée**, **Maya**, **Reem**, **Fahima** et **Olivia** avec qui nous avons partagé de bons moments. Cela a été un véritable plaisir d'être avec vous dans le labo.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe 12 grâce à qui j'ai pu travailler dans un environnement agréable. Merci à **Delphine** pour les moments café et potins. Merci **Isabelle**, **Sandra**, **Muriel**, **Philippe**, **Emilie**, **Jean-Claude** et **Christophe** pour ce que vous avez pu apporter au projet lors des nombreuses réunions Li3.

Merci également à **Laura**, **Nathan**, **Margot**, **Elodie**, **Laurye**, **Gwen**, **Eva**, **Bachirou**, **Rémi**, **Morgane**, **Olivier**, **Julie**, **Delphine**, **Gaëlle**, **Magdiel** et **Quentin**, ainsi que toutes les personnes ayant travaillé dans l'équipe 12, pour tout ce que vous avez pu m'apporter durant ces 4 années passées ici.

Sans oublier mes stagiaires, **Emmeline** et **Elise**. Merci à vous pour votre aide dans les manips à la paillasse ou en animalerie.

Merci à mes amies Thésardes ou Docteurs, oui **Géraldine**, **Marion**, **Laëtitia** et **Jeanne** je parle de vous. Nous avons commencé sur les bancs de la Fac et nous voilà arrivées au bout. Merci pour toutes nos discussions, les cafés et les éclats de rire.

Ces remerciements ne seraient pas complets si je ne remerciais pas **Landry**. Te voilà soulagé ! Merci pour toute la patience dont tu as fait preuve ces dernières années, pour ton soutien sans faille et pour m'avoir offert un endroit où mes difficultés au labo ne comptaient plus. Tu as été là pour moi plus que n'importe qui et pour cela je ne te remercierai jamais assez.

Enfin, je voudrais remercier **ma famille** sans qui cette thèse n'existerait sûrement pas. Merci à mes frères, **Thibaut** et **Clément** qui m'ont poussé chacun à leur manière à me dépasser et à aller jusqu'au bout. Merci à **mes parents** qui en ont vu de toutes les couleurs et qui m'ont malgré tout soutenu. Vous avez fait preuve d'une patience incontestable durant ces quatre années et pour cela je vous dis un immense Merci ! J'adresse un merci spécial à mon Papa et à ma Maman pour les corrections apportées à cette thèse. Vous avez eu le courage de lire ces dizaines de pages, je n'en reviens pas !

Résumé

Durant l'infection par le virus Influenza A (IAV), les changements physiques et immunologiques du poumon prédisposent l'hôte aux surinfections bactériennes. Les cellules T Natural Killer invariantes (iNKT) sont des lymphocytes T innés pouvant avoir des rôles bénéfiques ou délétères durant l'infection. Nos objectifs ont visé à (i) étudier le rôle naturel des cellules iNKT et (ii) à rechercher l'effet d'une activation exogène des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne post-influenza.

Lors de mon arrivée, le laboratoire venait de décrire, pour la première fois en contexte infectieux, que les cellules iNKT étaient capables de produire de l'IL-22 au cours de l'infection grippale. Cette cytokine joue un rôle majeur dans les processus de maintien et de réparation des épithéliums. L'une des causes des surinfections bactériennes post-grippales étant l'altération et/ou la perte de l'intégrité de l'épithélium pulmonaire, nous nous sommes proposés d'étudier le rôle potentiel de cette cytokine dans un modèle expérimental de surinfection bactérienne à *S. pneumoniae*. Nous avons ainsi pu montrer que si cette cytokine ne joue pas un rôle majeur dans la réponse anti-virale de l'hôte, l'IL-22 participe au contrôle de l'inflammation au cours de l'infection grippale et joue un rôle protecteur dans la surinfection bactérienne.

Par ailleurs, l'utilisation de souris dépourvues en cellules iNKT (*Ja18^{-/-}*) a permis de montrer que les cellules iNKT limitent la susceptibilité aux surinfections et réduisent le synergisme létal de la coinfection virus/bactérie. Au moment de l'infection bactérienne, les cellules iNKT des souris grippées sont incapables de produire de l'IFN- γ , cytokine dont nous avons montré le rôle essentiel dans les mécanismes de défense antibactérienne. Le défaut d'activation des cellules iNKT chez les souris surinfectées est lié à l'interleukine-10 (IL-10), cytokine immunosuppressive induite par l'infection virale, plutôt qu'à un défaut intrinsèque des cellules iNKT. L'IL-10 inhibe l'activation des cellules iNKT en réponse au pneumocoque en inhibant la production d'IL-12 par les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs). La neutralisation de l'IL-10 restaure l'activation des cellules iNKT et augmente la résistance à la surinfection. Ainsi, les cellules iNKT ont un rôle bénéfique (en amont de la colonisation bactérienne) dans le contrôle de la surinfection bactérienne de la grippe et représentent une cible de l'immunosuppression.

Nous avons par la suite étudié la possibilité que le superagoniste des cellules iNKT, l' α -galactosylceramide (α -GalCer) puisse limiter la surinfection bactérienne. Pour cela, les souris ont été traitées par voie intranasale avec de l' α -GalCer à différents temps post-influenza, juste avant l'infection par le pneumocoque. Le traitement à jour 3, au pic de la réplication virale, limite fortement la surinfection. Cependant, l'inoculation d' α -GalCer pendant la phase aiguë du virus (jour 7) ne permet pas d'activer les cellules iNKT pulmonaires et n'a pas d'effet sur la surinfection. L'absence d'activation des cellules iNKT n'est pas intrinsèque et est associée à une disparition complète des cellules dendritiques CD103⁺ respiratoires (cDCs), lesquelles sont cruciales dans l'activation des cellules iNKTs. À des temps plus tardifs (jour 14), les cDCs repeuplent le poumon et l' α -GalCer promeut l'activité antibactérienne des cellules iNKT.

Pris dans son ensemble, cette étude souligne le rôle des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne de la grippe et ouvre de nouvelles voies thérapeutiques afin de limiter les surinfections bactériennes post-influenza.

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
RESUME.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION.....	8
CHAPITRE 1 : LE VIRUS INFLUENZA A	9
I. <i>Généralités sur la Grippe</i>	9
1. Les symptômes et modes de transmission.....	9
2. Épidémiologie.....	10
3. Les pandémies.....	10
II. <i>Le virus de l'Influenza A : Structure</i>	11
III. <i>La réponse immunitaire dirigée contre le virus Influenza A</i>	12
1. Reconnaissance par les récepteurs innés.....	12
a. Reconnaissance par les Toll-Like Receptors (TLR)	12
b. Reconnaissance par les NLRs.....	13
c. Reconnaissance par les RLRs	14
2. La réponse immunitaire innée	14
a. Les macrophages alvéolaires	14
b. Les cellules dendritiques	15
c. Les neutrophiles	15
d. Les cellules Natural Killer.....	16
e. Les cellules T Natural Killer invariantes	16
3. La réponse immunitaire adaptative	16
a. La réponse T spécifique	16
b. La réponse B spécifique.....	17
CHAPITRE 2 : STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE	18
I. <i>Épidémiologie</i>	18
1. Pneumovax® 23	18
2. Prevenar® 13.....	19
II. <i>Streptococcus pneumoniae : Structure</i>	19
1. La capsule polysaccharidique	19
a. Acide teichoïque et acide lipoteichoïque	19
i. L'acide teichoïque.....	19
ii. L'acide lipoteichoïque.....	20
iii. Protéines bactériennes.....	20
La pneumolysine (Ply)	20
Les neuraminidases (Nan A et Nan B)	20
Choline-Binding Proteins (CBPs).....	21
III. <i>La réponse immunitaire dirigée contre S. pneumoniae</i>	22
1. Reconnaissance par le système immunitaire innée	22
a. Rôle des TLRs.....	23
b. Rôles des NLRs.....	24
c. Rôle des récepteurs d'épuration	24
d. Rôle des Récepteurs C-type lectin	24
e. Rôle des protéines du surfactant	25
f. Le rôle du complément	25
2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> et les cellules de l'immunité innée	25
a. Les macrophages alvéolaires.....	25
b. Les neutrophiles	26
c. Lymphocytes $\gamma\delta$	27
d. NK cells	27
e. iNKT cells	27

3.	Le rôle de l'immunité adaptative	28
a.	Rôle des lymphocytes T	28
b.	Rôle des lymphocytes B.....	28
CHAPITRE 3 :	LES SURINFECTIONS BACTERIENNES DE LA GRIPPE	30
I.	<i>Mécanismes des surinfections bactériennes post-grippales par S. pneumoniae</i>	30
1.	Facteurs viraux facilitant la surinfection	30
2.	Facteurs bactériens impliqués dans la surinfection	31
3.	Altérations induites par le virus de la grippe.....	32
a.	Altération mécanique de l'épithélium pulmonaire	32
b.	Dysfonctionnement du système immunitaire	32
II.	<i>Moyens thérapeutiques</i>	34
1.	Traitements par agonistes TLR	34
2.	Traitements par cytokines.....	35
3.	Traitements par antibiotiques.....	36
CHAPITRE 4 :	LES LYMPHOCYTES T NATURAL KILLER (NKT)	37
I.	<i>Caractérisation</i>	37
1.	Découverte.....	37
2.	Classification	37
a.	Cellules NKT de type I (iNKT)	38
b.	Cellules NKT de type II (vNKT)	39
c.	Cellules NKT de type III (NKT-like)	39
3.	Localisation et homéostasie	40
4.	Sélection et maturation.....	40
a.	Sélection positive et négative.....	40
b.	Maturation	41
II.	<i>Activation des cellules iNKT</i>	42
1.	Activation TCR-dépendante	42
a.	La molécule de CD1d.....	42
b.	Les ligands des cellules iNKT.....	43
i.	Ligands exogènes.....	43
L'α-Galactosylcéramide (α-GalCer)	43	
Autres ligands exogènes.....	44	
ii.	Ligands endogènes	45
2.	Activation cytokines-dépendante	45
3.	<i>Activation dépendante du TCR et des cytokines</i>	46
4.	Cellules activatrices	47
a.	Cellules dendritiques et cellules dérivées de monocytes	47
b.	Autres cellules activatrices	48
III.	<i>Rôle des cellules iNKT dans les pathologies</i>	49
1.	Cancers.....	49
2.	Pathologies infectieuses.....	49
3.	Pathologies auto-immunes et inflammatoires.....	50
a.	Pathologies pulmonaires	50
b.	Autres pathologies	50
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....		52
RESULTATS		56
Article 1: <i>Interleukin-22 reduces lung inflammation during Influenza A virus infection and protects against secondary bacterial infection</i>		57
Résultats complémentaires Article 1	Erreur ! Signet non défini.	
Article 2: <i>Influenza A virus-induced release of interleukin-10 inhibits the antimicrobial activities of invariant natural killer T cells during invasive pneumococcal superinfection</i>		58

<i>Article 3: Early activation of invariant natural killer T cells by alpha-galactosylceramide protects against bacterial superinfection post-influenza</i>	60
DISCUSSION	61
BIBLIOGRAPHIE	73
ANNEXE	95
<i>Communications scientifiques (Oral)</i>	96
<i>Communications scientifiques (Posters)</i>	96

Liste des abréviations

α-GalCer : α-galactosylceramide

ADN : acide désoxiribonucléique

AIM2 : *absent in melanoma 2*

ARN : acide ribonucléique

BPCO: broncho pneumopathie chronique obstructive

CBP: *choline-binding protein*

cDC : cellule dendritique conventionnelle

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CpG-ODN: **CpG oligodeoxynucleotides**

DC : cellule dendritique

DN: double negative

LBA : lavages broncho-alvéolaires

LPS: lipopolysaccharide

LTA: *lipoteichoic acid*

MARCO: *macrophage receptor with collagenous structure*

MDSC: *myeloid-derived suppressor cells*

MoDC : *monocyte-derived dendritic cell*

MyD88: *myeloid differentiation factor 88*

NA : neuraminidase

NETs: *neutrophils extracellular traps*

NK: *natural killer*

NLR : *NOD-Like Receptor*

NLRP3: *NOD-like receptor pyrin domain containing 3*

EAE: encéphalomyélite auto-immune expérimentale

GD3: ganglioside 3

GM-CSF: *granulocyte macrophage colony stimulating factor*

GSL: glycosphingolipide

HA : hémagglutinine

IFN : interféron

Ig : Immunoglobuline

iGb3: isoglobotrihexosylceramide

IL : interleukine

IM: *inflammatory monocyte*

iNKT: *invariant natural killer T*

NOD: (mice) *non-obese diabetic*

NP : nucléoprotéine

PAFR: *platelet-activating factor receptor*

pDC : cellule dendritique plasmacytoïde

PRR: *pattern recognition receptor*

RLR : *RIG-Like Receptor*

RNP : Ribonucléoprotéine

ROS: *reactive oxygen species*

SCID: *severe combined immunodeficiency*

SP-A (ou-D): *surfactant protein*

TCR: *T cell receptor*

TLR : *Toll-Like Receptor*

vNKT: *variant natural killer T*

Introduction

Chapitre 1 : Le virus Influenza A

Les virus Influenza de type A sont responsables de pathologies respiratoires très contagieuses. Les premières descriptions de ces pathologies ont été réalisées lors d'épidémies dans l'Antiquité. Cependant, ce n'est qu'au cours du XIV^{ème} siècle que le terme grippe apparaît. De nos jours, ces virus représentent un problème majeur de santé publique. En effet, les virus influenza de type A sont responsables d'épidémies annuelles, lesquelles touchent entre 5 et 15% de la population mondiale (Beveridge et al. 1991). Par ailleurs, leur capacité de transmission et d'adaptation à l'Homme se produit de façon sporadique et peut donner lieu à des épidémies de grande envergure (Ghendon et al. 1994), telles que les pandémies de 1918, 1957, 1968 et plus récemment celle de 2009.

I. Généralités sur la Grippe

1. Les symptômes et modes de transmission

Chez l'adulte, la grippe clinique se traduit généralement par l'installation soudaine d'un syndrome grippal, lequel est associé à une forte fièvre, une quinte de toux, des rhinorrhées claires, des frissons et des douleurs musculaires et articulaires. Ces symptômes disparaissent en quelques jours, mais l'asthénie post-grippale peut perdurer quelques semaines (Monto et al. 2000). Une pneumonie peut se manifester lors d'infections plus sévères. Par ailleurs, les virus de la grippe peuvent également être la cause de bronchiolites, de laryngites, et dans de plus rares cas, de myocardites ou d'encéphalites. Le virus est détectable rapidement dans les sécrétions nasopharyngées avant même l'apparition des symptômes, jusqu'à atteindre des titres élevés en 2-3 jours pour revenir à de faibles taux à partir du 5^{ème} jour (Nicholson et al. 2003). Le virus se réplique préférentiellement au niveau de l'épithélium trachéo-bronchique mais peut également s'étendre à toute la muqueuse respiratoire.

À l'heure actuelle, le mode exact de transmission reste encore discuté. Le mode de transmission le plus fréquent se fait par voie respiratoire via des gouttelettes riches en virus provenant de la toux ou des éternuements de personnes infectées. Ces aérosols sont de tailles importantes et ne restent pas en suspension dans l'air, rendant la transmission sans contact rapproché moins fréquente (Cox et al. 2000). Cependant, de plus en plus d'études mettent en avant les risques de transmission manu portée, notamment dans les transports en commun.

2. Épidémiologie

En Europe et Amérique du Nord, les virus Influenza A sont responsables de nombreuses pandémies et épidémies hivernales. Cependant, leur impact en santé publique reste difficile à établir, les symptômes grippaux étant peu spécifiques. L'incidence d'épidémie par an est estimée à 10-20% chez les adultes et 40 à 50% chez les personnes plus susceptibles (personnes âgées et écoliers) (Cox et al. 2000). La mortalité due à l'infection grippale est, quant à elle, peu connue. En effet, les certificats de décès ne mentionnent que rarement l'infection grippale qui aurait pu mener ou contribuer au décès. Ainsi la mortalité liée aux infections par le virus de la grippe est sans doute sous-estimée. Une étude clinique réalisée sur une cohorte d'individus décédés pendant les saisons hivernales de 1975 à 1990 a mis en évidence que la grippe n'est signalée comme ayant contribué au décès que dans 10% des cas réels (Nickolson et al. 1996).

Les populations les plus à risques sont les personnes âgées et les enfants en bas âge ou étant scolarisés. En effet, des études montrent que dans 90% des cas, le décès lié à la grippe survient chez les personnes âgées de plus de 65 ans (Hak et al. 2002). Par ailleurs, plus de 10 000 hospitalisations d'enfants de moins de deux ans sont observées chaque année aux États-Unis (Izurieta et al. 2000). Cette sensibilité accrue à l'infection grippale est due principalement à l'immaturation du système immunitaire durant les six premiers mois de vie et au fait que leurs voies respiratoires sont moins développées que celles d'un adulte (Glezen et al. 1997).

3. Les pandémies

Le virus de la grippe peut se présenter de plusieurs façons, mais les pandémies sont sans aucun doute sa forme la plus dramatique et dévastatrice. Au cours de l'histoire, le monde a connu plusieurs pandémies dont quatre au XXème siècle. La première, et sans doute la plus dramatique, s'est produite lors de l'hiver 1918, due à une souche H1N1. Elle est connue sous le nom de « grippe espagnole ». L'origine géographique du virus est encore discutée, celui-ci ayant touché l'Amérique du Nord, l'Europe et l'Afrique de façon presque simultanée (Crosby et al. 1989). Lors de cette pandémie, un tiers de la population mondiale fut touché et le nombre de décès est estimé à environ 50 millions (Taubenberger et al. 2006). Cependant, le taux de mortalité est encore controversé et pourrait s'élever à 100 millions de morts. Par ailleurs, la population la plus touchée lors de cette pandémie regroupe les jeunes adultes, population peu infectée lors des épidémies hivernales et des pandémies grippales. L'impact de la pathogénicité de cette souche est encore étudié de nos jours. Cependant il a été révélé que l'hémagglutinine (HA), modifiée et reconnaissant une variété d'acides sialiques plus importante, aurait pu contribuer à une fixation augmentée dans les voies respiratoires de l'hôte (Reid et al. 2003).

Les pandémies survenues par la suite en 1958 (souche H2N2) et en 1968 (souche H3N2) ont été beaucoup moins meurtrières, bien qu'elles aient respectivement causées (selon l'OMS) 2 millions et 1 million de décès.

Plus récemment, en 2009, une nouvelle pandémie a vu le jour au Mexique et s'est répandue aux États-Unis et à l'ensemble du monde (Tautenberger et al. 2010). Ce virus, de sous-type H1N1, combine un triple assortiment de gènes de la grippe humaine, aviaire et porcine (Smith et al. 2009). 60% de personnes touchées étaient âgées de moins de 18 ans (Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, 2009) et il semblerait que les personnes obèses soient plus sensibles à l'infection par ce virus.

II. Le virus de l'Influenza A : Structure

Les virus influenza de type A sont des virus enveloppés de la famille des Orthomyxoviridae. Ceux-ci sont de forme sphérique ou filamenteuse et ont une taille pouvant varier entre 84 et 170 nm (Harris et al. 2006). L'enveloppe virale se compose d'une bicouche lipidique, dérivée des membranes cellulaires, dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines de surface hémagglutinine (HA), neuraminidase (NA) et la protéine M2. La nature des deux principales glycoprotéines de surface (HA et NA) permet de définir les différents sous-types de virus. Chez l'Homme, depuis 1918, seuls les virus porteurs de trois types de HA (H1, H2 et H3) et deux types de NA (N1 et N2) ont été décrits (Cheung et al. 2007).

La HA et la NA possèdent un court domaine d'ancrage à l'enveloppe et ressortent à l'extérieur du virion. La HA est une protéine trimérique permettant l'attachement de la particule virale aux acides sialiques (ses récepteurs) et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte. La NA, quant à elle, est une protéine tétramérique possédant une activité sialidase, permettant ainsi la libération des virions nouvellement formés de la cellule infectée. Enfin, la protéine M2 est tétramérique et transmembranaire. Celle-ci constitue un canal ionique important lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte.

La particule virale renferme 8 segments d'ARN simple brin encapsidés par la nucléoprotéine (NP) sous la forme de structures ribonucléoprotéiques hélicoïdales (RNP). Les extrémités de chacun des segments d'ARN sont associées au complexe de transcription/réplication du virus, lequel est composé de trois protéines PB1, PB2 et PA (voir Figure 1).

À l'interface entre la NP et l'enveloppe virale, nous retrouvons la protéine M1, laquelle intervient dans l'assemblage et le bourgeonnement de la particule virale (Harris et al. 2006). Cette protéine interagit avec les RNP au cœur de la particule (Ye et al. 1999) ainsi qu'avec les lipides de l'enveloppe virale et les extrémités cytosoliques des glycoprotéines de surface (Barman et al. 2001). La protéine NS2 (ou NEP pour « Nuclear Export Protein ») est associée à M1 permettant ainsi l'exportation des RNP nouvellement synthétisés du noyau vers le cytoplasme (Huang et al.

2001). La protéine NS1 est retrouvée en abondance dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées. Cependant, cette protéine n'est pas retrouvée dans la particule virale. NS1 intervient principalement dans l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires et le blocage de la réponse immunitaire, notamment interféron (IFN)-dépendante (Krug et al. 2003). Enfin, la protéine PB1-F2 est retrouvée dans le cytoplasme, le noyau, mais aussi dans les mitochondries des cellules hôtes. Celle-ci peut jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose par voie mitochondriale (Chen et al. 2001 ; Le Goffic et al. 2011).

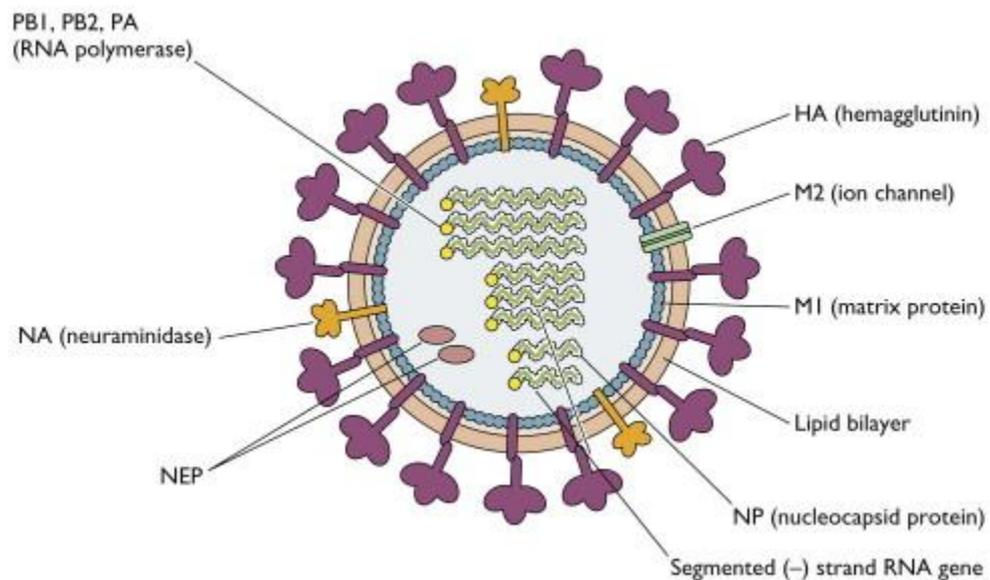


Figure 1 : Structure du virus Influenza A

III. La réponse immunitaire dirigée contre le virus Influenza A

1. Reconnaissance par les récepteurs innés

L'infection initiale par le virus Influenza A s'effectue au niveau des cellules épithéliales du tractus respiratoire. En ce lieu, le virus est reconnu par un grand nombre de récepteurs de l'immunité innée. La reconnaissance de composants de la particule virale engendre alors une forte production de cytokines, de facteurs chimio-attractants, mais également des composés pro-apoptotiques. Parmi les récepteurs capables de reconnaître le virus, on retrouve les Toll-Like Receptor (TLR), Nod-Like Receptors (NLR) et les Rig-Like Receptors (RLR).

a. Reconnaissance par les Toll-Like Receptors (TLR)

Il existe plusieurs récepteurs de type TLR chacun reconnaissant un motif particulier (Lester et al. 2014). Parmi ceux-là, les TLR3 et 7 jouent un rôle important dans la reconnaissance du virus

Influenza A (Guillot et al. 2005 ; Diebold et al. 2004). Ces récepteurs reconnaissent l'ARN simple et double brin du virus et leur activation induit une forte production de cytokines, notamment d'interférons de type I. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) sont les sources principales de cette cytokine et le TLR7, en activant les voies IRF-7, AP-1 et NFκB, joue un rôle majeur dans ce phénomène (Barchet et al. 2005). Par ailleurs, il a également été montré que les souris déficientes pour le TLR3 ont une meilleure survie par rapport aux souris contrôles (Le Goffic et al. 2006). Néanmoins, si la présence de ce récepteur semble être délétère, une étude plus récente montre que la déficience en TLR3 et TLR7 induit une mortalité plus élevée par rapport aux souris contrôles (Seo et al. 2010). Ceci peut s'expliquer par le fait que les souris *TLR7*^{-/-} ont une charge virale et une mortalité plus importante que les souris sauvages (Kaminski et al. 2011). De plus, le TLR7 est important dans l'induction de l'inflammasome et dans la production de pro-IL1β en réponse au virus (Ichinohe et al. 2010). Enfin, une étude récente montre le rôle positif du TLR3 dans la diminution de la charge virale lorsque celui-ci est activé par l'IL-24. Ce contrôle de la réplication virale se fait de façon indépendante de l'IFN de type I (Weiss et al. 2015).

Chez l'Homme, le groupe de Lee a montré un rôle important du TLR10 lors de l'infection par le virus Influenza A (Lee et al 2014). Si ce TLR est encore peu connu chez l'Homme et est non fonctionnel chez la souris, cette étude montre que la reconnaissance du virus par les TLR est encore à étudier.

b. Reconnaissance par les NLRs

Le virus Influenza A est reconnu également par les Nod-like Receptor (ou NLRs). En effet, la protéine PB1-F2 du virus est reconnue par NLRX1, protéine mitochondriale, afin de limiter l'apoptose des macrophages et d'induire la production d'IFN de type I (Jaworska et al. 2014). Néanmoins, il a été montré qu'au sein des fibroblastes, l'activation de NLRX1 semble avoir un rôle délétère en empêchant la production d'IFN de type I. Cette même étude rapporte également que les souris *NLRX1*^{-/-} ont une meilleure clairance virale pulmonaire que les souris contrôles, mais une pathologie pulmonaire plus importante (Allen et al. 2011). Ces résultats sont en contraste avec ceux de Jaworska et al. qui observent une augmentation de la charge virale pulmonaire chez les souris *NLRX1*^{-/-}.

Récemment, plusieurs études ont montré l'importance de la molécule NLRP3 lors d'une infection par le virus Influenza A. En effet, les souris déficientes pour cette molécule sont plus sensibles à l'infection virale (Allen et al. 2009). Si l'étude d'Ichinohe et al. montre également une survie plus faible chez les souris *Caspase-1*^{-/-} et *IL-1R*^{-/-}, celle-ci décrit une survie identique des souris contrôles et des souris *NLRP3*^{-/-} (Ichinohe et al. 2009). Cette étude montre un rôle important de l'inflammasome dans le recrutement des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au virus et dans la sécrétion d'IgA et IgG. De plus, chez les animaux *IL1R*^{-/-}, la réponse immunitaire est altérée et un

défaut de recrutement de neutrophiles est observé au niveau pulmonaire (Schmitz et al. 2005). L'ensemble de ces études indique un rôle crucial de l'inflammasome et de son activation au cours de l'infection par le virus Influenza A.

c. Reconnaissance par les RLRs

En plus des TLR et des NLR, des études récentes ont montré l'importance des récepteurs cytosoliques. Ces récepteurs sont connus sous le nom de Retinoic acid Induced Gene I (RIG-I) – Like Receptor (ou RLR) et reconnaissent des séquences d'ARN viraux. RIG-I est le membre de cette famille le mieux caractérisé. Celui-ci signale via la protéine mitochondriale MAVS laquelle permet l'activation d'IRF-3, IRF-7 et NFκB et ainsi la production d'IFN de type 1 et de cytokines proinflammatoires (Chen et al. 2015). Il a également été montré que NLRC5 interagit avec RIG-1 afin de stabiliser l'induction de la réponse antivirale (Ranjan et al. 2014).

Une étude récente décrit également un rôle du récepteur AIM2 (Absent In Melanoma 2) dans l'infection par Influenza A. Ce récepteur reconnaît les ADN double brin cytosolique. Lors de l'infection par le virus, une grande quantité d'ADN est retrouvée dans l'environnement pulmonaire, principalement à cause de la mort et nécrose cellulaire. Les souris déficientes pour AIM2 présentent une faible production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6 et TNF-α) et une survie beaucoup plus faible que les souris sauvages. L'injection d'une DNase induit le même profil (Schattgen et al. 2016). Ainsi, l'augmentation d'ADN dans le microenvironnement pulmonaire représente un nouveau mécanisme permettant d'alerter le système immunitaire.

2. La réponse immunitaire innée

Après reconnaissance du virus par les récepteurs innés, une première réponse immunitaire va se mettre en place. Celle-ci met en jeu de nombreux types cellulaires.

a. Les macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires font partie de la première ligne de défense contre les pathogènes respiratoires, ceux-ci étant à l'interface air-tissu. De récents travaux ont montré une importance capitale de ces cellules lors de l'infection par le virus Influenza A. En effet, l'absence de macrophages alvéolaires induit une pathologie pulmonaire plus importante ainsi qu'une survie plus faible des souris infectées par le virus (Purnama et al. 2014, Schneider et al 2014). Cependant, si l'absence de macrophages alvéolaires est importante dans le contrôle du virus et de la pathologie pulmonaire, celle-ci n'impacte pas les réponses T et B antivirales. Néanmoins, Hogner et al ont observé que la production d'IFN de type I par les macrophages alvéolaires induit une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales (Hogner et al. 2013).

b. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) ont une place centrale dans l'induction de la réponse immunitaire dirigée contre le virus de la grippe. Celles-ci participent à la fois à la réponse immunitaire innée et à la réponse immunitaire adaptative. Il existe plusieurs sous-populations de DC au sein des poumons (voir Chapitre 4 page 47). Les DC sont des cellules sentinelles capables de capter des antigènes de deux façons distinctes : elles peuvent être directement infectées par le virus ou phagocyter des cellules infectées apoptotiques. Lorsque les DC sont activées, celles-ci produisent un grand nombre de cytokines et de chimiokines, lesquelles induisent la réponse innée. Parmi celles-ci on retrouve IL-6, IL-12, IL-18, TNF α , IL-8, IP-10, RANTES, MIP-1 et les IFN de type 1. Des études ont montré un rôle important des DC dans la survie des souris et le contrôle de la charge virale. En effet, la déplétion des DC induit une diminution importante de la survie des souris et une augmentation du titre virale dans le poumon (McGill et al. 2008)

Les DC sont connues pour présenter les antigènes aux cellules T et B afin d'induire une réponse immunitaire adaptative. Il est connu que les cellules T CD8⁺ sont importantes dans la réponse anti-virale. Une étude a décrit une inhibition de la réponse T CD8⁺ virus-spécifique suite à la déplétion en DC (McGill et al. 2008). La même équipe publie quelques années plus tard une étude montrant que les DC jouent un rôle important dans la survie des cellules T CD8⁺ en leur présentant l'IL-15 (McGill et al. 2010). On observe une augmentation de l'apoptose de cellules T CD8⁺ chez les souris déplétées en DC. Enfin, plus récemment, des travaux révèlent un rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans l'induction de la réponse T CD8⁺. En effet, les pDC sont infectées directement par le virus et présentent les antigènes viraux aux cellules T CD8⁺ par voie endogène (Hemann et al. 2015).

c. Les neutrophiles

Les neutrophiles constituent une population effectrice importante. Ces cellules sont rapidement recrutées dans les poumons et les Lavages Broncho-Alvéolaires (LBA) après l'infection par le virus Influenza A (Tate et al. 2008). Néanmoins, ce recrutement rapide et l'activation de ces cellules contribuent au développement d'une forte inflammation pulmonaire. La déplétion de ces cellules induit une diminution du contrôle de la charge virale dans les poumons et aggrave ainsi la pathologie (Tate et al. 2008). Par ailleurs, il est important de noter que l'utilisation de différents anticorps neutralisants (anti-GR1 ou anti-Ly6G) induit des effets différents. De plus, les neutrophiles peuvent avoir un rôle différent selon la souche virale utilisée (Tate et al. 2011). Le virus Influenza A est capable d'infecter les neutrophiles et ceux-ci sont capables d'initier une activation des cellules T CD8⁺ (Hufford et al. 2012). Cependant l'infection des neutrophiles par le virus induit une mort cellulaire plus rapide de ceux-ci (Ivan et al. 2013).

d. Les cellules Natural Killer

Les cellules Natural Killer (NK) sont connues pour leur activité cytotoxique et la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces cellules appartenant à la première ligne de défense lors d'une infection semblent pourtant être délétères lors de l'infection par le virus de la grippe. En effet, la déplétion de ces cellules améliore la pathologie induite par l'infection virale (Zhou et al 2013). Il en est de même dans un modèle de souris *IL-15^{-/-}* chez lesquelles l'absence de cellules NK est une caractéristique (Abdul-Careem et al. 2012). Cependant Kumar et al ont montré que la production massive d'IL-22 par les cellules NK protégeait de l'inflammation due à l'infection et induisait également une régénération de l'épithélium pulmonaire (Kumar et al. 2013). Le rôle des cellules NK est donc encore imprécis lors de l'infection par le virus de la grippe.

e. Les cellules T Natural Killer invariantes

Les cellules T Natural Killer invariantes ou iNKT sont des cellules à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ces cellules ont la capacité de produire en grande quantité des cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-4 ou encore l'IL-17. Ces cellules sont bénéfiques lors de l'infection virale (De Santo et al. 2008, Kok et al 2011 ; Paget et al. 2011). En effet, les souris déficientes en cellules iNKT (*Ja18^{-/-}*) sont beaucoup plus sensibles au virus de la grippe, ont une pathologie plus prononcée et ont une augmentation du recrutement de monocytes inflammatoires dans les poumons. De plus, leur capacité à produire de l'IL-22, permet une réduction des dommages épithéliaux pulmonaires (Paget et al. 2012). Par ailleurs, De Santo et al. ont montré un rôle des cellules iNKT dans le contrôle de l'activité immunosuppressive des cellules Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC). En effet, l'absence de cellules iNKT chez la souris induit un fort recrutement de cellules MDSC immunosuppressives au sein du poumon. Par ailleurs, cette étude montre également un défaut de contrôle de la réplication virale chez les souris *Ja18^{-/-}* (De Santo et al. 2008). De plus, l'activation des cellules iNKT par l'injection d'un agoniste des cellules iNKT, l' α -galactosylceramide (α -GalCer), permet un meilleur contrôle de la charge virale et une pathologie amoindrie (Ho et al. 2008) ainsi qu'une meilleure réponse B et une plus grande production d'anticorps (Galli et al. 2007).

3. La réponse immunitaire adaptative

a. La réponse T spécifique

Après la capture des antigènes viraux, les DCs migrent vers les ganglions drainants et présentent ceux-ci aux lymphocytes T spécifiques naïfs. Ce contact est rendue possible grâce aux différentes molécules telles que le TCR de la cellule T et les molécules de co-stimulation menant au « priming » du lymphocyte T (Hugues 2010). Le « priming » initial des lymphocytes T se fait dans les 30h après l'infection. Les instructions données par les DCs ont un impact sur le devenir des

lymphocytes T spécifiques générés. En effet, l'expression de la molécule FasL sur les DCs après infection par le virus influence l'intensité de la réponse T CD8⁺ (Legge et al. 2005). Par ailleurs, d'autres facteurs tels que l'expression des molécules de co-stimulation, l'avidité du TCR ainsi que l'environnement cytokinique contribuent également au développement d'une réponse CD8⁺ optimale (Hendriks et al. 2005, La Gruta et al. 2004).

On observe dès le 5^{ème} jour une augmentation du nombre de lymphocytes T (Sckisel et al. 2014). Les premiers lymphocytes T spécifiques sont eux observés au 6^{ème} jour. Toutefois, les chimiokines importantes dans le recrutement des lymphocytes T spécifiques au moment de l'infection sont encore mal connues.

Les souris dont la réponse par les lymphocytes T CD8⁺ est altérée ont une mortalité plus élevée et un contrôle de la charge virale beaucoup plus faible (Bender et al. 1992). En effet, en plus de produire des cytokines telles que IFN- γ , TNF α et IL-10 (La Gruta et al. 2004, Sun et al. 2009), ces cellules ont une forte capacité cytolytique grâce à la libération de perforine et granzyme ou encore à des interactions Fas-FasL (Altenburg et al. 2015)

b. La réponse B spécifique

La production d'anticorps spécifiques du virus joue un rôle important dans la clairance du virus Influenza et plus particulièrement au cours de la primo-infection (Stanekova et al. 2010).

Les anticorps peuvent neutraliser le virus de plusieurs façons : Les IgG peuvent empêcher le virus d'entrer dans la cellule en bloquant l'interaction entre le virus et son récepteur. Au niveau des voies respiratoires, les IgA prédominent. Ceux sécrétés par les cellules épithéliales peuvent également empêcher l'interaction virus-cellule.

En plus de produire des anticorps, les lymphocytes B sont capables de capturer des antigènes viraux. Par ailleurs, les DCs favorisent la production d'anticorps par les lymphocytes B en leur présentant des antigènes viraux au niveau des ganglions (Gonzalez et al. 2010). Il a également été montré que la production d'anticorps neutralisants nécessitait la présence de la molécule CD40L. Sans elle, les souris sont très sensibles au virus Influenza (Hashem et al. 2014).

Chapitre 2 : *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae ou encore « pneumocoque » est une bactérie à l'origine de pathologies sévères responsables d'une forte morbidité et mortalité. Cette bactérie a été découverte de façon indépendante par Pasteur et Sternberg en 1881. Cette bactérie extracellulaire, encapsulée à Gram positif colonise les voies respiratoires supérieures et provoque de nombreuses pathologies telles que les pneumonies, bronchites, otites ou encore méningites. On considère qu'environ 1.6 million de personnes meurent chaque année de pathologies associées à *S. pneumoniae*, pour la plupart des enfants et des personnes âgées.

I. Épidémiologie

Les enfants les plus à risque de développer une pathologie liée à l'infection par *S. pneumoniae* (pneumonie, méningites) sont ceux n'ayant pas encore deux ans. En effet, le pneumocoque est responsable de 11% de la mortalité des enfants de moins de 5 ans (O'Brien et al. 2009) et est la cause majoritaire du développement de méningites chez l'adulte ce qui constitue un problème de santé majeur. Les personnes ayant un système immunitaire affaibli telles que les individus atteints du sida, de la drépanocytose, développant des bronchopneumopathies chroniques (dont BPCO) ou ayant des déficits immunitaires congénitaux sont plus à même de développer une infection pneumococcique. *Streptococcus pneumoniae* est une bactérie commensale des voies aériennes supérieures (muqueuses naso-pharyngées). Elle peut ainsi se propager dans d'autres sites de l'organisme et engendrer des pathologies telles que les otites, méningites ou pneumonies invasives. De plus, il a été montré un lien étroit entre le virus de la grippe et les pneumonies pneumococciques (Smith et al. 2013 ; Wren et al. 2014). En effet, au cours de la pandémie de 1918-1919, il est estimé qu'une pneumonie bactérienne est apparue chez au moins 20% des personnes grippées avec un taux de mortalité s'élevant à 30% des personnes surinfectées. Des études plus récentes ont montré que *S. pneumoniae* est l'agent bactérien le plus représenté dans ces surinfections.

Plusieurs vaccins ont été développés afin de protéger contre certains sérotypes de *S. pneumoniae*.

1. Pneumovax® 23

Le Pneumovax® 23 est un vaccin polyvalent pneumococcique contenant des polysaccharides de 23 sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8 ; 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F). Ces 23 sérotypes représentent les

sérotypes les plus fréquents ou ceux responsables des pneumocoques invasives. Ce vaccin est recommandé chez les personnes de plus de 50 ans. Cependant, celui-ci n'est pas efficace chez les enfants de moins de deux ans puisque ceux-ci ont une réponse immunitaire faible contre les types capsulaires contenus dans le vaccin.

2. Prevenar®13

Le Prevenar®13 est un vaccin dit conjugué, contenant des polysides pneumococques de 13 sérotypes (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F). Ces polysides sont conjugués à une protéine CRM197™. Ce vaccin peut être administré à des individus de tout âge, dès la naissance. Son efficacité a été confirmée rapidement puisque son utilisation à grande échelle chez les jeunes enfants aux USA a permis une forte baisse des infections invasives et des pneumonies nécessitant une hospitalisation.

II. *Streptococcus pneumoniae* : Structure

1. La capsule polysaccharidique

La virulence de la bactérie est principalement due à sa capsule qui la protège du système immunitaire. Elle est composée de plusieurs couches de polysaccharides. On distingue à ce jour 97 sérotypes différents en fonction de la composition polysaccharidique de la capsule. Environ 20 d'entre eux sont responsables de plus de 70% des cas d'infection par *Streptococcus pneumoniae* dans le monde. La capsule joue un rôle crucial dans le mécanisme de protection du pneumocoque en inhibant la phagocytose de la bactérie par les neutrophiles (Hyams et al. 2010) et en empêchant la clairance médiée par le mucus (Nelson et al. 2007).

a. Acide teichoïque et acide lipoteichoïque

La structure des acides teichoïque et lipoteichoïque est extrêmement complexe chez *Streptococcus pneumoniae*. Ces deux molécules constituent des éléments majeurs de la paroi bactérienne et ont de nombreux rôles au cours de l'infection.

i. L'acide teichoïque

C'est le constituant majeur de la paroi bactérienne des bactéries Gram positives. La fonction principale de l'acide teichoïque est de maintenir une certaine rigidité de la paroi en attirant les cations. Il est constitué de polymères anioniques de glycérol phosphate ou de ribitol phosphate, reliés entre eux par des liaisons ester. L'acide teichoïque est impliqué dans le transport des nutriments, des ions et de certaines protéines. Il est également impliqué dans la colonisation de la

bactérie (Xu et al. 2015) et dans la défense contre les peptides antimicrobiens cationiques (Kovacs et al. 2006).

ii. L'acide lipoteichoïque

L'acide lipoteichoïque (LTA) est un composant pro-inflammatoire important de la paroi des bactéries Gram positives. Ce polysaccharide est composé de sept unités osidiques. Sa structure commence par un glucose et se termine par une base ribitol. Lorsque la bactérie est tuée, le LTA est libéré et induit une inflammation importante au site d'infection. En effet celui-ci active le Toll-Like-Receptor 2 (TLR-2) (Shwandner et al. 1999) et peut également être reconnu par le CD14 (Dessing et al. 2008). Chez les souris déficientes en TLR-2 (TLR-2 Knock-Out), l'inflammation pulmonaire ainsi que le recrutement de neutrophiles sont largement diminués. Par ailleurs, le LTA facilite l'adhérence bactérienne au niveau des cellules de l'hôte.

iii. Protéines bactériennes

Streptococcus pneumoniae possède de nombreuses protéines intracellulaires ou de surface dont le rôle au cours de l'infection est bien connu. Parmi celles-ci, on peut retrouver la « pneumococcal surface protein A » (PspA), la pneumolysine (Ply), la « pneumococcal adherence and virulence factor A » (PavA), la « choline binding protein A » (CbpA/PcpA), la « putative proteinase maturation protein A » (PpmA), l'IgA1 protease (IgA1p), la « pneumococcal surface adhesin A » (PsaA), ainsi que les neuraminidases (Nan A et Nan B).

La pneumolysine (Ply)

Cette protéine de 53kDa est composée de 471 acides aminés et intervient dans l'activité hémolytique de la bactérie. La pneumolysine utilise les motifs de cholestérol des cellules cibles pour se fixer et exercer son activité lytique. L'utilisation de mutants bactériens déficients pour la pneumolysine a permis de mettre en évidence un rôle important de cette enzyme dans la virulence bactérienne (Schachern et al. 2013). La pneumolysine est capable d'endommager les cellules épithéliales respiratoires et de réduire les battements ciliaires de ces cellules (Feldman et al. 1990 ; Rubins et al. 1993). Cette protéine est reconnue par le TLR-4 et cible plusieurs types cellulaires comme les neutrophiles puisque celle-ci est connue pour en induire l'activation (Karmakar et al. 2015 ; Martner et al. 2008). Par ailleurs, la pneumolysine active la voie du complément ; activation se traduisant par une diminution de l'opsonisation au cours des phases tardives de l'infection permettant ainsi l'évasion du système immunitaire et la survie des bactéries (Boulnois et al. 1991). Cette protéine active également la voie NLRP3 afin d'induire une production de cytokines pro-inflammatoires (McNeela et al. 2010).

Les neuraminidases (Nan A et Nan B)

Ces enzymes sont responsables du clivage des liens glycosidiques des acides N-acétylneuraminique (ou acides sialiques) à la surface des cellules du tractus respiratoire. Ce clivage permet la libération de potentiels récepteurs pour la bactérie et ainsi la progression de la pathologie. En effet la Nan A joue un rôle important dans l'adhésion et la colonisation de la bactérie au sein des voies respiratoires (Brittan et al. 2012). De plus, il a été montré que Nan A est importante pour le développement de biofilms et que les résidus d'acides sialiques libérés par cette enzyme favorisent la colonisation de la bactérie et accroît sa virulence (Parker et al. 2009 ; Trappetti et al. 2009). Sachant que certains virus, tel que l'Influenza A virus, possèdent une forte activité neuraminidase, cette découverte pourrait expliquer le phénomène de surinfections bactériennes observé chez certains sujets grippés.

Choline-Binding Proteins (CBPs)

Ces protéines sont liées aux phosphocholines présentes dans les acides teichoïques et lipoteichoïques de la paroi bactérienne. Les CBPs étaient considérés comme uniques à *S. pneumoniae*, mais de récentes études montrent que d'autres espèces bactériennes du tractus respiratoire en possédaient (Gosink et al. 2000). Le nombre de ces protéines varie selon les souches bactériennes et celles-ci sont très importantes lors de l'infection. On retrouve majoritairement la CBPA, laquelle est une protéine pouvant être sécrétée et qui permet la production de chimiokines (Murdoch et al. 2002). La Lyt A est connue pour échapper au complément et empêcher, avec l'aide de la pneumolysine, son activation (Ramos Sevillano et al. 2015). Cependant la Lyt A a été montrée comme n'étant pas responsable de la libération de la pneumolysine (Balachandran et al. 2001).

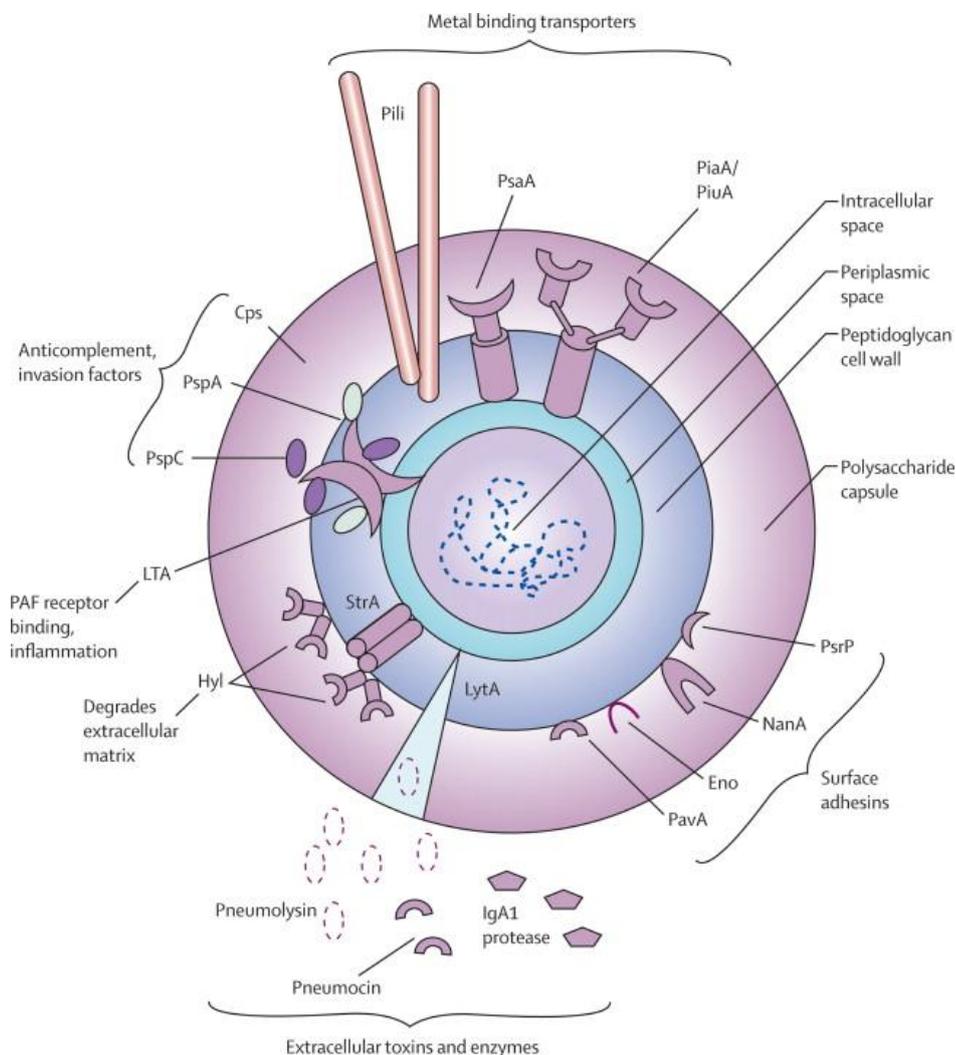


Figure 2 : Facteurs de virulence exprimés par *S. pneumoniae*
(Ven der Poll et al. 2009)

III. La réponse immunitaire dirigée contre *S. pneumoniae*

1. Reconnaissance par le système immunitaire innée

Le système immunitaire inné de l'hôte constitue la première ligne de défense contre les pathogènes. Grâce à de nombreux mécanismes (phagocytose, production de cytokines et de peptides) les cellules de l'immunité innée assurent une première ligne de défense et participent à la mise en place de l'immunité adaptative. La première étape est d'assurer la reconnaissance des pathogènes. Au cours des infections respiratoires, l'épithélium pulmonaire joue en général un rôle essentiel puisqu'il assure le rôle de barrière mécanique et de système de

détection/reconnaissance des pathogènes. Cette reconnaissance est assurée par de nombreux récepteurs appelés Pattern Recognition Receptors (PRR).

a. Rôle des TLRs

Dans la grande famille que constituent les TLRs, les TLR 2, 4 et 9 sont ceux pouvant reconnaître des motifs bactériens aidant à la réponse immunitaire dirigée contre le pneumocoque. La molécule adaptatrice Myeloid Differentiation factor 88 (MyD88) est cruciale dans la signalisation de la majorité des TLRs et est très importante dans la défense contre l'infection pneumococcique. En effet, il a été montré que les souris *MyD88*^{-/-} ont un plus fort taux de mortalité dans un modèle de sepsis que les souris sauvages, mortalité accompagnée d'un défaut de production de cytokines (Khan et al. 2005).

Le TLR2 est capable de reconnaître les peptidoglycans bactériens et en particulier le LTA du pneumocoque (Shwandner et al. 1999). Les souris *TLR2*^{-/-} sont plus susceptibles à l'infection bactérienne dans un modèle de méningite (Echchannaoui et al 2002), mais ne présentent pas de différence de phénotype avec les souris sauvages dans un modèle de sepsis (Khan et al. 2005). Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par l'utilisation de différents sérotypes de *S. pneumoniae* et de modèles différents d'infection. En effet, les sérotypes peuvent avoir des modifications dans la structure du LTA et donc activer de façon différente le TLR2 (Draing et al. 2006). Par ailleurs, il est possible que l'absence d'un TLR soit compensée par la présence d'un autre.

Le TLR4, connu pour reconnaître les lipopolysaccharides (LPS), est impliqué dans la reconnaissance du pneumocoque bien que celui-ci soit dépourvu de LPS. En effet, le TLR4 reconnaît plusieurs autres motifs, dont la pneumolysine (Srivastava et al 2005 ; Malley et al. 2003). L'ensemble des travaux ne permet pas de conclure définitivement sur le rôle du TLR4 dans l'infection pneumococcique. En effet, les souris *TLR4*^{-/-} ont une colonisation plus forte au niveau des voies supérieures respiratoires (Malley et al. 2003). Cependant, selon une autre étude, ces mêmes souris n'ont pas de phénotype différent de celui des souris sauvages (van Rossum et al. 2005). Une étude plus récente montre que l'injection de LPS avant infection permet de protéger les souris sauvages, mais pas les souris déficientes pour le TLR4 (Musie et al. 2014).

Le TLR9 reconnaît chez *S. pneumoniae* les séquences cytosine-phosphate-guanosine hypométhylées (CpG) de son ADN. Les souris *TLR9*^{-/-} ont un taux de mortalité beaucoup plus élevé que les souris sauvages ou même que les souris *TLR2*^{-/-} ou *TLR4*^{-/-}, et ont une charge bactérienne bien plus élevée dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) et dans les lavages naso-pharyngés (LNP) que les souris sauvages (Albiger et al. 2007).

b. Rôles des NLRs

Les NLRs constituent un groupe de récepteurs situés dans le cytosol et reconnaissant des composés bactériens ayant été phagocytés. Les mieux caractérisés à l'heure actuelle sont NOD1, reconnaissant l'acide D-glutamyl-méso-diaminopimélique (IE-DAP), et NOD2, reconnaissant le muramyl dipeptide (MDP). L'activation de ces deux récepteurs induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la sécrétion de cytokines inflammatoires (Chen et al. 2009). Il a été montré que lors d'une méningite, l'absence de NOD2 conduisait à une clairance bactérienne et une production cytokinique plus faible (Liu et al. 2010). La pneumolysine de *S. pneumoniae* est également capable d'être reconnue par le récepteur NLRP3, impliqué dans l'activation de la caspase-1 et ainsi dans la production d'IL-1 β (McNeela et al. 2010). Les souris *NLRP3*^{-/-} ont une survie et une production d'IL-1 β plus faible que les souris sauvages (Witzenrath et al. 2011).

c. Rôle des récepteurs d'épuration

Les récepteurs d'épuration (scavenger receptors) sont des glycoprotéines de surface exprimés plus particulièrement sur les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules dendritiques (Murphy et al. 2005). Les récepteurs d'épuration capables de reconnaître le pneumocoque sont Scavenger Receptor-A (SR-A) et Macrophage Receptor with Collagenous structure (MARCO) et sont impliqués dans les mécanismes de phagocytose des pathogènes (Areschoug and Gordon 2009). Ces deux récepteurs sont extrêmement importants pour la clairance bactérienne puisque les souris déficientes pour l'une ou l'autre de ces molécules ont plus de bactéries au sein des voies respiratoires et produisent de plus faibles quantités de cytokines (Arredouani et al. 2004 ; Dorrington et al. 2013 ; Arredouani et al. 2006).

d. Rôle des Récepteurs C-type lectin

Le récepteur C-type lectin SIGN-related 1 (SIGN-R1) est exprimé principalement à la surface des macrophages et permet la phagocytose des bactéries en reconnaissant les motifs polysaccharidiques de la capsule bactérienne (Kang et al. 2004). Les souris SIGN-R1^{-/-} succombent plus rapidement et ont un taux plus fort de bactéries dans les poumons suite à une infection létale, en comparaison avec les souris sauvages (Lanoue et al. 2004). De plus, le taux de phagocytose est plus faible chez les souris déficientes.

Une étude récente a décrit le récepteur Mincle (Macropaghe INducible-C-type LECTin) comme pouvant se fixer à *S. pneumoniae* de façon calcium dépendante. Si son rôle dans la réponse dirigée contre le pneumocoque est encore inconnu, cette étude indique que l'absence de Mincle n'influence pas l'immunité anti-pneumocoque (Rabes et al. 2015).

e. Rôle des protéines du surfactant

Le surfactant pulmonaire est composé de différents types de molécules telles que des protéines, des lipides ou encore des phospholipides dont le rôle principal est de réduire les tensions superficielles à la surface des alvéoles pulmonaires. Les surfactant protein-A (SP-A) et SP-D le constituant sont produits par les cellules épithéliales et participent aux mécanismes de défense contre les pathogènes (Whitsett et al. 2005). En effet, les souris déficientes pour SP-D sont plus susceptibles à l'infection (Jounblat et al. 2005). De plus, l'augmentation de l'expression de SP-A au niveau des macrophages permettrait une meilleure phagocytose des bactéries (Kuronuma et al. 2004).

f. Le rôle du complément

Le système du complément se compose d'environ 30 protéines sériques et membranaires, lesquelles participent à la défense de l'hôte contre le pathogène, aidant les anticorps et les cellules phagocytaires dans cette défense. Ces protéines peuvent attirer par chimiotactisme les cellules phagocytaires, augmenter l'opsonisation et la lyse cellulaire. Il existe trois voies du complément : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (Pandya et al. 2014). La molécule C3 (Component 3) est importante pour les deux premières voies. Une étude a montré l'importance de cette molécule dans un modèle de méningite. En effet, les souris déficientes pour C3 présentent plus de bactéries dans le cerveau et le sang et une survie plus faible que des souris sauvages (Rupprecht et a. 2007). Une autre étude montre que la déficience en protéines du complément, autres que C3, induit une susceptibilité accrue au pneumocoque (Brown et al. 2002).

2. *Streptococcus pneumoniae* et les cellules de l'immunité innée

L'immunité innée joue un rôle essentiel dans la défense dirigée contre le pneumocoque. Les cellules épithéliales constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes respiratoires. L'épithélium respiratoire répond aux agressions extérieures en produisant différents types de molécules telles que des chimiokines, des cytokines ou encore des peptides antimicrobiens. Ceci permet la mise en place de la réponse immune innée cellulaire aboutissant à une élimination rapide et efficace des pathogènes. Parmi les cellules permettant cette élimination on retrouve les macrophages, les neutrophiles et certaines sous-populations de lymphocytes.

a. Les macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires représentent la première ligne de défense phagocytaire au niveau des muqueuses respiratoires. Ces cellules sont capables d'internaliser et de dégrader un certain nombre de bactéries dans les poumons et sont ainsi importantes pour la clairance bactérienne (Dockrell et al. 2003). En effet, la déplétion ou la déficience en ces cellules impliquent une diminution de la survie des souris, un plus grand nombre de bactéries dans les poumons et une

neutrophilie accrue au sein des voies respiratoires (Dockrell et al. 2003 ; Knapp et al. 2003). Dockrell *et al.* ont montré également l'importance de l'apoptose des macrophages dans l'élimination des bactéries et l'atténuation de l'inflammation. En effet, l'infection par *S. pneumoniae* entraîne une forte inflammation pulmonaire (production de cytokines inflammatoires) et le recrutement de neutrophiles. Les macrophages alvéolaires ont la capacité de phagocyter les neutrophiles en apoptose limitant ainsi l'inflammation (Knapp et al. 2003). Une autre étude montre que les macrophages alvéolaires ont la capacité de transporter rapidement les bactéries vers les ganglions lymphatiques drainants, et cela de façon CCR7 indépendante et donc différemment des cellules dendritiques (Kirby et al. 2009). Plus récemment, une étude a montré que l'IL-1 β produit lors de l'infection par le pneumocoque est indispensable au recrutement des macrophages au sein du poumon. En effet, les souris IL1R1^{-/-} ont une altération de l'expression des chimiokines recrutant les macrophages et ont donc un nombre de macrophages beaucoup plus faible que les souris sauvages lors de l'infection (Lemon et al. 2015).

b. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont connus pour jouer un rôle important dans les infections bactériennes. L'infection par *S. pneumoniae* induit une augmentation de l'expression du Protease-Activated Receptor 1 (PAR-1) sur les cellules épithéliales, ce qui suscite un fort recrutement de neutrophiles au sein du poumon (José et al. 2015). Une autre étude a montré un rôle crucial du récepteur CXCR2 pour le recrutement des neutrophiles et des macrophages alvéolaires. En effet, les souris CXCR2^{-/-} présentent une mortalité plus élevée accompagnée d'une charge bactérienne pulmonaire forte en plus d'une absence de recrutement des neutrophiles après infection par le pneumocoque (Herbold et al. 2010). La glycoprotéine Galectine-3 est connue pour être importante pour la phagocytose des neutrophiles. Lorsque cette molécule produite par les macrophages est absente, les souris ont plus de bactéries dans les poumons et une survie plus faible après infection (Farnworth et al. 2008).

Les neutrophiles permettent la clairance bactérienne en partie grâce à leur capacité de produire des « pièges extracellulaires » appelés NETs (Neutrophils Extracellular Traps), de façon IFN- γ dépendante (Yamada et al. 2011). *S. pneumoniae* peut se fixer aux neutrophiles via l' α -enolase, une enzyme glycolytique présente à sa surface. Grâce à cette interaction, la bactérie peut induire la formation de NETs (Mori et al. 2012).

Enfin, une étude plus récente montre un rôle double des neutrophiles. En effet, si on déplete les neutrophiles avant l'infection les souris ont une mortalité plus élevée. Néanmoins, si on déplete ces cellules 12 heures après l'infection les souris ont une survie améliorée. Ceci suggère que les neutrophiles ont un rôle bénéfique au début de l'infection, mais auraient un rôle délétère, probablement inflammatoire, après 12 heures (Bou-Ghanem et al. 2015).

c. Lymphocytes $T\gamma\delta$

Les lymphocytes $T\gamma\delta$ constituent une population hétérogène de cellules. Il en existe en effet plusieurs sous-types définis selon leur réarrangement du TCR et leur localisation dans le corps. La fréquence de ces cellules augmente au cours de l'infection bactérienne et principalement les sous-populations $\gamma 1$ et $V\gamma 4$. Ces cellules sont actives et capables de produire des cytokines inflammatoires (Kirby et al. 2007). L'absence des lymphocytes $T\gamma\delta$ se traduit par une forte inflammation pulmonaire associée à la formation de granulomes et une augmentation du nombre de DC et de macrophages (Kirby et al. 2007). En effet les lymphocytes $T\gamma\delta$ ont la capacité de tuer par un mécanisme de cytotoxicité les DC et les macrophages, empêchant ainsi la mise en place d'une inflammation pulmonaire. Par ailleurs, les souris déficientes pour la sous-population $V\gamma 4$ sont beaucoup plus sensibles à l'infection par *S. pneumoniae* (Nakasone et al. 2007). En effet, ces souris déficientes ont une mortalité et une charge bactérienne beaucoup plus élevée que les souris sauvages. Des travaux récents dans le laboratoire ont confirmé le rôle clé des lymphocytes $T\gamma\delta$, notamment ceux produisant l'IL-17A, dans les mécanismes de défense inné contre le pneumocoque (C. Paget. Communication personnelle)

d. NK cells

Deux études différentes montrent un effet néfaste des cellules Natural Killer dans l'infection par le pneumocoque. En effet, une première étude montre que les souris SCID déplétées en cellules NK ont une charge bactérienne plus faible dans le sang et une diminution de la production de cytokines inflammatoires (Kerr et al. 2005). Une étude plus récente a confirmé ces résultats chez des souris C5Bl/6. Cette étude montre également une survie complète des souris déplétées en cellules NK alors que les souris sauvages ont une survie d'environ 40% (Christaki et al. 2015).

e. iNKT cells

Le rôle des cellules iNKT a été étudié de deux façons dans le modèle d'infection par le pneumocoque. L'équipe de Kawakami a montré un rôle bénéfique de ces cellules grâce à l'utilisation de souris knock-out. En effet, ces souris déficientes en cellules iNKT ont une survie faible, une charge bactérienne élevée et un défaut de recrutement de neutrophiles, comparées aux souris sauvages (Kawakami et al. 2003). Ces travaux montrent également une augmentation du nombre de cellules iNKT au site d'infection, phénomène dépendant de la chimiokine MCP-1. Par ailleurs l' α -galactosylceramide, puissant activateur de ces cellules, a un rôle protecteur dans l'infection par *S. pneumoniae* (Ivanov et al. 2012 ; Nakamatsu et al. 2007 ; Kawakami et al. 2003). Il semblerait que l'IFN- γ produit par les cellules iNKT soit important dans leur rôle protecteur puisque l'injection de cette cytokine chez des souris déficientes permet de diminuer la charge bactérienne. De plus, si l'injection d' α -GalCer permet le contrôle de la charge bactérienne, l'injection d'un anticorps neutralisant l'IFN- γ au même moment inhibe cet effet (Nakamatsu et al. 2007). Une

étude a également confirmé l'effet des cellules iNKT sur la survie et le contrôle de la charge bactérienne grâce à un modèle de déplétion avec un anticorps neutralisant le CD1d (Christaki et al. 2015). Enfin, une étude menée au laboratoire a mis en évidence que les DC CD103⁺ sont indispensables à l'activation des cellules iNKT par l' α -GalCer et que l'IFN- γ et l'IL-17 produit par les cellules iNKT ont un rôle déterminant dans l'induction de la réponse anti-bactérienne (Ivanov et al. 2012)

3. Le rôle de l'immunité adaptative

a. Rôle des lymphocytes T

Les lymphocytes T sont connus pour avoir un rôle bénéfique dans un grand nombre de pathologies infectieuses. Ces cellules sont capables de produire, après activation, de nombreuses cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-17, IL-22, TNF- α et l'IL-2. Ces cellules vont alors permettre l'activation des macrophages alvéolaires et des neutrophiles.

Les cellules T CD4⁺ jouent un rôle essentiel dans la mise en place de la réponse adaptative et la production d'anticorps dirigés contre le pneumocoque. En effet, les cellules T CD4⁺ sont rapidement recrutées dans le poumon après l'infection (LeMessurier et al. 2010). L'équipe de Kadioglu a montré que les souris déficientes pour le CMH de classe 2 (*MHCII*^{-/-}) ont une charge bactérienne plus importante dans les poumons et le sang (Kadioglu et al. 2004). Néanmoins, l'étude de LeMessurier montre une meilleure survie des souris *MHCII*^{-/-} ou des souris traitées avec un anticorps neutralisant le CD4 avec une charge bactérienne dans le poumon équivalente chez les différentes souches de souris. Cette amélioration de la survie s'accompagne d'une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires (LeMessurier et al. 2010). Cette différence de résultats peut s'expliquer par l'utilisation de différentes souches de souris *MHCII*^{-/-} et une taille d'inoculum légèrement différente.

Par ailleurs, grâce à des souris CD8^{-/-}, Weber et al. ont montré un rôle bénéfique des cellules T CD8⁺ lors d'une infection par *S. pneumoniae* de sérotype 3. En effet, les souris CD8^{-/-} ont une charge bactérienne plus forte, une pathologie pulmonaire plus importante et une survie plus faible que les souris sauvages (Weber et al. 2011). Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'anticorps déplaçant les cellules CD8⁺.

b. Rôle des lymphocytes B

Le développement d'infections invasives provoquées par *S. pneumoniae* sont souvent précédés d'une colonisation naso-pharyngée. Cette colonisation induit la production d'anticorps, lesquels participent à la clairance du naso-pharynx. Ces anticorps spécifiques reconnaissent les polysaccharides ou les protéines bactériennes (McCool et al. 2004). Lors des infections invasives, il a été montré que les lymphocytes B IL-7 dépendant jouaient un rôle majeur dans la production

d'IgM et dans la réponse anti-pneumococcique (Shriner et al. 2010). Par ailleurs, les souris SIGNR-1^{-/-} ont un taux d'IgM beaucoup plus faible que les souris sauvages. En effet, SIGNR-1 est capable de reconnaître la bactérie et d'interagir avec les lymphocytes B de la zone marginale (Koopel et al. 2008).

Chapitre 3 : Les surinfections bactériennes de la Grippe

Les pneumonies d'origine infectieuse affectent environ 400 millions de personnes et sont la cause de plus de 4 millions de décès chaque année (WHO). Les personnes les plus à risques sont les jeunes enfants (âgés de moins de 5 ans) et les personnes âgées (ayant plus de 75 ans). Dans de nombreux cas, les surinfections bactériennes survenant suite à une primo-infection virale (grippe) sont responsables de la pathologie. Les interactions entre virus et bactéries au cours de pneumonies sont complexes et peu connues. Il a été montré en 2008 que les forts taux de mortalité des pandémies grippales de 1918, 1957 et 1968 étaient essentiellement dus à des surinfections bactériennes (Morens et al. 2008). En effet, grâce à l'analyse de prélèvements post-mortem, cette étude a révélé une surinfection bactérienne chez 60% des personnes décédées. Parmi les bactéries associées aux surinfections bactériennes de la grippe, on retrouve *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae*. Cette dernière représente le pathogène le plus fréquemment retrouvé. Néanmoins, lors de la pandémie de 2009, seulement 4 à 20% des sujets ont développé une surinfection bactérienne. Bien que les surinfections bactériennes aient été décrites pour plusieurs virus respiratoires, la morbidité et la mortalité associées aux surinfections du virus de la grippe sont beaucoup plus importantes.

I. Mécanismes des surinfections bactériennes post-grippales par *S. pneumoniae*

Des études épidémiologiques ont montré que les individus infectés par le virus de la grippe sont plus susceptibles de développer des surinfections bactériennes entre 4 et 14 jours après l'apparition des symptômes de l'infection virale. Les mécanismes précis menant aux surinfections bactériennes de la grippe sont encore peu connus, mais de nombreux travaux montrent un rôle majeur du virus, lequel induit des altérations mécaniques et un dysfonctionnement du système immunitaire.

1. Facteurs viraux facilitant la surinfection

Le virus de la grippe possède des facteurs pouvant faciliter la surinfection et en particulier la fixation des bactéries aux cellules épithéliales. En effet, plusieurs études montrent que l'infection favorise l'adhérence de *Streptococcus pneumoniae* aux cellules épithéliales *in vitro*. Cette adhérence est cependant réduite lorsqu'on a injecté à des souris de l'oseltamivir, un inhibiteur des

fonctions de la neuraminidase (McCullers et al. 2003, McCullers et al. 2004 ; Peltola et al. 2005). Ces travaux ont été confirmés avec un virus déficient pour la neuraminidase. De plus, lorsque l'activité de la neuraminidase est bloquée, on observe une dissémination beaucoup plus faible de l'infection bactérienne (McCullers et al. 2004).

La neuraminidase n'est cependant pas la seule protéine virale impliquée dans la surinfection bactérienne de la grippe. En effet, la protéine PB1-F2, protéine induisant l'apoptose, semble également jouer un rôle. Les souris infectées avec un virus déficient pour cette protéine ont des dommages pulmonaires plus faibles et une infection bactérienne contrôlée, ceci induisant alors une survie améliorée (McAuley et al. 2007). Une autre étude a également montré une survie plus importante des souris surinfectées si celles-ci étaient infectées avec une souche virale ayant une protéine PB1-F2 non virulente (Weeks-Gorospe et al. 2012).

2. Facteurs bactériens impliqués dans la surinfection

Les composés bactériens participant à la surinfection bactérienne de la grippe sont encore peu définis. King et al. ont étudié le rôle de la neuraminidase, de l'hyaluronidase et de la protéine PspA de *Streptococcus pneumoniae* dans la surinfection bactérienne de la grippe. De façon intéressante, il semblerait que la neuraminidase et la hyaluronidase ne jouent pas de rôle dans la colonisation du pneumocoque après une primo-infection virale (King et al. 2009). La protéine PspA, quant à elle, semble être importante. Cependant, cette protéine étant connue pour jouer un rôle majeur dans l'infection bactérienne seule, il est difficile de déterminer son rôle exact dans la surinfection.

Streptococcus pneumoniae a été montré comme pouvant se fixer aux Platelet-Activating Factor Receptor (PAFR) via la phosphatidylcholine de sa paroi cellulaire (Cundell et al. 1995). L'infection par le virus induit l'augmentation de l'expression de PAFR et les souris déficientes pour ce récepteur ont une meilleure survie et moins de bactéries dans le poumon et le sang comparées aux souris sauvages (Van der sluijs et al. 2006). Cependant, une étude plus récente indique que la déficience ou la neutralisation de PAFR n'induit pas de différence d'adhérence ou de mortalité lors de la surinfection bactérienne de la grippe (McCullers et al. 2008). En somme, peu de travaux montrent un véritable rôle des facteurs bactériens dans la pathogénicité de la surinfection bactérienne.

3. Altérations induites par le virus de la grippe

L'infection par le virus Influenza A induit des dommages au niveau de l'épithélium pulmonaire ainsi qu'un dysfonctionnement du système immunitaire tel qu'un défaut de recrutement ou d'activation cellulaire et une altération de la production de cytokines au niveau du poumon.

a. Altération mécanique de l'épithélium pulmonaire

L'épithélium est la première ligne de défense contre les infections bactériennes grâce à la production de mucus et la présence de cils permettant l'élimination des bactéries. Cependant, l'épithélium pulmonaire est également la première cible du virus de l'influenza A. Il a en effet été montré que l'altération de l'épithélium par Influenza A favorise la surinfection bactérienne. Le virus induit une desquamation des cellules épithéliales et une disparition des cils (Nagent et al 1983 ; Plotkowski et al. 1986). Six jours après l'infection virale, les cellules épithéliales ciliées et non ciliées ont disparu et ont laissé place aux cellules basales, ceci entraînant une adhérence augmentée des bactéries à la trachée (Plotkowski et al. 1986). Une étude plus récente montre une vélocité mucociliaire de la trachée affaiblie après infection virale entraînant un défaut d'élimination des bactéries (Pittet et al. 2010). Cependant, ces travaux ne montrent pas d'adhérence augmentée des bactéries aux cellules de trachées *in vitro*. Enfin, Armstrong et al. décrivent une perméabilité accrue suite à l'infection virale et une apoptose prononcée des cellules endothéliales (Armstrong et al. 2012). Cependant ces études ne tiennent pas compte du rôle des cellules recrutées lors de l'infection virale.

b. Dysfonctionnement du système immunitaire

Le virus de la grippe induit une diminution de la production de cytokines et chimiokines en favorisant une désensibilisation des TLR reconnaissant les composants bactériens (Didierlaurent et al. 2008). En effet, la désensibilisation des TLR a pour conséquence la diminution de production de KC, MIP-1 α , MIP-2 α et de TNF- α et GM-CSF, chimiokines et cytokines importantes dans le recrutement des neutrophiles. Les neutrophiles semblent en effet être absents ou inactifs dans les poumons, au pic de susceptibilité à l'infection (McNamee and Harmsen 2006). L'injection d'un anticorps déplétant les neutrophiles à un temps précoce après l'infection virale induit une augmentation de la charge bactérienne dans les poumons. Cependant, une déplétion plus tardive (6 jours post-infection grippale) n'induit aucune modification. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que les neutrophiles ont un rôle bénéfique dans une surinfection survenant précocement dans l'infection virale, mais que ceux-ci ne sont plus là ou n'ont plus d'effet lors d'une surinfection tardive. D'ailleurs, des travaux de 1999 démontrent une apoptose des neutrophiles dans les premiers jours de l'infection virale (Colamussi et al. 1999). Des travaux plus récents, démontrent un défaut de recrutement des neutrophiles, principalement dû à la production d'IFN de type I induite par l'infection virale. Les souris déficientes pour le récepteur à l'IFN de type I (IFNAR^{-/-}

), lors d'une surinfection, ont une charge bactérienne plus faible et un recrutement de neutrophiles augmenté au sein des poumons (Li et al. 2012). Ces souris présentent également une augmentation de production de KC, de Mip2 et de l'activité Myéloperoxydase (MPO) (Shahangian et al. 2001). De plus, si on injecte aux souris IFNAR^{-/-} un anticorps neutralisant le CXCR2 (récepteur de KC et de MIP2, impliqué dans le recrutement des neutrophiles), on retrouve une charge bactérienne équivalente à la charge retrouvée chez des souris sauvages non traitées. Ces travaux montrent donc un rôle délétère de l'IFN de type I dans la surinfection bactérienne.

Si les neutrophiles sont très importants dans la clairance bactérienne lors d'une surinfection bactérienne de la grippe, les macrophages restent des cellules ayant un rôle majeur dans le contrôle de l'infection par *S. pneumoniae*. Il a d'ailleurs été montré que l'infection par le virus Influenza A induit la mort des macrophages alvéolaires et la disparition presque totale de ces cellules (Gohneim et al. 2013). L'injection de GM-CSF chez les souris grippées au moment de la surinfection permet d'augmenter le nombre de macrophages alvéolaires dans le poumon et de contrôler la charge bactérienne. Une seconde étude menée par Sun en 2008 démontre que les macrophages alvéolaires ne jouent plus leur rôle de phagocytes. Dans ce mécanisme, la production d'IFN- γ au cours de l'infection virale diminue l'expression de MARCO (MACrophage Receptor with COLlagenous structure), un récepteur clé dans la reconnaissance et l'internalisation des bactéries par les macrophages (Sun et al. 2008). Les souris IFN- γ ^{-/-} ont ainsi une survie plus élevée et une charge bactérienne plus faible que les souris sauvages. Des résultats équivalents ont été obtenus avec un anticorps neutralisant l'IFN- γ (Sun et al. 2008 et données personnelles).

Si les cellules immunitaires ont un rôle important, les cytokines produites suite à l'infection virale peuvent également accroître la susceptibilité à la surinfection. En effet, l'infection virale induit une forte production d'IL-10 dans les poumons, cytokine anti-inflammatoire qui pourrait être délétère dans la surinfection bactérienne post-grippale. En effet, l'injection d'un anticorps neutralisant l'IL-10 induit une diminution de la charge bactérienne et une meilleure survie des souris lors d'une surinfection bactérienne de la grippe (Van der Sluijs et al. 2004). Néanmoins les souris IL-10^{-/-} sont plus résistantes au virus. En effet, ces souris ont plus de lymphocytes B au lieu d'infection que les souris sauvages, et présentent dès lors un fort taux d'anticorps. L'absence d'IL-10 au sein des lymphocytes B induit donc une réponse adaptative plus rapide et ainsi un meilleur contrôle de l'infection virale (Sun et al. 2010). Ces souris IL-10^{-/-} présentent également une production de cytokines de type Th17 plus importante que les souris sauvages. Par ailleurs, il semblerait que les cellules T CD4⁺ soient les cellules productrices majoritaires de l'IL-10 lors de l'infection virale (McKinstry et al. 2009). Ainsi l'IL-10 produit lors de l'infection par Influenza A inhibe la réponse Th17, réponse connue pour être importante dans la défense antibactérienne. La réponse Th17 ne serait cependant pas affaiblie uniquement par l'IL-10. En effet, Kudva et al ont montré que la diminution de la production d'IL-17 et d'IL-22 serait, en partie, due à l'augmentation de production d'IFN de type I suite à l'infection virale (Kudva et al. 2011). Une étude montre également que

l'infection par le virus Influenza A inhibe la production d'IL-1 β lors de la surinfection bactérienne, cytokine importante dans la défense anti-bactérienne (Robinson et al. 2013). Par ailleurs, des travaux récents démontrent que l'infection virale induit la production d'IL-27. Les souris IL-27^{-/-} ont une production plus faible d'IL-10 et plus forte d'IL-17 et d'IFN- γ , le tout résultant en une diminution de la charge bactérienne pulmonaire. L'IL-27 serait donc le point de départ du dysfonctionnement immunitaire induit par le virus Influenza A (Robinson et al. 2015). Enfin, l'IL-22 a aussi un rôle important dans la surinfection bactérienne de la grippe. En effet, cette cytokine est produite très rapidement après l'infection virale et les souris IL-22^{-/-} sont plus susceptibles à la surinfection bactérienne. Ces souris ont une pathologie très prononcée et une survie à l'infection virale plus faible que les souris sauvages (Ivanov et al. 2013). Les souris déficientes pour l'IL-22 ont une fonction pulmonaire altérée, une réparation des dommages épithéliaux réduite et un dépôt de collagène plus important (Pociask et al. 2013). Cette cytokine est donc importante pour garder l'intégrité de la barrière épithéliale lors de l'infection virale

L'infection virale met donc en place un environnement immunologique dysfonctionnel au sein du poumon, ceci empêchant une bonne réponse à la surinfection bactérienne. En effet, la combinaison d'un défaut de réponse cellulaire et d'une production cytokinique importante induit une susceptibilité accrue à l'infection par *S. pneumoniae*.

II. Moyens thérapeutiques

Les surinfections bactériennes de la grippe ayant un taux de mortalité très élevé et étant difficile à prévenir, un grand nombre d'équipes se sont intéressés à la prévention de la maladie par l'utilisation de différents traitements.

1. Traitements par agonistes TLR

Les TLRs sont importants dans la reconnaissance du pneumocoque et l'induction de la réponse immunitaire contre celui-ci. L'utilisation d'agonistes, et ainsi l'activation de ces TLRs, pourrait protéger de la surinfection bactérienne. En 2013, une étude montre que l'utilisation de Pam2Cys, agoniste de TLR2, permet de diminuer la charge virale lors de l'infection par Influenza A et d'augmenter la survie des souris. De plus, l'administration de cet agoniste permet de limiter la perte de poids engendrée par l'infection virale, phénotype prédisposant à la surinfection bactérienne (Tan et al. 2012 ; Mifsud et al. 2014). L'injection d'un autre agoniste du TLR2, MALP-2, permet d'augmenter le recrutement de leucocytes et la production d'IL-1 β et de TNF- α lors de l'infection par le virus Influenza A. De plus, l'injection de MALP-2 24h avant l'infection par *S. pneumoniae* permet d'augmenter la survie des souris surinfectées, de réduire la perte de poids et de contrôler la charge bactérienne (Reppe et al. 2015). De plus, l'injection de cet agoniste TLR2 n'induit pas d'inflammation pulmonaire. Néanmoins, les souris TLR2^{-/-} ne sont pas plus sensibles que les souris

sauvages lors d'une surinfection bactérienne de la grippe (Dessing et al. 2007). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les souris sauvages sont déjà très sensibles à la surinfection et qu'une sensibilité plus importante est difficile à mettre en évidence. Le TLR2 pourrait ainsi être une cible potentielle pour diminuer la susceptibilité des souris aux surinfections bactériennes.

L'activation du TLR5, récepteur de la flagelline bactérienne, est connue pour protéger contre une infection létale de *S. pneumoniae* (Munoz et al. 2010). L'injection de la flagelline après l'infection virale permet d'induire une forte production de cytokines et de chimiokines et ainsi d'induire une forte immunité, laquelle protège contre la surinfection bactérienne post-grippale (Porte et al. 2015).

2. Traitements par cytokines

L'infection virale induisant un dysfonctionnement immunitaire, plusieurs équipes ont étudié l'effet de la supplémentation en cytokines afin de mieux contrôler la surinfection. L'absence des macrophages dans les poumons de souris grippées au moment de la surinfection est l'un des facteurs importants induisant la susceptibilité à celle-ci. Ainsi, l'injection de GM-CSF pendant l'infection virale permet de protéger contre une surinfection bactérienne de la grippe par *Streptococcus pneumoniae*. Celle-ci permet en effet d'augmenter l'influx de macrophages dans les poumons. L'injection de GM-CSF, et donc l'influx de macrophages, permet de réduire le nombre de bactéries lors de la surinfection (Gohneim et al. 2013). Par ailleurs, les souris surexprimant le GM-CSF ont moins de bactéries dans les poumons lors d'une surinfection par *Staphylococcus aureus*, comparées aux souris sauvages et un taux d'albumine dans les lavages broncho-alvéolaires beaucoup plus faible. De plus, l'influx de macrophages et de neutrophiles est important sans pour autant augmenter l'inflammation pulmonaire. Cette protection serait liée au fait que les macrophages alvéolaires produisent du ROS, car la neutralisation de la production de ROS inhibe le rôle protecteur de la surproduction du GM-CSF (Subramaniam et al. 2014).

L'absence de production de cytokines Th17 lors de la surinfection est une des causes du taux de mortalité importante. Les cellules $\gamma\delta$ sont connues pour être les productrices majoritaires d'IL-17. Li et al. ont réussi à protéger les souris de la surinfection bactérienne de la grippe en injectant des cellules $\gamma\delta$ productrice d'IL-17 de souris IFNAR^{-/-} chez des souris sauvages surinfectées (Li et al. 2012). En effet les IFN de type I bloquent la production et la signalisation de l'IL-17. Ainsi lorsque la production d'IL-17 par ces cellules n'est pas bloquée, l'effet protecteur de cette cytokine est important.

Deux études ont également mis en évidence que l'injection d'IL-1 β ou d'IL-23 induisait une diminution de la charge bactérienne, une meilleure survie des souris et une augmentation de la production de cytokines de type Th17 dans le cas d'une surinfection par *S. aureus* (Robinson et al. 2013 ; Kudva et al. 2011).

3. Traitements par antibiotiques

La mortalité survenant suite aux surinfections bactériennes de la grippe est essentiellement due à une charge bactérienne excessive dans les poumons et en périphérie. L'utilisation d'antibiotiques pourrait donc s'avérer bénéfique dans la surinfection bactérienne post-grippale. En effet, plusieurs antibiotiques semblent avoir un effet bénéfique lors de la surinfection : Azithromycine, Ampicilline et Clindamycin. Cependant, si l'ampicilline contrôle la croissance bactérienne, cet antibiotique induit une forte pathologie pulmonaire (Karlström et al. 2009). Quelques années plus tard, la même équipe met en évidence une plus grande efficacité de l'Azithromycine. Cet antibiotique bactériostatique n'induit aucune pathologie pulmonaire. Cependant, ces travaux montrent un rôle anti-inflammatoire de l'antibiotique, indépendant de son rôle antibactérien grâce à une souche de *S. pneumoniae* résistante à l'Azithromycine (Karlström et al. 2011). Cette étude démontre ainsi que le contrôle de la charge bactérienne n'est pas suffisant pour améliorer l'issue de la surinfection. Damjanovic et al. émettent l'hypothèse que pour améliorer la survie et réduire la pathologie des surinfections, il faut contrôler la charge bactérienne ainsi que la pathologie pulmonaire. Les souris traitées avec l'Azithromycine seule perdent moins de poids et ont une charge bactérienne diminuée. Cependant, la combinaison de l'antibiotique avec la dexaméthasone, un anti-inflammatoire, permet un meilleur contrôle de la charge bactérienne et de la perte de poids, une réponse inflammatoire amoindrie, ainsi qu'une pathologie pulmonaire beaucoup plus faible (Damjanovic et al. 2013). L'ampicilline permet également de contrôler la charge bactérienne lors d'une surinfection peu sévère. Cependant, lorsque l'infection se révèle sévère (une forte croissance bactérienne au sein des poumons), cet antibiotique seul ne semble pas avoir d'effet. Le traitement à la dexaméthasone au moment du traitement antibiotique et de l'infection pneumococcique permet d'améliorer la survie et de réduire le taux d'albumine et le nombre de neutrophiles au sein du poumon. Un traitement plus précoce (trois jours après l'infection virale) ne permet pas d'obtenir les mêmes résultats (Gohneim et al. 2014). Nous avons vu plus haut que l'injection de flagelline lors de l'infection virale permet d'induire une immunité limitant la surinfection. Il s'avère que l'injection simultanée de flagelline et d'amoxicilline permet de réduire de façon considérable la charge bactérienne dans les poumons et de limiter la propagation des bactéries (Porte et al. 2015).

Le traitement par antibiotiques est ainsi une approche prometteuse qui permettrait à terme de contrôler la pathologie. Cependant, le choix de l'antibiotique est primordial car le contrôle de la charge bactérienne ne semble pas être suffisant pour améliorer la pathologie et la survie. Celui-ci doit également avoir un rôle anti-inflammatoire permettant le contrôle des dommages pulmonaires engendrés par la surinfection.

Chapitre 4 : Les lymphocytes T Natural Killer (NKT)

I. Caractérisation

1. Découverte

Le terme de cellules NKT apparaît pour la première fois en 1995. A l'époque, il désigne des cellules ayant à la fois les caractéristiques des cellules T et des cellules NK, et plus particulièrement l'expression de la molécule NK1.1. Tout a commencé en 1987 lorsque deux laboratoires constatent l'existence, chez la souris, de cellules $T\alpha\beta$ exprimant de façon modérée le TCR, de façon plus forte la chaîne $V\beta 8$, le tout accompagné d'une absence des molécules CD4 et CD8 (Budd et al. 1987 ; Fowlkes et al. 1987). En parallèle, deux autres laboratoires découvrent une sous-population de cellules $T\alpha\beta$ exprimant la molécule NK1.1, laquelle était considérée jusque-là comme spécifique des cellules NK (Ballas et al. 1990 ; Sykes et al. 1990). Cette sous-population présente de fortes similarités avec la population décrite en 1987 puisqu'elle présente un $TCR\alpha\beta$ très conservé exprimant préférentiellement la chaîne $V\beta 8$ et n'exprime pas les molécules CD4 et CD8 (Double Négative, DN). Quelques années plus tard, il est mis en évidence que ces cellules sont de fortes productrices d'IFN- γ , d'IL-4 et de TNF- α , ce qui intensifia par la suite l'intérêt des recherches (Zlotnik et al. 1992 ; Arase et al. 1993). En 1994, dans une étude chez l'homme, une population de lymphocytes T DN exprimant un réarrangement invariant du TCR de type $V\alpha 24$ -JaQ (actuellement nommé $V\alpha 24$ -Ja18) est mise en évidence. Ces cellules représentent l'équivalent humain de ce que l'on appelle à l'époque les lymphocytes T invariant murins (Dellabona et al. 1994). Néanmoins, l'hétérogénéité et l'importance du nombre de paramètres qui entrent en jeu dans la caractérisation des cellules NKT fait que depuis 1995, ce terme est encore parfois employé à mauvais escient.

2. Classification

Pendant longtemps, l'expression de la molécule NK1.1 sur des cellules $T\alpha\beta$ était suffisante pour définir ces cellules comme étant des cellules NKT. Toutefois, la définition des cellules NKT est plus compliquée et une description se limitant à l'expression de cette molécule semble inappropriée. En effet, toutes les souches de souris n'expriment pas le marqueur NK1.1 ou possèdent un polymorphisme pour cette molécule, ce qui la rend indétectable à un anticorps reconnaissant le NK1.1 (Souris Balb/C, SJL, CBA, NOD ou encore 129SV). De plus, il est connu que certains lymphocytes T conventionnels peuvent exprimer le NK1.1 suite à une activation (Assarsson et al. 2000). Néanmoins, ces dernières années de nombreuses études portant sur le

développement et les propriétés fonctionnelles et phénotypiques des cellules NKT ont permis d'établir une nomenclature admise par les chercheurs. Cette nomenclature prend en compte le répertoire TCR $\alpha\beta$ conservé, l'expression du marqueur NK1.1, la restriction à la molécule CD1d et la reconnaissance des glycosphingolipides (GSL) tel que l' α -Galactosylcéramide (α -GalCer).

Cette nomenclature permet de classer les cellules NKT en trois groupes distincts : les cellules NKT de type I (ou NKT invariants, iNKT), les cellules de type II (ou NKT variants, vNKT) et les cellules de type III (ou NKT-like) (voir Figure 3).

a. Cellules NKT de type I (iNKT)

Cette population de cellules NKT a la particularité d'exprimer un TCR semi-invariant formé d'une chaîne α invariante monomorphe, utilisant uniquement un réarrangement V α 14-J α 18. Cette chaîne α est associée le plus souvent à une chaîne V β 8.2 ou aux segments V β 7 ou V β 2 (Lantz et al. 1994). Les cellules iNKT ne sont pas restreintes au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II, contrairement aux lymphocytes T conventionnels, mais à la molécule CD1d, apparentée au CMH de classe I. La molécule CD1d a un rôle majeur dans l'activation des cellules iNKT, mais a également un rôle dans l'ontogénie de ces cellules (Gapin et al. 2001). L' α -GalCer, composé isolé à partir de l'éponge marine *Agelas mauritianus*, est capable de s'insérer dans la poche du CD1d et ainsi d'activer de façon forte et spécifique les cellules iNKT. Cette sous-population est actuellement la plus documentée et la plus étudiée car il existe différents outils permettant son étude spécifique. En effet, en 2000, l'équipe de M. Kronenberg a produit un tétramère CD1d/ α -GalCer composé de quatre molécules de CD1d chargées avec le ligand α -GalCer (Matsuda et al. 2000). Ce tétramère permet d'identifier spécifiquement les cellules iNKT par méthode de cytométrie en flux. L'étude des cellules iNKT est également facilitée par l'existence de souris déficientes pour le segment J α 18 du TCR (souris J α 18^{-/-}). Ces souris sont totalement dépourvues de cellules iNKT et permettent d'étudier l'impact qu'ont ces cellules dans différentes pathologies (Cui et al. 1997).

En ce qui concerne le phénotype, il a été décrit deux sous-populations : les cellules CD4⁺CD8⁻ et les cellules CD4⁻CD8⁻ (ou DN). Chez l'homme, une sous-population CD8⁺ existe mais n'est pas retrouvée chez la souris (Ishihara et al. 1999). Les cellules CD4⁺ et DN ne présentent pas les mêmes aptitudes à produire les cytokines. Par ailleurs, la molécule NK1.1, qui a servi à identifier ces cellules au départ, n'est finalement pas indispensable pour la caractérisation des cellules iNKT puisqu'une de leurs sous-populations est NK1.1⁻. Les cellules de cette population sont de plus CD4⁺ pour la majorité d'entre elles (Matsuda et al. 2000). Si les cellules NK1.1⁻ ont été pendant longtemps considérées comme immatures, il s'avère qu'une partie d'entre elles sont matures et produisent de l'IL-17 (Michel et al. 2007). Les cellules iNKT expriment à leur surface d'autres marqueurs de cellules NK tels que Ly49, NKG2A et NKG2D. Enfin, ces cellules présentent également un

phénotype ressemblant à celui des cellules mémoires puisqu'elles expriment le CD62L, le CD69, le CD44 et le CD122 (Bendelac et al. 2007).

b. Cellules NKT de type II (vNKT)

Contrairement aux cellules iNKT, relativement peu de choses sont connues sur les vNKT. Ces cellules sont CD1d restreintes mais ne possèdent pas de réarrangement V α 14-J α 18 (Cardell et al. 1995 ; Park et al. 2001). Activées via le CD1d, ces cellules reconnaissent une plus grande variété de ligands lipidiques mais pas l' α -GalCer. Le tétramère CD1d/ α -GalCer ne peut donc pas être utilisé pour les identifier. Leur répertoire TCR est plus diversifié et est composé des chaînes V α 3.2-J α 9/V β 8 ou V α 8/V β 8 (Bendelac et al. 2007). De plus, il est connu que la majorité des cellules vNKT expriment le NK1.1. Néanmoins, peu de travaux ont été réalisés sur ce type cellulaire, leur étude spécifique étant difficile. Toutefois, il est connu que les cellules iNKT et les cellules vNKT peuvent avoir un rôle antagoniste durant les pathologies infectieuses ou cancéreuses (Duthie et al. 2005 ; Mallevaey et al. 2007 ; Terabe et al. 2014).

c. Cellules NKT de type III (NKT-like)

Cette population est la plus hétérogène. Ces cellules expriment le NK1.1 et sont activées de façon CD1d-indépendante. Elles ont un répertoire TCR plus diversifié que les NKT de type I et de type II et leur activation est restreinte au CMH (Iwabuchi et al. 1998 ; Legendre et al. 1999). Les NKT-like sont majoritairement CD8+, certaines d'entre elles peuvent être CD4+ ou DN. Elles expriment également le CD3 et le CD56 (Jiang et al. 2014). Néanmoins, ces cellules produisent peu de cytokines *in vitro* (Hammond et al. 2001). Le rôle des cellules NKT-like est encore peu connu mais leur rôle dans les pathologies infectieuses commence à être étudié (Jiang et al. 2014).

	NKT Type I	NKT Type II	NKT Type III
TCR- α	V α 14J α 18 (s) V α 24J α 18 (h)	Divers V α 3.2-J α 9, V α 8	Divers
TCR- β	V β 8.2, 7.2(s) V β 11 (h)	Divers, V β 8 (s)	Divers
CD4 et CD8	CD4+ ou DN (s) CD4+, CD8+, DN (h)	CD4+ ou DN	CD4+, CD8+, DN
α -GalCer reactive?	Oui	Non	Non

Figure 3: Caractéristiques des différentes populations de cellules NKT

3. Localisation et homéostasie

Les cellules NKT sont retrouvées de façon ubiquitaire dans l'organisme. Ces cellules sont surtout retrouvées dans le foie où elles représentent entre 10 et 30% de lymphocytes résidents. Ces cellules sont également présentes dans la rate, le poumon, les ganglions, le thymus et le sang à une fréquence variable mais faible (en général moins de 1% de la population de lymphocytes). Chez l'Homme, les cellules NKT sont présentes mais dans une proportion beaucoup plus faible que chez la souris (environ 10 fois moins) (Exley et al. 2002).

La répartition tissulaire des différents types de cellules NKT est très hétérogène. En effet, les cellules iNKT sont surtout présentes dans le foie où elles représentent 80 à 90% des cellules NKT totales (Hammond et al. 2001). Les vNKT, quant à elles, sont principalement retrouvées dans la rate (environ 50% des cellules NKT) (Malleveay et al. 2007). Enfin, les cellules NKT-like sont le plus souvent retrouvées dans la rate ou la moelle osseuse (Eberl et al. 1999). Cette hétérogénéité de répartition est due à leur différence d'expression des récepteurs aux chimiokines et des récepteurs de « homing » (Eberl et al. 1999 ; Kim et al. 2002).

De nombreuses études se sont intéressées à l'homéostasie de cellules NKT. Il a notamment été montré que l'IL-15 joue un rôle essentiel dans le maintien de la survie de ces cellules. En effet, les souris déficientes pour l'IL-15 ou son récepteur sont dépourvues en cellules iNKT (Matsuda et al. 2002 ; Lodolce et al. 1998). De plus, le rôle de l'IL-15 serait médié par l'expression de Bcl-x(L) (Gordy et al. 2011). Plusieurs études ont révélé un rôle important des molécules de signal ou des facteurs de transcriptions dans le maintien ou la génération des cellules iNKT (Slauenwhite et al. 2015). Les chimiokines ont également un rôle dans le maintien de la survie des cellules NKT. En effet, les souris déficientes pour CXCR6 ou CXCL16 (son ligand) n'ont pas de cellules NKT dans le foie et le poumon (Geissman et al. 2005). Enfin, la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WAsp) est importante pour la migration des cellules NKT du thymus dans les différents organes. En effet, les souris WAsp^{-/-} ont le même nombre de cellules dans le thymus mais ont nettement moins de cellules dans les autres organes. De plus, ces cellules sont incapables de produire des cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-4 après stimulation avec l' α -GalCer (Astrakhan et al. 2009).

4. Sélection et maturation

a. Sélection positive et négative

Tout comme les lymphocytes T conventionnels, les cellules iNKT subissent une sélection positive et une sélection négative. Les cellules iNKT sont issues de thymocytes CD4⁺ CD8⁺ ayant un réarrangement particulier de leur TCR. La formation du TCR est un élément clé dans le développement et la sélection des cellules iNKT. En effet, les souris déficientes pour les protéines de recombinaison RAG1 et RAG2 ou les souris *Ja18* déficientes sont dépourvues de cellules iNKT. La molécule CD1d est également importante puisque les souris CD1d^{-/-} sont elles aussi dépourvues

de cellules iNKT. Cette molécule doit être exprimée sur les thymocytes corticaux afin de réaliser la sélection positive (Bendelac et al. 1995). L'interaction TCR-CD1d se fait via la reconnaissance de ligands endogènes tels que l'iGb3 (Zhou et al. 2004). Cependant, les souris déficientes pour l'enzyme iGb3 synthase, enzyme importante dans la biosynthèse de cette molécule, ont un développement normal des cellules iNKT (Porubsky et al. 2007). D'autres ligands (phospholipides, gangliosides ou galactocéramides) ont été suggérés comme étant d'éventuels candidats, mais encore peu d'études ont été réalisées sur ce sujet (Bendelac et al. 2007)

Les cellules iNKT ayant une auto-réactivité importante, les modalités de sélection négative sont encore peu documentées. Toutefois, deux études rapportent un rôle de l' α -GalCer dans le développement de ces cellules. En effet, le traitement par l' α -GalCer de façon précoce induit une inhibition du développement des cellules iNKT. La surexpression du CD1d induit cette même inhibition (Chun et al. 2003). En revanche, un traitement plus tardif avec l' α -GalCer n'induit aucun effet sur le développement (Pellicci et al. 2003). Nous pouvons donc en déduire que la sélection dite négative se fait de façon précoce dans le développement des cellules iNKT. Cependant, l' α -GalCer n'est pas un ligand physiologique, il est donc difficile d'affirmer que ces études décrivent un mécanisme similaire à ceux induits par la reconnaissance de ligands endogènes naturels.

b. Maturation

Les cellules iNKT se développent dans le thymus où ils se différencient et passent par plusieurs stades de développement. Ce processus est long et est régulé par de nombreux facteurs clés. Suite à la sélection positive, les cellules iNKT expriment le CD8, le CD4 et le facteur de transcription ROR- γ t. La grande majorité des cellules immatures perdent l'expression du CD8 et de ROR- γ t et suivent un processus de maturation se divisant en 4 étapes. Ces 4 étapes se distinguent par l'expression des marqueurs CD24, CD44 et NK1.1. La population la plus précoce, appelée « stade 0 » est caractérisée par les marqueurs CD4⁺CD24⁺CD44^{lo}NK1.1^{lo} (Benlagha et al. 2005). Par la suite les cellules entrent dans une phase de forte prolifération, appelée « stade 1 ». A ce stade, les cellules n'expriment plus le marqueur CD24 et sont alors CD4⁺CD24^{lo}CD44^{lo}NK1.1^{lo}. C'est à ce stade que les cellules s'expandent. Au « stade 2 », les cellules prolifèrent moins et sont CD4⁺/DN CD24^{lo}CD44^{hi}NK1.1^{lo}. Enfin les cellules de « stade 3 » expriment davantage la molécule NK1.1 (CD4⁺/DN CD24^{lo}CD44^{hi}NK1.1^{hi}) (Benlagha et al. 2002 ; Benlagha et al. 2005). Si les marqueurs exprimés à la surface des cellules iNKT permettent de distinguer les stades, la production de cytokines permet également de les différencier. En effet, les cellules iNKT des stades 1 et 2 sécrètent des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-13) tandis que les cellules du stade 3 produisent des cytokines de type Th1 et plus particulièrement l'IFN- γ (Benlagha et al. 2002 ; Pellicci et al. 2002). Néanmoins, la population de précurseurs ayant conservé l'expression du facteur de transcription ROR- γ t après la sélection positive aura, quant à elle, perdu l'expression des marqueurs CD4 et CD8 et deviendra CD44^{hi}NK1.1⁻. Cette population minoritaire excelle dans la

production de cytokines de type Th17 et plus spécifiquement d'IL-17 (Doisne et al. 2011 ; Michel et al. 2007).

La maturation des cellules iNKT se fait par différents mécanismes régulés par de nombreux facteurs : facteurs de transcription, cytokines et molécules exprimées à la surface cellulaire. Dans la première catégorie on retrouve Egr2 (Early Growth Factor 2), lequel est induit par l'augmentation du taux de calcium intracellulaire, lui-même provoqué par l'activation du TCR. Les souris déficientes pour Egr2 présentent une chute importante du nombre de cellules iNKT après l'étape de sélection positive (Lazarevic et al. 2009). Egr2 induit l'expression du facteur de transcription PLZF, lequel joue un rôle essentiel dans la différenciation tardive des cellules iNKT (Seiler et al. 2012). Pour les stades précoces du développement, les facteurs de transcriptions tels que HEB (E protein transcription factor) et c-Myc (myelocytomatoseis oncogene) sont importants. En effet, les thymocytes de souris déficientes pour HEB ou c-Myc sont bloqués au stade 0 de la différenciation (Mycko et al. 2009 ; D'Cruz et al. 2010). Pour les stades plus tardifs, le facteur de transcription NF κ B est essentiel. En effet, les souris déficientes pour ce facteur ont des cellules iNKT bloquées au stade 2 (Stanic et al. 2004).

Les interactions cellule-cellule ont également un rôle important dans la maturation des cellules iNKT. En effet, l'absence de molécules de co-stimulation CD80 et CD86 induit un défaut de maturation des cellules iNKT du thymus, mais pas celle des cellules iNKT périphériques (Chung et al. 2008). Enfin, les cytokines telles que le TGF β sont fortement impliquées dans la maturation des cellules iNKT. En effet, TGF β est essentiel dans l'expansion des cellules iNKT durant le stade 1 (Doisne et al. 2009).

II. Activation des cellules iNKT

Les cellules iNKT matures peuvent être activées de 3 façons différentes : TCR-dépendante, TCR-indépendante (cytokine-dépendante) ou de façon TCR- et cytokines-dépendante (voir Figure 5).

1. Activation TCR-dépendante

L'activation TCR-dépendante se fait grâce à la reconnaissance d'un ligand présenté par la molécule CD1d au TCR de la cellule. Ainsi, afin qu'il y ait activation, l'expression de la molécule CD1d à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et la présence de ligands endogènes ou exogènes sont indispensables.

a. La molécule de CD1d

La molécule CD1d est une glycoprotéine transmembranaire apparentée au CMH de classe I. Cette molécule est ubiquitaire et est donc exprimée par la majorité des cellules hématopoïétiques

des tissus lymphoïdes : lymphocytes T et B, cellules dendritiques, monocytes et macrophages. Contrairement au CMH de classe I, cette molécule présente des antigènes glycolipidiques grâce à ses deux poches hydrophobes (voir figure 4) impliquées dans la fixation d'antigènes de nature lipidique (Moody et al. 2005).

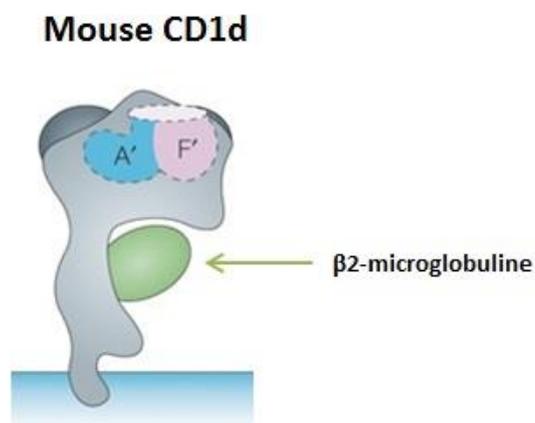


Figure 4: Représentation en 2 dimensions de la molécule CD1d murine

b. Les ligands des cellules iNKT

Peu de choses sont connues sur l'origine et la nature des ligands présentés par la molécule de CD1d. Néanmoins, plusieurs ligands restreints par la molécule CD1d ont été décrits comme étant activateurs des cellules iNKT.

i. Ligands exogènes

L' α -Galactosylcéramide (α -GalCer)

L' α -GalCer a été le premier ligand découvert des cellules iNKT. Celui-ci fut découvert en 1995 lors d'une recherche menée par Kirin Pharmaceuticals sur l'éponge marine *Agelas mauritanus*, afin d'identifier des composés anti-tumoraux (Morita et al. 1995). Depuis, ce glycolipide a été légèrement modifié afin de créer un composé synthétique appelé KRN7000 (Kobayashi et al. 1995). Ce ligand se fixe à la molécule de CD1d et active de façon importante le TCR des cellules iNKT. L'interaction entre CD1d/ α -GalCer et le TCR est puissante avec un Kd d'environ 100nM. L' α -GalCer est un glycosphingolipide composé d'une partie hydrophobe, le céramide (une sphingosine et un acide cérotique) et d'un galactose lié en α . La sphingosine se fixe dans la poche F' du CD1d, tandis que l'acide cérotique se fixe dans la poche A', laissant ainsi le galactose libre de se fixer au TCR (voir figure). La conformation anomérique α du galactose semble être très importante puisque le β -galactosylcéramide n'active pas, ou peu, les cellules iNKT (Kawano et al. 1997).

Il existe d'autres analogues structuraux de l' α -GalCer comme l'OCH (Miyamoto et al. 2001), le PBS-25 (Zajonc et al. 2005) ou le Nu- α -GalCer (Aspeslagh et al. 2011) (voir Figure 5). Ces composés ont des chaînes d'acides gras et/ou une base sphingosine plus courte et activent les cellules iNKT de façon moins efficace. De plus, l'OCH (sphingoside tronqué) induit une réponse pro-Th2 tandis que le Nu- α -GalCer (substitué de type naphtyluré sur le galactose) induit une réponse pro-Th1.

La capacité de l' α -GalCer à induire une production importante de cytokines par les cellules iNKT en fait un candidat idéal en immunothérapie. En effet, l'activation des cellules iNKT par l' α -GalCer se traduit par la production de cytokines de profil Th1 (IFN- γ), Th2, (IL-4) ou encore Th17 (IL-17). Néanmoins, l'activation des cellules iNKT par l' α -GalCer induit une anergie durable de ces cellules (Parekh et al. 2005). Ainsi les principaux domaines de recherche sur les cellules iNKT et l'utilisation d'analogues de l' α -GalCer doivent se concentrer sur la diminution du phénomène d'anergie et la production spécifique d'un type de cytokine selon la réponse recherchée.

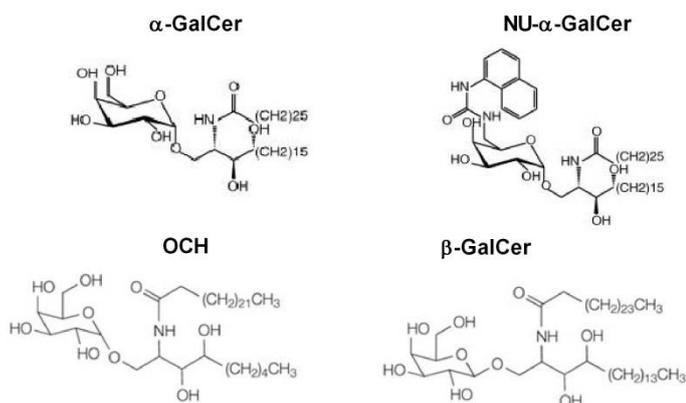


Figure 5: Structure de l' α -GalCer et de ses analogues.

Autres ligands exogènes

D'autres ligands exogènes ont été identifiés, principalement des composés d'origine bactérienne. En effet, les α -galactosyldiacylglycérols isolés de la bactérie Gram⁻ *Borrelia burgdorferi*, et plus particulièrement le monogalactosyl diacylglycérol BgGL-II, induit une prolifération des cellules iNKT, ainsi qu'une production de cytokines par ces cellules (Kinjo et al. 2006). De plus, le composé principal de la paroi des bactéries du genre *Sphingomonas* (bactérie Gram⁻), le GSL-1 (GlucosphingoLipid-1, un α -galacturonocéramide) induit la production d'IL-4 et d'IFN- γ par les cellules iNKT *in vitro* et *in vivo* (Sriram et al. 2005 ; Mattner et al. 2005). Plus récemment, l'équipe de Kinjo et al. a mis en évidence l'effet activateur des α -glucosyldiacylglycerol présents à la surface de *Streptococcus pneumoniae* (SPN-Glc-DAG) (Kinjo et al. 2011). Enfin, un lipopeptidophosphoglycane (LPPG) isolé de la membrane d'*Entamoeba histolytica*, un parasite protozoaire, induit la production d'IFN- γ par les cellules iNKT. Cette propriété

pourrait avoir des conséquences sur le développement des abcès hépatiques induits par l'amide (Lotter et al. 2009).

ii. Ligands endogènes

Si les ligands exogènes des cellules NKT sont bien documentés, la liste des ligands endogènes est moins exhaustive. Ces glycolipides sont pour la plupart des glycosphingolipides (GSL) et des phospholipides.

L'isoglobotrihexosylcéramide ou iGb3 est un GSL provenant de la dégradation de l'isoglobotétrahexosylcéramide par l'enzyme β -hexoaminidase. L'iGb3 est le ligand endogène le plus connu. Il est impliqué dans la sélection positive des cellules NKT. En effet, les souris déficientes pour la β -hexoaminidase présentent un déficit important en cellules NKT (environ 95%) (Zhou et al. 2004). Les cellules dendritiques chargées avec de l'iGb3 induisent l'activation de la majorité des cellules NKT (Xia et al. 2006). Néanmoins l'activation induite par l'iGb3 est plus faible que celle induite par l' α -GalCer. En effet, il faut une quantité nettement plus forte d'iGb3 pour obtenir une activation comparable à celle obtenue par l' α -GalCer. Toutefois, les souris déficientes pour l'iGb3 synthase (enzyme impliquée dans la synthèse d'iGb3) ont un nombre et une fréquence normale de cellules NKT (Porubsky et al. 2007). Cette étude a remis en cause le rôle de l'iGb3 dans la sélection positive des cellules iNKT.

Le diganglioside GD3 est fortement exprimé par les cellules cancéreuses (mélanomes, carcinomes). L'injection de cellules cancéreuses exprimant le GD3 induit l'expansion d'une sous-population de cellules NKT (5% de la population totale). De plus, le tétramère CD1d/GD3 permet l'activation des cellules NKT et ainsi la production d'IL-10 et d'IFN- γ par ces cellules (Wu et al. 2003).

2. Activation cytokines-dépendante

De nombreuses études ont montré que certaines cytokines sont capables d'activer les cellules iNKT et cela en absence de stimulation dépendante du TCR. Les premières études montrent que l'ajout exogène d'IL-12 et d'IL-18 est suffisant pour induire l'activation des cellules iNKT (Cui et al. 1997 ; Eberl et al. 1998 ; Leite de Moraes et al. 1999). Plus tard, d'autres travaux montrent que l'engagement des TLR9 et TLR4 présents sur les DC permet une activation CD1d-indépendante, via l'IL-12 et de l'IL-18 produit par ces cellules (Nagarajan et al. 2007 ; Tyznik et al. 2008). Les cellules iNKT produisent de l'IFN- γ lors d'une infection par le cytomégalovirus, probablement via l'engagement du TLR9. L'activation de ces cellules est essentiellement induite par l'IL-12 et les IFN de type I (Wesley et al. 2008). L'activation des cellules iNKT par *Streptococcus pneumoniae* et par *Sphigomonas yanoikuyal* est dépendante de l'IL-12 produit par les DC (Brigl et al. 2011). L'IL-33 induit la prolifération et l'activation des cellules iNKT (Bourgeois et al. 2009) tandis que l'IL-1 β et l'IL-23 induisent la production d'IL-22 par ces cellules (Paget et al. 2012).

3. Activation dépendante du TCR et des cytokines

Si certaines bactéries comme *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis* ne possèdent pas de glycolipides pouvant activer directement les cellules iNKT, l'activation de ces cellules se fait quand même via le CD1d (Brigl et al. 2003 ; Mattner et al. 2005). En effet, ces bactéries induisent un programme de maturation au sein des APC conduisant à la néo-synthèse d'antigènes lipidiques. Les TLR4, 7 et 9 semblent avoir un rôle important dans celle-ci. En effet, le LPS, le R848 et le CpG-ODN induisent l'activation des cellules iNKT via la néo-synthèse d'antigènes lipidiques (Brigl et al. 2003 ; Mattner et al. 2005 ; Paget et al. 2007 ; Brigl et al. 2011). Dans ce processus, les cytokines IL-12, IL-18 et/ou IFN de type I coopèrent et induisent la production d'IFN- γ par les cellules iNKT.

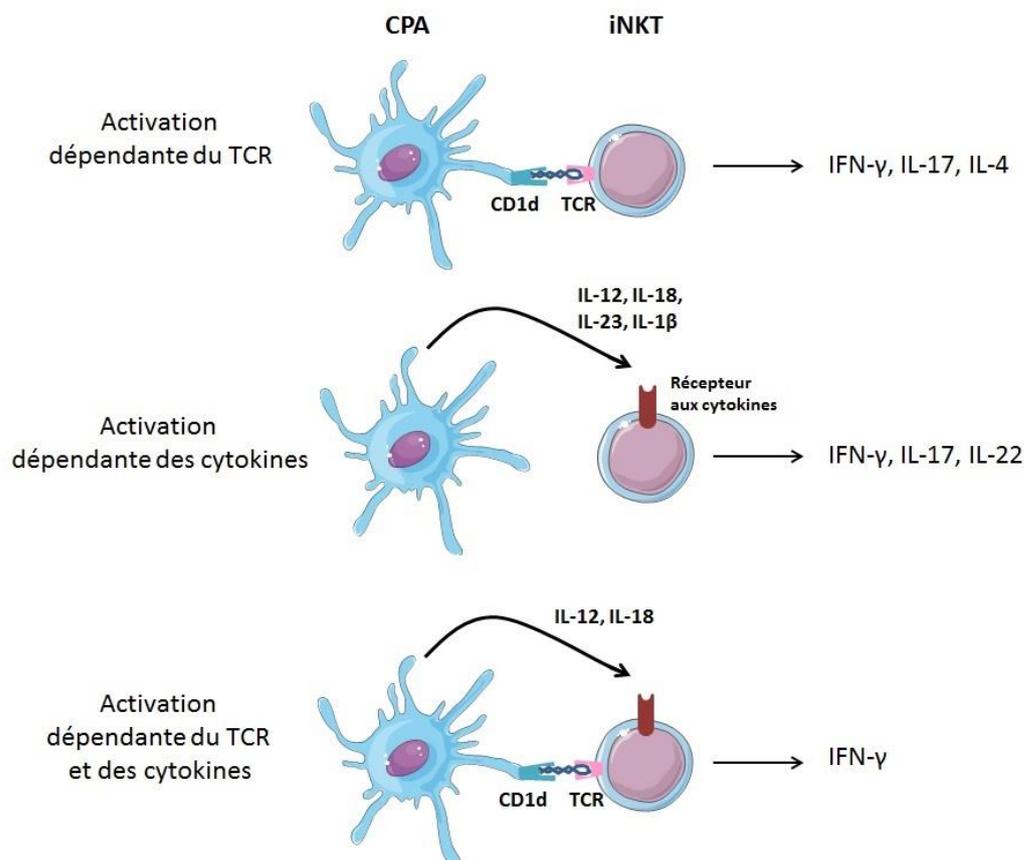


Figure 6: Schéma des différents mécanismes d'activation des cellules iNKT.

4. Cellules activatrices

a. Cellules dendritiques et cellules dérivées de monocytes

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules iNKT sont activées par plusieurs mécanismes. Dans ce processus, les cellules présentatrices d'antigènes jouent un rôle crucial. Parmi celles-ci, les cellules dendritiques (DC) représentent la population archétype des APC professionnelles.

Les DC forment un groupe hétérogène d'APC, composé de plusieurs sous-populations divisées selon leur phénotype (expression de marqueurs) et leur fonction. Les deux grandes sous-populations sont les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Cette dernière population exprime peu le CD1d et est principalement connue pour sa capacité à produire de fortes quantités d'IFN de type I en réponse à une stimulation virale (Schlitzer et al. 2015). Parmi les cDC, deux populations se distinguent : les DC de type 1 exprimant le CD8 (organe lymphoïde) ou le CD103 (organe non-lymphoïde) et les DC de type 2 exprimant le CD4 (organe lymphoïde) ou le CD11b (organe non-lymphoïde) (voir Figure 7). Dans les poumons, nous retrouvons ainsi des DC CD103⁺ ou des DC CD11b⁺. Les cellules CD103⁺/CD8⁺ sont les seules à exprimer le TLR3 et sont donc les premiers senseurs des infections virales. De plus, les cellules CD103⁺ jouent un rôle important dans l'induction de la réponse T CD8⁺ (Ho et al. 2011), les cellules CD11b⁺ sont quant à elles importantes pour l'induction de l'immunité à long terme.

Outre les cDC, il existe une population dérivée de monocytes générés et recrutés dans les tissus suite à un stimulus inflammatoire ou microbien. Ces cellules, appelées Monocyte-derived DC (MoDC), étaient classées au départ comme DC inflammatoires puisqu'elles ont la capacité de présenter des antigènes et expriment des marqueurs communs aux cDC. Cependant, les MoDC ont une forte plasticité et sont MHCII⁺, CD11c⁺ CD11b⁺ CD64⁺ alors que les cDC sont MHCII⁺, CD11c⁺ CD11b⁺ CD64⁻ (Langlet et al. 2012 ; Schlitzer et al. 2015) (voir Figure 7). Encore peu de choses sont connues sur ce type cellulaire.

Les DC sont connues pour activer les cellules iNKT dans différentes pathologies (Brigl et al. 2003 ; Mattner et al. 2005 ; Bialecki et al. 2011). Ainsi, les cellules CD8⁺ induisent une réponse anti-tumorale médiée par les cellules iNKT (Macho-Fernandez et al. 2014). Les cellules CD103⁺ ont quant à elles un rôle clé dans la protection contre *S. pneumoniae* en activant directement les cellules iNKT de façon CD1d-dépendante (Ivanov et al. 2012).

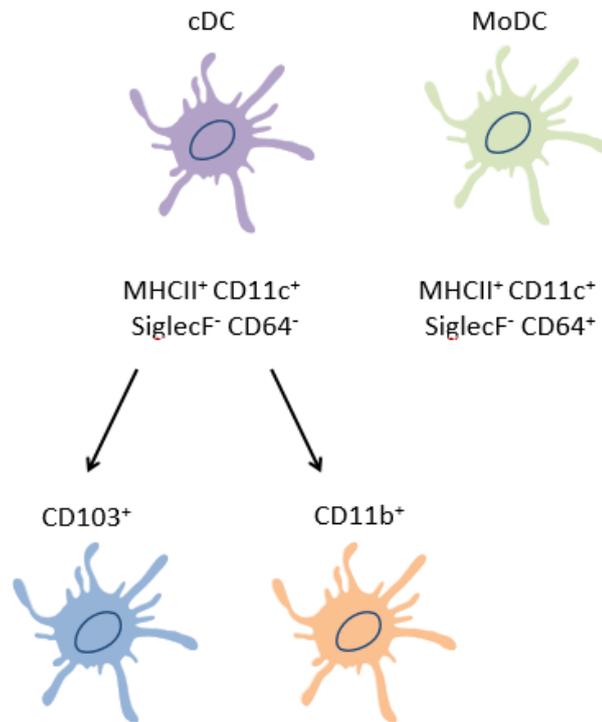


Figure 7: Schéma des différentes populations de cellules dendritiques

b. Autres cellules activatrices

Les cellules dendritiques ne sont pas les seules ayant la capacité d'activer les cellules iNKT. En effet, les macrophages et les lymphocytes B expriment la molécule CD1d et sont connus pour activer les cellules iNKT.

Les macrophages CD169⁺ présents dans les ganglions activent rapidement les cellules iNKT de façon CD1d-dépendante (Barral et al. 2010). En effet, l'inoculation de particules chargées avec de l' α GC a permis de mettre en évidence que les cellules iNKT reconnaissent les antigènes chargés sur les macrophages CD169⁺ des ganglions. Ce contact induit l'activation et la prolifération de cellules iNKT. Une seconde étude décrit une production d'IL-4 et d'IFN- γ par les cellules iNKT, dans le foie et la rate, induite par les macrophages CD169⁺ avec une meilleure activation dans le foie. En effet, c'est dans cet organe que ces cellules sont le plus retrouvées (Kawasaki et al. 2013).

Les lymphocytes B humains circulants sont capables de présenter l' α -GalCer aux cellules iNKT (Galli et al. 2003). Les cellules B aident ainsi à la maintenance des cellules iNKT (Bosma et al. 2012). Une étude menée au laboratoire a également montré que les lymphocytes B de la zone marginale de la rate (cellules MZB) sont capables d'activer les hybridomes iNKT *in vitro*, mais pas les cellules iNKT *ex vivo* (Bialecki et al. 2009).

III. Rôle des cellules iNKT dans les pathologies

Nous avons vu précédemment que les cellules iNKT ont un rôle bénéfique dans les infections par le virus de la grippe ou par *S. pneumoniae*. Les études sur l'implication des cellules iNKT dans les pathologies cancéreuses, infectieuses ou inflammatoires sont très nombreuses. Le rôle de ces cellules diffère en fonction du modèle de pathologies et peuvent ainsi être bénéfiques ou délétères.

1. Cancers

L' α -GalCer a été initialement isolé pour ses propriétés anti-tumorales (Morita et al. 1995). Son pouvoir anti-tumoral est principalement dû à sa capacité d'activer les cellules iNKT. L'activation de ces cellules permet, en effet, de diminuer le développement de cancers chez la souris (Smyth et al. 2002). De plus, les souris *Ja18^{-/-}* sont plus susceptibles au développement de sarcomes et l'injection de cellules iNKT permet de contrôler le développement du cancer (Crowe et al. 2002). Ainsi, les cellules iNKT ont un rôle important dans le contrôle du développement de tumeurs. Les cellules iNKT, lors de leur activation via l' α -GalCer, produisent de l'IFN- γ , lequel permet de transactiver les cellules NK, d'augmenter leur cytotoxicité et d'induire la maturation des DC (Swann et al. 2004). Si chez la souris l' α -GalCer a fait ses preuves comme agent anti-tumoral, les études chez l'Homme sont moins convaincantes. En effet, les premiers essais cliniques ne sont pas encourageants puisqu'aucune réponse anti-tumorale n'est observée chez les patients traités quotidiennement avec le KRN7000 (Motahashi et al. 2008). De nouvelles études utilisant des APC (notamment des DC) chargées avec l' α -GalCer dans le cas de cancer de la peau et du cou ont donné de meilleurs résultats, cependant ceux-ci restent très hétérogènes (Motahashi et al. 2011).

2. Pathologies infectieuses

Les cellules iNKT sont décrites pour avoir un rôle dans de nombreuses pathologies infectieuses. Grâce à l'utilisation de souris déficientes pour la molécule CD1d ou dépourvues en cellules iNKT (*Ja18^{-/-}*), ou dans des modèles d'activation exogène par l' α -GalCer, il a été montré que les cellules iNKT jouent un rôle bénéfique lors d'infections expérimentales par *Pseudomonas aeruginosa* (Nieuwenhuis et al. 2002) et *Borrelia burgdoferi* (Kumar et al. 2000), ainsi que dans des modèles d'infections virales par le virus herpétique HSV-1 (Grubor-Bauk et al. 2008) et le RSV (Johnson et al. 2002). Ces cellules ont également été décrites pour avoir un rôle favorable dans les infections parasitaires induites par *Schistosoma mansoni* (Mallevaey et al. 2007) et *Plasmodium berghei* (Gonzales-Aseguinolaza et al. 2002). Dans ces infections, l'injection d' α -GalCer induit une protection contre l'agent pathogène et les souris déficientes, soit pour la molécule CD1d, soit pour les cellules iNKT, ont une survie plus faible et une pathologie plus prononcée.

Néanmoins, si les cellules iNKT semblent avoir un rôle bénéfique dans de nombreuses pathologies infectieuses, des travaux montrent un rôle délétère de ces cellules dans l'infection par *Chlamydia muridarum* et par le virus de la Dengue. En effet, les souris $Ja18^{-/-}$ sont protégées lors d'une infection par *C. muridarum* et l'injection d' α -GalCer chez les souris sauvages aggrave la pathologie (Bilenki et al. 2005). Une étude réalisée dans notre laboratoire a également mis en évidence un rôle délétère des cellules iNKT dans l'infection par le virus de la dengue. Les souris $Ja18^{-/-}$ ont une inflammation et des lésions tissulaires hépatiques plus faibles que les souris sauvages (Renneson et al. 2011). Une étude récente chez l'homme semble confirmer ces données (Matangkasombut et al. 2014)

3. Pathologies auto-immunes et inflammatoires

a. Pathologies pulmonaires

L'asthme est une maladie respiratoire inflammatoire affectant des millions de gens à travers le monde. Le rôle des cellules iNKT dans cette pathologie a fait l'objet de nombreuses études. En effet, les souris déficientes pour la molécule CD1d ou dépourvues en cellules iNKT ont été décrites comme ne développant pas d'asthme allergique. Cependant, lorsqu'on injecte des cellules iNKT au sein de ces souris, celles-ci développent l'asthme. Il semblerait que les cytokines IL-4 et IL-13 aient un rôle important dans ce mécanisme (Akbari et al. 2003). De plus, l'activation des cellules NKT pulmonaires par l'injection d' α -GalCer ou de lipides bactériens peut induire une susceptibilité à long terme à l'inflammation allergique des voies respiratoires (Scanlon et al. 2011). Néanmoins, plusieurs équipes démontrent que l'activation des cellules iNKT par l'injection d' α -GalCer avant la sensibilisation à l'allergène, paralyse/anergise les cellules iNKT et inhibe ainsi le développement de l'hypersensibilité respiratoire, symptôme important de l'asthme (Hachem et al. 2005 ; Matsuda et al. 2005). Ces données s'accordent pour dire que les cellules iNKT ont un rôle important dans le développement de l'hypersensibilité respiratoire et ainsi dans le développement de l'asthme allergique.

La BPCO est une pathologie pulmonaire touchant plus de 200 millions de personnes. Elle se caractérise par une inflammation chronique des voies respiratoires. La BPCO induite par la fumée de cigarette conduit à une augmentation du nombre de cellules iNKT dans les poumons. Cette augmentation est également retrouvée chez les patients atteints de BPCO. De plus, les souris $Ja18^{-/-}$ développent moins la pathologie (Pichavant et al. 2014).

b. Autres pathologies

Le diabète de type I est la maladie auto-immune au cours de laquelle le rôle des cellules iNKT a été bien étudié. Les souris Non-Obese Diabetic (NOD) développent cette pathologie spontanément et ont un taux plus faible de iNKT (Hammond and Godfrey et al. 2002).

L'augmentation artificielle du nombre de cellules iNKT protège ces souris du développement d'un diabète, protection principalement due à leur production d'IL-4 et d'IL-10 (Baxter et al. 1997).

L'Encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est un modèle expérimental murin de la sclérose en plaque. L'injection d' α -GalCer chez les souris développant l'EAE induit une forte production d'IL-4 par les cellules iNKT et améliore ainsi la pathologie (Furlan et al. 2003).

Si les cellules iNKT ont un rôle bénéfique dans le diabète et l'EAE, ce n'est pas le cas dans toutes les maladies auto-immunes. En effet, dans le modèle murin de lupus érythémateux disséminé (souris NZB/W) les cellules iNKT s'expandent et l'administration d' α -GalCer favorise le développement de la pathologie. De plus, un traitement anti-CD1d semble être bénéfique dans ce modèle (Zeng et al. 2003).

Dans l'athérosclérose, maladie se traduisant par des plaques lipidiques sur les parois des artères, les lésions tissulaires sont importantes. Chez les souris développant cette pathologie (apoE^{-/-}), l'injection d' α -GalCer induit des lésions plus importantes et la production de cytokines pro-inflammatoires (Tupin et al. 2004). Des résultats semblables ont été obtenus avec l'OCH (Nakai et al. 2004). De plus, les souris CD1d^{-/-} apoE^{-/-} ont une pathologie moins prononcée. Ainsi, les cellules iNKT ont un rôle délétère dans l'athérosclérose.

Dans l'ensemble des pathologies, qu'elles soient infectieuses, auto-immunes, inflammatoires ou cancéreuses, les cellules iNKT peuvent avoir un rôle bénéfique ou délétère. Néanmoins, le rôle de ces cellules n'a pas encore été étudié dans le cas d'une surinfection bactérienne de la grippe. Leur rôle étant bénéfique à la fois dans l'infection grippale et dans l'infection par *S. pneumoniae*, ces cellules pourraient jouer un rôle clé dans la surinfection.

Objectifs de l'étude

Objectifs de l'étude

Les surinfections bactériennes de la grippe constituent un problème majeur de santé publique. Les mécanismes conduisant à la susceptibilité aux infections bactériennes lors de la grippe sont complexes et font intervenir à la fois des facteurs viraux et des facteurs de l'hôte. En particulier, l'altération des structures pulmonaires (notamment des épithéliums) et un défaut de la réponse immunitaire innée dirigée contre les bactéries ont été décrits. A ce jour, le rôle potentiel des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne post-grippale n'a pas été rapporté. Comme nous l'avons vu, ces cellules occupent une place charnière dans le système immunitaire, à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les cellules iNKT jouent un rôle important dans la polarisation et la régulation des réponses immunes et inflammatoires lors de pathologies comme le cancer, les maladies auto-immunes et inflammatoires et lors des processus infectieux notamment au niveau des muqueuses. Au sein du laboratoire, le rôle protecteur des cellules iNKT dans l'infection virale par le virus Influenza A (IAV) (Paget et al. 2011) et dans l'infection bactérienne par *Streptococcus pneumoniae* (Ivanov et al. 2012) a été démontré. Ces données suggéraient un rôle potentiellement bénéfique des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne post-grippale. Cependant, la complexité des mécanismes mis en jeu lors des processus de surinfection ne permettait pas de prédire cette hypothèse avec certitude.

Le premier objectif de cette étude a été d'étudier le rôle des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne post-grippale et d'en étudier les mécanismes d'action.

Lors de mon arrivée, le laboratoire venait de décrire, pour la première fois en contexte infectieux, que les cellules iNKT étaient capables de produire de l'IL-22 au cours de l'infection grippale (Paget et al. 2012). Cette cytokine joue un rôle majeur dans les processus de maintien et de réparation des épithéliums, notamment au niveau intestinal. L'une des causes des surinfections bactériennes post-grippales étant l'altération et/ou la perte de l'intégrité de l'épithélium pulmonaire, nous nous sommes proposé d'étudier le rôle potentiel de cette cytokine dans un modèle expérimental de surinfection bactérienne à *S. pneumoniae*. J'ai pleinement contribué à la mise en place de ce modèle de surinfection. Grâce à l'utilisation de souris déficientes en IL-22, nous avons pu démontrer que si cette cytokine ne joue pas un rôle majeur dans la réponse anti-virale de l'hôte, l'IL-22 participait au contrôle de l'inflammation au cours de l'infection grippale et jouait un rôle protecteur dans le modèle de surinfection bactérienne (**Article 1**).

Au cours de cette étude nous avons également confirmé que les cellules iNKT étaient l'une des sources majeures d'IL-22 au cours de l'infection par le virus grippal. Ainsi, en produisant de l'IL-22 au cours des phases précoces de l'infection virale, les cellules iNKT pourraient participer au

maintien des épithéliums pulmonaires et ainsi réduire la susceptibilité à l'infection bactérienne secondaire. Notre laboratoire et d'autres équipes ont mis en évidence le rôle bénéfique des cellules iNKT dans le contrôle du développement du pneumocoque chez la souris (Ivanov, 2014 ; Paget, 2013). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'activité anti-bactérienne des cellules iNKT puisse également contribuer au rôle bénéfique global de ces cellules dans la surinfection bactérienne.

Nous avons montré, dans notre modèle de surinfection bactérienne, que les souris dépourvues en cellules iNKT ont une survie plus faible ainsi qu'une pathologie pulmonaire et une charge bactérienne plus élevées que celles des souris sauvages. Cet effet bénéfique n'est pas lié à l'activité anti-bactérienne des cellules iNKT. En effet, au pic de la susceptibilité à la surinfection, les cellules iNKT sont incapables de s'activer et de produire l'IFN- γ et l'IL-17A ; cytokines dont nous avons montré le rôle majeur dans l'immunité anti-pneumococcique (Ivanov et al. 2012). L'interleukine-10, très fortement produite lors de l'infection virale, est responsable de cet effet inhibiteur. Nous montrons que cette cytokine agit indirectement sur les cellules iNKT, les empêchant ainsi de s'activer en réponse au pneumocoque. Cette cytokine cible les cellules présentatrices d'antigènes présentes dans les poumons et inhibe leur production de cytokines activatrices telles que l'IL-12 (**Article 2**).

Le second objectif de notre travail a visé à exploiter le potentiel immunothérapeutique des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne post-grippale.

L' α -GalCer présente un intérêt en clinique, notamment dans le cancer. Nous avons montré, dans le modèle d'infection par *S. pneumoniae* seul, que l'activation exogène des cellules iNKT pulmonaires par l' α -GalCer protégeait contre l'infection (Ivanov et al. 2012). Nous avons donc testé l'activité protectrice de l' α -GalCer dans notre modèle expérimental de surinfection bactérienne post-grippale. Nous avons dans un premier temps étudié la cinétique de susceptibilité à la surinfection au cours de la grippe. Nous avons montré que l'injection d' α -GalCer au pic de la susceptibilité à la surinfection (jour 7) n'induisait pas l'activation des cellules iNKT, en accord avec l'article 1 bien que les mécanismes soient très différents. Néanmoins, l'injection d' α -GalCer à des temps précoces (jour 4, pic de la charge virale) et durant la phase de résolution induit une nette diminution de la charge bactérienne dans les poumons et empêche la dissémination des bactéries au niveau systémique (**Article 3**). Cet effet bénéfique n'a cependant pas de conséquences favorables sur la survie des souris. Nous avons donc imaginé un protocole permettant d'améliorer la survie des souris surinfectées. Nous avons émis l'hypothèse et démontré que l'inflammation pulmonaire des souris surinfectées était responsable de la mortalité des souris. Pour tester notre hypothèse de travail, la dexaméthasone, molécule anti-inflammatoire, a été inoculée aux souris surinfectées. Bien qu'à ce

jour une optimisation soit souhaitable, nos travaux montrent une amélioration de la morbidité et de la mortalité des souris surinfectées et co-traitées avec l' α -GalCer et à la dexaméthasone.

Notre travail de thèse a fait l'objet d'1 article accepté pour publication en 2012 dans *the Journal of Virology*, d'un deuxième article en cours de révision favorable dans *Mucosal Immunology* et d'un troisième article en cours de soumission dans *Journal of Infectious Diseases*.

Résultats

Article 1: Interleukin-22 reduces lung inflammation during Influenza A virus infection and protects against secondary bacterial infection

Journal of Virology (2013)

L'interleukine-22 est connue pour avoir un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité épithéliale, notamment au niveau intestinal (Dudakov et al. 2015). Dans le poumon, l'IL-1 β produit par de nombreux types cellulaires (cellules épithéliales, neutrophiles, macrophages... etc.) induit la production d'IL-22. Cette cytokine agit en trois modes d'action : (i) induire la production de protéines antibactériennes et de chimiokines, (ii) induire la prolifération des cellules épithéliales, (iii) permettre la réparation des dommages tissulaires. Nous avons décrit au laboratoire une production de cette cytokine dans les poumons après infection par l'IAV (Paget et al. 2012). Parmi les cellules productrices d'IL-22, on retrouve les cellules T $\alpha\beta$, T $\gamma\delta$, les ILC ainsi que par les cellules iNKT NK1.1. L'apparition des surinfections bactériennes de la grippe s'expliquant en partie par une altération de l'intégrité de l'épithélium pulmonaire, nous nous sommes intéressés au rôle de cette cytokine dans la surinfection bactérienne post-grippale.

Dans ces travaux, nous avons tout d'abord étudié le rôle de l'IL-22 lors d'une infection par une dose sub létale de virus Influenza A (H3N2), en étudiant la production de cette cytokine dans les poumons et plus particulièrement les sources cellulaires de celle-ci. Nous avons ainsi montré que l'IL-22 est fortement produite dès les premiers jours de l'infection par le virus, notamment par les cellules T $\alpha\beta$, les cellules T $\gamma\delta$ et les cellules iNKT. Les souris *IL-22*^{-/-}, bien que présentant la même charge virale, ont une pathologie pulmonaire plus prononcée que les souris sauvages. Nous avons par la suite étudié le rôle de l'IL-22 dans notre modèle de surinfection bactérienne de la grippe. Celui-ci consiste en une infection par une dose sub létale de virus Influenza, suivi 7 jours plus tard par une infection par une dose sub létale de *Streptococcus pneumoniae*. En effet, les souris sont beaucoup plus sensibles à la surinfection bactérienne de la grippe 7 jours après l'infection grippale. Nous avons alors pu décrire que les souris déficientes pour l'IL-22 succombent de façon plus importante à la surinfection bactérienne de la grippe. Toutefois, la réponse cytokinique et le recrutement cellulaire dans les poumons sont équivalents chez les souris *IL22*^{-/-} et chez les souris sauvages.

Pris dans son ensemble, nos résultats montrent que l'IL-22 ne joue pas de rôle important dans la réponse anti-virale de l'hôte mais participe au contrôle de l'inflammation pulmonaire induit par l'infection grippale. De ce fait, cette cytokine pourrait jouer un rôle protecteur dans la surinfection bactérienne de la grippe en limitant les dommages pulmonaires. Il est important de mentionner que deux autres études indépendantes ont confirmé le rôle bénéfique de l'IL-22 endogène dans la grippe, bien que son rôle dans la surinfection n'ait pas été étudié dans ces travaux (Pociask et al. 2013 ; Kumar et al. 2013).

Article 2: Influenza A virus-induced release of interleukin-10 inhibits the antimicrobial activities of invariant natural killer T cells during invasive pneumococcal superinfection

Mucosal Immunology (2016, révision mineure)

Les infections par le virus de la grippe sont souvent suivies par des surinfections bactériennes. L'agent bactérien le plus souvent rencontré est *Streptococcus pneumoniae* ; la cause majeure des pneumonies bactériennes chez l'homme. Nous, et d'autres laboratoires, avons montré que les cellules iNKT jouaient un rôle important au cours des infections virales et bactériennes pulmonaires. Cette activité bénéfique est en grande partie liée à la production de grandes quantités de cytokines immuno-régulatrices. De nombreuses études ont rapporté que les cellules iNKT peuvent jouer un rôle dans l'initiation et le maintien de l'inflammation pulmonaire ou au contraire dans la résolution de l'inflammation.

Les cellules iNKT ont un rôle bénéfique lors de l'infection grippale, les souris *Jα18^{-/-}* ayant une survie plus faible et une pathologie pulmonaire plus importante que les souris sauvages (Paget et al. 2011). Le rôle bénéfique des cellules iNKT dans les infections par le pneumocoque a également été mis en évidence (Kawakami et al. 2003). Néanmoins, peu de choses sont connues sur leur rôle dans la surinfection bactérienne de la grippe. Dans cet article, nous avons étudié le rôle des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne post-grippale. L'article 1 présente un rôle bénéfique de l'IL-22 dans la surinfection bactérienne de la grippe, cytokine produite par les cellules iNKT durant l'infection virale par IAV (Paget et al. 2012). Ainsi, les cellules iNKT pourraient avoir un rôle dans le maintien de l'épithélium pulmonaire et ainsi jouer un rôle protecteur dans la surinfection bactérienne. Par ailleurs, de par leur activité anti-bactérienne, les cellules iNKT pourrait aussi participer au contrôle de la surinfection bactérienne de la grippe.

Bien que le rôle des cellules iNKT ait été décrit lors de l'infection expérimentale par le sérotype 3 de *S. pneumoniae*, nous avons décidé de revisiter leur rôle, et leur mode d'activation, lors d'une infection par une souche de sérotype 1 (utilisée dans notre modèle de surinfection). Nous avons pu mettre en évidence que lors d'une infection par *S. pneumoniae* seule, les cellules iNKT sont activées de façon CD1d-indépendante, via l'IL-12 produite par les cellules présentatrices d'antigènes et plus particulièrement par les cellules dendritiques du poumon. En effet, lors de l'infection par *S. pneumoniae*, les cellules dendritiques semblent être indispensables à l'activation des cellules iNKT. Lors de l'infection pneumococque seule, les cellules iNKT jouent un rôle dans les mécanismes de défense. L'injection de cellules iNKT triées, chez des souris *Jα18^{-/-}* permet de contrôler l'infection bactérienne mettant en évidence un rôle anti-bactérien des cellules iNKT dans notre modèle d'infection par *S. pneumoniae*.

Par la suite, nous avons montré, grâce aux souris *Ja18^{-/-}*, que les cellules iNKT ont un rôle bénéfique dans notre modèle de surinfection bactérienne de la grippe. En effet, les souris *Ja18^{-/-}* ont une charge bactérienne plus élevée dans les poumons et dans la rate ainsi qu'une survie plus faible par rapport aux souris sauvages. Toutefois, l'activation des cellules iNKT est inhibée lors de la surinfection bactérienne. En effet, au moment de l'infection secondaire par *S. pneumoniae*, ces cellules sont incapables de produire l'IFN- γ et l'IL-17. Nous avons montré que l'infection virale induit une forte production d'IL-10 dans les poumons, cytokine connue pour avoir de puissantes fonctions anti-inflammatoires. L'injection d'un anticorps neutralisant le récepteur à l'IL-10 lève l'inhibition de l'activation des cellules iNKT lors de l'infection bactérienne secondaire. Les cellules iNKT étant dépourvues du récepteur à cette cytokine, ne sont pas la cible directe de l'IL-10. Un état des lieux des cellules présentatrices d'antigènes présentes au moment de la surinfection a permis de mettre en évidence une disparition des cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et un fort recrutement des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC). Ces cellules possèdent à leur surface le récepteur à l'IL-10. Nous montrons que les MoDC sont directement ciblées par cette cytokine. L'IL-10 induit une diminution de la production d'IL-12 par ces cellules lorsqu'elles sont sensibilisées en présence de la bactérie. Cette voie inhibitrice prévient l'activation des cellules iNKT.

Pris dans son ensemble, nos résultats suggèrent que les cellules iNKT ont un rôle bénéfique précoce dans la surinfection bactérienne de la grippe mais n'exercent pas de rôle anti-bactérien. Leur effet bénéfique se situe en amont de l'infection secondaire et pourrait reposer sur leur capacité à produire de l'IL-22. Ce travail montre également que les cellules NKT représentent une cible de l'immunosuppression induite par le virus Influenza A. Nos travaux apportent de nouvelles connaissances sur le mode d'action de l'IL-10 dans l'inhibition de l'activation des cellules iNKT

Article 3: Early activation of invariant natural killer T cells by alpha-galactosylceramide protects against bacterial superinfection post-influenza

Journal of Infectious Diseases (En préparation)

L'infection par le virus Influenza A prédispose à la surinfection bactérienne. Nous avons montré dans l'article 2 que les cellules iNKT ont un rôle bénéfique dans la surinfection bactérienne post-Influenza. De plus, le laboratoire avait déjà montré dans un modèle d'infection par une dose létale de *S. pneumoniae* seul, que l'activation des cellules iNKT par l'injection d' α -GalCer permettait de diminuer la charge bactérienne et d'augmenter la survie des souris (Ivanov et al. 2012). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'activation exogène des cellules iNKT par l' α -GalCer pourrait conduire à une meilleure clairance bactérienne et une meilleure survie des souris surinfectées.

Nous avons tout d'abord montré dans cette étude que la susceptibilité à la surinfection bactérienne de la grippe est longue et que les souris peuvent être surinfectées entre 4 et 21 jours après l'infection virale. De plus, l'injection d' α -GalCer avant l'infection bactérienne secondaire, au pic de susceptibilité à la surinfection, n'induit pas de protection. Néanmoins, le traitement lors d'une surinfection précoce (4 jours post-infection grippale) ou d'une surinfection tardive (14 jours post-infection grippale) permet d'induire une diminution de la charge bactérienne dans les poumons et de limiter la dissémination dans la rate. Par ailleurs, l'injection d' α -GalCer à ces deux temps induit une production d'IFN- γ et d'IL-17 par les cellules iNKT. L'activation des cellules iNKT par l' α -GalCer ne permet pas d'augmenter la survie des souris, malgré la réduction importante de la charge bactérienne. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'inflammation pulmonaire survenant suite à l'infection virale était responsable de la mortalité des souris surinfectées. Nous avons donc inoculé de la dexaméthasone, molécule anti-inflammatoire, en parallèle de l' α -GalCer. Bien que ce protocole soit encore à optimiser, nos travaux montrent une amélioration de la morbidité des souris traitées avec l' α -GalCer et à la dexaméthasone.

Pris dans son ensemble, nos résultats suggèrent que l'activation exogène des cellules iNKT par l' α -GalCer limite la croissance bactérienne dans les surinfections bactériennes de la grippe survenant à des temps précoces (jour 4) ou tardif (jour 14-21) mais pas au pic de la susceptibilité (jour 7). Néanmoins, l'inflammation pulmonaire et l'immunosuppression induites par le virus étant toujours importante, la diminution de la charge bactérienne n'est pas suffisante pour améliorer la survie des souris surinfectées. Ainsi, un traitement anti-inflammatoire combiné à l'effet antibactérien de l' α -GalCer permet une amélioration de la morbidité des souris.

Discussion

Discussion

L'objectif de ce projet de thèse était d'étudier le rôle des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne de la grippe. En effet, ces cellules sont connues pour avoir un rôle bénéfique dans de nombreuses pathologies infectieuses, notamment dans les infections par le virus Influenza A et *Streptococcus pneumoniae*. Cependant, le rôle potentiel de ces cellules dans la surinfection bactérienne de la grippe n'a pas été décrit. Au sein du laboratoire, nous avons mis en place un modèle de surinfection bactérienne, lequel consiste en une primo-infection virale avec une dose sub létale du virus H3N2, suivie 7 jours plus tard d'une infection bactérienne avec une dose sub létale de *S. pneumoniae* de sérotype 1. Grâce à ce modèle, nous avons réalisé une première étude sur le rôle de l'IL-22 dans la surinfection bactérienne de la grippe. En effet, nos travaux montraient que les cellules iNKT étaient capables de produire cette cytokine au cours de la grippe. Considérant le rôle protecteur de l'IL-22 dans le maintien de la barrière épithéliale au niveau intestinal, il nous paraissait intéressant d'en étudier le rôle dans la surinfection. Nous avons dans un deuxième temps étudié le rôle naturel des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne. Enfin, nous avons étudié l'effet d'une activation exogène des cellules iNKT, à l'aide d'un agoniste puissant (l' α -GalCer), sur la surinfection bactérienne.

Rôle de l'IL-22 dans l'infection grippale et la surinfection bactérienne de la grippe (Article 1)

Le rôle de l'IL-22 dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium pulmonaire durant une infection par le virus Influenza a été rapporté par plusieurs équipes (Paget et al. 2012 ; Pociask et al. 2013). Dans notre laboratoire, nous avons confirmé le rôle bénéfique de l'IL-22 dans le maintien de l'épithélium pulmonaire ainsi que dans le contrôle de l'inflammation. De façon intéressante, nous avons mis en évidence l'importance de l'IL-22 dans le contrôle de la surinfection bactérienne de la grippe.

Durant l'infection par le virus Influenza, le transcrite de l'IL-22 est fortement exprimé dès le deuxième jour dans les Lavages Broncho Alvéolaires (LBA) tandis que l'expression du messenger codant pour son antagoniste, l'IL-22BP, est diminuée. En parallèle, les cellules iNKT RoR γ t⁺ et d'autres cellules RoR γ t⁺ (T α β , T γ δ et ILC3) expriment le transcrite de l'IL-22. Cependant, les cellules RoR γ t⁻ n'expriment pas d'IL-22 dans le contexte de l'infection par le virus Influenza. Deux études avaient décrit une production d'IL-22 par les cellules NK lors de l'infection par le virus de la grippe (Kumar et al. 2013 ; Guo et al. 2010). Dans notre étude, les cellules NK ne produisent pas d'IL-22, que ce soit suite à l'infection ou suite à la stimulation par de l'IL-1 β /IL-23. Ceci est sans doute dû au fait que ces cellules n'expriment pas RoR γ t. La différence de résultat entre ces deux études et nos

travaux vient sûrement de l'utilisation de souches de virus différentes. En effet, ces études utilisent des souches H1N1 tandis que nous avons utilisé une souche H3N2 dans notre modèle. Nous avons également mis en évidence que la production d'IL-22 au cours de la grippe expérimentale n'influe pas sur la charge virale pulmonaire, confirmant les travaux de l'équipe de Guo (Guo et al. 2010).

Lors d'une infection par une dose létale de virus Influenza, les souris *IL22^{-/-}* ne présentent pas de différence de survie par rapport aux souris sauvages. Cependant, lors d'une infection par une dose sublétales de virus, les souris *IL22^{-/-}* ont une inflammation pulmonaire plus prononcée. Ces souris ne présentent cependant pas de diminution significative de la survie. Ainsi, l'IL-22 joue un rôle important dans la diminution de l'inflammation pulmonaire lors d'une infection modérée, mais ne semble pas être capable d'agir lors d'une infection par une dose létale de virus. Il est possible que l'infection virale avec une dose forte de virus induise une production différente de facteurs inflammatoires contrôlant l'activité de l'IL-22, comparativement à une infection modérée. De plus, une dose létale de virus pourrait induire des dommages épithéliaux trop importants pour être contrôlés par l'IL-22.

Les dommages épithéliaux sont induits principalement par la lyse des cellules épithéliales infectées (effet cytolytique du virus) ou par une action cytotoxique des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. L'expression de facteurs apoptotiques joue aussi un rôle dans les dommages épithéliaux lors de l'infection par le virus Influenza. Nous avons montré dans notre laboratoire que l'IL-22 protège contre la mort des cellules épithéliales infectées *in vitro* (Paget et al. 2012). L'IL-22 a donc une action bénéfique sur l'effet cytolytique du virus. Il serait intéressant d'en connaître le mécanisme et également d'étudier l'effet protecteur potentiel de l'IL-22 sur la mortalité cellulaire liée à l'activité cytotoxique des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺. Au cours de l'infection grippale, les souris *IL-22^{-/-}* ont des dommages épithéliaux plus importants que les souris sauvages. Cet effet bénéfique pourrait être lié, comme discuté plus haut, à un rôle protecteur contre les dommages épithéliaux liés à l'infection. Il est également possible que l'IL-22 puisse intervenir plus tardivement au niveau des mécanismes de réparation, comme cela a été décrit au niveau intestinal (Mizoguchi, 2012).

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action de l'IL-22 au cours de la grippe, des approches *in vitro* basées sur l'utilisation de cellules épithéliales infectées ainsi que des études *in vivo* basées par exemple sur des analyses transcriptomiques seraient souhaitables. Il est connu que l'infection par le virus Influenza A augmente la susceptibilité à la surinfection bactérienne. Les mécanismes responsables de la surinfection comprennent une altération de la barrière épithéliale ainsi qu'une altération des défenses immunologiques. Nous avons rapporté que dans notre modèle de surinfection avec *S. pneumoniae*, les souris *IL22^{-/-}* ont une survie plus faible que les souris sauvages. Notre hypothèse est que dans ce modèle, le rôle protecteur de l'IL-22 réside dans sa capacité à limiter les dommages épithéliaux induits par le virus. En effet, en limitant les altérations

de la barrière épithéliales, l'IL-22 inhiberait l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales et ainsi la colonisation pulmonaire de celles-ci. Nous ne pouvons cependant pas totalement écarter l'hypothèse d'un rôle de l'IL-22 dans le contrôle de l'infection par *S. pneumoniae*. En effet, cette cytokine est capable de contrôler la charge bactérienne lors de l'infection par *Klebsiella pneumoniae* (Zheng et al. 2016). Par ailleurs, dans notre laboratoire, nous avons suggéré un rôle potentiel de cette cytokine dans les mécanismes de défense lors de l'infection par *S. pneumoniae* (Van Maele et al. 2014, et P. Gosset, communication personnelle). Bien que difficile à étudier, il serait intéressant de connaître la part respective de l'effet de l'IL-22 endogène sur les mécanismes de protection physique des épithéliums pulmonaires et de protection immunologique.

Si l'IL-22 endogène produite lors de l'infection virale a un rôle bénéfique, l'apport d'IL-22 exogène pourrait conduire à une amélioration de la pathologie pulmonaire dans la grippe expérimentale et/ou lors de la surinfection bactérienne secondaire. Nous avons déjà montré que l'injection d'IL-22 chez des souris *IL-22^{-/-}* restaure le phénotype des souris sauvages surinfectées (article 1). Nous avons réalisé une première étude au cours de laquelle les souris ont été injectées tous les deux jours avec de l'IL-22 recombinante (jour 2, 4 et 6 post-infection grippale). Cependant, ce traitement n'a pas conduit à une amélioration de la morbidité et de la mortalité des souris grippées. Nous pensons que ce résultat négatif pourrait venir de la manipulation excessive des souris. Nous avons donc tenté d'optimiser le protocole. Pour cela, nous avons initié une collaboration avec la société Genentech, laquelle nous a fourni une molécule d'IL-22 couplée à un fragment Fc (IL-22-Fc). Cette molécule est beaucoup plus stable que l'IL-22 recombinante utilisée jusque-là. Elle permet ainsi de diminuer le nombre d'inoculations et ainsi de réduire la manipulation animale. Nous avons montré que cette molécule est active *in vivo*, notamment dans le foie où elle active la synthèse de gènes cibles (résultats annexes de l'Article 1). De façon assez surprenante, peu de gènes cibles ont une expression augmentée au niveau pulmonaire suite à l'inoculation intranasale de l'IL-22-Fc. Pour cette raison, nous avons initié une collaboration avec le Dr R. Le Goffic (INRA, Jouy-en-Jossas) visant à analyser de façon globale la signature pulmonaire induite par l'IL-22. Cette approche transcriptomique globale, et non biaisée, nous permettra peut-être de mieux comprendre le mode d'action de cette cytokine lors de l'infection virale et de la surinfection bactérienne. Concernant la signature, nous nous concentrerons particulièrement sur les familles de gènes connues pour jouer un rôle dans la protection des épithéliums et dans les mécanismes de réparation de la barrière épithéliale, ou dans les processus liés aux défenses immunologiques anti-bactériennes. Cette étude est actuellement en cours. Ces travaux permettront peut-être d'envisager l'exploitation thérapeutique de cette molécule dans l'infection par le virus Influenza A ou lors de la surinfection bactérienne de la grippe.

Rôle naturel des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne de la grippe (Article 2)

Les résultats du premier article démontrent un rôle bénéfique de l'IL-22 dans l'infection virale ainsi que dans la surinfection bactérienne de la grippe. Les cellules iNKT font partie des cellules productrices d'IL-22 et pourraient ainsi avoir un rôle important dans cette pathologie. Nous avons donc étudié le rôle naturel de ces cellules dans notre modèle de surinfection bactérienne de la grippe.

Avant d'étudier l'importance des cellules iNKT dans le modèle de surinfection, nous avons regardé leur rôle ainsi que leur mécanisme d'action lors d'une infection seule par *S. pneumoniae*. Nous avons ainsi pu montrer que les souris *Ja18^{-/-}* ont une survie plus faible ainsi qu'une charge bactérienne plus forte que les souris sauvages. Nous avons également décrit une activation des cellules iNKT médiée par l'IL-12 et non pas par le CD1d comme le montrait l'équipe de Kronenberg (Kinjo et al. 2013). L'activation des cellule iNKT se traduit par une forte production d'IFN- γ et une faible production d'IL-17. En effet, lors de l'infection par *S. pneumoniae*, les cellules $\gamma\delta$ sont les sources majeures d'IL-17 (C. Paget, communication personnelle). Dans ce modèle, nous avons également démontré l'importance des cellules dendritiques et plus particulièrement des cellules CD103⁺ dans l'activation des cellules iNKT. Par ailleurs, une expérience de transfert de cellules nous a permis de mettre en évidence un rôle important de l'IFN- γ produit par les cellules iNKT dans le contrôle de la charge bactérienne.

Après avoir validé le rôle bénéfique des cellules iNKT lors d'une infection par *S. pneumoniae* de sérotype 1, nous nous sommes intéressés au rôle de ces cellules lors d'une surinfection bactérienne de la grippe. Les cellules iNKT pourraient ainsi avoir un rôle lors de l'infection virale et/ou lors de l'infection bactérienne (rôle anti-bactérien). Nous avons tout d'abord montré que les souris *Ja18^{-/-}* surinfectées présentent une survie plus faible et une charge bactérienne dans les poumons et la rate plus forte que les souris sauvages. Néanmoins, nous avons observé que l'infection par le virus influenza A induit un milieu immunosuppresseur dans les poumons et que les cellules iNKT sont incapables de s'activer suite à l'infection bactérienne. Puisque ces cellules ne s'activent pas au moment de la surinfection, elles doivent agir en amont de l'infection bactérienne. Nous avons montré au laboratoire que les cellules iNKT produisent de l'IL-22 lors de l'infection par le virus Influenza A (Paget et al. 2012). Ainsi les cellules iNKT grâce à leur capacité à produire de l'IL-22 pourraient avoir un rôle dans le maintien et le remodelage de l'épithélium pulmonaire. Aussi il serait intéressant de voir si l'injection d'IL-22 au sein de souris *Ja18^{-/-}* suffirait à diminuer les dommages pulmonaires. Pour étudier le rôle potentiel de l'IL-22 produit par les cellules iNKT dans

la surinfection, nous pourrions aussi procéder à des expériences de transfert de cellules iNKT sauvages ou déficientes en IL-22 chez des souris *Ja18^{-/-}*.

Nous avons alors voulu comprendre le mécanisme induit par l'infection virale inhibant l'activation des cellules iNKT lors de l'infection bactérienne secondaire. Nous avons tout d'abord montré que les cellules iNKT sont présentes dans les poumons au moment de la surinfection et que celles-ci sont capables de s'activer *in vitro* en réponse à l'IL-12 et l'IL-18, ainsi qu'en présence des cellules présentatrices d'antigènes retrouvées dans les poumons de souris grippées (MoDC) stimulées par *S. pneumoniae*. Les cellules iNKT ne s'activant pas *in vivo*, nous avons émis l'hypothèse d'un milieu immunosuppresseur dans le poumon. Nos résultats indiquent un rôle important de l'IL-10, laquelle est fortement produite au pic de susceptibilité à la surinfection. Des travaux avaient déjà montré un rôle important de cette cytokine lors d'une surinfection bactérienne de la grippe (H1N1/Sp3) (Van der Sluijs et al. 2004). L'injection d'un anticorps neutralisant le récepteur à l'IL-10 induit une augmentation de survie de 40%, ce qui confirme l'effet délétère de cette cytokine dans la surinfection bactérienne. L'anticorps neutralisant induit également une production de cytokines et notamment d'IFN- γ par les cellules iNKT ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-12 dans le poumon. Nous avons ainsi décrit dans notre étude que l'IL-10 inhibe la production de cytokines activatrices par les cellules présentatrices d'antigènes et l'activation des cellules iNKT. Toutefois, les souris *Ja18^{-/-}* survivent également plus avec l'injection de l'anti-IL-10R, l'IL-10 a donc également une action indépendante des cellules iNKT et pourrait agir directement sur d'autres types cellulaires importants dans la défense antibactérienne, tels que les macrophages (malgré leur nombre réduit) ou les neutrophiles.

L'IL-10 étant importante dans notre modèle, nous nous sommes par la suite intéressés aux sources cellulaires de cette cytokine. Si des études précédentes indiquaient que les cellules T étaient les cellules productrices majeures d'IL-10 lors de l'infection par le virus Influenza A (Sun et al. 2009), l'utilisation de souris rapporteur très sensible (souris ITIB) nous a permis de confirmer une production d'IL-10 par les cellules T, mais également de mettre en évidence pour la première fois, une production d'IL-10 par les cellules NK et les cellules myéloïdes (surtout les monocytes inflammatoires). L'équipe de M. Mohrs a décrit une production d'IL-10 par une sous-population des cellules NK, induisant le contrôle de la production d'IL-12 par les DC (Perona-Wright et al. 2009). Ainsi, il serait intéressant de regarder, par une approche de transfert cellulaire, le rôle des cellules productrices d'IL-10 dans notre modèle d'infection. Récemment, une nouvelle sous-population de cellules iNKT productrice d'IL-10 a été isolée (Sag et al. 2014). Nos résultats ne montrent cependant pas de production d'IL-10 par les cellules iNKT au cours de l'infection grippale.

Si le mode d'action de l'interleukine 10 sur les cellules iNKT est peu connu, il semble que dans notre étude, l'IL-10 ne cible pas les cellules iNKT. En effet, ces cellules ne possèdent pas le récepteur à l'IL-10 et la présence de cette cytokine n'empêche pas l'activation des cellules iNKT *in*

vitro. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'IL-10 cible les cellules présentatrices d'antigènes et empêche ces cellules de produire de l'IL-12, inhibant ainsi l'activation des cellules iNKT. Nous avons alors étudié les populations de CPA présentes dans les poumons de souris grippées, juste avant l'infection bactérienne. Nos travaux décrivent une disparition presque complète des cDC ainsi qu'un fort recrutement de MoDC et de monocytes inflammatoires (IM). Nous avons également décrit un plus faible pouvoir activateur des MoDC, comparées aux cDCs. Les IM, quant à elles, n'activent pas les cellules iNKT. Ce fort recrutement de cellules inflammatoires pourrait être une des causes de l'inflammation pulmonaire. En effet, une étude a mis en évidence récemment, dans un modèle de surinfection H1N1/D39 le rôle délétère des MoDC et IM recrutées lors de l'infection virale. Ces travaux décrivent ces cellules comme exprimant la molécule TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Cette molécule est induite par l'IFN de type I, lui-même induit par l'infection virale par IAV (Huang et al. 2009 ; Li et al. 2012). Cette molécule est considérée comme un ligand induisant le processus d'apoptose. Ces travaux montrent ainsi un rôle délétère des monocytes inflammatoires TRAIL⁺ recrutés dans le poumon après l'infection par le virus Influenza A. En effet, lors de l'absence de ces cellules, les souris présentent une pathologie pulmonaire plus faible. (Ellis et al. 2015). Dans l'étude menée par A. Wack, le traitement des souris avec un anti-TRAIL de façon continue ou au début de l'infection par le virus, induit une augmentation de la survie des souris et une diminution de la charge bactérienne dans les poumons. Nous avons ainsi étudié l'expression de cette molécule à la surface des cellules recrutées dans les poumons après l'infection virale. Nous n'avons pas détecté d'expression de TRAIL à la surface des monocytes inflammatoires et des MoDC (résultats non montrés). De plus, l'expression de TRAIL n'est pas augmentée dans les poumons de souris surinfectées (data non montré). Ceci pourrait être dû au fait que nous n'avons pas utilisé la même souche de virus. Ainsi, si l'IL-10 semble jouer un rôle important dans la surinfection. Le changement de population de cellules présentatrices d'antigènes pourrait avoir un effet considérable sur l'activation des cellules iNKT, l'activation d'autres populations cellulaires ainsi que sur les dommages pulmonaires. Une étude approfondie sur le rôle des CPA ainsi que les mécanismes impliqués dans ce changement de population est à envisager. L'injection, chez des souris grippées, de cDC triées, permettrait d'étudier le rôle de ces cellules dans le contexte d'une surinfection bactérienne de la grippe. De plus, des recherches sur la disparition des cDC est à considérer. En effet, nous ne savons pas si ces cellules ont subi une apoptose ou ont migré dans les organes périphériques. L'importance des facteurs de croissance et de différenciation est à déterminer. De plus, une étude sur les progéniteurs de cellules dendritiques éclairerait fortement cet aspect de l'infection virale par IAV. Pour cela une étude cinétique devra être menée.

Dans l'article 2 nous nous sommes concentrés sur l'IFN- γ car dans notre cas, la production d'IFN- γ par les cellules iNKT (et les cellules NK) permet un meilleur contrôle de la charge bactérienne dans le cas d'une infection seule par *S. pneumoniae*. Il semble donc logique que

l'inhibition de production d'IFN- γ dans notre modèle de surinfection soit un des facteurs aggravant la pathologie. Après l'injection de l'anti-IL-10R, les cellules iNKT produisent de l'IFN- γ et peu d'IL-17 et les souris ont une meilleure survie. Néanmoins, une étude décrit l'IFN- γ comme étant délétère dans la surinfection bactérienne de la grippe (H1N1/Sp3) (Sun et al. 2008). Une autre étude démontre qu'une diminution des cellules TCD8⁺ spécifique du virus et donc la diminution d'IFN- γ est un des facteurs impliqués dans la susceptibilité à la surinfection bactérienne de la grippe (Blevins et al. 2014). Enfin, il semblerait que les souris *IFN- γ ^{-/-}* soient aussi sensibles à la surinfection par *S. aureus* que les souris sauvages (Kudva et al. 2011). Le rôle de l'IFN- γ dans la surinfection bactérienne de la grippe est donc encore controversé et pourrait dépendre du modèle utilisé.

Les cellules iNKT sont également connues pour produire de l'IL-17, cytokine importante dans la défense immunitaire dirigée contre *S. pneumoniae*. Cependant, comme nous l'avons dit plus tôt, les cellules iNKT produisent peu cette cytokine. Nous avons décrit dans notre modèle de surinfection une diminution de la production de cette cytokine par les cellules iNKT. Néanmoins l'injection de l'anticorps neutralisant le récepteur à l'IL-10 n'induit pas une augmentation de production d'IL-17 par les cellules iNKT. Ainsi il semblerait que dans notre modèle, l'IL-17 produite par les cellules iNKT n'est pas primordial à la défense anti-bactérienne contre *S. pneumoniae*. Il serait néanmoins très intéressant de comprendre pourquoi l'injection de l'anti-IL-10R induit une production d'IFN- γ mais pas d'IL-17.

Les travaux présentés dans l'article 2 décrivent ainsi un nouveau mécanisme immunosuppresseur induit par le virus IAV, lequel engendre une susceptibilité accrue à la surinfection bactérienne. En effet, l'infection virale induit la production d'IL-10 laquelle va inhiber l'activation des cellules iNKT de manière indirecte. Pour la première fois, le rôle des cellules iNKT dans un modèle de surinfection bactérienne post-grippale a été décrit.

Activation exogène des cellules iNKT (Article 3)

Avec l'apparition de virus grippaux de plus en plus pathogènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, il est important de trouver une alternative pouvant contrôler le développement des surinfections bactériennes. Les résultats émanant du deuxième article indiquent un rôle important des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne de la grippe. L' α -GalCer est un agoniste puissant des cellules iNKT et est utilisé actuellement dans des essais cliniques en tant qu'agent thérapeutique (cancer). Dans l'article 3, nous avons donc étudié l'efficacité de l' α -GalCer dans la protection contre les surinfections bactériennes de grippe.

Nous, et une autre étude, avons montré un rôle protecteur de l'injection d' α -GalCer dans une infection létale par *S. pneumoniae* (Nakamatsu et al. 2007 ; Ivanov et al. 2012). Nous nous sommes donc proposés d'étudier l'effet d'une injection d' α -GalCer sur la clairance bactérienne lorsque celui-

ci est injecté chez des souris préalablement infectées par le virus de la grippe. Nos résultats montrent une diminution de la charge bactérienne pulmonaire chez les souris traitées par l' α -GalCer lors d'une surinfection précoce (jour 4), pic de la réplication virale, ou lors d'une surinfection tardive (jour 14 – jour 21), phase de résolution de l'infection virale. Cette clairance bactérienne s'accompagne d'une production d'IFN- γ et d'IL-17 par les cellules iNKT. Néanmoins, l'injection d' α -GalCer chez des souris surinfectées 7 jours après l'infection virale, au pic de la susceptibilité à la surinfection bactérienne, n'induit pas d'effet, que ce soit au niveau de l'activation des cellules iNKT *in vivo* ou au niveau de la clairance bactérienne. En effet, 7 jours après l'infection virale, la barrière épithéliale est altérée, permettant ainsi l'adhérence et la colonisation des bactéries. De plus, un environnement immunosuppresseur est induit dans le poumon ; changement de populations cellulaires et forte production d'IL-10. Toutefois, lorsque les cellules iNKT sont stimulées *in vitro* par de l' α -GalCer, celles-ci sont capables de produire de l'IFN- γ . Les cellules iNKT ont donc la capacité de s'activer. Nous avons tout d'abord pensé à un rôle de l'IL-10 dans l'inhibition de l'activation des cellules iNKT. En effet, nos travaux (article 2) montraient un rôle inhibiteur de cette cytokine dans l'activation naturelle des cellules iNKT au cours de la surinfection. Cependant, en réponse à l' α -GalCer, l'injection d'un anticorps neutralisant le récepteur à l'IL-10 ne permet pas de restaurer *in vivo* la production d'IFN- γ et d'IL-17 par ces cellules. L'IL-10 n'étant pas le facteur impliqué dans ce phénomène, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel des cellules présentatrices d'antigènes dans le poumon. En effet, les cDC (et plus particulièrement des DC CD103⁺) sont connues pour présenter l' α -GalCer aux cellules iNKT (Ivanov et al. 2012). Cependant, nos travaux montrent que ces cellules sont absentes du poumon 7 jours après l'infection grippale. Nous avons cependant noté un très fort recrutement des MoDC et des monocytes inflammatoires. Il s'avère que ces deux types cellulaires expriment peu le CD1d et ont donc une capacité plus faible (par rapport aux cDC) à présenter l' α -GalCer aux cellules iNKT. Ainsi, le changement de population de CPA dans le poumon explique le manque d'activation des cellules iNKT par l' α -GalCer. Nous avons également montré que l'IL-10 n'avait pas de rôle sur l'expression du CD1d. Cette absence d'activation des cellules iNKT au jour 7 n'induit pas seulement une inhibition du pouvoir thérapeutique de l' α -GalCer. Celle-ci pourrait en effet empêcher l'activation naturelle des cellules iNKT lors de surinfection avec un pathogène bactérien exprimant des antigènes présentés par le CD1d. Afin de confirmer que la disparition des cDC est un événement déterminant dans l'inactivation des cellules iNKT, le transfert de cDC de souris naïves chez des souris infectées sera envisagé.

Nous nous sommes intéressés par la suite au fait que les cellules iNKT sont activées lors de surinfections survenant lors de la phase de résolution de l'infection virale (jour 14-jour 21). Nous avons ainsi décrit un retour des cDC dans les poumons 14 jours après l'infection virale. Ceci explique pourquoi les cellules iNKT s'activent et produisent notamment de l'IFN- γ . À ces temps, la clairance bactérienne dans les poumons induite par l'injection d' α -GalCer est accompagnée d'un

défaut de dissémination des bactéries dans la rate. Néanmoins, si la charge bactérienne est réduite considérablement, la survie des souris n'est pas améliorée par l'injection d' α -GalCer. Nous avons confirmé ces résultats avec une souche moins virulente de virus (souche WSN/H1N1). Si la septicémie est une des causes majeures de mortalité lors d'une surinfection bactérienne, l'inflammation pulmonaire résultant de l'infection virale est aussi à prendre en compte. En effet, il a déjà été montré qu'une action antibactérienne seule avait souvent peu d'effet (Ghoneim et al. 2014 ; Damjonovic et al. 2013). Ces deux études montrent l'intérêt de l'injection d'un anti-inflammatoire (la dexaméthasone) en combinaison d'un antibiotique afin d'augmenter la survie des souris. Nous avons donc injecté de la dexaméthasone quotidiennement après l'infection par *S. pneumoniae*, en combinaison avec l' α -GalCer afin d'obtenir un effet antibactérien et anti-inflammatoire. Grâce à cette combinaison, les souris perdent moins de poids, mais ont une survie équivalente aux souris traitées uniquement avec l' α -GalCer. L'injection de dexaméthasone permettrait de limiter l'inflammation engendrée par la surinfection mais ne serait pas suffisante, les dommages pulmonaires étant très étendus. Ainsi, notre protocole comprenant l'injection de dexaméthasone a un effet mais doit être optimiser afin d'augmenter la survie des souris. Un traitement plus précoce (48h avant l'injection d' α -GalCer) est à envisager. En effet, l'injection de dexaméthasone n'altère pas l'activation des cellules iNKT par l' α -GalCer lorsque celle-ci est injectée 48h au préalable (résultats non montrés). Enfin, une étude similaire avec l'utilisation d'un virus moins pathogène et donc enclin à induire moins de dommages pulmonaires serait intéressante.

En ce qui concerne les résultats obtenus au jour 3, nous avons mis en évidence la présence d'une charge bactérienne modérée dans les poumons des souris surinfectées, mais aucune bactérie en périphérie. Ainsi, il semble que l'intégrité de la barrière pulmonaire ne soit pas encore complètement altérée. Des études histologiques montrent en effet une altération de l'épithélium plus faible qu'au jour 7 (data non montré). L'injection d' α -GalCer au jour 3 induit une diminution considérable du nombre de bactéries dans les poumons. Cependant les souris succombent quand même à la surinfection. Afin d'approfondir notre étude, il faudrait déterminer précisément le phénomène inflammatoire induit au pic de la réplication virale. De plus, il est possible que dès 3 jours après l'infection virale, des cellules inflammatoires soient recrutées et induisent une inflammation pulmonaire prononcée. Ainsi, l'étude des cellules inflammatoires (MoDC, IM) présentes dans les poumons à ce temps précis pourrait aider à comprendre le fort taux de mortalité induit par la surinfection précoce. Enfin, si lors d'une surinfection bactérienne tardive, l'injection simultanée de dexaméthasone et d' α -GalCer ne permet pas d'augmenter la survie des souris, cette combinaison au jour 3 pourrait peut-être fonctionner, les dommages pulmonaires étant plus faibles.

Dans cette étude nous avons donc décrit un rôle bénéfique de l'activation exogène des cellules iNKT lors de surinfections bactériennes précoces ou tardives et en particulier dans la

diminution de la charge bactérienne pulmonaire et systémique. Néanmoins, dans les deux protocoles, les souris n'ont pas de survie améliorée. Si l'injection de dexaméthasone permet une morbidité réduite, la mortalité, elle, reste toujours la même. Ainsi, si le contrôle de l'inflammation pulmonaire (dexaméthasone) et le contrôle de la charge bactérienne (α -GalCer) ne permettent pas d'améliorer la survie, un autre facteur doit être impliqué dans la mortalité élevée des souris. Il a été démontré dans une étude récente que l'infection par IAV pouvait induire un syndrome de détresse respiratoire aiguë, lequel est responsable en parti de la forte mortalité des sujets (Sugiyama et al. 2015). L'injection de Vasculotide permet une meilleure survie des souris en augmentant l'intégrité de la barrière endothéliale pulmonaire. Une autre étude décrit une apoptose des cellules endothéliales induite par le virus grippal lors de la surinfection par *S. aureus*. Ainsi, les souris surinfectées présentent une fuite vasculaire et un œdème pulmonaire plus important que les souris grippées (Wang et al. 2014). Ceux-ci peuvent engendrer un arrêt respiratoire ainsi qu'une hypoxémie artérielle (les tissus ne reçoivent pas assez d'oxygène). Il est possible que dans notre modèle de surinfection, *S. pneumoniae* induit les mêmes symptômes, ce qui pourrait expliquer la mortalité importante malgré la diminution de la charge bactérienne et le contrôle de l'inflammation pulmonaire.

Conclusion et Perspectives

Les trois études menées lors de ma thèse ont donc permis de mieux comprendre les phénomènes immunologiques impliqués dans la susceptibilité à la surinfection bactérienne de la grippe. Nous avons tout d'abord décrit un rôle crucial de l'IL-22 dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium pulmonaire. Ce phénomène pourrait jouer un rôle important lors du développement de l'infection bactérienne secondaire. Nous avons également décrit un rôle des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne de la grippe. Dans ce mécanisme, il semble que l'effet bénéfique soit lié à une activité de ces cellules dans les premiers jours de l'infection virale ; ces cellules étant incapables de s'activer en réponse à *S. pneumoniae*. Enfin, nous avons prouvé que l'activation des cellules iNKT par l'injection d'un ligand exogène pouvait conduire à une diminution de la charge bactérienne à des temps précoces ou tardifs après l'infection virale.

Les deux dernières études ont également permis de décrire une immunosuppression induite par le virus, inhibant à la fois l'activation TCR-dépendante et TCR-indépendante des cellules iNKT. En effet, nous avons montré que l'IL-10 produite suite à l'infection virale cible les cellules présentatrices d'antigènes et les empêche de produire l'IL-12, cytokine activant les cellules iNKT en réponse à *S. pneumoniae*. Nous avons également montré que le changement de populations de CPA entraînait un fort recrutement de cellules exprimant peu de CD1d et la disparition de cellules

exprimant fortement cette molécule, indispensable lors d'une activation des cellules iNKT via le TCR.

Pour la suite des travaux portant sur la surinfection bactérienne de la grippe, nous avons à notre disposition deux autres souches du virus IAV : WSN et H1N1pandemic. Ces souches sont décrites pour être moins pathogènes que notre souche H3N2. Ainsi, nous pourrions étudier l'effet thérapeutique de l' α -GalCer avec d'autres souches d'IAV. En effet, comme nous l'avons vu, l'injection de dexaméthasone ne semble pas avoir d'effet sur la survie lors d'une infection avec une souche virulente d'IAV. Cependant, l'injection de cette molécule dans un modèle d'infection plus modérée pourrait avoir des effets plus bénéfiques. Ceci combiné à l'optimisation du protocole pourra à terme permettre de développer une stratégie thérapeutique efficace, impliquant l'activation des cellules iNKT.

En ce qui concerne les applications thérapeutiques potentielles de nos travaux, il semble que le traitement par l' α -GalCer ou par l'IL-22 à des temps précoces ne soient pas envisageables car les symptômes de la grippe n'apparaissent que 4 jours après l'infection virale. Néanmoins le traitement avec l' α -GalCer ou avec l'IL-22 (combiné à un anti-inflammatoire) à des temps plus tardifs est envisageable. L' α -GalCer étant déjà en essais cliniques pour le traitement de cancers, l'utilisation chez l'homme dans le traitement ou la prévention de maladies infectieuses, telles que les surinfections bactériennes de la grippe, est une possibilité à évaluer.

Ce travail de thèse a permis de mieux comprendre les mécanismes responsables de la surinfection bactérienne post-grippale. Nous avons également proposé deux stratégies thérapeutiques potentiellement capables de diminuer la susceptibilité à la surinfection bactérienne de la grippe. La première est basée sur une administration d'IL-22 exogène et vise à limiter les dommages épithéliaux induits par le virus. La seconde consiste à induire l'activation des cellules iNKT et ainsi à promouvoir une immunité anti-bactérienne locale afin de contrôler le développement de bactéries.

Bibliographie

Bibliographie

- Abdul-Careem, Mohamed F., M. Firoz Mian, Geoffry Yue, Amy Gillgrass, Meghan J. Chenoweth, Nicole G. Barra, Marianne V. Chew, et al. "Critical Role of Natural Killer Cells in Lung Immunopathology during Influenza Infection in Mice." *The Journal of Infectious Diseases* 206, no. 2 (July 15, 2012): 167–77.
- Akbari, Omid, Philippe Stock, Everett Meyer, Mitchell Kronenberg, Stephane Sidobre, Toshinori Nakayama, Masaru Taniguchi, Michael J. Grusby, Rosemarie H. DeKruyff, and Dale T. Umetsu. "Essential Role of NKT Cells Producing IL-4 and IL-13 in the Development of Allergen-Induced Airway Hyperreactivity." *Nature Medicine* 9, no. 5 (May 2003): 582–88.
- Albiger, Barbara, Sofia Dahlberg, Andreas Sandgren, Florian Wartha, Katharina Beiter, Hiroaki Katsuragi, Shizuo Akira, Staffan Normark, and Birgitta Henriques-Normark. "Toll-like Receptor 9 Acts at an Early Stage in Host Defence against Pneumococcal Infection." *Cellular Microbiology* 9, no. 3 (March 2007): 633–44.
- Allen, Irving C., Chris B. Moore, Monika Schneider, Yu Lei, Beckley K. Davis, Margaret A. Scull, Denis Gris, et al. "NLRX1 Protein Attenuates Inflammatory Responses to Infection by Interfering with the RIG-I-MAVS and TRAF6-NF- κ B Signaling Pathways." *Immunity* 34, no. 6 (June 24, 2011): 854–65.
- Allen, Irving C., Margaret A. Scull, Chris B. Moore, Eda K. Holl, Erin McElvania-TeKippe, Debra J. Taxman, Elizabeth H. Guthrie, Raymond J. Pickles, and Jenny P.-Y. Ting. "The NLRP3 Inflammasome Mediates in Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA." *Immunity* 30, no. 4 (April 17, 2009): 556–65.
- Arase, H., N. Arase, K. Nakagawa, R. A. Good, and K. Onoé. "NK1.1+ CD4+ CD8- Thymocytes with Specific Lymphokine Secretion." *European Journal of Immunology* 23, no. 1 (January 1993): 307–10.
- Areschoug, Thomas, and Siamon Gordon. "Scavenger Receptors: Role in Innate Immunity and Microbial Pathogenesis." *Cellular Microbiology* 11, no. 8 (August 2009): 1160–69.
- Armstrong, Susan M., Changsen Wang, Jayesh Tigdi, Xiaoe Si, Carlo Dumpit, Steffany Charles, Asela Gamage, Theo J. Moraes, and Warren L. Lee. "Influenza Infects Lung Microvascular Endothelium Leading to Microvascular Leak: Role of Apoptosis and Claudin-5." *PLoS One* 7, no. 10 (2012): e47323.
- Arredouani, Mohamed, Zhiping Yang, YaoYu Ning, Guozhong Qin, Raija Soininen, Karl Tryggvason, and Lester Kobzik. "The Scavenger Receptor MARCO Is Required for Lung Defense against Pneumococcal Pneumonia and Inhaled Particles." *The Journal of Experimental Medicine* 200, no. 2 (July 19, 2004): 267–72.
- Arredouani, Mohamed S., Zhiping Yang, Amy Imrich, Yaoyu Ning, Guozhong Qin, and Lester Kobzik. "The Macrophage Scavenger Receptor SR-AI/II and Lung Defense against Pneumococci and Particles." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35, no. 4 (October 2006): 474–78.
- Aspeshlagh, Sandrine, Yali Li, Esther Dawen Yu, Nora Pauwels, Matthias Trappeniers, Enrico Girardi, Tine Decruy, et al. "Galactose-Modified iNKT Cell Agonists Stabilized by an Induced Fit of CD1d Prevent Tumour Metastasis." *The EMBO Journal* 30, no. 11 (June 1, 2011): 2294–2305.
- Assarsson, E., T. Kambayashi, J. K. Sandberg, S. Hong, M. Taniguchi, L. Van Kaer, H. G. Ljunggren, and B. J. Chambers. "CD8+ T Cells Rapidly Acquire NK1.1 and NK Cell-Associated Molecules upon Stimulation in Vitro and in Vivo." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165, no. 7 (October 1, 2000): 3673–79.
- Astrakhan, Alexander, Hans D. Ochs, and David J. Rawlings. "Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Is Required for Homeostasis and Function of Invariant NKT Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, no. 12 (June 15, 2009): 7370–80.
- Balachandran, P., S. K. Hollingshead, J. C. Paton, and D. E. Briles. "The Autolytic Enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* Is Not Responsible for Releasing Pneumolysin." *Journal of Bacteriology* 183, no. 10 (May 2001): 3108–16.

- Ballas, Z. K., and W. Rasmussen. "NK1.1+ Thymocytes. Adult Murine CD4-, CD8- Thymocytes Contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V Beta 8+ Subset." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 145, no. 4 (August 15, 1990): 1039–45.
- Barchet, Winfried, Marina Cella, and Marco Colonna. "Plasmacytoid Dendritic Cells--Virus Experts of Innate Immunity." *Seminars in Immunology* 17, no. 4 (August 2005): 253–61.
- Barman, S., A. Ali, E. K. Hui, L. Adhikary, and D. P. Nayak. "Transport of Viral Proteins to the Apical Membranes and Interaction of Matrix Protein with Glycoproteins in the Assembly of Influenza Viruses." *Virus Research* 77, no. 1 (September 2001): 61–69.
- Barral, Patricia, Paolo Polzella, Andreas Bruckbauer, Nico van Rooijen, Gurdyal S. Besra, Vincenzo Cerundolo, and Facundo D. Batista. "CD169(+) Macrophages Present Lipid Antigens to Mediate Early Activation of iNKT Cells in Lymph Nodes." *Nature Immunology* 11, no. 4 (April 2010): 303–12.
- Baxter, A. G., S. J. Kinder, K. J. Hammond, R. Scollay, and D. I. Godfrey. "Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-Cell Deficiency and IDDM in NOD/Lt Mice." *Diabetes* 46, no. 4 (April 1997): 572–82.
- Bendelac, A. "Positive Selection of Mouse NK1+ T Cells by CD1-Expressing Cortical Thymocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 182, no. 6 (December 1, 1995): 2091–96.
- Bendelac, Albert, Paul B. Savage, and Luc Teyton. "The Biology of NKT Cells." *Annual Review of Immunology* 25 (2007): 297–336.
- Bender, B. S., T. Croghan, L. Zhang, and P. A. Small. "Transgenic Mice Lacking Class I Major Histocompatibility Complex-Restricted T Cells Have Delayed Viral Clearance and Increased Mortality after Influenza Virus Challenge." *The Journal of Experimental Medicine* 175, no. 4 (April 1, 1992): 1143–45.
- Benlagha, Kamel, Tim Kyin, Andrew Beavis, Luc Teyton, and Albert Bendelac. "A Thymic Precursor to the NK T Cell Lineage." *Science (New York, N.Y.)* 296, no. 5567 (April 19, 2002): 553–55.
- Benlagha, Kamel, Datsen G. Wei, Joel Veiga, Luc Teyton, and Albert Bendelac. "Characterization of the Early Stages of Thymic NKT Cell Development." *The Journal of Experimental Medicine* 202, no. 4 (August 15, 2005): 485–92.
- Beveridge, W. I. "The Chronicle of Influenza Epidemics." *History and Philosophy of the Life Sciences* 13, no. 2 (1991): 223–34.
- Bialecki, Emilie, Elodie Macho Fernandez, Stoyan Ivanov, Christophe Paget, Josette Fontaine, Fabien Rodriguez, Luc Lebeau, et al. "Spleen-Resident CD4+ and CD4- CD8 α - Dendritic Cell Subsets Differ in Their Ability to Prime Invariant Natural Killer T Lymphocytes." *PloS One* 6, no. 10 (2011): e26919.
- Bialecki, Emilie, Christophe Paget, Josette Fontaine, Monique Capron, François Trottein, and Christelle Faveeuw. "Role of Marginal Zone B Lymphocytes in Invariant NKT Cell Activation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, no. 10 (May 15, 2009): 6105–13.
- Bilenki, Laura, Shuhe Wang, Jie Yang, Yijun Fan, Antony George Joyee, and Xi Yang. "NK T Cell Activation Promotes Chlamydia Trachomatis Infection in Vivo." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175, no. 5 (September 1, 2005): 3197–3206.
- Blevins, Lance K., John T. Wren, Beth C. Holbrook, Sarah L. Hayward, W. Edward Swords, Griffith D. Parks, and Martha A. Alexander-Miller. "Coinfection with Streptococcus Pneumoniae Negatively Modulates the Size and Composition of the Ongoing Influenza-Specific CD8⁺ T Cell Response." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193, no. 10 (November 15, 2014): 5076–87.
- Bosma, Anneleen, Azza Abdel-Gadir, David A. Isenberg, Elizabeth C. Jury, and Claudia Mauri. "Lipid-Antigen Presentation by CD1d(+) B Cells Is Essential for the Maintenance of Invariant Natural Killer T Cells." *Immunity* 36, no. 3 (March 23, 2012): 477–90.

- Bou Ghanem, Elsa N., Stacie Clark, Sara E. Roggensack, Sally R. McIver, Pilar Alcaide, Philip G. Haydon, and John M. Leong. "Extracellular Adenosine Protects against *Streptococcus Pneumoniae* Lung Infection by Regulating Pulmonary Neutrophil Recruitment." *PLoS Pathogens* 11, no. 8 (August 2015): e1005126.
- Bourgeois, Elvire, Linh Pham Van, Michel Samson, Séverine Diem, Anne Barra, Stéphane Roga, Jean-Marc Gombert, et al. "The pro-Th2 Cytokine IL-33 Directly Interacts with Invariant NKT and NK Cells to Induce IFN-Gamma Production." *European Journal of Immunology* 39, no. 4 (April 2009): 1046–55.
- Brigl, Manfred, Lynn Bry, Sally C. Kent, Jenny E. Gumperz, and Michael B. Brenner. "Mechanism of CD1d-Restricted Natural Killer T Cell Activation during Microbial Infection." *Nature Immunology* 4, no. 12 (December 2003): 1230–37.
- Brigl, Manfred, Raju V. V. Tatituri, Gerald F. M. Watts, Veemal Bhowruth, Elizabeth A. Leadbetter, Nathaniel Barton, Nadia R. Cohen, Fong-Fu Hsu, Gurdyal S. Besra, and Michael B. Brenner. "Innate and Cytokine-Driven Signals, rather than Microbial Antigens, Dominate in Natural Killer T Cell Activation during Microbial Infection." *The Journal of Experimental Medicine* 208, no. 6 (June 6, 2011): 1163–77.
- Brittan, J. L., T. J. Buckeridge, A. Finn, A. Kadioglu, and H. F. Jenkinson. "Pneumococcal Neuraminidase A: An Essential Upper Airway Colonization Factor for *Streptococcus Pneumoniae*." *Molecular Oral Microbiology* 27, no. 4 (August 2012): 270–83.
- Brown, Jeremy S., Tracy Hussell, Sarah M. Gilliland, David W. Holden, James C. Paton, Michael R. Ehrenstein, Mark J. Walport, and Marina Botto. "The Classical Pathway Is the Dominant Complement Pathway Required for Innate Immunity to *Streptococcus Pneumoniae* Infection in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, no. 26 (December 24, 2002): 16969–74.
- Budd, R. C., G. C. Miescher, R. C. Howe, R. K. Lees, C. Bron, and H. R. MacDonald. "Developmentally Regulated Expression of T Cell Receptor Beta Chain Variable Domains in Immature Thymocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 166, no. 2 (August 1, 1987): 577–82.
- Cardell, S., S. Tangri, S. Chan, M. Kronenberg, C. Benoist, and D. Mathis. "CD1-Restricted CD4+ T Cells in Major Histocompatibility Complex Class II-Deficient Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 182, no. 4 (October 1, 1995): 993–1004.
- Chen, Grace, Michael H. Shaw, Yun-Gi Kim, and Gabriel Nuñez. "NOD-like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease." *Annual Review of Pathology* 4 (2009): 365–98. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239.
- Chen, I.-Yin, and Takeshi Ichinohe. "Response of Host Inflammasomes to Viral Infection." *Trends in Microbiology* 23, no. 1 (January 2015): 55–63.
- Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, et al. "A Novel Influenza A Virus Mitochondrial Protein That Induces Cell Death." *Nature Medicine* 7, no. 12 (December 2001): 1306–12.
- Cheung, Timothy K. W., and Leo L. M. Poon. "Biology of Influenza a Virus." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1102 (April 2007): 1–25.
- Christaki, Eirini, Evdoxia Diza, Evangelos J. Giamarellos-Bourboulis, Nikoletta Papadopoulou, Aikaterini Pistiki, Dionysia-Irini Droggiti, Marianna Georgitsi, et al. "NK and NKT Cell Depletion Alters the Outcome of Experimental Pneumococcal Pneumonia: Relationship with Regulation of Interferon- γ Production." *Journal of Immunology Research* 2015 (2015): 532717.
- Chun, Taehoon, Michael J. Page, Laurent Gapin, Jennifer L. Matsuda, Honglin Xu, Hanh Nguyen, Hyung-Sik Kang, et al. "CD1d-Expressing Dendritic Cells but Not Thymic Epithelial Cells Can Mediate Negative Selection of NKT Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 197, no. 7 (April 7, 2003): 907–18.
- Colamussi, M. L., M. R. White, E. Crouch, and K. L. Hartshorn. "Influenza A Virus Accelerates Neutrophil Apoptosis and Markedly Potentiates Apoptotic Effects of Bacteria." *Blood* 93, no. 7 (April 1, 1999): 2395–2403.
- Cox, N. J., and K. Subbarao. "Global Epidemiology of Influenza: Past and Present." *Annual Review of Medicine* 51 (2000): 407–21.

- Crosby, Alfred W. "America's Forgotten Pandemic | Twentieth Century American History Cambridge University Press," 1989.
- Crowe, Nadine Y., Mark J. Smyth, and Dale I. Godfrey. "A Critical Role for Natural Killer T Cells in Immunosurveillance of Methylcholanthrene-Induced Sarcomas." *The Journal of Experimental Medicine* 196, no. 1 (July 1, 2002): 119–27.
- Cui, J., T. Shin, T. Kawano, H. Sato, E. Kondo, I. Taura, Y. Kaneko, H. Koseki, M. Kanno, and M. Taniguchi. "Requirement for Valpha14 NKT Cells in IL-12-Mediated Rejection of Tumors." *Science (New York, N.Y.)* 278, no. 5343 (November 28, 1997): 1623–26.
- Cundell, D. R., N. P. Gerard, C. Gerard, I. Idanpaan-Heikkila, and E. I. Tuomanen. "Streptococcus Pneumoniae Anchor to Activated Human Cells by the Receptor for Platelet-Activating Factor." *Nature* 377, no. 6548 (October 5, 1995): 435–38.
- Damjanovic, Daniela, Rocky Lai, Mangalakumari Jeyanathan, Cory M. Hogaboam, and Zhou Xing. "Marked Improvement of Severe Lung Immunopathology by Influenza-Associated Pneumococcal Superinfection Requires the Control of Both Bacterial Replication and Host Immune Responses." *The American Journal of Pathology* 183, no. 3 (September 2013): 868–80.
- D'Cruz, Louise M., Cliff Y. Yang, and Ananda W. Goldrath. "Transcriptional Regulation of NKT Cell Development and Homeostasis." *Current Opinion in Immunology* 22, no. 2 (April 2010): 199–205.
- Dellabona, P., E. Padovan, G. Casorati, M. Brockhaus, and A. Lanzavecchia. "An Invariant V Alpha 24-J Alpha Q/V Beta 11 T Cell Receptor Is Expressed in All Individuals by Clonally Expanded CD4-8- T Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 180, no. 3 (September 1, 1994): 1171–76.
- De Santo, Carmela, Mariolina Salio, S. Hajar Masri, Laurel Yong-Hwa Lee, Tao Dong, Anneliese O. Speak, Stefan Porubsky, et al. "Invariant NKT Cells Reduce the Immunosuppressive Activity of Influenza A Virus–induced Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mice and Humans." *The Journal of Clinical Investigation* 118, no. 12 (December 1, 2008): 4036–48.
- Dessing, Mark C., Marcel Schouten, Christian Draing, Marcel Levi, Sonja von Aulock, and Tom van der Poll. "Role Played by Toll-like Receptors 2 and 4 in Lipoteichoic Acid-Induced Lung Inflammation and Coagulation." *The Journal of Infectious Diseases* 197, no. 2 (January 15, 2008): 245–52.
- Dessing, Mark C., Koenraad F. van der Sluijs, Sandrine Florquin, Shizuo Akira, and Tom van der Poll. "Toll-like Receptor 2 Does Not Contribute to Host Response during Postinfluenza Pneumococcal Pneumonia." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 36, no. 5 (May 2007): 609–14.
- Didierlaurent, Arnaud, John Goulding, Seema Patel, Robert Snelgrove, Lionel Low, Magali Bebien, Toby Lawrence, et al. "Sustained Desensitization to Bacterial Toll-like Receptor Ligands after Resolution of Respiratory Influenza Infection." *The Journal of Experimental Medicine* 205, no. 2 (February 18, 2008): 323–29.
- Diebold, Sandra S., Tsuneyasu Kaisho, Hiroaki Hemmi, Shizuo Akira, and Caetano Reis e Sousa. "Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA." *Science (New York, N.Y.)* 303, no. 5663 (March 5, 2004): 1529–31.
- Dockrell, David H., Helen M. Marriott, Lynne R. Prince, Victoria C. Ridger, Paul G. Ince, Paul G. Hellewell, and Moira K. B. Whyte. "Alveolar Macrophage Apoptosis Contributes to Pneumococcal Clearance in a Resolving Model of Pulmonary Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171, no. 10 (November 15, 2003): 5380–88.
- Doisne, Jean-Marc, Laurent Bartholin, Kai-Ping Yan, Céline N. Garcia, Nadia Duarte, Jean-Benoît Le Luëdec, David Vincent, et al. "iNKT Cell Development Is Orchestrated by Different Branches of TGF-Beta Signaling." *The Journal of Experimental Medicine* 206, no. 6 (June 8, 2009): 1365–78.
- Doisne, Jean-Marc, Valérie Soulard, Chantal Bécourt, Latiffa Amniai, Pauline Henrot, Colin Havenar-Daughton, Charlène Blanchet, et al. "Cutting Edge: Crucial Role of IL-1 and IL-23 in the Innate IL-17 Response of

- Peripheral Lymph Node NK1.1- Invariant NKT Cells to Bacteria." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186, no. 2 (January 15, 2011): 662–66.
- Dorrington, Michael G., Aoife M. Roche, Sarah E. Chauvin, Zhongyuan Tu, Karen L. Mossman, Jeffrey N. Weiser, and Dawn M. E. Bowdish. "MARCO Is Required for TLR2- and Nod2-Mediated Responses to *Streptococcus Pneumoniae* and Clearance of Pneumococcal Colonization in the Murine Nasopharynx." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190, no. 1 (January 1, 2013): 250–58.
- Draing, Christian, Markus Pfitzenmaier, Sebastiana Zummo, Giuseppe Mancuso, Armin Geyer, Thomas Hartung, and Sonja von Aulock. "Comparison of Lipoteichoic Acid from Different Serotypes of *Streptococcus Pneumoniae*." *The Journal of Biological Chemistry* 281, no. 45 (November 10, 2006): 33849–59.
- Dudakov, Jarrod A., Alan M. Hanash, and Marcel R. M. van den Brink. "Interleukin-22: Immunobiology and Pathology." *Annual Review of Immunology* 33 (2015): 747–85.
- Duthie, Malcolm S., Maria Kahn, Maria White, Raj P. Kapur, and Stuart J. Kahn. "Critical Proinflammatory and Anti-Inflammatory Functions of Different Subsets of CD1d-Restricted Natural Killer T Cells during *Trypanosoma Cruzi* Infection." *Infection and Immunity* 73, no. 1 (January 2005): 181–92.
- Eberl, G., and H. R. MacDonald. "Rapid Death and Regeneration of NKT Cells in Anti-CD3epsilon- or IL-12-Treated Mice: A Major Role for Bone Marrow in NKT Cell Homeostasis." *Immunity* 9, no. 3 (September 1998): 345–53.
- Eberl, Gérard, Rosemary Lees, Stephen T. Smiley, Masaru Taniguchi, Michael J. Grusby, and H. Robson MacDonald. "Tissue-Specific Segregation of CD1d-Dependent and CD1d-Independent NK T Cells." *The Journal of Immunology* 162, no. 11 (June 1, 1999): 6410–19.
- Echchannaoui, Hakim, Karl Frei, Christian Schnell, Stephen L. Leib, Werner Zimmerli, and Regine Landmann. "Toll-like Receptor 2-Deficient Mice Are Highly Susceptible to *Streptococcus Pneumoniae* Meningitis because of Reduced Bacterial Clearing and Enhanced Inflammation." *The Journal of Infectious Diseases* 186, no. 6 (September 15, 2002): 798–806.
- Ellis, Gregory T., Sophia Davidson, Stefania Crotta, Nora Branzk, Venizelos Papayannopoulos, and Andreas Wack. "TRAIL+ Monocytes and Monocyte-Related Cells Cause Lung Damage and Thereby Increase Susceptibility to Influenza-*Streptococcus Pneumoniae* Coinfection." *EMBO Reports* 16, no. 9 (September 2015): 1203–18.
- Exley, Mark A., Qi He, Olivia Cheng, Ruo-Jie Wang, Catherine P. Cheney, Steven P. Balk, and Margaret J. Koziel. "Cutting Edge: Compartmentalization of Th1-like Noninvariant CD1d-Reactive T Cells in Hepatitis C Virus-Infected Liver." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168, no. 4 (February 15, 2002): 1519–23.
- Farnworth, Sarah L., Neil C. Henderson, Alison C. Mackinnon, Kirsten M. Atkinson, Tom Wilkinson, Kevin Dhaliwal, Katsutoshi Hayashi, et al. "Galectin-3 Reduces the Severity of Pneumococcal Pneumonia by Augmenting Neutrophil Function." *The American Journal of Pathology* 172, no. 2 (February 2008): 395–405.
- Feldman, C., T. J. Mitchell, P. W. Andrew, G. J. Boulnois, R. C. Read, H. C. Todd, P. J. Cole, and R. Wilson. "The Effect of *Streptococcus Pneumoniae* Pneumolysin on Human Respiratory Epithelium in Vitro." *Microbial Pathogenesis* 9, no. 4 (October 1990): 275–84.
- Fowlkes, B. J., A. M. Kruisbeek, H. Ton-That, M. A. Weston, J. E. Coligan, R. H. Schwartz, and D. M. Pardoll. "A Novel Population of T-Cell Receptor Alpha Beta-Bearing Thymocytes Which Predominantly Expresses a Single V Beta Gene Family." *Nature* 329, no. 6136 (September 17, 1987): 251–54.
- Furlan, Roberto, Alessandra Bergami, Daniela Cantarella, Elena Brambilla, Masaru Taniguchi, Paolo Dellabona, Giulia Casorati, and Gianvito Martino. "Activation of Invariant NKT Cells by alphaGalCer Administration Protects Mice from MOG35-55-Induced EAE: Critical Roles for Administration Route and IFN-Gamma." *European Journal of Immunology* 33, no. 7 (July 2003): 1830–38.
- Galli, Grazia, Sandra Nuti, Simona Tavarini, Luisa Galli-Stampino, Claudia De Lalla, Giulia Casorati, Paolo Dellabona, and Sergio Abrignani. "CD1d-Restricted Help to B Cells by Human Invariant Natural Killer T Lymphocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 197, no. 8 (April 21, 2003): 1051–57.

- Galli, Grazia, Paola Pittoni, Elena Tonti, Carmine Malzone, Yasushi Uematsu, Marco Tortoli, Domenico Maione, et al. "Invariant NKT Cells Sustain Specific B Cell Responses and Memory." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, no. 10 (March 6, 2007): 3984–89.
- Gapin, L., J. L. Matsuda, C. D. Surh, and M. Kronenberg. "NKT Cells Derive from Double-Positive Thymocytes That Are Positively Selected by CD1d." *Nature Immunology* 2, no. 10 (October 2001): 971–78.
- Geissmann, Frederic, Thomas O. Cameron, Stephane Sidobre, Natasha Manlongat, Mitchell Kronenberg, Michael J. Briskin, Michael L. Dustin, and Dan R. Littman. "Intravascular Immune Surveillance by CXCR6+ NKT Cells Patrolling Liver Sinusoids." *PLoS Biology* 3, no. 4 (April 2005): e113.
- Ghendon, Y. "Introduction to Pandemic Influenza through History." *European Journal of Epidemiology* 10, no. 4 (August 1994): 451–53.
- Ghoneim, Hazem E., and Jonathan A. McCullers. "Adjunctive Corticosteroid Therapy Improves Lung Immunopathology and Survival during Severe Secondary Pneumococcal Pneumonia in Mice." *The Journal of Infectious Diseases* 209, no. 9 (May 1, 2014): 1459–68.
- Ghoneim, Hazem E., Paul G. Thomas, and Jonathan A. McCullers. "Depletion of Alveolar Macrophages during Influenza Infection Facilitates Bacterial Superinfections." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191, no. 3 (August 1, 2013): 1250–59.
- Glezen, W. P., L. H. Taber, A. L. Frank, W. C. Gruber, and P. A. Piedra. "Influenza Virus Infections in Infants." *The Pediatric Infectious Disease Journal* 16, no. 11 (November 1997): 1065–68.
- Gonzalez, Santiago F., Veronika Lukacs-Kornek, Michael P. Kuligowski, Lisa A. Pitcher, Søren E. Degn, Young-A. Kim, Mary J. Cloninger, et al. "Capture of Influenza by Medullary Dendritic Cells via SIGN-R1 Is Essential for Humoral Immunity in Draining Lymph Nodes." *Nature Immunology* 11, no. 5 (May 2010): 427–34.
- Gonzalez-Aseguinolaza, Gloria, Luc Van Kaer, Cornelia C. Bergmann, James M. Wilson, John Schmiegl, Mitchell Kronenberg, Toshinori Nakayama, Masaru Taniguchi, Yasuhiko Koezuka, and Moriya Tsuji. "Natural Killer T Cell Ligand Alpha-Galactosylceramide Enhances Protective Immunity Induced by Malaria Vaccines." *The Journal of Experimental Medicine* 195, no. 5 (March 4, 2002): 617–24.
- Gordy, Laura E., Jelena S. Bezbradica, Andrew I. Flyak, Charles T. Spencer, Alexis Dunkle, Jingchun Sun, Aleksandar K. Stanic, et al. "IL-15 Regulates Homeostasis and Terminal Maturation of NKT Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187, no. 12 (December 15, 2011): 6335–45.
- Gosink, K. K., E. R. Mann, C. Guglielmo, E. I. Tuomanen, and H. R. Masure. "Role of Novel Choline Binding Proteins in Virulence of *Streptococcus Pneumoniae*." *Infection and Immunity* 68, no. 10 (October 2000): 5690–95.
- Grubor-Bauk, Branka, Jane Louise Arthur, and Graham Mayrhofer. "Importance of NKT Cells in Resistance to Herpes Simplex Virus, Fate of Virus-Infected Neurons, and Level of Latency in Mice." *Journal of Virology* 82, no. 22 (November 2008): 11073–83.
- Guillot, Loïc, Ronan Le Goffic, Sarah Bloch, Nicolas Escriou, Shizuo Akira, Michel Chignard, and Mustapha Si-Tahar. "Involvement of Toll-like Receptor 3 in the Immune Response of Lung Epithelial Cells to Double-Stranded RNA and Influenza A Virus." *The Journal of Biological Chemistry* 280, no. 7 (February 18, 2005): 5571–80.
- Guo, Hailong, and David J. Topham. "Interleukin-22 (IL-22) Production by Pulmonary Natural Killer Cells and the Potential Role of IL-22 during Primary Influenza Virus Infection." *Journal of Virology* 84, no. 15 (August 2010): 7750–59.
- Hachem, Patricia, Mariette Lisbonne, Marie-Laure Michel, Séverine Diem, Sukit Roongapinun, Jean Lefort, Gilles Marchal, et al. "Alpha-Galactosylceramide-Induced iNKT Cells Suppress Experimental Allergic Asthma in Sensitized Mice: Role of IFN-Gamma." *European Journal of Immunology* 35, no. 10 (October 2005): 2793–2802.

- Hak, Eelko, James Nordin, Feifei Wei, John Mullooly, Sung Poblete, Raymond Strikas, and Kristin L. Nichol. "Influence of High-Risk Medical Conditions on the Effectiveness of Influenza Vaccination among Elderly Members of 3 Large Managed-Care Organizations." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 35, no. 4 (August 15, 2002): 370–77
- Hammond, K. J., D. G. Pellicci, L. D. Poulton, O. V. Naidenko, A. A. Scalzo, A. G. Baxter, and D. I. Godfrey. "CD1d-Restricted NKT Cells: An Interstrain Comparison." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167, no. 3 (August 1, 2001): 1164–73.
- Hammond, K. J. L., and D. I. Godfrey. "NKT Cells: Potential Targets for Autoimmune Disease Therapy?" *Tissue Antigens* 59, no. 5 (May 2002): 353–63.
- Harris, Audray, Giovanni Cardone, Dennis C. Winkler, J. Bernard Heymann, Matthew Brecher, Judith M. White, and Alasdair C. Steven. "Influenza Virus Pleiomorphy Characterized by Cryoelectron Tomography." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, no. 50 (December 12, 2006): 19123–27.
- Hashem, Anwar M., Caroline Gravel, Ze Chen, Yinglei Yi, Monika Tocchi, Bozena Jaentschke, Xingliang Fan, et al. "CD40 Ligand Preferentially Modulates Immune Response and Enhances Protection against Influenza Virus." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193, no. 2 (July 15, 2014): 722–34.
- Hemann, Emily A., Louisa E. Sjaastad, Ryan A. Langlois, and Kevin L. Legge. "Plasmacytoid Dendritic Cells Require Direct Infection to Sustain the Pulmonary Influenza A Virus-Specific CD8 T Cell Response." *Journal of Virology*, December 30, 2015.
- Hendriks, Jenny, Yanling Xiao, John W. A. Rossen, Koenraad F. van der Sluijs, Kazuo Sugamura, Naoto Ishii, and Jannie Borst. "During Viral Infection of the Respiratory Tract, CD27, 4-1BB, and OX40 Collectively Determine Formation of CD8+ Memory T Cells and Their Capacity for Secondary Expansion." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175, no. 3 (August 1, 2005): 1665–76.
- Herbold, Wiebke, Regina Maus, Ines Hahn, Nadine Ding, Mrigank Srivastava, John W. Christman, Matthias Mack, et al. "Importance of CXC Chemokine Receptor 2 in Alveolar Neutrophil and Exudate Macrophage Recruitment in Response to Pneumococcal Lung Infection." *Infection and Immunity* 78, no. 6 (June 2010): 2620–30.
- Ho, Adrian W. S., Nayana Prabhu, Richard John Betts, Moyar Qing Ge, Xilei Dai, Paul Edward Hutchinson, Fei Chuin Lew, et al. "Lung CD103+ Dendritic Cells Efficiently Transport Influenza Virus to the Lymph Node and Load Viral Antigen onto MHC Class I for Presentation to CD8 T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187, no. 11 (December 1, 2011): 6011–21.
- Ho, Ling-Pei, Laura Denney, Kerstin Luhn, Denise Teoh, Colin Clelland, and Andrew J. McMichael. "Activation of Invariant NKT Cells Enhances the Innate Immune Response and Improves the Disease Course in Influenza A Virus Infection." *European Journal of Immunology* 38, no. 7 (July 2008): 1913–22.
- Högner, Katrin, Thorsten Wolff, Stephan Pleschka, Stephanie Plog, Achim D. Gruber, Ulrich Kalinke, Hans-Dieter Walmrath, et al. "Macrophage-Expressed IFN- β Contributes to Apoptotic Alveolar Epithelial Cell Injury in Severe Influenza Virus Pneumonia." *PLoS Pathogens* 9, no. 2 (February 2013): e1003188.
- Huang, X., T. Liu, J. Muller, R. A. Levandowski, and Z. Ye. "Effect of Influenza Virus Matrix Protein and Viral RNA on Ribonucleoprotein Formation and Nuclear Export." *Virology* 287, no. 2 (September 1, 2001):
- Huang, Yunlong, Angelique Walstrom, Luwen Zhang, Yong Zhao, Min Cui, Ling Ye, and Jialin C. Zheng. "Type I Interferons and Interferon Regulatory Factors Regulate TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in HIV-1-Infected Macrophages." *PLoS One* 4, no. 4 (2009): e5397.
- Hufford, Matthew M., Graham Richardson, Haixia Zhou, Balaji Manicassamy, Adolfo García-Sastre, Richard I. Enelow, and Thomas J. Braciale. "Influenza-Infected Neutrophils within the Infected Lungs Act as Antigen Presenting Cells for Anti-Viral CD8(+) T Cells." *PLoS One* 7, no. 10 (2012): e46581.

- Hugues, Stéphanie. "Dynamics of Dendritic Cell-T Cell Interactions: A Role in T Cell Outcome." *Seminars in Immunopathology* 32, no. 3 (September 2010): 227–38.
- Hyams, Catherine, Emilie Camberlein, Jonathan M. Cohen, Katie Bax, and Jeremy S. Brown. "The Streptococcus Pneumoniae Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms." *Infection and Immunity* 78, no. 2 (February 2010): 704–15.
- Ichinohe, Takeshi, Heung Kyu Lee, Yasunori Ogura, Richard Flavell, and Akiko Iwasaki. "Inflammasome Recognition of Influenza Virus Is Essential for Adaptive Immune Responses." *The Journal of Experimental Medicine* 206, no. 1 (January 16, 2009): 79–87.
- Ichinohe, Takeshi, Iris K. Pang, and Akiko Iwasaki. "Influenza Virus Activates Inflammasomes via Its Intracellular M2 Ion Channel." *Nature Immunology* 11, no. 5 (May 2010): 404–10.
- Ichihara, S., M. Nieda, J. Kitayama, T. Osada, T. Yabe, Y. Ishikawa, H. Nagawa, T. Muto, and T. Juji. "CD8(+)NKR-P1A (+)T Cells Preferentially Accumulate in Human Liver." *European Journal of Immunology* 29, no. 8 (August 1999): 2406–13.
- Ivan, Fransiskus X., K. S. Tan, M. C. Phoon, Bevin P. Engelward, Roy E. Welsch, Jagath C. Rajapakse, and Vincent T. Chow. "Neutrophils Infected with Highly Virulent Influenza H3N2 Virus Exhibit Augmented Early Cell Death and Rapid Induction of Type I Interferon Signaling Pathways." *Genomics* 101, no. 2 (February 2013): 101–12.
- Ivanov, Stoyan, Josette Fontaine, Christophe Paget, Elodie Macho Fernandez, Laurye Van Maele, Joelle Renneson, Isabelle Maillet, et al. "Key Role for Respiratory CD103(+) Dendritic Cells, IFN- γ , and IL-17 in Protection against Streptococcus Pneumoniae Infection in Response to α -Galactosylceramide." *The Journal of Infectious Diseases* 206, no. 5 (September 1, 2012): 723–34.
- Iwabuchi, C., K. Iwabuchi, K. Nakagawa, T. Takayanagi, H. Nishihori, S. Tone, K. Ogasawara, R. A. Good, and K. Onoé. "Intrathymic Selection of NK1.1(+) α /beta T Cell Antigen Receptor (TCR)+ Cells in Transgenic Mice Bearing TCR Specific for Chicken Ovalbumin and Restricted to I-Ad." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, no. 14 (July 7, 1998): 8199–8204.
- Izurieta, H. S., W. W. Thompson, P. Kramarz, D. K. Shay, R. L. Davis, F. DeStefano, S. Black, H. Shinefield, and K. Fukuda. "Influenza and the Rates of Hospitalization for Respiratory Disease among Infants and Young Children." *The New England Journal of Medicine* 342, no. 4 (January 27, 2000): 232–39.
- Jaworska, Joanna, François Coulombe, Jeffrey Downey, Fanny Tzelepis, Karim Shalaby, Ivan Tattoli, Julie Berube, et al. "NLRX1 Prevents Mitochondrial Induced Apoptosis and Enhances Macrophage Antiviral Immunity by Interacting with Influenza Virus PB1-F2 Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, no. 20 (May 20, 2014): E2110–19.
- Jiang, Yongjun, Xiaojian Cui, Chen Cui, Jian Zhang, Fangyuan Zhou, Zining Zhang, Yajing Fu, et al. "The Function of CD3+CD56+ NKT-like Cells in HIV-Infected Individuals." *BioMed Research International* 2014 (2014): 863625.
- Johnson, Teresa R., Seokmann Hong, Luc Van Kaer, Yasuhiko Koezuka, and Barney S. Graham. "NK T Cells Contribute to Expansion of CD8(+) T Cells and Amplification of Antiviral Immune Responses to Respiratory Syncytial Virus." *Journal of Virology* 76, no. 9 (May 2002): 4294–4303.
- José, Ricardo, Andrew Williams, Michal Sulikowski, David Brealey, Jeremy Brown, and Rachel Chambers. "Regulation of Neutrophilic Inflammation in Lung Injury Induced by Community-Acquired Pneumonia." *Lancet (London, England)* 385 Suppl 1 (February 26, 2015): S52.
- Jounblat, R., H. Clark, P. Eggleton, S. Hawgood, P. W. Andrew, and A. Kadioglu. "The Role of Surfactant Protein D in the Colonisation of the Respiratory Tract and Onset of Bacteraemia during Pneumococcal Pneumonia." *Respiratory Research* 6 (2005): 126.

- Kadioglu, Aras, William Coward, M. Joseph Colston, Colin R. A. Hewitt, and Peter W. Andrew. "CD4-T-Lymphocyte Interactions with Pneumolysin and Pneumococci Suggest a Crucial Protective Role in the Host Response to Pneumococcal Infection." *Infection and Immunity* 72, no. 5 (May 2004): 2689–97.
- Kaminski, Michael M., Annette Ohnemus, Marius Cornitescu, and Peter Staeheli. "Plasmacytoid Dendritic Cells and Toll-like Receptor 7-Dependent Signalling Promote Efficient Protection of Mice against Highly Virulent Influenza A Virus." *The Journal of General Virology* 93, no. Pt 3 (March 2012): 555–59.
- Kang, Young-Sun, Jae Y. Kim, Sandra A. Bruening, Maggi Pack, Anna Charalambous, Alla Pritsker, Thomas M. Moran, Jutta M. Loeffler, Ralph M. Steinman, and Chae Gyu Park. "The C-Type Lectin SIGN-R1 Mediates Uptake of the Capsular Polysaccharide of *Streptococcus Pneumoniae* in the Marginal Zone of Mouse Spleen." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, no. 1 (January 6, 2004): 215–20.
- Karlström, Asa, Kelli L. Boyd, B. Keith English, and Jonathan A. McCullers. "Treatment with Protein Synthesis Inhibitors Improves Outcomes of Secondary Bacterial Pneumonia after Influenza." *The Journal of Infectious Diseases* 199, no. 3 (February 1, 2009): 311–19.
- Karlström, Asa, Sarah M. Heston, Kelli L. Boyd, Elaine I. Tuomanen, and Jonathan A. McCullers. "Toll-like Receptor 2 Mediates Fatal Immunopathology in Mice during Treatment of Secondary Pneumococcal Pneumonia Following Influenza." *The Journal of Infectious Diseases* 204, no. 9 (November 2011): 1358–66.
- Karmakar, Mausita, Michael Katsnelson, Hesham A. Malak, Neil G. Greene, Scott J. Howell, Amy G. Hise, Andrew Camilli, Aras Kadioglu, George R. Dubyak, and Eric Pearlman. "Neutrophil IL-1 β Processing Induced by Pneumolysin Is Mediated by the NLRP3/ASC Inflammasome and Caspase-1 Activation and Is Dependent on K⁺ Efflux." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194, no. 4 (February 15, 2015): 1763–75.
- Kawakami, Kazuyoshi, Natsuo Yamamoto, Yuki Kinjo, Kazuya Miyagi, Chikara Nakasone, Kaori Uezu, Takeshi Kinjo, Toshinori Nakayama, Masaru Taniguchi, and Atsushi Saito. "Critical Role of Valpha14⁺ Natural Killer T Cells in the Innate Phase of Host Protection against *Streptococcus Pneumoniae* Infection." *European Journal of Immunology* 33, no. 12 (December 2003): 3322–30.
- Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, et al. "CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of valpha14 NKT Cells by Glycosylceramides." *Science (New York, N.Y.)* 278, no. 5343 (November 28, 1997): 1626–29.
- Kawasaki, Norihito, Jose Luis Vela, Corwin M. Nycholat, Christoph Rademacher, Archana Khurana, Nico van Rooijen, Paul R. Crocker, Mitchell Kronenberg, and James C. Paulson. "Targeted Delivery of Lipid Antigen to Macrophages via the CD169/sialoadhesin Endocytic Pathway Induces Robust Invariant Natural Killer T Cell Activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, no. 19 (May 7, 2013): 7826–31.
- Kerr, Alison R., Lea Ann S. Kirkham, Aras Kadioglu, Peter W. Andrew, Paul Garside, Hal Thompson, and Tim J. Mitchell. "Identification of a Detrimental Role for NK Cells in Pneumococcal Pneumonia and Sepsis in Immunocompromised Hosts." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 7, no. 5–6 (May 2005): 845–52.
- Khan, Abdul Q., Quanyi Chen, Zheng-Qi Wu, James C. Paton, and Clifford M. Snapper. "Both Innate Immunity and Type 1 Humoral Immunity to *Streptococcus Pneumoniae* Are Mediated by MyD88 but Differ in Their Relative Levels of Dependence on Toll-like Receptor 2." *Infection and Immunity* 73, no. 1 (January 2005): 298–307.
- Kim, Chang H., Brent Johnston, and Eugene C. Butcher. "Trafficking Machinery of NKT Cells: Shared and Differential Chemokine Receptor Expression among V Alpha 24(+)V Beta 11(+) NKT Cell Subsets with Distinct Cytokine-Producing Capacity." *Blood* 100, no. 1 (July 1, 2002): 11–16.
- King, Quinton O., Benfang Lei, and Allen G. Harmsen. "Pneumococcal Surface Protein A Contributes to Secondary *Streptococcus Pneumoniae* Infection after Influenza Virus Infection." *The Journal of Infectious Diseases* 200, no. 4 (August 15, 2009): 537–45.

- Kinjo, Yuki, Petr Illarionov, José Luis Vela, Bo Pei, Enrico Girardi, Xiangming Li, Yali Li, et al. "Invariant Natural Killer T Cells Recognize Glycolipids from Pathogenic Gram-Positive Bacteria." *Nature Immunology* 12, no. 10 (October 2011): 966–74.
- Kinjo, Yuki, Emmanuel Tupin, Douglass Wu, Masakazu Fujio, Raquel Garcia-Navarro, Mohammed Rafei-El-Idrissi Benhnia, Dirk M. Zajonc, et al. "Natural Killer T Cells Recognize Diacylglycerol Antigens from Pathogenic Bacteria." *Nature Immunology* 7, no. 9 (September 2006): 978–86.
- Kirby, A. C., D. J. Newton, S. R. Carding, and P. M. Kaye. "Pulmonary Dendritic Cells and Alveolar Macrophages Are Regulated by Gammadelta T Cells during the Resolution of *S. Pneumoniae*-Induced Inflammation." *The Journal of Pathology* 212, no. 1 (May 2007): 29–37.
- Kirby, Alun C., Mark C. Coles, and Paul M. Kaye. "Alveolar Macrophages Transport Pathogens to Lung Draining Lymph Nodes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183, no. 3 (August 1, 2009): 1983–89.
- Knapp, Sylvia, Jaklien C. Leemans, Sandrine Florquin, Judith Branger, Nico A. Maris, Jennie Pater, Nico van Rooijen, and Tom van der Poll. "Alveolar Macrophages Have a Protective Antiinflammatory Role during Murine Pneumococcal Pneumonia." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167, no. 2 (January 15, 2003): 171–79.
- Kobayashi, E., K. Motoki, T. Uchida, H. Fukushima, and Y. Koezuka. "KRN7000, a Novel Immunomodulator, and Its Antitumor Activities." *Oncology Research* 7, no. 10–11 (1995): 529–34.
- Kok, Wai Ling, Laura Denney, Kambez Benam, Suzanne Cole, Colin Clelland, Andrew J. McMichael, and Ling-Pei Ho. "Pivotal Advance: Invariant NKT Cells Reduce Accumulation of Inflammatory Monocytes in the Lungs and Decrease Immune-Pathology during Severe Influenza A Virus Infection." *Journal of Leukocyte Biology* 91, no. 3 (March 2012): 357–68.
- Koppel, Estella A., Catharina W. Wieland, Venice C. M. van den Berg, Manja Litjens, Sandrine Florquin, Yvette van Kooyk, Tom van der Poll, and Teunis B. H. Geijtenbeek. "Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin-Related 1 (SIGNR1) Expressed by Marginal Zone Macrophages Is Essential for Defense against Pulmonary *Streptococcus Pneumoniae* Infection." *European Journal of Immunology* 35, no. 10 (October 2005): 2962–69.
- Kovács, Márta, Alexander Halfmann, Iris Fedtke, Manuel Heintz, Andreas Peschel, Waldemar Vollmer, Regine Hakenbeck, and Reinhold Brückner. "A Functional Dlt Operon, Encoding Proteins Required for Incorporation of D-Alanine in Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria, Confers Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides in *Streptococcus Pneumoniae*." *Journal of Bacteriology* 188, no. 16 (August 2006): 5797–5805.
- Krug, Robert M., Weiming Yuan, Diana L. Noah, and Anita Ghate Latham. "Intracellular Warfare between Human Influenza Viruses and Human Cells: The Roles of the Viral NS1 Protein." *Virology* 309, no. 2 (May 10, 2003): 181–89.
- Kudva, Anupa, Erich V. Scheller, Keven M. Robinson, Chris R. Crowe, Sun Mi Choi, Samantha R. Slight, Shabaana A. Khader, et al. "Influenza A Inhibits Th17-Mediated Host Defense against Bacterial Pneumonia in Mice." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186, no. 3 (February 1, 2011): 1666–74.
- Kumar, H., A. Belperron, S. W. Barthold, and L. K. Bockenstedt. "Cutting Edge: CD1d Deficiency Impairs Murine Host Defense against the Spirochete, *Borrelia Burgdorferi*." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165, no. 9 (November 1, 2000): 4797–4801.
- Kumar, P., M. S. Thakar, W. Ouyang, and S. Malarkannan. "IL-22 from Conventional NK Cells Is Epithelial Regenerative and Inflammation Protective during Influenza Infection." *Mucosal Immunology* 6, no. 1 (January 2013): 69–82.
- Kuronuma, Koji, Hitomi Sano, Kazunori Kato, Kazumi Kudo, Naoki Hyakushima, Shin-ichi Yokota, Hiroki Takahashi, et al. "Pulmonary Surfactant Protein A Augments the Phagocytosis of *Streptococcus Pneumoniae* by Alveolar Macrophages through a Casein Kinase 2-Dependent Increase of Cell Surface Localization of Scavenger Receptor A." *The Journal of Biological Chemistry* 279, no. 20 (May 14, 2004): 21421–30.

- Langlet, Christelle, Samira Tamoutounour, Sandrine Henri, Hervé Luche, Laurence Ardouin, Claude Grégoire, Bernard Malissen, and Martin Williams. "CD64 Expression Distinguishes Monocyte-Derived and Conventional Dendritic Cells and Reveals Their Distinct Role during Intramuscular Immunization." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188, no. 4 (February 15, 2012): 1751–60.
- La Gruta, Nicole L., Stephen J. Turner, and Peter C. Doherty. "Hierarchies in Cytokine Expression Profiles for Acute and Resolving Influenza Virus-Specific CD8+ T Cell Responses: Correlation of Cytokine Profile and TCR Avidity." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172, no. 9 (May 1, 2004): 5553–60.
- Lanoue, Astrid, Menna R. Clatworthy, Philippa Smith, Sheila Green, Michael J. Townsend, Helen E. Jolin, Kenneth G. C. Smith, Padraic G. Fallon, and Andrew N. J. McKenzie. "SIGN-R1 Contributes to Protection against Lethal Pneumococcal Infection in Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 200, no. 11 (December 6, 2004): 1383–93.
- Lantz, O., and A. Bendelac. "An Invariant T Cell Receptor Alpha Chain Is Used by a Unique Subset of Major Histocompatibility Complex Class I-Specific CD4+ and CD4-8- T Cells in Mice and Humans." *The Journal of Experimental Medicine* 180, no. 3 (September 1, 1994): 1097–1106.
- Lazarevic, Vanja, Alfred J. Zullo, Michelle N. Schweitzer, Tracy L. Staton, Elena M. Gallo, Gerald R. Crabtree, and Laurie H. Glimcher. "The Gene Encoding Early Growth Response 2, a Target of the Transcription Factor NFAT, Is Required for the Development and Maturation of Natural Killer T Cells." *Nature Immunology* 10, no. 3 (March 2009): 306–13.
- Lee, Suki M. Y., Kin-Hang Kok, Martial Jaume, Timothy K. W. Cheung, Tsz-Fung Yip, Jimmy C. C. Lai, Yi Guan, Robert G. Webster, Dong-Yan Jin, and J. S. Malik Peiris. "Toll-like Receptor 10 Is Involved in Induction of Innate Immune Responses to Influenza Virus Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, no. 10 (March 11, 2014): 3793–98.
- Legendre, V., C. Boyer, S. Guerder, B. Arnold, G. Hämmerling, and A. M. Schmitt-Verhulst. "Selection of Phenotypically Distinct NK1.1+ T Cells upon Antigen Expression in the Thymus or in the Liver." *European Journal of Immunology* 29, no. 7 (July 1999): 2330–43. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(Legge, Kevin L., and Thomas J. Braciale. "Lymph Node Dendritic Cells Control CD8+ T Cell Responses through Regulated FasL Expression." *Immunity* 23, no. 6 (December 2005): 649–59.
- Legge, Kevin L., and Thomas J. Braciale. "Lymph Node Dendritic Cells Control CD8+ T Cell Responses through Regulated FasL Expression." *Immunity* 23, no. 6 (December 2005): 649–59.
- Le Goffic, Ronan, Olivier Leymarie, Christophe Chevalier, Emmanuelle Rebours, Bruno Da Costa, Jasmina Vidic, Delphine Descamps, et al. "Transcriptomic Analysis of Host Immune and Cell Death Responses Associated with the Influenza A Virus PB1-F2 Protein." *PLoS Pathogens* 7, no. 8 (August 2011): e1002202.
- Le Goffic, Ronan, Viviane Balloy, Micheline Lagranderie, Lena Alexopoulou, Nicolas Escriou, Richard Flavell, Michel Chignard, and Mustapha Si-Tahar. "Detrimental Contribution of the Toll-Like Receptor (TLR)3 to Influenza A Virus-Induced Acute Pneumonia." *PLoS Pathogens* 2, no. 6 (June 2006).
- Leite-De-Moraes, M. C., A. Hameg, A. Arnould, F. Machavoine, Y. Koezuka, E. Schneider, A. Herbelin, and M. Dy. "A Distinct IL-18-Induced Pathway to Fully Activate NK T Lymphocytes Independently from TCR Engagement." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163, no. 11 (December 1, 1999): 5871–76.
- LeMessurier, Kim, Hans Häcker, Elaine Tuomanen, and Vanessa Redecke. "Inhibition of T Cells Provides Protection against Early Invasive Pneumococcal Disease." *Infection and Immunity* 78, no. 12 (December 2010): 5287–94.
- Lemon, Jamie K., Megan R. Miller, and Jeffrey N. Weiser. "Sensing of Interleukin-1 Cytokines during Streptococcus Pneumoniae Colonization Contributes to Macrophage Recruitment and Bacterial Clearance." *Infection and Immunity* 83, no. 8 (August 2015): 3204–12.
- Lester, Sandra N., and Kui Li. "Toll-like Receptors in Antiviral Innate Immunity." *Journal of Molecular Biology* 426, no. 6 (March 20, 2014): 1246–64.

- Li, Wenjing, Bruno Moltedo, and Thomas M. Moran. "Type I Interferon Induction during Influenza Virus Infection Increases Susceptibility to Secondary Streptococcus Pneumoniae Infection by Negative Regulation of $\gamma\delta$ T Cells." *Journal of Virology* 86, no. 22 (November 2012): 12304–12.
- Liu, Xinjie, Vinita S. Chauhan, Amy B. Young, and Ian Marriott. "NOD2 Mediates Inflammatory Responses of Primary Murine Glia to Streptococcus Pneumoniae." *Glia* 58, no. 7 (May 2010): 839–47.
- Lodolce, J. P., D. L. Boone, S. Chai, R. E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma. "IL-15 Receptor Maintains Lymphoid Homeostasis by Supporting Lymphocyte Homing and Proliferation." *Immunity* 9, no. 5 (November 1998): 669–76.
- Lotter, Hannelore, Nestor González-Roldán, Buko Lindner, Florian Winau, Armando Isibasi, Martha Moreno-Lafont, Artur J. Ulmer, Otto Holst, Egbert Tannich, and Thomas Jacobs. "Natural Killer T Cells Activated by a Lipopeptidophosphoglycan from Entamoeba Histolytica Are Critically Important to Control Amebic Liver Abscess." *PLoS Pathogens* 5, no. 5 (May 2009): e1000434.
- Macho-Fernandez, Elodie, Luis Javier Cruz, Reem Ghinnagow, Josette Fontaine, Emilie Bialecki, Benoit Frisch, François Trottein, and Christelle Faveeuw. "Targeted Delivery of α -Galactosylceramide to CD8 α + Dendritic Cells Optimizes Type I NKT Cell-Based Antitumor Responses." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193, no. 2 (July 15, 2014): 961–69.
- Major, Amy S., Michael T. Wilson, Jennifer L. McCaleb, Yan Ru Su, Aleksandar K. Stanic, Sebastian Joyce, Luc Van Kaer, Sergio Fazio, and Macrae F. Linton. "Quantitative and Qualitative Differences in Proatherogenic NKT Cells in Apolipoprotein E-Deficient Mice." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24, no. 12 (December 2004): 2351–57.
- Mallevaey, Thierry, Josette Fontaine, Laetitia Breuilh, Christophe Paget, Alexandre Castro-Keller, Catherine Vendeville, Monique Capron, Maria Leite-de-Moraes, François Trottein, and Christelle Faveeuw. "Invariant and Noninvariant Natural Killer T Cells Exert Opposite Regulatory Functions on the Immune Response during Murine Schistosomiasis." *Infection and Immunity* 75, no. 5 (May 2007): 2171–80.
- Malley, Richard, Philipp Henneke, Sarah C. Morse, Michael J. Cieslewicz, Marc Lipsitch, Claudette M. Thompson, Evelyn Kurt-Jones, James C. Paton, Michael R. Wessels, and Douglas T. Golenbock. "Recognition of Pneumolysin by Toll-like Receptor 4 Confers Resistance to Pneumococcal Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 4 (February 18, 2003): 1966–71.
- Matangkasombut, Ponpan, Wilawan Chan-In, Anunya Opasawaschai, Pisut Pongchaikul, Nattaya Tangthawornchaikul, Sirijitt Vasanawathana, Wannee Limpitikul, et al. "Invariant NKT Cell Response to Dengue Virus Infection in Human." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, no. 6 (June 2014): e2955.
- Martner, Anna, Claes Dahlgren, James C. Paton, and Agnes E. Wold. "Pneumolysin Released during Streptococcus Pneumoniae Autolysis Is a Potent Activator of Intracellular Oxygen Radical Production in Neutrophils." *Infection and Immunity* 76, no. 9 (September 2008): 4079–87.
- Matsuda, Hiroyuki, Takafumi Suda, Jun Sato, Toshi Nagata, Yukio Koide, Kingo Chida, and Hirotohi Nakamura. "Alpha-Galactosylceramide, a Ligand of Natural Killer T Cells, Inhibits Allergic Airway Inflammation." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 33, no. 1 (July 2005): 22–31.
- Matsuda, Jennifer L., Laurent Gapin, Stéphane Sidobre, William C. Kieper, Joyce T. Tan, Rhodri Ceredig, Charles D. Surh, and Mitchell Kronenberg. "Homeostasis of V Alpha 14i NKT Cells." *Nature Immunology* 3, no. 10 (October 2002): 966–74.
- Matsuda, J. L., O. V. Naidenko, L. Gapin, T. Nakayama, M. Taniguchi, C. R. Wang, Y. Koezuka, and M. Kronenberg. "Tracking the Response of Natural Killer T Cells to a Glycolipid Antigen Using CD1d Tetramers." *The Journal of Experimental Medicine* 192, no. 5 (September 4, 2000): 741–54.
- Mattner, Jochen, Kristin L. Debord, Nahed Ismail, Randal D. Goff, Carlos Cantu, Dapeng Zhou, Pierre Saint-Mezard, et al. "Exogenous and Endogenous Glycolipid Antigens Activate NKT Cells during Microbial Infections." *Nature* 434, no. 7032 (March 24, 2005): 525–29.

- McAuley, Julie L., Felicita Hornung, Kelli L. Boyd, Amber M. Smith, Raelene McKeon, Jack Bennink, Jonathan W. Yewdell, and Jonathan A. McCullers. "Expression of the 1918 Influenza A Virus PB1-F2 Enhances the Pathogenesis of Viral and Secondary Bacterial Pneumonia." *Cell Host & Microbe* 2, no. 4 (October 11, 2007): 240–49.
- McCool, Tera L., and Jeffrey N. Weiser. "Limited Role of Antibody in Clearance of Streptococcus Pneumoniae in a Murine Model of Colonization." *Infection and Immunity* 72, no. 10 (October 2004): 5807–13.
- McCullers, Jonathan A., and Kimberly C. Bartmess. "Role of Neuraminidase in Lethal Synergism between Influenza Virus and Streptococcus Pneumoniae." *The Journal of Infectious Diseases* 187, no. 6 (March 15, 2003): 1000–1009.
- McCullers, Jonathan A., Amy R. Iverson, Raelene McKeon, and Peter J. Murray. "The Platelet Activating Factor Receptor Is Not Required for Exacerbation of Bacterial Pneumonia Following Influenza." *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 40, no. 1 (2008): 11–17.
- McCullers, Jonathan A. "Effect of Antiviral Treatment on the Outcome of Secondary Bacterial Pneumonia after Influenza." *The Journal of Infectious Diseases* 190, no. 3 (August 1, 2004): 519–26.
- McGill, Jodi, Nico Van Rooijen, and Kevin L. Legge. "Protective Influenza-Specific CD8 T Cell Responses Require Interactions with Dendritic Cells in the Lungs." *The Journal of Experimental Medicine* 205, no. 7 (July 7, 2008): 1635–46.
- McGill, Jodi, Nico Van Rooijen, and Kevin L. Legge. "IL-15 Trans-Presentation by Pulmonary Dendritic Cells Promotes Effector CD8 T Cell Survival during Influenza Virus Infection." *The Journal of Experimental Medicine* 207, no. 3 (March 15, 2010): 521–34.
- McKinstry, K. Kai, Tara M. Strutt, Amanda Buck, Jonathan D. Curtis, John P. Dibble, Gail Huston, Michael Tighe, et al. "IL-10 Deficiency Unleashes an Influenza-Specific Th17 Response and Enhances Survival against High-Dose Challenge." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, no. 12 (June 15, 2009): 7353–63.
- McNamee, Lynnelle A., and Allen G. Harmsen. "Both Influenza-Induced Neutrophil Dysfunction and Neutrophil-Independent Mechanisms Contribute to Increased Susceptibility to a Secondary Streptococcus Pneumoniae Infection." *Infection and Immunity* 74, no. 12 (December 2006): 6707–21.
- McNeela, Edel A., Aine Burke, Daniel R. Neill, Cathy Baxter, Vitor E. Fernandes, Daniela Ferreira, Sarah Smeaton, et al. "Pneumolysin Activates the NLRP3 Inflammasome and Promotes Proinflammatory Cytokines Independently of TLR4." *PLoS Pathogens* 6, no. 11 (2010): e1001191.
- Michel, Marie-Laure, Alexandre Castro Keller, Christophe Paget, Masakazu Fujio, François Trottein, Paul B. Savage, Chi-Huey Wong, Elke Schneider, Michel Dy, and Maria C. Leite-de-Moraes. "Identification of an IL-17-Producing NK1.1(neg) iNKT Cell Population Involved in Airway Neutrophilia." *The Journal of Experimental Medicine* 204, no. 5 (May 14, 2007): 995–1001.
- Mifsud, Edin J., Amabel C. L. Tan, and David C. Jackson. "TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease." *Frontiers in Immunology* 5 (March 3, 2014).
- Miyamoto, K., S. Miyake, and T. Yamamura. "A Synthetic Glycolipid Prevents Autoimmune Encephalomyelitis by Inducing TH2 Bias of Natural Killer T Cells." *Nature* 413, no. 6855 (October 4, 2001): 531–34.
- Mizoguchi, Atsushi. "Healing of Intestinal Inflammation by IL-22." *Inflammatory Bowel Diseases* 18, no. 9 (September 1, 2012): 1777–84.
- Monto, A. S., S. Gravenstein, M. Elliott, M. Colopy, and J. Schweinle. "Clinical Signs and Symptoms Predicting Influenza Infection." *Archives of Internal Medicine* 160, no. 21 (November 27, 2000): 3243–47.
- Moody, D. Branch, Dirk M. Zajonc, and Ian A. Wilson. "Anatomy of CD1-Lipid Antigen Complexes." *Nature Reviews. Immunology* 5, no. 5 (May 2005): 387–99.

- Morens, David M., Jeffery K. Taubenberger, and Anthony S. Fauci. "Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness." *The Journal of Infectious Diseases* 198, no. 7 (October 1, 2008): 962–70.
- Mori, Yuka, Masaya Yamaguchi, Yutaka Terao, Shigeyuki Hamada, Takashi Ooshima, and Shigetada Kawabata. "α-Enolase of *Streptococcus Pneumoniae* Induces Formation of Neutrophil Extracellular Traps." *The Journal of Biological Chemistry* 287, no. 13 (March 23, 2012): 10472–81.
- Morita, M., K. Motoki, K. Akimoto, T. Natori, T. Sakai, E. Sawa, K. Yamaji, Y. Koezuka, E. Kobayashi, and H. Fukushima. "Structure-Activity Relationship of Alpha-Galactosylceramides against B16-Bearing Mice." *Journal of Medicinal Chemistry* 38, no. 12 (June 9, 1995): 2176–87.
- Motohashi, Shinichiro, Yoshitaka Okamoto, Ichiro Yoshino, and Toshinori Nakayama. "Anti-Tumor Immune Responses Induced by iNKT Cell-Based Immunotherapy for Lung Cancer and Head and Neck Cancer." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 140, no. 2 (August 2011): 167–76.
- Muñoz, Natalia, Laurye Van Maele, Juan M. Marqués, Analía Rial, Jean-Claude Sirard, and José A. Chabalgoity. "Mucosal Administration of Flagellin Protects Mice from *Streptococcus Pneumoniae* Lung Infection." *Infection and Immunity* 78, no. 10 (October 2010): 4226–33.
- Murdoch, Craig, Robert C. Read, Qibo Zhang, and Adam Finn. "Choline-Binding Protein A of *Streptococcus Pneumoniae* Elicits Chemokine Production and Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (CD54) by Human Alveolar Epithelial Cells." *The Journal of Infectious Diseases* 186, no. 9 (November 1, 2002): 1253–60.
- Murphy, Jane E., Philip R. Tedbury, Shervanthi Homer-Vanniasinkam, John H. Walker, and Sreenivasan Ponnambalam. "Biochemistry and Cell Biology of Mammalian Scavenger Receptors." *Atherosclerosis* 182, no. 1 (September 2005): 1–15.
- Musie, Edgar, Christopher C. Moore, Edward N. Martin, and W. Michael Scheld. "Toll-like Receptor 4 Stimulation before or after *Streptococcus Pneumoniae* Induced Sepsis Improves Survival and Is Dependent on T-Cells." *PLoS One* 9, no. 1 (2014): e86015.
- Mycko, Marcin P., Isabel Ferrero, Anne Wilson, Wei Jiang, Teresa Bianchi, Andreas Trumpp, and H. Robson MacDonald. "Selective Requirement for c-Myc at an Early Stage of V(α)14i NKT Cell Development." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, no. 8 (April 15, 2009): 4641–48.
- Nagarajan, Niranjana A., and Mitchell Kronenberg. "Invariant NKT Cells Amplify the Innate Immune Response to Lipopolysaccharide." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178, no. 5 (March 1, 2007): 2706–13.
- Nakai, Yukihito, Kazuya Iwabuchi, Satoshi Fujii, Naoki Ishimori, Nyambayar Dashtsoodol, Keiko Watano, Tetsuya Mishima, et al. "Natural Killer T Cells Accelerate Atherogenesis in Mice." *Blood* 104, no. 7 (October 1, 2004): 2051–59.
- Nakamatsu, Masashi, Natsuo Yamamoto, Masumitsu Hatta, Chikara Nakasone, Takeshi Kinjo, Kazuya Miyagi, Kaori Uezu, et al. "Role of Interferon-Gamma in Vα14+ Natural Killer T Cell-Mediated Host Defense against *Streptococcus Pneumoniae* Infection in Murine Lungs." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 9, no. 3 (March 2007): 364–74.
- Nakasone, Chikara, Natsuo Yamamoto, Masashi Nakamatsu, Takeshi Kinjo, Kazuya Miyagi, Kaori Uezu, Kiwamu Nakamura, et al. "Accumulation of Gamma/delta T Cells in the Lungs and Their Roles in Neutrophil-Mediated Host Defense against Pneumococcal Infection." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 9, no. 3 (March 2007): 251–58.
- Nelson, Aaron L., Aoife M. Roche, Jane M. Gould, Kannie Chim, Adam J. Ratner, and Jeffrey N. Weiser. "Capsule Enhances Pneumococcal Colonization by Limiting Mucus-Mediated Clearance." *Infection and Immunity* 75, no. 1 (January 2007): 83–90.
- Nicholson, Karl G., John M. Wood, and Maria Zambon. "Influenza." *Lancet (London, England)* 362, no. 9397 (November 22, 2003): 1733–45.

- Nicholson, K. G. "Impact of Influenza and Respiratory Syncytial Virus on Mortality in England and Wales from January 1975 to December 1990." *Epidemiology and Infection* 116, no. 1 (February 1996): 51–63.
- Nieuwenhuis, Edward E. S., Tetsuya Matsumoto, Mark Exley, Robbert A. Schleipman, Jonathan Glickman, Dan T. Bailey, Nadia Corazza, Sean P. Colgan, Andrew B. Onderdonk, and Richard S. Blumberg. "CD1d-Dependent Macrophage-Mediated Clearance of *Pseudomonas Aeruginosa* from Lung." *Nature Medicine* 8, no. 6 (June 2002): 588–93.
- Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Fatimah S. Dawood, Seema Jain, Lyn Finelli, Michael W. Shaw, Stephen Lindstrom, Rebecca J. Garten, et al. "Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans." *The New England Journal of Medicine* 360, no. 25 (June 18, 2009): 2605–15.
- O'Brien, Katherine L., Lara J. Wolfson, James P. Watt, Emily Henkle, Maria Deloria-Knoll, Natalie McCall, Ellen Lee, et al. "Burden of Disease Caused by *Streptococcus Pneumoniae* in Children Younger than 5 Years: Global Estimates." *Lancet (London, England)* 374, no. 9693 (September 12, 2009): 893–902.
- Paget, Christophe, Stoyan Ivanov, Josette Fontaine, Fany Blanc, Muriel Pichavant, Joelle Renneson, Emilie Bialecki, et al. "Potential Role of Invariant NKT Cells in the Control of Pulmonary Inflammation and CD8+ T Cell Response during Acute Influenza A Virus H3N2 Pneumonia." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186, no. 10 (May 15, 2011): 5590–5602.
- Paget, Christophe, Stoyan Ivanov, Josette Fontaine, Joelle Renneson, Fany Blanc, Muriel Pichavant, Laure Dumoutier, et al. "Interleukin-22 Is Produced by Invariant Natural Killer T Lymphocytes during Influenza A Virus Infection: Potential Role in Protection against Lung Epithelial Damages." *The Journal of Biological Chemistry* 287, no. 12 (March 16, 2012): 8816–29.
- Paget, Christophe, Thierry Malleval, Anneliese O. Speak, David Torres, Josette Fontaine, Kathleen C. F. Sheehan, Monique Capron, et al. "Activation of Invariant NKT Cells by Toll-like Receptor 9-Stimulated Dendritic Cells Requires Type I Interferon and Charged Glycosphingolipids." *Immunity* 27, no. 4 (October 2007): 597–609.
- Pandya, Pankita H., and David S. Wilkes. "Complement System in Lung Disease." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 51, no. 4 (June 5, 2014): 467–73.
- Parekh, Vrajesh V., Michael T. Wilson, Danyvid Olivares-Villagómez, Avneesh K. Singh, Lan Wu, Chyung-Ru Wang, Sebastian Joyce, and Luc Van Kaer. "Glycolipid Antigen Induces Long-Term Natural Killer T Cell Energy in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 115, no. 9 (September 2005): 2572–83.
- Park, S. H., A. Weiss, K. Benlagha, T. Kyin, L. Teyton, and A. Bendelac. "The Mouse CD1d-Restricted Repertoire Is Dominated by a Few Autoreactive T Cell Receptor Families." *The Journal of Experimental Medicine* 193, no. 8 (April 16, 2001): 893–904.
- Parker, Dane, Grace Soong, Paul Planet, Jonathan Brower, Adam J. Ratner, and Alice Prince. "The NanA Neuraminidase of *Streptococcus Pneumoniae* Is Involved in Biofilm Formation." *Infection and Immunity* 77, no. 9 (September 2009): 3722–30.
- Pellicci, Daniel G., Kirsten J. L. Hammond, Adam P. Uldrich, Alan G. Baxter, Mark J. Smyth, and Dale I. Godfrey. "A Natural Killer T (NKT) Cell Developmental Pathway Involving a Thymus-Dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-Dependent Precursor Stage." *The Journal of Experimental Medicine* 195, no. 7 (April 1, 2002): 835–44.
- Pellicci, Daniel G., Adam P. Uldrich, Konstantinos Kyparissoudis, Nadine Y. Crowe, Andrew G. Brooks, Kirsten J. L. Hammond, Stephané Sidobre, Mitchell Kronenberg, Mark J. Smyth, and Dale I. Godfrey. "Intrathymic NKT Cell Development Is Blocked by the Presence of Alpha-Galactosylceramide." *European Journal of Immunology* 33, no. 7 (July 2003): 1816–23.
- Peltola, Ville T., K. Gopal Murti, and Jonathan A. McCullers. "Influenza Virus Neuraminidase Contributes to Secondary Bacterial Pneumonia." *The Journal of Infectious Diseases* 192, no. 2 (July 15, 2005): 249–57.

- Perona-Wright, Georgia, Katja Mohrs, Frank M. Szaba, Lawrence W. Kummer, Rajat Madan, Christopher L. Karp, Lawrence L. Johnson, Stephen T. Smiley, and Markus Mohrs. "Systemic but Not Local Infections Elicit Immunosuppressive IL-10 Production by Natural Killer Cells." *Cell Host & Microbe* 6, no. 6 (December 17, 2009): 503–12.
- Pichavant, M., G. Rémy, S. Bekaert, O. Le Rouzic, G. Kervoaze, E. Vilain, N. Just, et al. "Oxidative Stress-Mediated iNKT-Cell Activation Is Involved in COPD Pathogenesis." *Mucosal Immunology* 7, no. 3 (May 2014): 568–78.
- Pittet, Lynnelle A., Luanne Hall-Stoodley, Melanie R. Rutkowski, and Allen G. Harmsen. "Influenza Virus Infection Decreases Tracheal Mucociliary Velocity and Clearance of Streptococcus Pneumoniae." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 42, no. 4 (April 2010): 450–60.
- Plotkowski, M. C., E. Puchelle, G. Beck, J. Jacquot, and C. Hannoun. "Adherence of Type I Streptococcus Pneumoniae to Tracheal Epithelium of Mice Infected with Influenza A/PR8 Virus." *The American Review of Respiratory Disease* 134, no. 5 (November 1986): 1040–44.
- Pociask, Derek A., Erich V. Scheller, Sivanarayana Mandalapu, Kevin J. McHugh, Richard I. Enelow, Cheryl L. Fattman, Jay K. Kolls, and John F. Alcorn. "IL-22 Is Essential for Lung Epithelial Repair Following Influenza Infection." *The American Journal of Pathology* 182, no. 4 (April 2013): 1286–96.
- Porte, Rémi, Delphine Fougeron, Natalia Muñoz-Wolf, Julien Tabareau, Anne-France Georgel, Frédéric Wallet, Christophe Paget, et al. "A Toll-Like Receptor 5 Agonist Improves the Efficacy of Antibiotics in Treatment of Primary and Influenza Virus-Associated Pneumococcal Mouse Infections." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59, no. 10 (October 2015): 6064–72.
- Porubsky, Stefan, Anneliese O. Speak, Bruno Luckow, Vincenzo Cerundolo, Frances M. Platt, and Hermann-Josef Gröne. "Normal Development and Function of Invariant Natural Killer T Cells in Mice with Isoglobotrihexosylceramide (iGb3) Deficiency." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, no. 14 (April 3, 2007): 5977–82.
- Purnama, Christina, See Liang Ng, Piotr Tetlak, Yolanda Aphrilia Setiagani, Matheswaran Kandasamy, Sivasankar Baalalabramanian, Klaus Karjalainen, and Christiane Ruedl. "Transient Ablation of Alveolar Macrophages Leads to Massive Pathology of Influenza Infection without Affecting Cellular Adaptive Immunity." *European Journal of Immunology* 44, no. 7 (July 2014): 2003–12.
- Rabes, Anne, Stephanie Zimmermann, Katrin Reppe, Roland Lang, Peter H. Seeberger, Norbert Suttrop, Martin Witzernath, Bernd Lepenies, and Bastian Opitz. "The C-Type Lectin Receptor Mincle Binds to Streptococcus Pneumoniae but Plays a Limited Role in the Anti-Pneumococcal Innate Immune Response." *PLoS One* 10, no. 2 (2015): e0117022.
- Ramos-Sevillano, Elisa, Ana Urzainqui, Susana Campuzano, Miriam Moscoso, Fernando González-Camacho, Mirian Domenech, Santiago Rodríguez de Córdoba, et al. "Pleiotropic Effects of Cell Wall Amidase LytA on Streptococcus Pneumoniae Sensitivity to the Host Immune Response." *Infection and Immunity* 83, no. 2 (February 2015): 591–603.
- Ranjan, Priya, Neetu Singh, Amrita Kumar, Andreas Neerinx, Elisabeth Kremmer, Weiping Cao, William G. Davis, et al. "NLRC5 Interacts with RIG-I to Induce a Robust Antiviral Response against Influenza Virus Infection." *European Journal of Immunology* 45, no. 3 (March 2015): 758–72.
- Reid, Ann H., Thomas A. Janczewski, Raina M. Lourens, Alex J. Elliot, Rod S. Daniels, Colin L. Berry, John S. Oxford, and Jeffery K. Taubenberger. "1918 Influenza Pandemic Caused by Highly Conserved Viruses with Two Receptor-Binding Variants." *Emerging Infectious Diseases* 9, no. 10 (October 2003): 1249–53.
- Renneson, Joelle, Rodrigo Guabiraba, Isabelle Maillet, Rafael E. Marques, Stoyan Ivanov, Josette Fontaine, Christophe Paget, et al. "A Detrimental Role for Invariant Natural Killer T Cells in the Pathogenesis of Experimental Dengue Virus Infection." *The American Journal of Pathology* 179, no. 4 (October 2011): 1872–83.

- Reppe, Katrin, Peter Radünzel, Kristina Dietert, Thomas Tschernig, Thorsten Wolff, Sven Hammerschmidt, Achim D. Gruber, Norbert Suttrop, and Martin Witzzenrath. "Pulmonary Immunostimulation with MALP-2 in Influenza Virus-Infected Mice Increases Survival after Pneumococcal Superinfection." *Infection and Immunity* 83, no. 12 (December 2015): 4617–29.
- Robinson, Keven M., Sun Mi Choi, Kevin J. McHugh, Sivanarayana Mandalapu, Richard I. Enelow, Jay K. Kolls, and John F. Alcorn. "Influenza A Exacerbates Staphylococcus Aureus Pneumonia by Attenuating IL-1 β Production in Mice." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191, no. 10 (November 15, 2013): 5153–59.
- Robinson, Keven M., Benjamin Lee, Erich V. Scheller, Sivanarayana Mandalapu, Richard I. Enelow, Jay K. Kolls, and John F. Alcorn. "The Role of IL-27 in Susceptibility to Post-Influenza Staphylococcus Aureus Pneumonia." *Respiratory Research* 16 (2015): 10.
- Rubins, J. B., P. G. Duane, D. Clawson, D. Charboneau, J. Young, and D. E. Niewoehner. "Toxicity of Pneumolysin to Pulmonary Alveolar Epithelial Cells." *Infection and Immunity* 61, no. 4 (April 1993): 1352–58.
- Rupprecht, Tobias A., Barbara Angele, Matthias Klein, Juergen Heesemann, Hans-Walter Pfister, Marina Botto, and Uwe Koedel. "Complement C1q and C3 Are Critical for the Innate Immune Response to Streptococcus Pneumoniae in the Central Nervous System." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178, no. 3 (February 1, 2007): 1861–69.
- Sag, Duygu, Petra Krause, Catherine C. Hedrick, Mitchell Kronenberg, and Gerhard Wingender. "IL-10-Producing NKT10 Cells Are a Distinct Regulatory Invariant NKT Cell Subset." *The Journal of Clinical Investigation* 124, no. 9 (September 2014): 3725–40.
- Scanlon, Seth T., Seddon Y. Thomas, Caroline M. Ferreira, Li Bai, Thomas Krausz, Paul B. Savage, and Albert Bendelac. "Airborne Lipid Antigens Mobilize Resident Intravascular NKT Cells to Induce Allergic Airway Inflammation." *The Journal of Experimental Medicine* 208, no. 10 (September 26, 2011): 2113–24.
- Schachern, Patricia A., Vladimir Tsuprun, Sarah Goetz, Sebahattin Cureoglu, Steven K. Juhn, David E. Briles, Michael M. Paparella, and Patricia Ferrieri. "Viability and Virulence of Pneumolysin, Pneumococcal Surface Protein A, and Pneumolysin/pneumococcal Surface Protein A Mutants in the Ear." *JAMA Otolaryngology--Head & Neck Surgery* 139, no. 9 (September 2013): 937–43.
- Schattgen, Stefan A., Guangping Gao, Evelyn A. Kurt-Jones, and Katherine A. Fitzgerald. "Cutting Edge: DNA in the Lung Microenvironment during Influenza Virus Infection Tempers Inflammation by Engaging the DNA Sensor AIM2." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 196, no. 1 (January 1, 2016): 29–33.
- Schlitzer, Andreas, Naomi McGovern, and Florent Ginhoux. "Dendritic Cells and Monocyte-Derived Cells: Two Complementary and Integrated Functional Systems." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 41 (May 2015): 9–22.
- Schmitz, Nicole, Michael Kurrer, Martin F. Bachmann, and Manfred Kopf. "Interleukin-1 Is Responsible for Acute Lung Immunopathology but Increases Survival of Respiratory Influenza Virus Infection." *Journal of Virology* 79, no. 10 (May 2005): 6441–48.
- Schneider, Christoph, Samuel P. Nobs, Alex K. Heer, Michael Kurrer, Glynis Klinke, Nico van Rooijen, Johannes Vogel, and Manfred Kopf. "Alveolar Macrophages Are Essential for Protection from Respiratory Failure and Associated Morbidity Following Influenza Virus Infection." *PLoS Pathogens* 10, no. 4 (April 2014): e1004053.
- Schwandner, Ralf, Roman Dziarski, Holger Wesche, Mike Rothe, and Carsten J. Kirschning. "Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-Induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2." *Journal of Biological Chemistry* 274, no. 25 (June 18, 1999): 17406–9.
- Sckisel, Gail D., Julia K. Tietze, Anthony E. Zamora, Hua-Hui Hsiao, Stephen O. Priest, Danice E. C. Wilkins, Louis L. Lanier, Bruce R. Blazar, Nicole Baumgarth, and William J. Murphy. "Influenza Infection Results in Local Expansion of Memory CD8(+) T Cells with Antigen Non-Specific Phenotype and Function." *Clinical and Experimental Immunology* 175, no. 1 (January 2014): 79–91.

- Seiler, Michael P., Rebecca Mathew, Megan K. Liszewski, Chauncey J. Spooner, Chauncey Spooner, Kenneth Barr, Fanyong Meng, Harinder Singh, and Albert Bendelac. "Elevated and Sustained Expression of the Transcription Factors Egr1 and Egr2 Controls NKT Lineage Differentiation in Response to TCR Signaling." *Nature Immunology* 13, no. 3 (March 2012): 264–71.
- Seo, Sang-Uk, Hyung-Joon Kwon, Joo-Hye Song, Young-Ho Byun, Baik Lin Seong, Taro Kawai, Shizuo Akira, and Mi-Na Kweon. "MyD88 Signaling Is Indispensable for Primary Influenza A Virus Infection but Dispensable for Secondary Infection." *Journal of Virology* 84, no. 24 (December 2010): 12713–22.
- Shahangian, Arash, Edward K. Chow, Xiaoli Tian, Jason R. Kang, Amir Ghaffari, Su Y. Liu, John A. Belperio, Genhong Cheng, and Jane C. Deng. "Type I IFNs Mediate Development of Postinfluenza Bacterial Pneumonia in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 119, no. 7 (July 2009): 1910–20.
- Shriner, Anne K., Hongqi Liu, Guizhi Sun, Martin Guimond, and Kishore R. Alugupalli. "IL-7-Dependent B Lymphocytes Are Essential for the Anti-Polysaccharide Response and Protective Immunity to *Streptococcus Pneumoniae*." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185, no. 1 (July 1, 2010): 525–31.
- Slauenwhite, Drew, and Brent Johnston. "Regulation of NKT Cell Localization in Homeostasis and Infection." *Frontiers in Immunology* 6 (2015): 255..
- Smith, Amber M., Frederick R. Adler, Ruy M. Ribeiro, Ryan N. Gutenkunst, Julie L. McAuley, Jonathan A. McCullers, and Alan S. Perelson. "Kinetics of Coinfection with Influenza A Virus and *Streptococcus Pneumoniae*." *PLoS Pathogens* 9, no. 3 (March 2013): e1003238.
- Smith, Gavin J. D., Dhanasekaran Vijaykrishna, Justin Bahl, Samantha J. Lycett, Michael Worobey, Oliver G. Pybus, Siu Kit Ma, et al. "Origins and Evolutionary Genomics of the 2009 Swine-Origin H1N1 Influenza A Epidemic." *Nature* 459, no. 7250 (June 25, 2009): 1122–25.
- Smyth, Mark J., Nadine Y. Crowe, Daniel G. Pellicci, Konstantinos Kyparissoudis, Janice M. Kelly, Kazuyoshi Takeda, Hideo Yagita, and Dale I. Godfrey. "Sequential Production of Interferon-Gamma by NK1.1(+) T Cells and Natural Killer Cells Is Essential for the Antimetastatic Effect of Alpha-Galactosylceramide." *Blood* 99, no. 4 (February 15, 2002): 1259–66.
- Sriram, Venkataraman, Wenjun Du, Jacquelyn Gervay-Hague, and Randy R. Brutkiewicz. "Cell Wall Glycosphingolipids of *Sphingomonas Paucimobilis* Are CD1d-Specific Ligands for NKT Cells." *European Journal of Immunology* 35, no. 6 (June 2005): 1692–1701.
- Srivastava, Amit, Philipp Henneke, Alberto Visintin, Sarah C. Morse, Victoria Martin, Claire Watkins, James C. Paton, Michael R. Wessels, Douglas T. Golenbock, and Richard Malley. "The Apoptotic Response to Pneumolysin Is Toll-like Receptor 4 Dependent and Protects against Pneumococcal Disease." *Infection and Immunity* 73, no. 10 (October 2005): 6479–87.
- Stanečková, Zuzana, and Eva Varečková. "Conserved Epitopes of Influenza A Virus Inducing Protective Immunity and Their Prospects for Universal Vaccine Development." *Virology Journal* 7 (2010): 351.
- Subramaniam, Renuka, Peter F. Barnes, Kalyn Fletcher, Vijay Boggaram, Zachary Hillberry, Pierre Neuenschwander, and Homayoun Shams. "Protecting against Post-Influenza Bacterial Pneumonia by Increasing Phagocyte Recruitment and ROS Production." *The Journal of Infectious Diseases* 209, no. 11 (June 1, 2014): 1827–36.
- Sugiyama, Michael G., Susan M. Armstrong, Changsen Wang, David Hwang, Howard Leong-Poi, Andrew Advani, Suzanne Advani, et al. "The Tie2-Agonist Vasculotide Rescues Mice from Influenza Virus Infection." *Scientific Reports* 5 (June 5, 2015).
- Sun, Jie, Rajat Madan, Christopher L. Karp, and Thomas J. Braciale. "Effector T Cells Control Lung Inflammation during Acute Influenza Virus Infection by Producing IL-10." *Nature Medicine* 15, no. 3 (March 2009): 277–84.
- Sun, Keer, and Dennis W. Metzger. "Inhibition of Pulmonary Antibacterial Defense by Interferon-Gamma during Recovery from Influenza Infection." *Nature Medicine* 14, no. 5 (May 2008): 558–64.

- Sun, Keer, Luisa Torres, and Dennis W. Metzger. "A Detrimental Effect of Interleukin-10 on Protective Pulmonary Humoral Immunity during Primary Influenza A Virus Infection." *Journal of Virology* 84, no. 10 (May 2010): 5007–14.
- Swann, Jeremy, Nadine Y. Crowe, Yoshihiro Hayakawa, Dale I. Godfrey, and Mark J. Smyth. "Regulation of Antitumour Immunity by CD1d-Restricted NKT Cells." *Immunology and Cell Biology* 82, no. 3 (June 2004): 323–31.
- Sykes, M. "Unusual T Cell Populations in Adult Murine Bone Marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and Alpha Beta TCR+NK1.1+ Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 145, no. 10 (November 15, 1990): 3209–15.
- Tan, Amabel C. L., Edin J. Mifsud, Weiguang Zeng, Kathryn Edenborough, Jodie McVernon, Lorena E. Brown, and David C. Jackson. "Intranasal Administration of the TLR2 Agonist Pam2Cys Provides Rapid Protection against Influenza in Mice." *Molecular Pharmaceutics* 9, no. 9 (September 4, 2012): 2710–18.
- Tate, Michelle D., Andrew G. Brooks, and Patrick C. Reading. "The Role of Neutrophils in the Upper and Lower Respiratory Tract during Influenza Virus Infection of Mice." *Respiratory Research* 9 (2008): 57.
- Tate, Michelle D., Lisa J. Ioannidis, Ben Croker, Lorena E. Brown, Andrew G. Brooks, and Patrick C. Reading. "The Role of Neutrophils during Mild and Severe Influenza Virus Infections of Mice." *PLoS One* 6, no. 3 (2011): e17618.
- Taubenberger, Jeffery K., and John C. Kash. "Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation." *Cell Host & Microbe* 7, no. 6 (June 25, 2010): 440–51.
- Taubenberger, Jeffery K. "The Origin and Virulence of the 1918 'Spanish' Influenza Virus." *Proceedings of the American Philosophical Society* 150, no. 1 (March 2006): 86–112.
- Terabe, Masaki, and Jay A. Berzofsky. "The Immunoregulatory Role of Type I and Type II NKT Cells in Cancer and Other Diseases." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 63, no. 3 (March 2014): 199–213.
- Trappetti, Claudia, Aras Kadioglu, Melissa Carter, Jasvinder Hayre, Francesco Iannelli, Gianni Pozzi, Peter W. Andrew, and Marco R. Oggioni. "Sialic Acid: A Preventable Signal for Pneumococcal Biofilm Formation, Colonization, and Invasion of the Host." *The Journal of Infectious Diseases* 199, no. 10 (May 15, 2009): 1497–1505.
- Tupin, Emmanuel, Antonino Nicoletti, Rima Elhage, Mats Rudling, Hans-Gustaf Ljunggren, Göran K. Hansson, and Gabrielle Paulsson Berne. "CD1d-Dependent Activation of NKT Cells Aggravates Atherosclerosis." *The Journal of Experimental Medicine* 199, no. 3 (February 2, 2004): 417–22.
- Tyznik, Aaron J., Emmanuel Tupin, Niranjana A. Nagarajan, Min J. Her, Chris A. Benedict, and Mitchell Kronenberg. "Cutting Edge: The Mechanism of Invariant NKT Cell Responses to Viral Danger Signals." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181, no. 7 (October 1, 2008): 4452–56.
- Uchida, Tetsuro, Shigetoshi Horiguchi, Yuriko Tanaka, Heizaburo Yamamoto, Naoki Kunii, Shinichiro Motohashi, Masaru Taniguchi, Toshinori Nakayama, and Yoshitaka Okamoto. "Phase I Study of Alpha-Galactosylceramide-Pulsed Antigen Presenting Cells Administration to the Nasal Submucosa in Unresectable or Recurrent Head and Neck Cancer." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 57, no. 3 (March 2008): 337–45.
- van der Sluijs, Koenraad F., Leontine J. R. van Elden, Monique Nijhuis, Rob Schuurman, Sandrine Florquin, Takao Shimizu, Satoshi Ishii, Henk M. Jansen, René Lutter, and Tom van der Poll. "Involvement of the Platelet-Activating Factor Receptor in Host Defense against *Streptococcus Pneumoniae* during Postinfluenza Pneumonia." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 290, no. 1 (January 2006): L194–99.
- van der Sluijs, Koenraad F., Leontine J. R. van Elden, Monique Nijhuis, Rob Schuurman, Jennie M. Pater, Sandrine Florquin, Michel Goldman, Henk M. Jansen, René Lutter, and Tom van der Poll. "IL-10 Is an Important

- Mediator of the Enhanced Susceptibility to Pneumococcal Pneumonia after Influenza Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172, no. 12 (June 15, 2004): 7603–9.
- van Rossum, Annemarie M. C., Elena S. Lysenko, and Jeffrey N. Weiser. "Host and Bacterial Factors Contributing to the Clearance of Colonization by *Streptococcus Pneumoniae* in a Murine Model." *Infection and Immunity* 73, no. 11 (November 2005): 7718–26.
- Wang, Changsen, Susan M. Armstrong, Michael G. Sugiyama, Arata Tabuchi, Adrienn Krauszman, Wolfgang M. Kuebler, Brendan Mullen, Suzanne Advani, Andrew Advani, and Warren L. Lee. "Influenza-Induced Priming and Leak of Human Lung Microvascular Endothelium upon Exposure to *Staphylococcus Aureus*." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 53, no. 4 (October 2015): 459–70.
- Weber, Sarah E., Haijun Tian, and Liise-anne Pirofski. "CD8+ Cells Enhance Resistance to Pulmonary Serotype 3 *Streptococcus Pneumoniae* Infection in Mice." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186, no. 1 (January 1, 2011): 432–42.
- Weeks-Gorospe, Jenni N., Heather R. Hurtig, Amy R. Iverson, Margaret J. Schuneman, Richard J. Webby, Jonathan A. McCullers, and Victor C. Huber. "Naturally Occurring Swine Influenza A Virus PB1-F2 Phenotypes That Contribute to Superinfection with Gram-Positive Respiratory Pathogens." *Journal of Virology* 86, no. 17 (September 2012): 9035–43.
- Weiss, René, Johannes Laengle, Monika Sachet, Anna-Polina Shurygina, Oleg Kiselev, Andrej Egorov, and Michael Bergmann. "Interleukin-24 Inhibits Influenza A Virus Replication in Vitro through Induction of Toll-like Receptor 3 Dependent Apoptosis." *Antiviral Research* 123 (November 2015): 93–104.
- Wesley, Johnna D., Marlowe S. Tessmer, Deanna Chaukos, and Laurent Brossay. "NK Cell-like Behavior of Valpha14i NK T Cells during MCMV Infection." *PLoS Pathogens* 4, no. 7 (July 2008): e1000106.
- Whitsett, Jeffrey A. "Surfactant Proteins in Innate Host Defense of the Lung." *Biology of the Neonate* 88, no. 3 (2005): 175–80.
- Witzenrath, Martin, Florence Pache, Daniel Lorenz, Uwe Koppe, Birgitt Gutbier, Christoph Tabeling, Katrin Reppe, et al. "The NLRP3 Inflammasome Is Differentially Activated by Pneumolysin Variants and Contributes to Host Defense in Pneumococcal Pneumonia." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187, no. 1 (July 1, 2011): 434–40.
- Wolk, Kerstin, Stefanie Kunz, Ellen Witte, Markus Friedrich, Khusru Asadullah, and Robert Sabat. "IL-22 Increases the Innate Immunity of Tissues." *Immunity* 21, no. 2 (août 2004): 241–54.
- Wren, John T., Lance K. Blevins, Bing Pang, Lauren B. King, Antonia C. Perez, Kyle A. Murrah, Jennifer L. Reimche, Martha A. Alexander-Miller, and W. Edward Swords. "Influenza A Virus Alters Pneumococcal Nasal Colonization and Middle Ear Infection Independently of Phase Variation." *Infection and Immunity* 82, no. 11 (November 2014): 4802–12.
- Wu, Dianna Y., Neil H. Segal, Stephane Sidobre, Mitchell Kronenberg, and Paul B. Chapman. "Cross-Presentation of Disialoganglioside GD3 to Natural Killer T Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 198, no. 1 (July 7, 2003): 173–81.
- Xia, Chengfeng, Dapeng Zhou, Chengwen Liu, Yanyan Lou, Qingjia Yao, Wenpeng Zhang, and Peng George Wang. "Thio-Isoglobotrihexosylceramide, an Agonist for Activating Invariant Natural Killer T Cells." *Organic Letters* 8, no. 24 (November 23, 2006): 5493–96.
- Xu, Hongmei, Libin Wang, Jian Huang, Yanqing Zhang, Feng Ma, Jianmin Wang, Wenchun Xu, Xuemei Zhang, Yibing Yin, and Kaifeng Wu. "Pneumococcal Wall Teichoic Acid Is Required for the Pathogenesis of *Streptococcus Pneumoniae* in Murine Models." *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 53, no. 2 (February 2015): 147–54.
- Yamada, Mitsuhiro, John C. Gomez, Pauline E. Chugh, Clifford A. Lowell, Mary C. Dinauer, Dirk P. Dittmer, and Claire M. Doerschuk. "Interferon- γ Production by Neutrophils during Bacterial Pneumonia in Mice." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183, no. 10 (May 15, 2011): 1391–1401.

- Ye, Zhiping, Teresa Liu, Daniel P. Offringa, Jonathan McInnis, and Roland A. Levandowski. "Association of Influenza Virus Matrix Protein with Ribonucleoproteins." *Journal of Virology* 73, no. 9 (September 1, 1999): 7467–73.
- Zajonc, Dirk M., Carlos Cantu, Jochen Mattner, Dapeng Zhou, Paul B. Savage, Albert Bendelac, Ian A. Wilson, and Luc Teyton. "Structure and Function of a Potent Agonist for the Semi-Invariant Natural Killer T Cell Receptor." *Nature Immunology* 6, no. 8 (August 2005): 810–18.
- Zeng, Defu, Yinping Liu, Stephane Sidobre, Mitchell Kronenberg, and Samuel Strober. "Activation of Natural Killer T Cells in NZB/W Mice Induces Th1-Type Immune Responses Exacerbating Lupus." *The Journal of Clinical Investigation* 112, no. 8 (October 2003): 1211–22.
- Zheng, Mingquan, William Horne, Jeremy P. McAleer, Derek Pociask, Taylor Eddens, Misty Good, Bin Gao, and Jay K. Kolls. "Therapeutic Role of Interleukin 22 in Experimental Intra-Abdominal *Klebsiella Pneumoniae* Infection in Mice." *Infection and Immunity*, January 4, 2016.
- Zhou, Dapeng, Jochen Mattner, Carlos Cantu, Nicolas Schrantz, Ning Yin, Ying Gao, Yuval Sagiv, et al. "Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT Cells." *Science (New York, N.Y.)* 306, no. 5702 (December 3, 2004): 1786–89.
- Zhou, Gang, Shih Wei W. Juang, and Kevin P. Kane. "NK Cells Exacerbate the Pathology of Influenza Virus Infection in Mice." *European Journal of Immunology* 43, no. 4 (April 2013): 929–38.
- Zlotnik, A., D. I. Godfrey, M. Fischer, and T. Suda. "Cytokine Production by Mature and Immature CD4-CD8- T Cells. Alpha Beta-T Cell Receptor+ CD4-CD8- T Cells Produce IL-4." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 149, no. 4 (August 15, 1992): 1211–15.

Annexe

ANNEXE

Communications scientifiques (Oral)

- ✓ *Center of Infection and Immunity of Lille* (Décembre 2015)

Barthélémy A., Ivanov S., Fontaine J., Soulard D., Paget C., Faveeuw C. et Trottein F.
“*Invariant NKT cells in bacterial superinfection*”

Communications scientifiques (Posters)

- ✓ « *7th International symposium on CD1 and NKT cells* » (Septembre 2013)

Barthélémy A., Ivanov S., Fontaine J., Macho-Fernandez E., Paget C., Faveeuw C. et Trottein F.
“*Interleukin-10 triggered by Influenza A virus hampers the protective role of invariant Natural Killer T cells against bacterial secondary superinfection*”

- ✓ 14^{ème} Journée André Verbert – Colloque annuel des Doctorants de Lille (Septembre 2014)

Barthélémy A., Ivanov S., Fontaine J., Paget C., Faveeuw C. et Trottein F.
“*Rôle de l'Interleukine-10 dans la surinfection bactérienne post-grippale*”

- ✓ Congrès annuel de la Société Française de l'Immunologie à Lille (Novembre 2014)

Barthélémy A., Ivanov S., Fontaine J., Paget C., Faveeuw C. et Trottein F.
“*Rôle de l'Interleukine-10 dans la surinfection bactérienne post-grippale*”

Résumé

Durant l'infection par le virus Influenza A (IAV), les changements physiques et immunologiques du poumon prédisposent l'hôte aux surinfections bactériennes. Les cellules T Natural Killer invariantes (iNKT) sont des lymphocytes T innés pouvant avoir des rôles bénéfiques ou délétères durant l'infection. Nos objectifs ont visé à (i) étudier le rôle naturel des cellules iNKT et (ii) à rechercher l'effet d'une activation exogène des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne post-influenza.

Lors de mon arrivée, le laboratoire venait de décrire, pour la première fois en contexte infectieux, que les cellules iNKT étaient capables de produire de l'IL-22 au cours de l'infection grippale. Cette cytokine joue un rôle majeur dans les processus de maintien et de réparation des épithéliums. L'une des causes des surinfections bactériennes post-grippales étant l'altération et/ou la perte de l'intégrité de l'épithélium pulmonaire, nous nous sommes proposés d'étudier le rôle potentiel de cette cytokine dans un modèle expérimental de surinfection bactérienne à *S. pneumoniae*. Nous avons ainsi pu montrer que si cette cytokine ne joue pas un rôle majeur dans la réponse anti-virale de l'hôte, l'IL-22 participe au contrôle de l'inflammation au cours de l'infection grippale et joue un rôle protecteur dans la surinfection bactérienne.

Par ailleurs, l'utilisation de souris dépourvues en cellules iNKT (*Ja18^{-/-}*) a permis de montrer que les cellules iNKT limitent la susceptibilité aux surinfections et réduisent le synergisme létal de la coinfection virus/bactérie. Au moment de l'infection bactérienne, les cellules iNKT des souris grippées sont incapables de produire de l'IFN- γ , cytokine dont nous avons montré le rôle essentiel dans les mécanismes de défense antibactérienne. Le défaut d'activation des cellules iNKT chez les souris surinfectées est lié à l'interleukine-10 (IL-10), cytokine immunosuppressive induite par l'infection virale, plutôt qu'à un défaut intrinsèque des cellules iNKT. L'IL-10 inhibe l'activation des cellules iNKT en réponse au pneumocoque en inhibant la production d'IL-12 par les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs). La neutralisation de l'IL-10 restaure l'activation des cellules iNKT et augmente la résistance à la surinfection. Ainsi, les cellules iNKT ont un rôle bénéfique (en amont de la colonisation bactérienne) dans le contrôle de la surinfection bactérienne de la grippe et représentent une cible de l'immunosuppression.

Nous avons par la suite étudié la possibilité que le superagoniste des cellules iNKT, l' α -galactosylceramide (α -GalCer) puisse limiter la surinfection bactérienne. Pour cela, les souris ont été traitées par voie intranasale avec de l' α -GalCer à différents temps post-influenza, juste avant l'infection par le pneumocoque. Le traitement à jour 3, au pic de la réplication virale, limite fortement la surinfection. Cependant, l'inoculation d' α -GalCer pendant la phase aiguë du virus (jour 7) ne permet pas d'activer les cellules iNKT pulmonaires et n'a pas d'effet sur la surinfection. L'absence d'activation des cellules iNKT n'est pas intrinsèque et est associée à une disparition complète des cellules dendritiques CD103⁺ respiratoires (cDCs), lesquelles sont cruciales dans l'activation des cellules iNKTs. À des temps plus tardifs (jour 14), les cDCs repeuplent le poumon et l' α -GalCer promeut l'activité antibactérienne des cellules iNKT.

Pris dans son ensemble, cette étude souligne le rôle des cellules iNKT dans la surinfection bactérienne de la grippe et ouvre de nouvelles voies thérapeutiques afin de limiter les surinfections bactériennes post-influenza.