

**UNIVERSITÉ DE LILLE – DROIT ET SANTÉ
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ DE LILLE**



THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

**DISCIPLINE : Immunologie
SPECIALITE : Sciences Biologiques (Pharmacie)**

**ANALYSE DES REponses ANTI-BACTERIENNES
ET ANTI-VIRALES RESPIRATOIRES
INDUITES PAR LES AGONISTES DES
RECEPTEURS DE L'IMMUNITE INNEE**

Thèse soutenue publiquement le 3 décembre 2018 par

Anne-France GEORGEL

Devant le jury composé de :

**Madame le Professeur Anne DECOSTER
Monsieur le Docteur François HELLE
Monsieur le Professeur Richard LE NAOUR
Madame le Docteur Valérie GISSOT
Monsieur le Docteur Christophe CARNOY
Monsieur le Docteur Jean-Claude SIRARD**

**Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de Thèse
Directeur de Thèse**

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier :

Dr Christophe Carnoy pour l'encadrement de cette thèse. Vous m'avez donné l'opportunité de m'initier à la recherche en Master 1. Vous m'avez confié ce projet de thèse qui par vos compétences et votre professionnalisme a pu être mené à terme. Je me souviendrai des longues heures passées à l'animalerie et du suspens à la découverte des résultats ! Si ce travail fondamental se termine, la collaboration se poursuivra avec les études cliniques.

Dr Jean-Claude Sirard pour le co-encadrement de cette thèse et l'accueil dans le groupe.

Dr François Trottein pour l'accueil dans l'équipe 12 du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille.

Les membres de mon comité de suivi de thèse : Pr Anne Decoster, Dr Philippe Gosset, Dr Amélie Lansiaux, Dr Guillaume Lefèvre pour leurs remarques et leurs conseils sur ce travail.

Les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail : le Professeur Richard Le Naour et le Docteur François Helle de me faire l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs, le Professeur Anne Decoster et le Docteur Valérie Gissot pour leur participation à ce jury.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail :

Delphine Cayet pour la formation pratique, les précieux conseils et l'énorme aide technique apportée à ce travail. Merci pour ta grande disponibilité.

Asma Ayari pour la formation à la quantification du virus IAV.

La Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation du GHICL pour sa collaboration dans la mise en œuvre du projet ASTRAL. Un grand merci tout particulier au Dr Amélie Lansiaux, à Jean-Jacques Vitagliano et Domitille Tristram pour leur professionnalisme et leur disponibilité dans le suivi du projet ASTRAL au quotidien.

Drs Delecluse et Masson et leurs équipes pour leur investissement dans le projet ASTRAL. Un merci particulier au Dr Masson pour la relecture attentive des généralités cliniques de ce manuscrit.

Les internes et les techniciens qui m'ont aidée pour la prise en charge des prélèvements de l'étude clinique ASTRAL au laboratoire de microbiologie.

Les membres de l'équipe 12 que j'ai côtoyés tout au long de ces 6 années. Une pensée particulière pour Rémi, ancien thésard, qui m'a accueillie en tant qu'étudiante et m'a fait découvrir avec beaucoup de passion le domaine de la recherche.

A mes collègues :

Pr Anne Decoster pour sa bienveillance depuis mon arrivée au laboratoire : merci de m'avoir accompagnée et guidée sur ce chemin professionnel.

Mes proches collègues du laboratoire qui me supportent quotidiennement et s'investissent avec beaucoup d'énergie dans la réalisation de nos projets et avec lesquels les relations professionnelles sont devenues amicales.

Mes collègues informaticiens et du groupe DPI pour leur accueil chaleureux, leur bonne humeur communicative et leur sympathie : la petite étudiante sera bientôt définitivement diplômée !

A ma famille et mes amis :

Mes parents pour leur soutien inconditionnel et les valeurs transmises. Merci de m'avoir donné la force et la rigueur d'atteindre ces objectifs. Vous avez fait de mon parcours une réussite. Je vous en serai éternellement reconnaissante.

Ma sœur pour notre complicité. Notre éducation gémellaire nous a conduites sur le même chemin professionnel malgré nos caractères bien différents !

Mon grand-père paternel qui suivait avec une extrême attention mon parcours scolaire. J'aurais tellement aimé que tu vois l'achèvement de ce travail. Sans aucun doute, tu veilleras sur moi le jour de la soutenance.

Toute ma famille pour les moments de partage, leur présence dans les bons moments et les plus difficiles.

Mon trio de filleuls : Charles, Gaspard et Antoine. La fierté et le bonheur d'être la marraine de ces trois boys. De la joie, des sourires et des fous rires !

Alice et Charlotte qui m'ont montré la route de la thèse de sciences.

Mes amis toujours présents dans les moments importants.

A tous ceux qui seront présents à la soutenance de thèse qui clôturera ces 16 années d'étude.

A toutes les personnes que j'ai rencontrées sur mon parcours : qui m'ont formée et enrichie de leur expérience.

Un grand merci à tous ...

Résumé

ANALYSE DES REPONSES ANTI-BACTERIENNES ET ANTI-VIRALES RESPIRATOIRES INDUITES PAR LES AGONISTES DES RECEPTEURS DE L'IMMUNITE INNEE

Les infections virales et bactériennes pulmonaires représentent un problème de santé publique majeur. Les approches thérapeutiques actuelles par antibiotique ont montré leur efficacité mais également leur limite notamment dans des cas de micro-organismes multirésistants ou dans le traitement de patients atteints de pathologies aggravantes. La stimulation de l'immunité innée pourrait représenter une voie thérapeutique complémentaire aux traitements actuels. En effet, l'activation du système immunitaire inné induit la production locale de molécules antimicrobiennes et le recrutement de cellules effectrices qui interviennent dans le contrôle de l'infection.

Les « *Toll-like receptors* » (TLR) sont des senseurs de l'immunité innée. Leur activation entraîne une cascade de signalisation qui module la transcription de gènes de l'immunité comme ceux codant certaines cytokines. TLR5 reconnaît la flagelline, protéine structurale des flagelles bactériens. TLR5 est exprimé à la surface des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules épithéliales.

Dans la première partie de travail, nous avons évalué la capacité de la flagelline à contrôler la réplication du virus de la grippe A H3N2. Nous avons tout d'abord montré que l'administration intranasale ou systémique de flagelline était capable d'activer des gènes antiviraux au niveau pulmonaire. L'administration de la flagelline conduit à une diminution de la réplication virale chez les souris infectées par le virus de la grippe A H3N2. Cet effet est également observé chez les souris *Il22^{-/-}* et *Ifnar^{-/-}* suggérant un mécanisme indépendant de l'interféron de type I et de l'IL-22. Enfin, nous avons également montré que l'association de la flagelline à l'oseltamivir (inhibiteur de neuraminidase) était plus efficace que les traitements administrés séparément.

La deuxième partie de ce travail correspond à l'étude clinique ASTRAL qui évalue la capacité des cellules mononucléées sanguines à répondre à différents agonistes de TLR chez des patients atteints de pneumonie franche lobaire aiguë. Cette étude a démarré en octobre 2017 et prévoit d'inclure 38 patients. L'objectif est d'observer la réponse induite par des agonistes de TLR à travers des analyses transcriptionnelles et des dosages de cytokines. Les premiers résultats (analyse chez 7 patients) montrent que les cellules mononucléées sanguines peuvent être activées par des agonistes de TLR dans le contexte de pneumonie.

Mots clés : Immunité innée, TLR5, agoniste, flagelline, grippe, infection respiratoire

Abstract

ANALYSIS OF RESPIRATORY ANTI-BACTERIAL AND ANTI-VIRAL RESPONSES INDUCED BY AGONISTS OF INNATE IMMUNITY SENSORS

Viral and bacterial infections remain a burden for health care systems. The current therapeutic approaches by antibiotic have shown their effectiveness but also their limit especially in cases of multidrug-resistant microorganisms or in the treatment of patients with aggravating pathologies. Stimulation of innate immunity could be a complementary therapeutic approach to current treatments. Indeed, the activation of the innate immune system induces local production of antimicrobial molecules and the recruitment of effector cells involved in controlling infection.

The Toll-like Receptors (TLRs) are innate sensors that trigger signaling cascades and promotes the archetypal pro-inflammatory responses involved in antimicrobial defense. TLR5 recognizes flagellin, the structural protein of bacterial flagella. TLR5 is expressed on the surface of macrophages, dendritic cells and epithelial cells.

In the first part of the work, we assessed the ability of flagellin to control the replication of influenza A virus H3N2. We first showed that intranasal or systemic administration of flagellin activated transcription of anti-viral genes in lung tissue. Administration of flagellin reduced viral replication in the lung of mice infected with H3N2 IAV. This effect is also observed in *Il22^{-/-}* and *Ifnar^{-/-}* mice suggesting a mechanism independent of type I interferon and interleukin 22 signaling. Finally, we also showed that the combination of flagellin with oseltamivir (neuraminidase inhibitor) was more efficacious than standalone treatments.

The second part of this work is the ASTRAL clinical study, which assesses the ability of blood mononuclear cells to respond to different TLR agonists in patients with acute lobar pneumonia. This study started in October 2017 and plans to include 38 patients. The objective is to observe the response after TLR agonist stimulation by transcriptional analysis and cytokine assays. The first results (analysis of 7 patients) show that blood mononuclear cells can be activated by TLR agonists in the context of pneumonia.

Key words: Inate immunity, TLR5, agonist, flagellin, influenza, respiratory infection

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	4
INTRODUCTION GENERALE	5
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6
I. Les infections respiratoires.....	7
I.1. Les infections respiratoires basses associées aux soins.....	7
I.1.1. Définitions.....	7
I.1.2. Le diagnostic	8
I.1.3. Traitement	9
I.2. Les infections respiratoires basses communautaires	9
I.2.1. Les exacerbations de BPCO	10
I.2.2. La bronchiolite du nourrisson.....	12
I.2.3. Les bronchites aiguës	13
I.2.4. Les pneumonies aiguës communautaires (PAC).....	14
I.2.5. La grippe	18
I.2.5.1. Pathogénicité.....	18
I.2.5.2. Traitement.....	19
II. Virus de la grippe et réponse antivirale de l'hôte.....	21
II.1. Le virus de la grippe.....	21
II.2. Le cycle répliatif viral	23
II.2.1. L'entrée du virus	23
II.2.2. Transcription et répliation des ARN viraux.....	25
II.2.3. Encapsidation et bourgeonnement.....	26
II.2.4. Libération des nouveaux virions	27
II.2.5. Variation antigénique	27
II.2.5.1. Dérive génétique (ou glissement antigénique).....	27
II.2.5.2. Cassure antigénique (ou saut)	28
II.3. La réponse interféron antigrippale	28
II.3.1. Action au niveau de l'entrée du virus.....	30
II.3.2. Action au niveau de la transcription et la répliation	31
II.3.2.1. La famille des GTPases	31
II.3.2.2. La protéine kinase R	32
II.3.2.3. La famille des protéines OAS	32
II.3.3. Action sur les protéines virales.....	33

II.3.4.	Action sur l'assemblage et la libération du virus.....	33
III.	Agonistes de TLR et activité anti-microbienne.....	35
III.1.	Les <i>Toll-like receptors</i>	36
III.2.	TLR5 et flagelline	38
	OBJECTIFS DE LA THESE	40
	TRAVAUX DE RECHERCHE.....	41
I.	L'agoniste du <i>Toll-like receptor 5</i> réduit les taux de transcrits M1 du virus de la grippe A indépendamment de l'interféron de type 1 et de l'interleukine-22 et améliore l'efficacité de l'oseltamivir	42
I.1.	Article : Toll-like receptor 5 agonist reduces Influenza A Virus M1 transcripts levels independently of type 1 interferon and interleukin-22 and improves the efficacy of oseltamivir.....	44
I.1.1.	Résumé	45
I.1.2.	Introduction	45
I.1.3.	Matériel et méthodes	47
I.1.4.	Résultats	50
I.1.5.	Discussion	62
I.1.6.	Remerciements	64
I.1.7.	Bibliographie.....	64
I.2.	Résultats complémentaires.....	70
I.2.1.	Matériels et méthodes.....	70
I.2.2.	Résultats	71
I.2.3.	Discussion	73
II.	ASTRAL : Analyse de la réponse immunitaire innée des cellules sanguines chez des patients atteints de pneumonies franches lobaires aiguës.....	76
II.1.	Introduction.....	76
II.2.	Etude préliminaire.....	78
II.2.1.	Etude de faisabilité.....	78
II.2.2.	Mise au point des conditions d'activation des PBMC par les agonistes TLR	79
II.3.	Description de l'étude ASTRAL.....	82
II.3.1.	Matériels et méthodes.....	82
II.3.1.1.	Patients étudiés	82
II.3.1.2.	Critères de jugement de l'étude ASTRAL	84
II.3.1.3.	Collecte et traitement des prélèvements sanguins.....	84
II.3.1.4.	Quantification de l'expression des ARNm	85
II.3.1.5.	Dosage des cytokines par cytométrie en flux.....	86
II.3.1.6.	Données cliniques et biologiques.....	86
II.3.1.7.	Analyses statistiques	87

II.3.2. Résultats	87
II.3.2.1. Description de la population	87
II.3.2.2. Analyse transcriptionnelle	88
II.3.2.3. Dosage d'IL-6.....	90
II.3.3. Discussion	91
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	96
ANNEXES.....	109
Annexe n°1 : Cahier d'observation de l'étude clinique ASTRAL	110
Annexe n°2 : Publications et Communications en relation avec le sujet	116

Liste des abréviations

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm : acide ribonucléique messenger
BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive
CPP : comité de protection des personnes
CRP : protéine C réactive
Ct : *critical threshold*
dNTP : désoxyribonucléotides
ELISA : *enzyme linked immunosorbent assay*
GHICL : groupement des hôpitaux de l'institut catholique de Lille
IFN- γ : interféron-gamma
IL : interleukine
ISG : gènes stimulés par l'interféron
NLR : *NOD-like receptors*
PAC : pneumopathie aiguë communautaire
PAS : pneumonies associée aux soins
PAVM : pneumonie acquise sous ventilation mécanique
PBMC : *peripheral blood mononuclear cell*
PBS : tampon phosphate salin
PCR : réaction en chaîne de la polymérase
PFLA : pneumopathie franche lobaire aiguë
PNN : polynucléaire neutrophile
PRR : *pattern recognition receptors* ou récepteurs de l'immunité innée
RLR : *RIG-I-like receptors*
RT : transcription reverse
TLR : *Toll-like receptors*
TNF : *tumor necrosis factor*
UFP = PFU : unité formant plaque
VEMS : volume expiratoire maximum seconde
VRS : virus respiratoire syncytial

INTRODUCTION GENERALE

Les infections respiratoires regroupent un certain nombre de pathologies pulmonaires d'origine bactérienne, virale et fongique. Elles touchent plus particulièrement les jeunes enfants et les personnes âgées, occasionnant des hospitalisations fréquentes et représentant la troisième cause de mortalité dans les pays développés (OMS 2016). Elles font l'objet d'une consommation importante d'antibiotiques et sont responsables d'un coût important en termes de santé publique. L'étude des interactions hôte-pathogène a permis de montrer que la stimulation de l'immunité innée induit localement, très rapidement, la production d'effecteurs solubles et le recrutement d'effecteurs cellulaires capables de contrôler l'infection. L'immunomodulation de cette immunité naturelle, efficace sur un large spectre de microorganismes, pourrait représenter une alternative aux thérapeutiques actuelles limitées notamment par le développement de résistances aux traitements.

Au cours de cette thèse, nous avons évalué les capacités immunomodulatrices de la flagelline, un activateur de la réponse innée qui reconnaît le *Toll-like receptor 5* (TLR5), présent sur de nombreux types cellulaires. Nous avons tout d'abord analysé, chez la souris, l'effet d'un traitement par la flagelline dans le contexte d'une infection pulmonaire par le virus de la grippe. Nous avons également étudié la capacité de la flagelline à stimuler les cellules immunitaires sanguines de patients atteints de pneumonie. La présentation des travaux expérimentaux sera précédée d'une revue bibliographique qui décrira dans un premier temps l'hétérogénéité des infections respiratoires basses avec un focus sur la grippe et les mécanismes antiviraux qui en découlent, puis par une description des *Toll-like receptors* et de leurs agonistes et de leur implication dans la réponse antimicrobienne.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les infections respiratoires

Parmi les infections respiratoires, on distingue les infections respiratoires hautes et basses. Les infections respiratoires hautes, essentiellement d'origine communautaire, correspondent aux angines, otites, sinusites et rhinopharyngites. Ces pathologies atteignent les voies respiratoires supérieures (nez et sinus, bouche, pharynx, larynx et trachée). Leurs étiologies peuvent être virales (entérovirus, rhinovirus, adénovirus ...) ou bactériennes (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ...). Les infections respiratoires basses touchent les voies aériennes inférieures (voies respiratoires intrathoraciques : des grosses bronches jusqu'aux alvéoles pulmonaires). Celles-ci peuvent être d'origine communautaire ou nosocomiale. Les infections respiratoires basses aiguës sont l'un des plus fréquents motifs de consultation en médecine générale. Seules les infections respiratoires basses seront abordées dans ce manuscrit.

I.1. Les infections respiratoires basses associées aux soins

I.1.1. Définitions

Les pneumonies associées aux soins (PAS), anciennement pneumonies nosocomiales, recouvrent différentes situations cliniques retrouvées :

- chez des patients hospitalisés au moment du diagnostic de pneumonie :
 - les pneumonies acquises sous ventilation mécanique survenant plus de 48 heures après le recours à la ventilation mécanique invasive ou non invasive (PAVM) ;
 - les pneumonies acquises à l'hôpital survenant sans ventilation mécanique (PAH) ;
- chez des patients non hospitalisés au moment du diagnostic de pneumonie mais :
 - ayant été hospitalisés plus de 48 heures dans les 3 mois précédents
 - ayant reçu une antibiothérapie par voie intraveineuse, une chimiothérapie ou des soins cutanés d'ulcère ou d'escarre dans les mois précédents
 - hébergés en moyen ou long séjour
 - insuffisants rénaux dialysés.

Les pneumonies présentes ou en incubation lors de la prise en charge en établissement de santé, les pneumonies d'inhalation favorisées par les troubles de conscience ou de déglutition antérieurs à l'admission et non liés aux soins initiaux et les colonisations bronchiques asymptomatiques chez un malade ventilé sans fièvre et sans image radiologique ne font pas partie de la définition des PAS (1).

I.1.2. Le diagnostic

Les PAS représentent 25 % des infections associées aux soins. Elles sont associées à la moitié des prescriptions d'antibiotiques en réanimation et à un allongement de la durée de séjour à l'hôpital. La mortalité attribuable aux PAS est de 30 à 50 % et est influencée par l'efficacité de l'antibiothérapie initiale. Le diagnostic clinique des PAS est difficile. Il s'appuie sur l'analyse des critères cliniques de pneumonie et sur les résultats microbiologiques (examen direct et cultures semi-quantitatives) d'un prélèvement respiratoire « non invasif » (expectoration ou aspiration trachéale). Le diagnostic clinique de PAS est évoqué devant l'apparition d'une fièvre associée à des sécrétions trachéales purulentes, une hyperleucocytose ou une leucopénie, l'apparition de nouveaux infiltrats radiologiques et une dégradation des échanges gazeux. Cependant, les signes cliniques et biologiques de pneumonie sont peu spécifiques (1). En ce qui concerne les PAVM, le spectre microbien est fonction du délai de survenue de la pneumonie par rapport à l'administration de la ventilation mécanique. Les PAVM précoces survenant avant le 5^{ème} jour sont le plus souvent dues à des micro-organismes qui colonisaient le patient à son admission, en dehors de facteurs de risques particuliers. Les PAVM tardives sont plutôt liées à des bacilles à Gram négatif résistants et à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

I.1.3. Traitement

Le choix de l'antibiothérapie initiale dépend du délai de survenue de la pneumonie, des antécédents et des facteurs de risque du patient et de l'écologie locale de l'unité. Il est recommandé d'administrer le plus rapidement possible (après les prélèvements microbiologiques) une bi-antibiothérapie probabiliste active sur *Pseudomonas aeruginosa*, plus ou moins associée à une antibiothérapie anti-staphylococcique s'il existe des facteurs de risque ou des antécédents de colonisation, antibiothérapie secondairement adaptée aux résultats microbiologiques (1). La durée de traitement est de 8 jours sauf en cas de *P. aeruginosa* (15 jours) (2). La désescalade est réalisée en fonction des résultats microbiologiques et de l'évolution clinique.

I.2. Les infections respiratoires basses communautaires

Les infections respiratoires basses forment un groupe hétérogène constitué des exacerbations de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) d'origine infectieuse, des bronchiolites, des bronchites aiguës, des pneumopathies aiguës communautaires (PAC) et de la grippe. Elles sont dues à des pathogènes qui diffèrent suivant les âges de la vie. La gravité et le pronostic de ces affections sont très divers selon l'agent causal et le terrain sur lequel elles surviennent. Elles sont une source de morbidité et de mortalité importantes. Les antibiotiques prescrits pour le traitement des infections respiratoires basses génèrent un coût de santé publique majeur, puisqu'on estime qu'ils représentent 75 % de la prescription globale de ces médicaments, alors que la plupart de ces pathologies sont d'origine virale (3).

Les infections respiratoires basses sont définies par l'association ou la succession de signes cliniques suivants survenant chez un malade ambulatoire ou hospitalisé depuis moins de 48h (4) :

- une toux à laquelle s'associe d'emblée ou secondairement une expectoration ;
- au moins un signe fonctionnel ou physique orientant vers une atteinte respiratoire basse (dyspnée, douleur thoracique, sifflement, signes auscultatoires récents en foyer ou diffus) ;
- au moins un signe général suggérant une infection (fièvre, sueurs, céphalées, myalgies, arthralgies, mal de gorge ou rhume)

I.2.1. Les exacerbations de BPCO

La BPCO est une maladie chronique inflammatoire des bronches, que l'on retrouve chez les fumeurs, lentement progressive, caractérisée par une diminution non complètement réversible des débits aériens. L'inflammation des voies aériennes observée dans la BPCO provoque un épaissement des parois par atrophie des muscles lisses, ainsi qu'une hypersécrétion réactionnelle de mucus. Le tissu pulmonaire est également inflammatoire, ce qui entraîne des perturbations cellulaires et des anomalies fonctionnelles. Les alvéoles pulmonaires qui permettent les échanges gazeux lors de la respiration sont progressivement détruites. L'exacerbation de BPCO correspond à la majoration d'une dyspnée, de la toux, du volume de l'expectoration et/ou de sa purulence (5). Chaque année, les exacerbations de BPCO sont responsables de 69 000 à 112 000 hospitalisations, occasionnant une morbidité et des coûts importants. Les exacerbations d'origine infectieuse ont un caractère saisonnier : leur prédominance hivernale est nette. Il en est de même pour les décès secondaires à la BPCO, survenant en particulier lors des fortes épidémies grippales (6). Les bactéries les plus fréquemment en cause sont *S. pneumoniae*, *H. influenzae* et *M. catarrhalis*. Les principaux virus sont les rhinovirus et métapneumovirus. Cependant, toutes les exacerbations de BPCO ne sont pas d'origine infectieuse, et l'antibiothérapie ne doit donc pas être systématique. Elle est fondée sur des critères d'infection (majoration de la dyspnée, de la purulence – verdâtre franche – et du volume des crachats) et sur la sévérité de la maladie, estimée en situation stable par la mesure du volume expiratoire maximum seconde (VEMS) et/ou par la sévérité de la dyspnée (3).

Le tableau 1 résume les indications de l'antibiothérapie ainsi que les molécules recommandées. Le choix d'un traitement par antibiotiques ainsi que le type d'antibiotiques utilisés sont conditionnés par le résultat du VEMS. Les principales classes d'antibiotiques utilisées sont les bêta-lactamines (+/- associées à un inhibiteur de bêta-lactamase), les macrolides et synergistines et les fluoroquinolones (7). Les fluoroquinolones ne doivent pas être utilisées en 1^{ère} intention. La durée de traitement actuellement recommandée est de 5 jours (8). Un échec thérapeutique impose d'éliminer une atteinte parenchymateuse par la radiographie de thorax et de rechercher une infection à *P. aeruginosa* en cas de BPCO évoluée.

Tableau 1 : Prescriptions d'antibiotiques dans les exacerbations de BPCO

Stade clinique de gravité de la BPCO évalué en dehors de toute exacerbation	Indications à l'antibiothérapie	Choix de l'antibiothérapie
Absence de dyspnée ou VEMS > 50 %	Pas d'antibiotique	
Dyspnée d'effort (VEMS < 50 %)	Antibiothérapie seulement si expectoration franchement purulente verdâtre	Amoxicilline ou cefuroxime-axetil ou cefpodoxime-proxetil ou cefotiam-hexetil* ou macrolide ou pristinamycine ou télichromycine**
Dyspnée au moindre effort ou dyspnée de repos (VEMS < 30 %)	Antibiothérapie systématique + recherche des autres causes d'exacerbation de la dyspnée	Amoxicilline - acide clavulanique ou C3G injectable : cefotaxime ceftriaxone ou fluoroquinolone anti-pneumococcique*** : lévofloxacine

* L'émergence de souches sécrétrices de bêta-lactamases dans la communauté devrait faire limiter leur utilisation.

** Utilisable si les autres antibiotiques proposés ne peuvent être prescrits (risque plus élevé d'effets indésirables graves).

*** Pas si le patient en a déjà pris une dans les 3 derniers mois. Prudence chez le sujet âgé.

Remarque : compte tenu des études, il n'y a aucune hiérarchisation des molécules dans chaque groupe.

Outre l'antibiothérapie, d'autres mesures sont conseillées : arrêt du tabac, bronchodilatateur par voie inhalée, courte corticothérapie per os si bronchospasme, kinésithérapie respiratoire. Les antitussifs sont contre-indiqués (3).

La prévention des exacerbations d'origine infectieuse repose sur la vaccination antigrippale annuelle et antipneumococcique. Actuellement, le schéma vaccinal recommandé pour les patients atteints de BPCO et plus largement pour tous les insuffisants respiratoires, consiste en une injection de vaccin conjugué 13-valent (VPC13) Prevenar® suivie 8 semaines plus tard par le vaccin non conjugué 23-valent (VPP23) Pneumovax®. Les personnes vaccinées avec la séquence VPC13 + VPP23 pourront recevoir une nouvelle injection du VPP23 en respectant un délai de 5 ans après la dernière injection. Pour les personnes qui n'ont reçu antérieurement que le vaccin VPP23, elles pourront recevoir une injection du VPC13 si la vaccination antérieure remonte à plus de 1 an ; l'injection ultérieure du VPP23 sera réalisée avec un délai minimal de 5 ans par rapport à la date de l'injection du VPP23 (9).

I.2.2. La bronchiolite du nourrisson

La bronchiolite aiguë est une affection virale respiratoire qui atteint les petites bronches. La bronchiolite du nourrisson est la principale cause d'infections respiratoires chez les nourrissons avant 2 ans. Prédominante l'hiver, elle affecte 460 000 bébés par an, principalement entre 2 et 8 mois. Favorisée par la promiscuité, elle est le plus souvent due au virus respiratoire syncytial humain (VRS) de transmission interhumaine (3).

Le diagnostic est clinique et ne requiert aucun examen biologique ni radiologique. Le tableau typique est celui d'une dyspnée expiratoire sifflante avec toux, parfois fébrile, généralement précédée d'une rhinopharyngite. L'auscultation trouve des râles sibilants et/ou crépitants bilatéraux ; la recherche d'une hépatomégalie est indispensable pour éliminer une insuffisance cardiaque (3).

La prise en charge est uniquement symptomatique et repose notamment sur les désobstructions rhinopharyngées pluriquotidiennes, au sérum physiologique (pas de respiration buccale lors des premiers mois de vie), l'hydratation et le fractionnement de l'alimentation. Les corticoïdes (inhalés ou per os) et les bronchodilatateurs n'ont aucune indication dans une première bronchiolite typique. La kinésithérapie respiratoire est sans effet sur la durée d'hospitalisation, même si son indication en médecine ambulatoire est débattue. Une prévention par des anticorps monoclonaux anti-VRS (palivizumab (SYNAGIS®)) diminue la fréquence des hospitalisations. Mais le coût élevé du traitement (environ 120 euros par kg) en limite l'utilisation aux prématurés (< 32 semaines d'aménorrhée), aux enfants de moins de 3 mois et aux enfants de moins de 2 ans avec dysplasie broncho-pulmonaire ou atteints d'une cardiopathie congénitale avec perturbations hémodynamiques. Les facteurs de risque de forme sévère sont un âge inférieur à 12 semaines, un antécédent de prématurité, une pathologie cardiovasculaire ou une immunodépression. Certains critères imposent une hospitalisation, parmi lesquels l'âge (nourrisson de moins de 6 semaines ou de moins de 3 mois d'âge corrigé pour les prématurés de moins de 32 semaines d'aménorrhée) et un environnement défavorable (difficultés psychosociales ou d'accès aux soins). Une hospitalisation doit également être envisagée en cas de polypnées, apnées, troubles de la conscience, cyanose, saturation capillaire < 94 % et troubles alimentaires (3).

I.2.3. Les bronchites aiguës

Les bronchites aiguës se définissent par une inflammation des bronches et des bronchioles. Les signes cliniques sont caractérisés par une toux souvent sèche au début qui peut devenir purulente, associée à des douleurs thoraciques bronchiques (brûlure rétrosternale). Une infection des voies aériennes supérieures peut précéder la symptomatologie. Les bronchites aiguës sont extrêmement fréquentes (10 millions de cas/an en France), mais rarement à l'origine d'insuffisance respiratoire aiguë chez l'enfant ou l'adulte sain (3). Les virus respiratoires sont à l'origine de 50 à 90 % des bronchites aiguës microbiologiquement documentées, quelles que soient les méthodes diagnostiques utilisées (10), (11),(12),(13),(14),(15). Les coronavirus, les rhinovirus et les adénovirus sont plutôt à l'origine d'une infection des voies aériennes supérieures associée à une bronchite. Les virus influenza A, influenza B, para-influenza et le virus respiratoire syncytial (VRS) sont plutôt à l'origine d'une bronchite prédominante (16). Les bactéries à développement intracellulaire (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* et *Bordetella pertussis*) sont en cause dans moins de 10 % des cas (17),(18). Liées à une inflammation des bronches proximales, les bronchites aiguës s'accompagnent d'une hypersécrétion de mucus. La toux, en général marquée (sèche initialement, volontiers nocturne, quinteuse douloureuse, devenant productive au bout de quelques jours), contraste avec la pauvreté de l'examen clinique (quelques ronchi à l'auscultation). Aucun traitement n'est recommandé en dehors d'une bonne hydratation, notamment chez les patients fragilisés (les antitussifs peuvent aggraver l'encombrement et induire une somnolence). Elles ne requièrent le plus souvent pas d'antibiothérapie puisqu'elles sont en grande majorité d'origine virale (19). En cas de comorbidités sévères, telles que l'insuffisance cardiaque chronique, le diabète insulino-dépendant, ou un antécédent d'accident vasculaire cérébral avec séquelles, le risque de complications (surinfections, décompensation cardiaque, déshydratation...) est sérieux. Ces patients doivent donc être étroitement surveillés, pour ne pas retarder la mise en route d'une antibiothérapie en cas de surinfection bactérienne (20).

I.2.4. Les pneumonies aiguës communautaires (PAC)

La pneumonie est définie par une infection du parenchyme pulmonaire d'évolution aiguë. Elle est la conséquence d'une infection par un germe caractérisé par son inoculum, sa virulence, ses résistances naturelles ou acquises aux antibiotiques usuels chez un hôte dont les défenses locales n'ont pas permis de maîtriser l'infection (21).

Avec environ 500 000 cas par an en France, les pneumonies aiguës communautaires (PAC) sont la première cause d'insuffisance respiratoire aiguë d'origine infectieuse. La mortalité liée à ces infections est de 15 % (19). Le tabagisme actif multiplie environ par deux leur risque de survenue (22). La prise en charge doit donc être bien codifiée, l'objectif étant pour le médecin généraliste d'initier rapidement une antibiothérapie adaptée à l'écologie bactérienne et d'hospitaliser les patients qui en ont besoin.

L'étiologie des pneumonies est complexe et encore mal comprise parce que les microbes responsables de pneumonies sont extrêmement variés et nombreux (Figure 1). Les agents identifiés sont très variés et incluent différents virus (virus à ARN et ADN, virus enveloppés ou non) et bactéries (bactéries à Gram positif et Gram négatif, bactéries intracellulaires ou extracellulaires). Les pneumonies peuvent être également causées par des levures ou des champignons comme *Pneumocystis jirovecii*. Chaque pathogène donné ne représente qu'une petite fraction de tous les cas de pneumonies, la plupart des cas étant d'étiologie inconnue. Les trois microorganismes les plus fréquemment retrouvés parmi les patients adultes hospitalisés pour une PAC sont les rhinovirus (9 %), les virus influenza (6 %) et *S. pneumoniae* (5 %) (23).

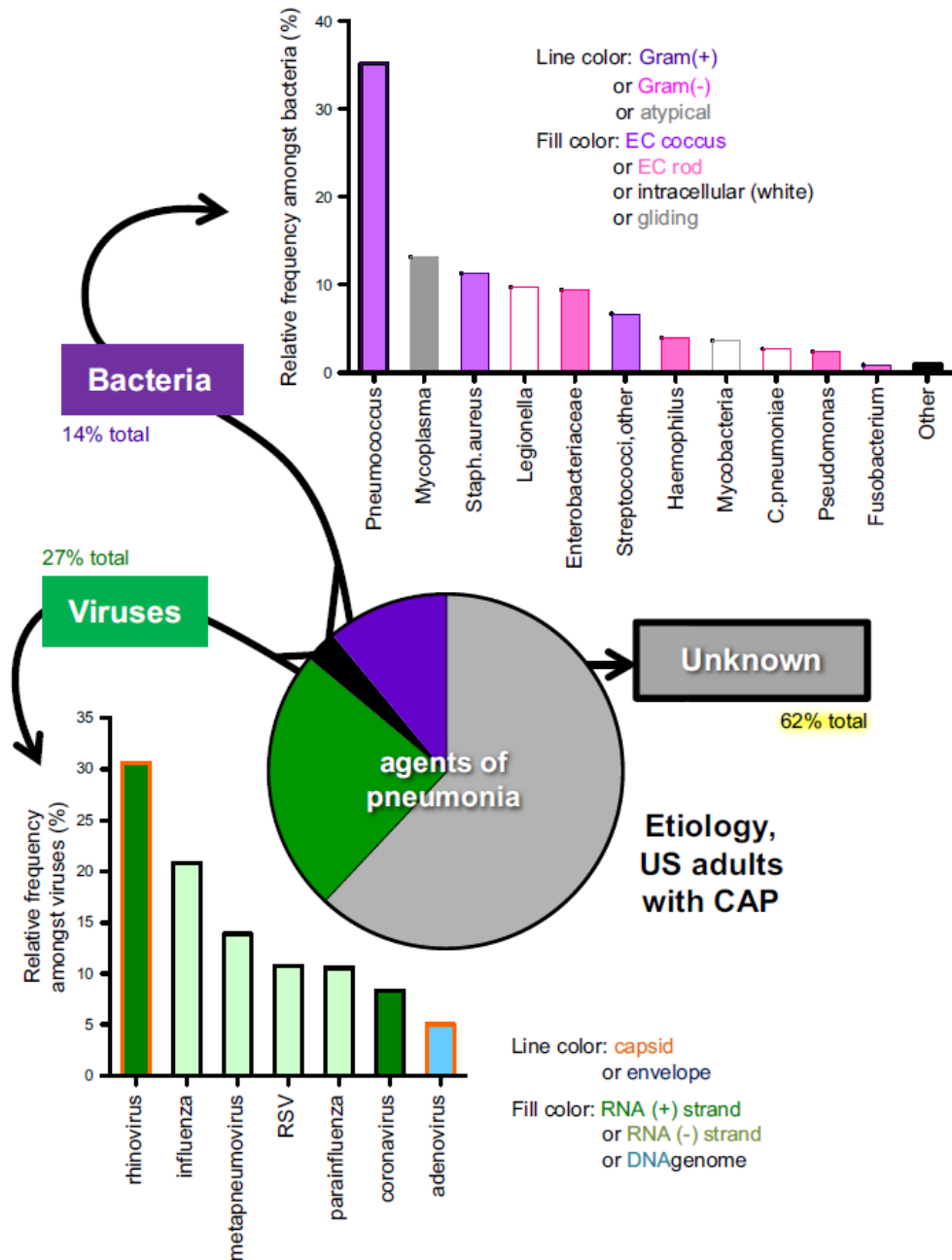


Figure 1: Agents microbiologiques retrouvés chez des patients adultes immunocompétents hospitalisés pour pneumonies aiguës communautaires (23)

Aucun signe clinique, radiologique ou biologique n'a de valeur discriminante suffisante pour identifier le micro-organisme. Néanmoins, certains éléments cliniques et biologiques, décrits dans le tableau 2, peuvent orienter le diagnostic vers une suspicion d'infection à *S. pneumoniae*, à bactéries atypiques ou à *Legionella pneumophila* (3). Dans le cas d'une pneumonie à *S. pneumoniae*, on parlera de pneumopathie franche lobaire aiguë (PFLA).

Tableau 2 : Eléments d'orientation diagnostique (3)

En faveur du pneumocoque (PFLA)	Agent le plus fréquent chez le sujet ≥ 40 ans et/ou avec comorbidité(s) Début brutal, fièvre élevée dès le premier jour Malaise général, point douloureux thoracique Opacité alvéolaire systématisée Hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles CRP élevée (> 50 mg/L)
En faveur des bactéries atypiques	Contexte épidémique (notamment pour <i>Mycoplasma pneumoniae</i>) Début progressif en 2 à 3 jours
En faveur d'une légionellose	Contexte épidémique ou « situation à risque » (voyage, thermes, exposition à de l'eau en aérosol contaminée ...) Comorbidité(s) fréquente(s) Tableau évocateur (1/3 des cas) avec pneumonie d'allure sévère, début progressif, sans signe ORL, pouls dissocié, atteinte souvent bilatérale avec opacité interstitielle non systématisée Signes extrathoraciques : digestifs (douleurs abdominales, vomissements, diarrhée), neurologiques (troubles de la conscience, céphalées, myalgies) Echec des bêta-lactamines

En l'absence de signe de gravité, il n'y a pas lieu de rechercher systématiquement le germe (20). L'antibiothérapie doit être précoce en raison de la gravité potentielle des pneumopathies à pneumocoque. Le traitement de première intention repose sur une mono-antibiothérapie par amoxicilline (1 g x 3/j pendant 7 à 14 jours) ciblant le pneumocoque, en l'absence de suspicion d'infection à bactéries atypiques. En cas d'échec à 48 heures, on doit lui substituer un macrolide (roxythromycine 150 mg x 2/j pendant 7 à 14 jours) ou la pristinamycine (1 g, 3 x/j, 7 à 14 jours) afin de couvrir les germes intracellulaires. Les fluoroquinolones anti-pneumococciques sont de plus en plus abandonnées du fait de la pression de sélection et des résistances qu'elles engendrent. En cas de surinfection suite à une grippe, c'est l'association amoxicilline-acide clavulanique qui est recommandée (3). Les facteurs de risque de complication de la pneumonie sont soit liés au terrain du patient (âge et environnement, pathologies et traitements associés) et soit liés à la sévérité de la PAC (Tableau 3) (20).

Tableau 3 : Facteurs de risque de complication des PAC (3)

Liés au terrain	Age \geq 65 ans BPCO, asthme Insuffisance cardiaque, diabète Hospitalisation dans les dernières années Prise de corticoïdes au long cours, immunodépression Traitement antibiotique dans le mois précédent Pathologie maligne évolutive Insuffisance rénale ou hépatique chronique Atteinte des fonctions supérieures Conditions socio-économiques défavorables, isolement
Liés à la gravité de la PAC	Sensation de malaise Absence de signe d'atteinte ORL Confusion, troubles de vigilance Pouls $>$ 100 battements/min Température $>$ 38°C Fréquence respiratoire $>$ 30/min Pression artérielle $<$ 90/60 mmHg Echec d'une antibiothérapie préalable Pneumonie d'inhalation

De nombreux scores pronostiques identifiant les patients les plus fragiles font décider d'une hospitalisation. Parmi toutes ces aides à la décision, le CRB-65 est le plus simple à retenir et à utiliser. Le score CRB-65 établi par la *British Thoracic Society* (« C » pour confusion, « R » pour respiratoire, « B » pour *blood pressure* et « 65 » pour 65 ans) est défini par une confusion, une fréquence respiratoire \geq 30/min, une pression artérielle systolique $<$ 90 mmHg ou une pression artérielle diastolique \leq 60 mmHg. La conduite à tenir varie en fonction du nombre de critères observés. L'absence de critères rend possible un traitement ambulatoire. Par contre, la présence d'au moins un critère nécessite une évaluation en milieu hospitalier (24). Le score CURB-65 (*British Thoracic Society*) permet d'évaluer le risque de mortalité. Il reprend les paramètres cliniques du score CRB-65 auquel s'ajoute un critère biologique (l'urée sanguine $>$ 7 mmol/L). Un patient présentant au moins 2 des 4 facteurs (hormis l'âge) multiplie par 36 le risque de mortalité (24). Enfin, le score ATS (*American Thoracic Society*) comprend des critères majeurs (nécessité d'une ventilation mécanique, choc septique) et des critères mineurs (pression artérielle systolique \leq 90 mmHg, atteinte multi lobaire, ratio pression partielle de l'oxygène/fraction inspirée en oxygène $<$ 250). La présence d'un critère majeur ou deux critères mineurs prédit la nécessité d'une admission en soins intensifs (25).

L'antibiothérapie probabiliste doit être instaurée dès le diagnostic porté, idéalement dans les 4 heures. En cas de comorbidités ou chez le sujet âgé (hors institution) sans signe de gravité, l'association amoxicilline-acide clavulanique est recommandée en premier choix, selon l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), la Société de pathologie infectieuse de langue française (Spilf) et la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF). Pour les PAC prises en charge en unité de soins intensifs et réanimation, l'association céphalosporines de 3^{ème} génération + macrolides ou lévofloxacine est préconisée. La durée du traitement antibiotique des PAC est classiquement de 7 à 14 jours (10 jours en moyenne) (7).

Enfin, chez le patient tabagique actif, la découverte d'une PAC doit être l'occasion de dépister une BPCO et un cancer bronchopulmonaire, surtout si une opacité radiologique persiste malgré le traitement antibiotique. Il est également licite de rechercher une immunodépression liée au VIH. En effet, la fréquence des PAC est très élevée dans la population séropositive pour le VIH, même en l'absence d'immunodépression sévère (CD4 > 500/mm³). Les germes les plus fréquemment retrouvés sont alors *S. pneumoniae* et *H. influenzae* (26).

I.2.5. La grippe

I.2.5.1. Pathogénicité

Le virus de la grippe est responsable d'épidémies annuelles hivernales, voire de pandémies. La grippe peut être à l'origine de pneumopathies virales, de surinfections respiratoires bactériennes et parfois de myocardites. Chaque année en France, on estime que la grippe saisonnière touche 5 à 7 millions de personnes (soit 5 à 10 % des adultes et 20 à 30 % des enfants), et est responsable d'au moins 1 500 décès (27). Elle engendre également des coûts économiques importants en termes d'hospitalisation mais aussi d'absentéisme professionnel, estimés à 100 millions d'euros par an (3).

Lors d'une épidémie saisonnière, tous les âges peuvent être touchés, mais le risque de complications (pneumopathies grippales, hospitalisations, décès...) est particulièrement élevé dans certains groupes à risque (3) :

- très jeune enfant, avant 2 ans ;
- patient atteint d'une maladie chronique respiratoire ou cardiaque. La grippe peut être à l'origine d'une exacerbation ou d'une décompensation, notamment chez les sujets atteints de BPCO ;

- personne âgée de plus de 65 ans, d'autant plus en cas de comorbidités importantes ;
- femme enceinte, chez laquelle la grippe est également plus fréquente et plus sévère que dans la population générale et est responsable de pneumopathies et d'hospitalisation. Le virus n'a pas de pouvoir tératogène mais peut être responsable de perte fœtale et d'accouchement prématuré (28).

I.2.5.2. Traitement

Quatre classes de médicaments antiviraux sont validées pour le traitement de la grippe dans plusieurs pays : les adamantanes, les inhibiteurs de neuraminidases, les inhibiteurs de la fusion membranaire, les inhibiteurs d'ARN polymérase ARN dépendante. Parmi eux, seuls les adamantanes et les inhibiteurs de neuraminidases sont autorisés en Europe et aux Etats-Unis. La famille des adamantanes incluent deux molécules utilisées par voie orale, l'amantadine (Mantadix®) et la rimantadine (Flumadine®), actifs uniquement sur les virus de la grippe A (29). Inhibiteurs de la protéine M2, elles bloquent la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule infectée (30),(31). Ces deux molécules ont été utilisées à grande échelle et ont entraîné le développement d'une résistance de la majorité des souches circulantes contemporaines du virus de la grippe A. L'utilisation des adamantanes n'est donc plus recommandée (29). La deuxième famille est représentée par les inhibiteurs de neuraminidase : oseltamivir (Tamiflu®) par voie orale et zanamivir (Relenza®) par inhalation. Ces molécules miment l'acide sialique, substrat de la neuraminidase. L'acide sialique et l'inhibiteur de neuraminidase rentrent alors en compétition pour se lier au site actif de l'enzyme. Une fois l'inhibiteur fixé au site catalytique, la neuraminidase est inactivée (32). Ces médicaments peuvent être utilisés en thérapeutique ainsi qu'en prophylactique post-exposition. Ils doivent être administrés au plus tard 48h après l'apparition des symptômes pour être efficaces. A noter qu'il existe un troisième inhibiteur de neuraminidase, le peramivir, administré par voie intraveineuse mais uniquement disponible aux Etats-Unis (29).

Un syndrome grippal chez une femme enceinte implique une évaluation médicale pour confirmer le diagnostic et éliminer une autre infection maternelle nécessitant une prise en charge rapide : listériose, chorio-amnionite, pyélonéphrite, primo-infection virale par exemple. En cas de contage avéré dans l'entourage proche et de symptomatologie grippale, un traitement précoce, prophylactique ou curatif selon les cas, par oseltamivir est recommandé chez la femme enceinte, quel que soit le terme (28).

La prévention la plus efficace est la vaccination annuelle. Elle est recommandée dans les groupes à risque (9) :

- patients âgés de 65 ans et plus ;
- femme enceinte quel que soit le trimestre de la grossesse ;
- dès l'âge de 6 mois chez les personnes ayant des affections cardiorespiratoires chroniques, des atteintes neurologiques, une néphropathie ou une hépatopathie chronique, un diabète, un déficit immunitaire, des pathologies du globule rouge
- les personnes obèses avec un indice de masse corporelle (IMC) égal ou supérieur à 40 kg/m², sans pathologie associée ou atteintes d'une pathologie autre que celles citées ci-dessus ;
- dans l'entourage des nourrissons < 6 mois ayant des facteurs de risque de grippe grave (prématurité, pathologie cardiorespiratoire) ;
- sujets institutionnalisés et largement chez les soignants et les professionnels au contact de voyageurs

II. Virus de la grippe et réponse antivirale de l'hôte

Les pneumonies qu'elles soient d'origine virale (grippe) ou bactérienne (*S. pneumoniae*) peuvent être un facteur déclenchant d'exacerbations de pathologies pulmonaires chroniques sous-jacentes comme la BPCO, l'asthme, les bronchites chroniques mais également responsable d'une diminution des fonctions pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose (29). Pour faire face à l'infection, l'hôte met en place des mécanismes de défense complexes. Le système immunitaire a pour objectif d'éliminer les pathogènes tandis que la résilience tissulaire implique la prévention et/ou la résolution des dommages tissulaires liés à l'infection et/ou à la réponse de l'hôte au pathogène. Ces deux systèmes doivent être équilibrés pour être efficace et respecter l'homéostasie (23). Nous présenterons ici les caractéristiques du virus de la grippe et l'exemple de la réponse antivirale de l'hôte lors de l'infection par ce virus.

II.1. Le virus de la grippe

Les virus grippaux appartiennent à la famille des Orthomyxoviridae. Ce sont des virus enveloppés de 80 à 120 nm de diamètre, à ARN simple brin de polarité négative (Figure 2). Leur génome est segmenté avec 8 segments pour les virus de la grippe A et B et 7 pour les virus de type C et D (Tableau 4). Chaque segment est recouvert de multiples copies de nucléoprotéines virales (NP). Chacune des extrémités 3' et 5' des huit segments d'ARN, strictement conservées, interagissent avec une ARN-polymérase formant ainsi un complexe ribonucléoprotéique (RNP), entité fonctionnelle pour la transcription et la réplication. Le complexe RNP comprend donc un segment d'ARN viral associé à la nucléoprotéine NP et trois polymérases (PA, PB1 et PB2). La protéine de la matrice (M1), couvrant la face interne de l'enveloppe, est associée à la fois au RNP et à l'enveloppe virale. L'enveloppe virale dérive de la membrane des cellules infectées. Elle est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées, sous la forme de spicules, deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Les virus de type C ne comportent qu'une seule glycoprotéine de surface l'hémagglutinine estérase (HEF). Une protéine transmembranaire, dite M2 pour les virus de types A, NB pour les virus de type B et CM2 pour les virus de type C, est également

présente en quantité moindre (Figure 2) (33),(34). La protéine non structurale NS1 est un facteur de virulence qui s'oppose aux défenses antivirales de l'hôte. Elle est absente de la particule virale mais est fortement exprimée dans la cellule infectée, agissant par un blocage général sur les synthèses cellulaires et en empêchant l'activation d'acteurs-clés du système interféron (35). La protéine NS2, désormais appelée NEP (*Nuclear Export Protein*), participe à l'export des RNPv du noyau vers le cytoplasme. NEP favorise la transition entre l'étape de transcription des gènes viraux et l'étape de réplication. Elle est également impliquée dans le processus de bourgeonnement (36).

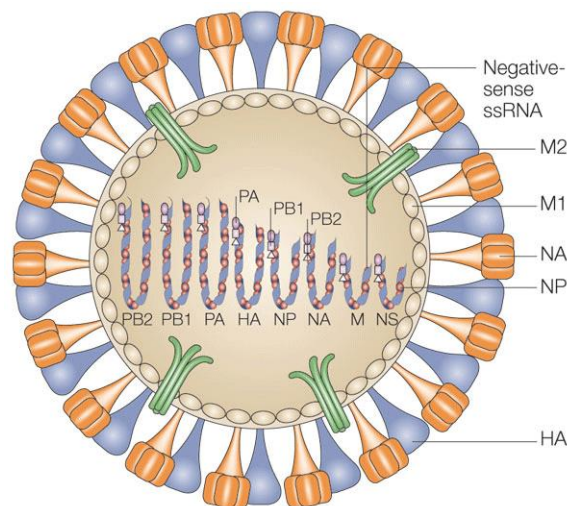


Figure 2 : Représentation schématique du virus de la grippe (33)

Deux protéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), et la protéine transmembranaire M2 sont intégrées dans l'enveloppe virale, qui dérive de la membrane plasmique de l'hôte. Le complexe ribonucléoprotéique est composé d'un segment d'ARN viral associé à la nucléoprotéine (NP) et trois polymérases (PA, PB1 and PB2). La protéine de matrice M1 est associée à la ribonucléoprotéine et à l'enveloppe virale. Une petite quantité de protéine non structurale 2 (NEP/NS2) est également présente, mais sa localisation dans le virion est inconnue.

Tableau 4 : les segments du virus de la grippe A et les protéines encodées (34)

N° de segment	Protéine(s) encodée(s)	Fonction principale
1	PB2	Composante de l'ARN polymérase, reconnaissance de la cape
2	PB1	Composante de l'ARN polymérase, élongation et activité endonucléase
3	PA	Composante de l'ARN polymérase, activité protéase
4	HA	Hémagglutinine, liaison au récepteur cellulaire et fusion
5	NP	Liaison avec l'ARN (forme les RNP ou ribonucléoprotéine)
6	NA	Neuraminidase
7	M1 M2	M1 : protéine de matrice M2 : canal ionique
8	NS1 NEP/NS2	NS1 : protéine antagoniste de l'interféron, régulation de l'expression des gènes de l'hôte NEP/NS2 : export nucléaire des RNP

La distinction entre les virus influenza de type A, B, C et D se fait sur les différences antigéniques des NP et des protéines matricielles M1. Les virus de type A, B et C infectent facilement les humains. Mais ce sont les virus de type A et B qui sont responsables des maladies respiratoires épidémiques saisonnières et pandémiques. Pour les virus de type A, un sous-typage supplémentaire est basé sur l'antigénicité des glycoprotéines de surface hémagglutinine et neuraminidase. Actuellement, 16 sous-types HA (H1-H16) et 9 sous-types NA (N1-N9) ont été identifiés dans les virus de type A (37),(38),(39).

II.2. Le cycle répliatif viral

II.2.1. L'entrée du virus

L'entrée du virus dans la cellule hôte est assurée par l'hémagglutinine HA qui se fixe spécifiquement aux acides sialiques portés par les glycolipides et les glycoprotéines cellulaires (étape 1 Figure 3). Pour être fonctionnelle et permettre l'infection, l'hémagglutinine HA sous forme de précurseur HA0 doit être clivée par des protéases cellulaires en HA1 et HA2, au

niveau d'un peptide reliant les deux sous-unités. La particule virale est internalisée dans des endosomes et fusionne avec les endosomes tardifs, au niveau de la région périnucléaire de la cellule (étape 2 Figure 3). L'acidification de l'endosome à un pH de l'ordre de 5 entraîne un changement de conformation de la protéine virale M2 qui a un rôle de canal ionique M2, ce qui provoque l'entrée d'un flux de protons de l'endosome acide dans la particule virale. Cela favorise la dissociation des complexes formés entre les RNPs et la protéine de matrice M1. Cette acidification produit également un changement de conformation de la protéine active HA, ce qui permet le démasquage du peptide de fusion. La fusion entre la membrane de l'endosome et la bicouche lipidique virale aboutit à la libération des RNPs dans le cytoplasme (étape 3 Figure 3). La protéine M1 n'interagit plus avec les complexes RNPs, qui peuvent dès lors migrer jusque dans le noyau (étape 4 Figure 3) (40).

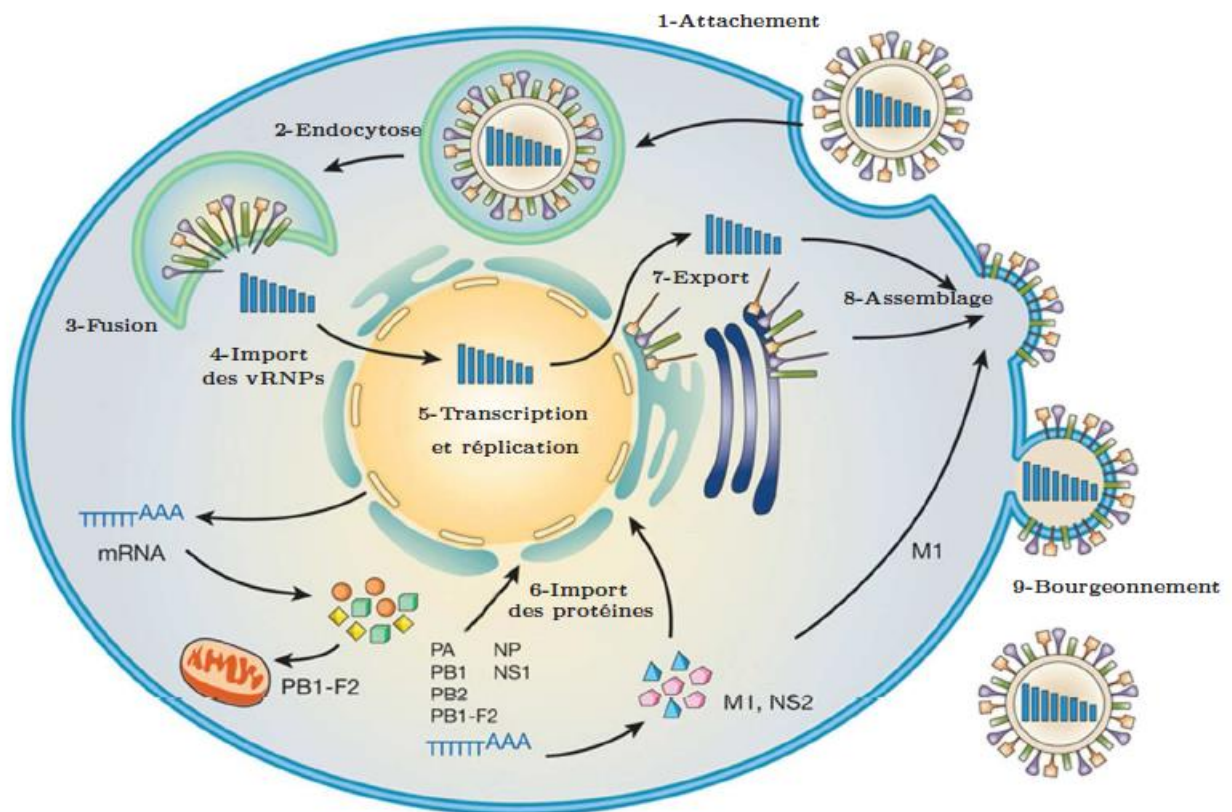


Figure 3 : Cycle de réplication du virus de la grippe, adapté de (41)

II.2.2. Transcription et réplication des ARN viraux

La transcription et la réplication des ARN se déroulent dans le noyau des cellules infectées (étape 5 Figure 3). La translocation des RNPs vers le noyau fait intervenir des protéines de la famille des importines et des signaux d'adressage nucléaire présents au niveau de la nucléoprotéine NP. La synthèse de nouvelles particules virales nécessite deux étapes. La première étape correspond à la transcription du génome viral en ARNm suivie de la synthèse des protéines virales dans le cytoplasme. La deuxième étape consiste en la réplication du génome par l'intermédiaire d'ARN complémentaires. Ces deux étapes bien distinctes nécessitent de copier l'ARNv de polarité négative en ARN de polarité positive. Chaque RNP fonctionne comme une unité de transcription et de réplication indépendante. La transcription et la réplication sont assurées par le complexe polymérase, constitué des protéines PB1, PB2 et PA (ou P3 pour les virus de type C) (42).

Lors de la transcription, l'ARN-polymérase virale synthétise des ARNm qui portent une coiffe à leur extrémité 5' et une queue poly-A à leur extrémité 3'. L'acquisition de cette coiffe est réalisée selon un mécanisme particulier appelé vol de coiffe. L'ARN-polymérase virale reconnaît spécifiquement la coiffe ou 7-méthyl-guanosine (7mG) des pré-ARNm cellulaires. Elle clive ensuite, grâce à une activité endonucléase, les pré-ARNm 10-13 nucléotides après la coiffe (étape B Figure 4). Ces petits oligonucléotides d'ARN cellulaires coiffés servent alors d'amorces pour initier la transcription des ARNm viraux (étape C Figure 4). En fin de transcription, l'ARN-polymérase ajoute une queue poly-A à l'extrémité 3' des ARNm viraux, par un mécanisme de bégaiement à partir d'une courte séquence poly-U localisée à l'extrémité 5' de l'ARN viral (ARNv) (étape D Figure 4) (42).

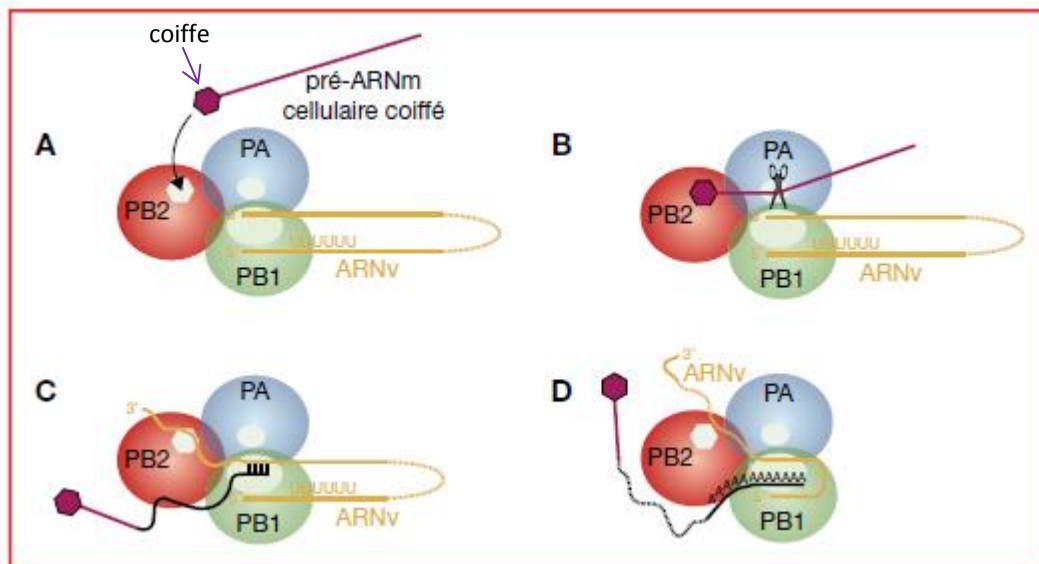


Figure 4 : Représentation schématique du mécanisme de transcription coiffe-dépendant spécifique de l'ARN-polymérase du virus de la grippe, d'après (43)

Lors de la réplication, une première copie complémentaire et colinéaire de l'ARNv est synthétisée puis « encapsidée » par l'ARN-polymérase et la NP. L'ARN complémentaire répliqué, porté par ces RNPs, sert alors de matrice pour la synthèse de nouveaux ARNv. Ceux-ci sont également encapsidés, formant de nouveaux complexes ribonucléoprotéiques et ensuite exportés dans le cytoplasme en vue de former de nouveaux virions. Les RNPs viraux nouvellement formés sont ré-importées au noyau : ils réalisent en effet les transcriptions et répliquions suivantes (étape 6 Figure 3). Les vRNPs nouvellement synthétisées sont exportées dans le cytoplasme (étape 7 Figure 3) (42).

II.2.3. Encapsidation et bourgeonnement

Afin que le virus s'assemble, il faut que les protéines virales et les segments ribonucléoprotéiques soient présents au niveau de la membrane (étape 8 Figure 3). Les protéines HA et NA vont s'insérer grâce à un remaniement dans la membrane de la cellule hôte. Sur la face interne de la membrane cytoplasmique, les protéines M1 et M2 vont former la matrice. C'est au niveau de cette matrice que viennent s'assembler les nucléocapsides et les protéines virales de l'enveloppe par un processus de bourgeonnement. Les ARN négatifs du génome viral s'associent avec la protéine NP pour former les ribonucléoprotéines associées au complexe polymérase. C'est surtout la protéine M1 qui est importante pour l'encapsidation et le bourgeonnement (44).

II.2.4. Libération des nouveaux virions

Les nouveaux virions formés par bourgeonnement restent attachés à la cellule hôte par la liaison de l'hémagglutinine virale et les acides sialiques cellulaires. Ils se détachent de la cellule par clivage de l'hémagglutinine par la neuraminidase (étape 9 Figure 3). Une fois libérées les particules virales diffusent à travers la couche de mucus et vont infecter d'autres cellules de l'épithélium respiratoire. La cellule hôte épuisée par la réplication virale devient alors la cible de la réponse immunitaire cytotoxique et est progressivement détruite (44).

II.2.5. Variation antigénique

II.2.5.1. Dérive génétique (ou glissement antigénique)

Comme souvent dans le cas des virus à ARN, l'ARN-polymérase du virus de la grippe est dépourvue d'activité de correction d'erreur, engendrant un taux élevé de mutations du génome viral à l'origine de la dérive génétique. Ces erreurs aboutissent à des mutations ponctuelles au niveau des bases nucléotidiques des gènes viraux et par conséquent à des modifications au niveau des protéines pour lesquelles ils codent. Ces variations antigéniques sont mineures, et apparaissent essentiellement pour l'hémagglutinine et à moindre titre pour la neuraminidase. Tous les gènes codant pour les autres protéines virales peuvent *a priori* subir des mutations, dans la limite où les protéines codées par ces gènes conservent des fonctions compatibles avec la réplication virale. Le glissement antigénique concerne un sous-type, pour lequel apparaissent des variants successifs qui diffèrent progressivement de la souche d'origine. Il concourt à l'apparition d'épidémies annuelles limitées en raison de l'échappement partiel du virus à la réponse immunitaire de l'hôte. Il apparaît que chaque nouveau variant de virus grippal A, capable de réinfecter un individu préalablement exposé, présente au moins quatre substitutions d'acides aminés au niveau d'au moins deux sites antigéniques de l'hémagglutinine (45).

II.2.5.2. Cassure antigénique (ou saut)

La cassure antigénique (ou saut) est rendue possible par le caractère segmenté du génome des virus grippaux et constitue le second mécanisme de variation antigénique présent uniquement chez les virus grippaux de groupe A. Elle se produit lorsque deux virus différents provenant de deux espèces hôtes différentes co-infectent un seul hôte, ce qui facilite l'échange d'informations génétiques entre les virus grippaux A et permet au virus de subir des sauts évolutifs imprévisibles. Elle correspond au remplacement complet d'un ou plusieurs gènes d'une souche virale par un gène équivalent d'une autre souche virale (réassortiment génétique). Ce processus a pour résultat un nouveau virus A au niveau antigénique contre lequel la population humaine ne présente pas d'immunité. De tels virus ont eu le potentiel de causer trois pandémies de grippe au XXe siècle, en 1918 avec un sous-type A H1N1, en 1957 avec un sous-type A H2N2 et en 1968 avec un sous-type A H3N2 (45). En 2009, un nouveau virus du sous-type A/H1N1, partant du Mexique, a provoqué la première pandémie grippale du XXIe siècle (nommée au début « grippe porcine ») (46).

II.3. La réponse interféron antigrippale

La réponse interféron est la réponse antivirale majeure qui se déclenche dès l'entrée du virus dans la cellule et la reconnaissance de l'ARN viral par les récepteurs de l'immunité innée. En effet, la reconnaissance des virus se fait grâce aux récepteurs de l'immunité innée tels que les « *Toll-like receptors* » (TLR), les « *RIG-I-like receptors* » (RLR) et les « *NOD-like receptors* » (NLR) (47). Ainsi, la stimulation de ces récepteurs par des motifs viraux active des voies de signalisation qui via les facteurs de régulation des interférons (IRF) conduisent à l'induction de la transcription des interférons de type I (IFN α , IFN β) mais aussi de cytokines et chimiokines. Les interférons de type I en se fixant à leurs récepteurs (IFNAR, *Interferon alpha/beta receptor*) induisent la voie JAK1-STAT1/2 (*Janus kinase1-Signal transducers and activators of transcription1/2*) qui mène à la transcription d'une centaine de gènes stimulés par l'interféron (ISG). Les ISG peuvent être directement induits par certains IRF via une voie de signalisation indépendante des interférons. Certains ISG sont des éléments des voies de signalisation médiées par les interférons et participent ainsi à l'amplification de la signalisation. Les ISG présentent des fonctions effectrices antivirales qui ciblent de nombreuses étapes du cycle viral. *A contrario*, certains ISG amplifient la réplication de certains virus (47).

Plusieurs PRR sont impliqués dans la reconnaissance du virus de la grippe. TLR3, qui reconnaît l'ARN double brin, est exprimé dans le compartiment endosomal de différents types cellulaires impliqués dans l'infection par le virus de la grippe, notamment les cellules épithéliales respiratoires et les cellules dendritiques. Le récepteur TLR8 humain et le récepteur TLR7 murin, également exprimés dans les endosomes, peuvent également détecter l'ARN simple brin pour favoriser la transcription des ISGs. En plus des récepteurs PRR endosomaux, la plupart des cellules expriment des récepteurs PRR cytosoliques de la famille des RLR, incluant RIG-I et MDA-5 (*melanoma differentiation associated proteïne 5*), qui reconnaissent l'ARN viral cytoplasmique. RIG-I reconnaît des ligands courts d'ARN avec des coiffes 5'-triphosphate (5'-ppp) produits lors de la réplication virale. MDA-5 reconnaît plutôt des ARN viraux de longue taille (supérieurs à 2 kilobases) et des produits de réplication intermédiaires (48).

Il est clairement établi que l'induction d'interféron en réponse à l'infection par le virus de la grippe dans les cellules épithéliales respiratoires et les autres types cellulaires dépend majoritairement de RIG-I. Cependant d'autres études suggèrent que MDA-5 jouerait un rôle complémentaire dans l'induction des IFN puisque les cellules déficientes en MDA-5 montrent une diminution de l'induction d'IFN après une exposition au virus de la grippe (48).

S'il est admis que les ISGs sont des médiateurs de l'activité anti-virale vis-à-vis de nombreux virus, la connaissance de leur mécanisme d'action est encore limitée. En plus des ISGs, les cellules de l'hôte expriment une série d'autres protéines avec une activité antivirale qui sont régulées indépendamment des IFN de type I. Les ISGs et autres protéines cellulaires avec une activité antivirale (nommées facteurs de restriction) peuvent être exprimés de façon constitutive à différents taux dans certains types cellulaires. Ces taux peuvent être modulés par l'infection virale, les IFN de type I ou d'autres facteurs (48).

Concernant le virus de la grippe, différents « facteurs de restriction » ciblent différentes étapes de son cycle viral (Figure 5).

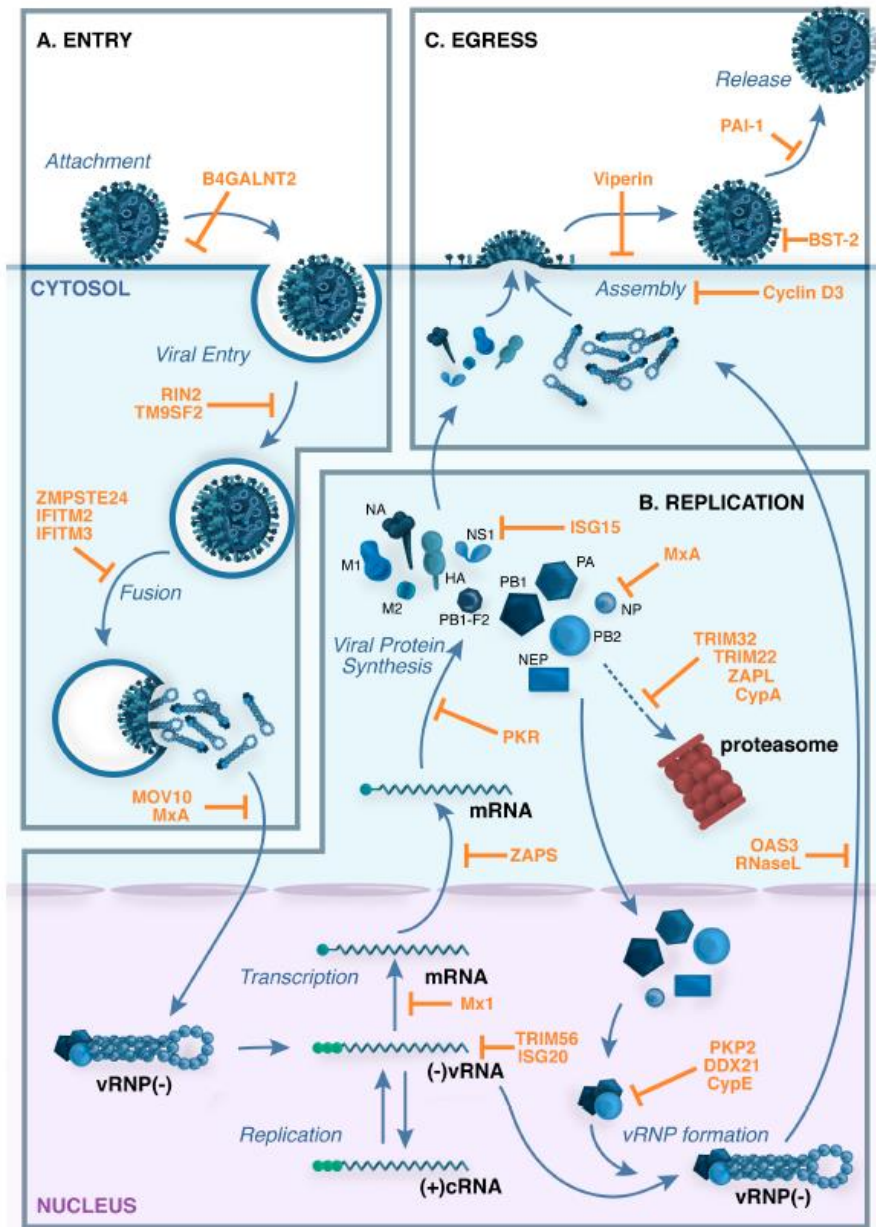


Figure 5 : les facteurs de restriction bloquent de multiples étapes du cycle viral du virus de la grippe (48).

II.3.1. Action au niveau de l'entrée du virus

Les gènes de la famille IFITM sont les plus étudiés parmi ceux agissant contre les virus de la grippe A. Chez l'homme, la famille est composée de 5 gènes : *ifitm1*, *ifitm2*, *ifitm3*, *ifitm5* et *ifitm10*. IFITM1, 2 et 3, localisés dans les endosomes, sont impliqués dans l'activité antivirale dirigée contre le virus de la grippe A et d'autres virus (49). Les propriétés antivirales de IFITM3 ont été particulièrement bien étudiées. IFITM3 n'inhibe pas la fixation ou l'internalisation du virus de la grippe A, mais piège les virions dans les compartiments endocytaires, ce qui entraîne leur dégradation (49),(50). A ce jour, IFITM1 et IFITM2, dans la réponse antivirale est moins clair.

Des études récentes ont démontré que la métallopeptidase à zinc STE24 (ZMPSTE24) était capable d'inhiber l'accès au compartiment endosomal. Des souris déficientes en ZMPSTE24 infectées par le virus de la grippe A présentaient une surmortalité associée à des titres viraux et une production de cytokines augmentés. Cela s'explique par le rôle de ZMPSTE24 détecté dans les complexes protéiques IFITM et nécessaire pour l'activité antivirale des IFITM. D'autres études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes spécifiques par lesquels l'entrée du virus est bloquée (51).

II.3.2. Action au niveau de la transcription et la réplication

La plupart des facteurs antiviraux identifiés à ce jour ciblent la transcription et la réplication dans le cycle du virus de la grippe A. Ceux-ci n'auront pas d'impact sur la fixation, l'entrée et la fusion du virus mais l'altération de la réplication virale inhibera également la libération du virus.

II.3.2.1. La famille des GTPases

Dans la famille des GTPases, on retrouve les protéines Mx. La protéine Mx1 cytoplasmique humaine (également appelée MxA) et la protéine Mx1 murine localisée dans le noyau présentent une forte activité antivirale en ciblant les complexes ribonucléoprotéiques viraux. La protéine MxA humaine intervient au niveau de deux étapes du cycle viral. Les vRNP entrants sont retenus dans le cytoplasme (52). L'amplification de l'ARNv à partir de copies d'ARNc (transcription secondaire) est également bloquée, potentiellement par séquestration cytoplasmique de la nucléoprotéine NP et la polymérase PB2 nouvellement synthétisées, mais le mode d'action exact n'est pas encore défini. En revanche, la protéine Mx1 nucléaire murine cible l'activité de la polymérase virale associée au complexe ribonucléoprotéique virale pour bloquer la transcription primaire des gènes viraux (53). Les différentes souches du virus de la grippe présentent une sensibilité variable aux protéines Mx, en fonction de la NP (54).

Les protéines liant le guanylate (GBPs) représentent un autre groupe de GTPases inductibles par l'interféron. À ce jour, 11 GBP ont été décrites chez la souris et 7 chez l'homme. La GBP1 humaine est impliquée dans l'activité antivirale contre le virus de la grippe A. L'activité de la GBP1 est essentielle pour l'inhibition de la réplication du virus de la grippe. Un mécanisme d'échappement du virus de la grippe consiste à bloquer l'activité antivirale de GBP1 en fixant la protéine NS1 à la GTPase (55).

II.3.2.2. La protéine kinase R

La protéine kinase R (PKR) cytosolique, inductible par l'interféron, est activée par sa liaison à l'ARN double brin et présente une activité antivirale vis-à-vis de nombreux virus. Une fois activée, la protéine PKR est autophosphorylée ainsi que d'autres substrats parmi lesquels eIF-2 α (*eukaryotic initiation factor 2 α -subunit*) et I κ B. La phosphorylation de eIF-2 α entraîne une forte inhibition de la synthèse des protéines virales, limitant ainsi la réplication virale. De plus, la phosphorylation de I κ B active NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) qui régule positivement la transcription des gènes IFN et donc contribue à l'expression des ISG. Les virus de la grippe A ont développé plusieurs mécanismes d'échappement pour empêcher l'action antivirale de la protéine kinase R (48).

II.3.2.3. La famille des protéines OAS

Les synthétases 2'-5'-oligoadenylate (2-5A) (OAS), localisées dans le cytosol, correspondent à une famille d'ISGs caractérisés par leur capacité à synthétiser du 2'-5'-oligoadenylate, qui induit la dégradation de l'ARN par activation de la RNaseL. Cette ribonucléase dégrade les ARN simple brin viraux et cellulaires, ce qui limite la réplication virale et induit l'apoptose des cellules infectées. De plus, certains produits issus de la dégradation ont été décrits comme capables de se lier et d'activer RIG-1 amplifiant ainsi la production d'interféron (48). A noter que la protéine virale NS1 du virus de la grippe A possède un domaine N-terminal capable de se lier et de séquestrer les ARN double brin ce qui entraîne l'inhibition du système OAS/RnaseL ainsi que l'inhibition de la signalisation induite par l'ARN double brin nécessaire pour la production d'interféron (56).

D'autres protéines ont été décrites comme interagissant directement avec l'ARN viral. La famille des protéines IFIT (*IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats* (TPRs)) contient 4 membres chez l'homme : IFIT1 (ISG56), IFIT2 (ISG54), IFIT3 (ISG60) et IFIT5 (ISG58). Elle présente une activité antivirale vis-à-vis de nombreux virus. Toutefois son rôle contre le virus de la grippe A reste à clarifier. De même, des rôles contradictoires ont été décrits pour ADAR1 (*Adenosine deaminase acting on RNA 1*) agissant contre le virus de la grippe A ou favorisant la réplication de certains virus dont le virus de la grippe A (48).

II.3.3. Action sur les protéines virales

ISG15 est une protéine cytosolique, analogue de l'ubiquitine, induite par l'interféron et qui se lie de façon covalente aux protéines cibles par l'action séquentielle de trois enzymes également induites par les interférons de type 1 (*E1 activating enzyme Ube1L*, *E2 conjugating enzyme UbcH8* et *E3 ligase Herc5*). Dans l'infection par le virus de la grippe A, la cible prédominante est la protéine NS1 virale. La conjugaison de ISG15 à la protéine NS1 entraîne la perte d'une ou plusieurs de ses fonctions inhibant ainsi la réplication virale (57).

Les protéines TRIM (*tripartite motif*) sont des composants clés de la réponse de l'hôte aux infections virales, fonctionnant comme des facteurs de restriction antiviraux directs ou modulant des cascades de signalisation qui conduisent à l'induction de cytokines pro-inflammatoires. Plus de 80 protéines de la famille TRIM ont été décrites chez l'homme. La plupart sont des ligases ubiquitine E3. Parmi les protéines TRIM impliquées dans la régulation de l'immunité innée, un certain nombre peut moduler les cascades de signalisation médiées par les PRR en réponse à l'infection virale, ainsi que l'autophagie induite par le virus de la grippe A. Pour d'autres protéines TRIM, un rôle de facteur de restriction a été décrit. Par exemple, l'activité antivirale de TRIM22 est médiée par la polyubiquitination de la nucléoprotéine virale dépendante de la ligase E3, favorisant ainsi la dégradation protéosomale dépendante (58). De même TRIM32 se lie et ubiquitine la protéine virale PB1, la ciblant ainsi pour la dégradation protéosomale, ce qui inhibe l'activité de la polymérase virale (59).

II.3.4. Action sur l'assemblage et la libération du virus

La cycline D3, présente une capacité, indépendante de son rôle de régulateur clé dans le cycle cellulaire, d'inhiber la libération de nouveaux virus. Elle se lie directement à la protéine virale M2, ce qui interfère dans liaison M1-M2 essentielle pour l'assemblage des nouveaux virions (60).

La protéine vipérine (*virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, interferon inducible*) ou Rsad2 a été décrite comme inhibiteur de la réplication de différents virus par différents mécanismes. Pour le virus de la grippe A, elle semble bloquer la libération des nouveaux virions formés en réduisant la synthèse d'isoprénoides, ce qui interfère avec la formation des radeaux lipidiques à partir desquels les virus bourgeonnent (61).

Après la libération du virus de la grippe à partir des cellules infectées, le clivage de l'hémagglutinine est essentiel pour permettre l'infection de nouvelles cellules cibles.

L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) est un ISG qui peut réduire la diffusion du virus de la grippe A par sa capacité à inhiber les protéases respiratoires nécessaires pour le clivage extracellulaire et donc la maturation de l'hémagglutinine (62). De plus, un déficit partiel en PAI-1, lié au polymorphisme du gène *SERPINE1*, qui code pour PAI-1, entraîne une susceptibilité augmentée *in vitro* à l'infection par le virus de la grippe A. PAI-1 représente donc le premier gène ISG décrit pour posséder une activité antivirale directe dans l'environnement extracellulaire (48).

III. Agonistes de TLR et activité anti-microbienne

Les traitements par antibiotiques ou antiviraux montrent actuellement leurs limites. En effet, les bactéries ont développé de nombreux mécanismes de résistance ce qui complique notamment le traitement des pneumonies par antibiotiques. Chaque année, le Centre National de Référence des Pneumocoques réalise l'étude de la sensibilité aux antibiotiques (souches invasives les années paires, souches invasives et souches isolées d'otite moyenne aiguë les années impaires). En 2016, la proportion de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) était de 26 % mais cette incidence pourrait toutefois amorcer une hausse (63). Ce sont les entérobactéries qui posent le plus de problème de résistance aux β -lactamines. Sader et al. ont évalué la sensibilité aux antibiotiques de bactéries à Gram négatif isolées chez des patients hospitalisés pour pneumonies aux Etats-Unis entre 2015 et 2017. Concernant la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération, 15 % des Entérobactéries présentent une résistance au ceftazidime, 18,7% à la ceftriaxone et 7,8% au cefepime selon le référentiel CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Selon le même référentiel, 13,1% des souches de *P. aeruginosa* sont résistantes au ceftazidime et 5,8 % au cefepime (64). En France, en 2015, 11,9 % des souches d'*Escherichia coli*, 25,9 % des souches de *K. pneumoniae* et 21 % des souches d'*E. cloacae* isolées de bactériémies sont productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) (65).

De même, le virus de la grippe présente des résistances aux antiviraux actuels. En effet, Dong et al. ont évalué la fréquence et la distribution des mutations du gène *M2* sur des souches du virus influenza, résistantes aux adamantanes, ayant circulé dans le monde entre 1902 and 2013. 31251 séquences de la protéine M2 de différents sous-types de virus influenza A (H1-H17) ont été analysées. 45,2 % de ces souches étaient résistantes aux adamantanes (95 % des souches portant la mutation S31N). La fréquence de la résistance aux adamantanes varie parmi les sous-types du virus de la grippe A, les années, les espèces d'hôte et la distribution géographique. En revanche, les résistances aux inhibiteurs de neuraminidase sont plus rares (66). Des mutations au niveau du site catalytique de la neuraminidase du virus ont été décrites, la substitution H275Y étant la plus observée. Elles empêchent la liaison, au site catalytique de l'enzyme, de la

molécule antivirale qui devient inefficace. La fréquence des virus présentant une résistance aux inhibiteurs de neuraminidase en 2016/2017 est de 0,2 % (incidence la plus basse observée à ce jour) (67). Les inhibiteurs de neuraminidase restent donc adaptés au traitement et à la prophylaxie de l'infection par le virus de la grippe. Toutefois, l'émergence de souches résistantes restent une menace (67). De plus, la nécessité d'administrer ces médicaments au maximum 48 heures après les débuts des symptômes reste un inconvénient majeur.

Face aux impasses thérapeutiques liées aux résistances ou au manque d'efficacité des antimicrobiens, de nouvelles alternatives thérapeutiques doivent donc être mises en œuvre. L'immunomodulation de l'immunité innée semble être une piste intéressante qui fait l'objet de nombreuses études. Les agonistes des récepteurs innés de type *Toll-like receptors* (TLR) sont les plus avancés en termes de recherche. En effet, de nombreuses études ont évalué l'effet prophylactique et/ou thérapeutique de ces agonistes dans le contrôle des pathologies infectieuses (68),(69),(70),(71),(72).

III.1. Les *Toll-like receptors*

Les récepteurs de l'immunité innée appelés PRR (*Pattern Recognition Receptor*) reconnaissent des motifs moléculaires microbiens universels et invariants ou MAMP (*Microbial Associated Molecular Pattern*) de nature bactérienne, virale, fongique ou parasitaire (73). Les « *Toll-like receptors* » (TLR) sont les premiers et les plus étudiés des PRR identifiés à ce jour. Chez l'homme, il existe 10 TLR, 13 chez la souris (Figure 6) (68),(74). Il s'agit de protéines transmembranaires, organisées en trois domaines : un domaine extracellulaire avec des répétitions riches en leucines impliquées dans la détection des MAMP, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire TIR (*Toll/IL-1R homology domain*) nécessaire à la transduction du signal. L'interaction entre les TLR et leur MAMP agoniste provoque le recrutement des adaptateurs moléculaires MyD88 (*Myeloid Differentiation factor 88*) ou TRIF (*TIR domain containing adaptor inducing IFN- β*) au niveau du domaine TIR. Ceci entraîne une cascade de signalisation induisant l'activation de la voie des MAPK (*Mitogen-Associated Protein Kinase*), la voie IRF3 et la voie NF- κ B, induisant ainsi une inflammation locale (75).

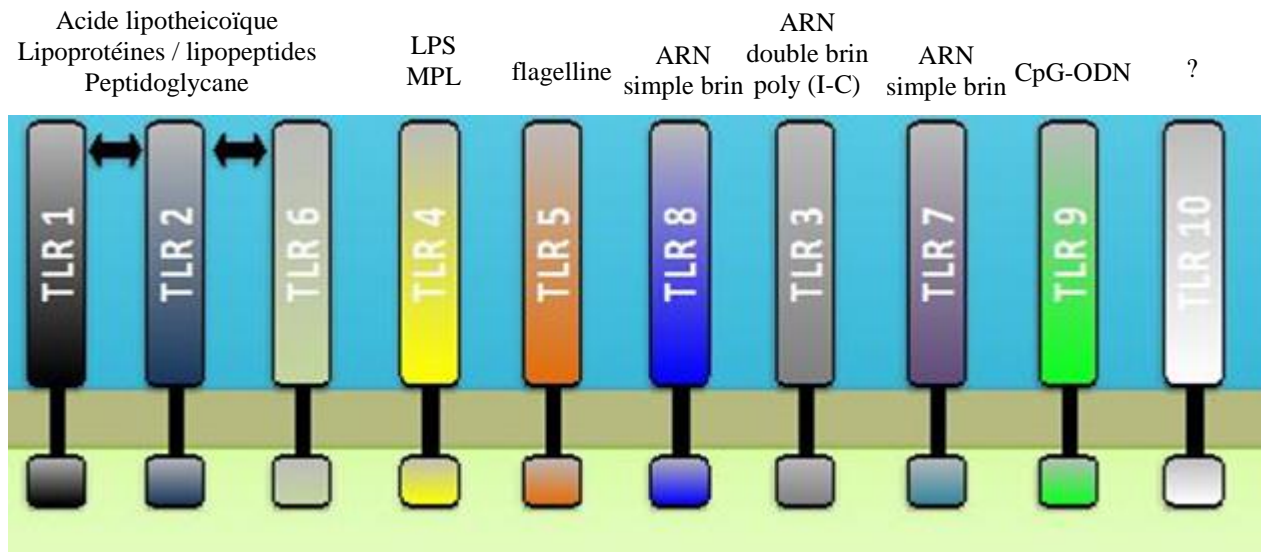


Figure 6 : Les TLR et leurs agonistes (68)

LPS : lipopolysaccharide ; MPL : monophosphoryl lipid A ; CpG : cytosine-phosphate-guanosine (CpG) non méthylé ; ODN : oligodéoxynucléotides non méthylés synthétiques contenant des motifs CpG ; poly I-C : polyinosinique-polycytidylique

L'état inflammatoire induit par les agonistes TLR, se traduit notamment par la production de cytokines (IL-1, IL-6, IL-8...) et de chimiokines impliquées dans le recrutement de cellules tels que les neutrophiles, les monocytes ou les macrophages. Parmi les gènes activés par les agonistes TLR, on retrouve également des gènes codant des molécules antimicrobiennes comme les peptides antimicrobiens (76). Enfin, les TLR jouent également un rôle dans la maturation des cellules dendritiques et dans leur capacité à activer les lymphocytes T naïfs et ainsi à permettre le développement d'une réponse adaptative (77).

De par leurs propriétés immunostimulantes, les ligands de TLR sont naturellement devenus des candidats médicaments pour le développement de nouveaux adjuvants vaccinaux (78),(79), pour le traitement de certains cancers (80) ou pour le contrôle des pathologies infectieuses (68),(69),(70),(71),(72).

III.2. TLR5 et flagelline

Parmi les 10 TLR fonctionnels chez l'homme, TLR5 reconnaît la flagelline, protéine structurale des flagelles bactériens. La flagelline FliC de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, constituée de 494 acides aminés, est la mieux caractérisée (Figure 7) (81). Les 170 acides aminés N-terminaux ainsi que les 90 résidus C-terminaux de FliC s'organisent en 2 domaines D0 et D1 qui sont très conservés parmi les bactéries à Gram négatif et confèrent son activité pro-inflammatoire à la flagelline (82),(83). Le domaine D1 et le motif QRVRELAV correspondant aux acides aminés 89 à 96 de FliC sont indispensables à la signalisation dépendante de TLR5 (84). Les domaines centraux D2 et D3 variables d'une espèce bactérienne à une autre participent à l'antigénicité du flagelle. Cette séquence hypervariable permet de définir des sérotypes flagellaires, communément dénommé antigène H chez les entérobactéries.

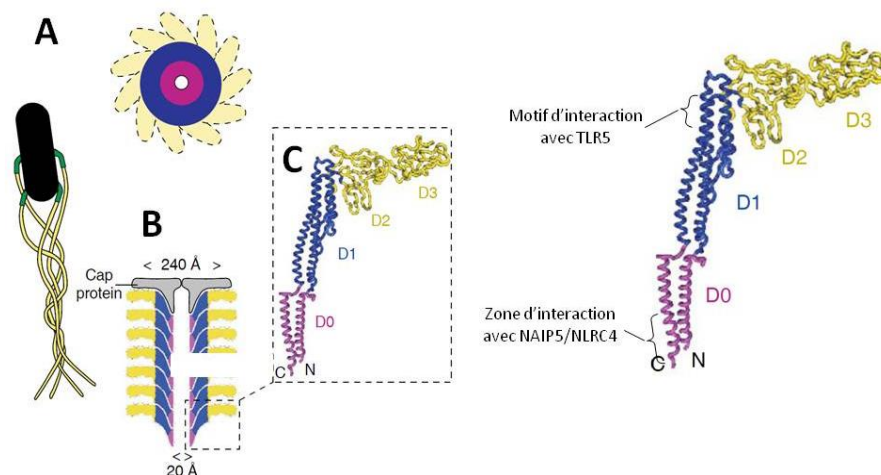


Figure 7 : Représentation structurale de la flagelline

(A, B) Représentation schématique transversale (A), longitudinale (B) de l'organisation du flagelle bactérien de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium. (C) Structure tridimensionnelle de la flagelline FliC : domaine terminal (violet), central (bleu) et région hypervariable (jaune) (85)

TLR5 est exprimé à la surface des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules épithéliales (86),(87). L'interaction entre TLR5 et la flagelline active l'expression de gènes de chimiokines telles que CCL20 et CXCL2, de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF, IL-1 β ou IL-6, de cytokines comme IL-17 et IL-22 ainsi que de composés antimicrobiens (par exemple : β -défensines ou iNOS). Cette réponse est très rapide (de quelques minutes à quelques heures) et présente un caractère transitoire car de nombreux mécanismes de

régulations négatives entretiennent un retour à l'homéostasie (88),(89),(90). Les chimiokines et cytokines produites après stimulation de TLR5 sont impliquées dans le recrutement et l'activation de cellules immunitaires telles que les polynucléaires neutrophiles, les monocytes ou les cellules dendritiques. Dans les muqueuses et plus particulièrement les cellules épithéliales, la signalisation dépendante de TLR5 mobilise des mécanismes de clairance microbienne. Le recrutement de polynucléaires neutrophiles dans le parenchyme et le compartiment luminal des muqueuses et la synthèse épithéliale de molécules antimicrobiennes représentent la signature dominante (90). De plus, l'augmentation de la production locale de molécules comme l'amphireguline, l'épiréguline ou le *trefoil factor 2* favorise la réparation tissulaire (90).

La flagelline active également la voie cytosolique de l'inflammasome, indépendamment de TLR5, via un complexe moléculaire formé du récepteur NAIP5 (*neuronal apoptosis inhibitory protein 5*) et de NLRC4 (*NLR family CARD domain-containing protein 4*) de la famille des « *NOD-like receptors* » (NLR) (91),(92). L'inflammasome NAIP5/NLRC4 active la caspase 1 et induit ainsi la maturation protéolytique des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18, qui contribuent à l'amplification de la réponse immunitaire innée. La délétion des 3 derniers acides aminés en position C-terminale de la flagelline FliC abolit totalement la capacité de la molécule à stimuler l'inflammasome (Figure 7) (92).

De nombreuses études ont montré le large potentiel anti-infectieux de la flagelline. En effet, la flagelline a démontré un effet anti-bactérien vis-à-vis des bacilles à Gram négatif tels que *Salmonella* (93), *E. coli* (84), *P. aeruginosa* (94),(95), des cocci à Gram positif tels que *Enterococcus* (96), *S. pneumoniae* (97) et des bactéries anaérobies comme *Clostridium difficile* (98). La flagelline possède également un effet antiviral vis-à-vis du rotavirus et du cytomégalovirus (99),(100) et anti-fongique (*Candida albicans*) (101).

OBJECTIFS DE LA THESE

La flagelline, agoniste de TLR5, a démontré des propriétés anti-infectieuses dans de nombreux modèles infectieux bactériens, y compris dans des modèles d'infections respiratoires (94),(97). Récemment, la flagelline a été impliquée dans la protection contre des infections virales dans des modèles murins d'infection au rotavirus ou au CMV (99),(100). Cependant, le rôle protecteur de la flagelline, dans des modèles d'infections virales respiratoires, n'a pas à ce jour été évalué. Dans une première partie, nous proposons d'analyser le potentiel thérapeutique de la flagelline dans un modèle d'infection par le virus de la grippe H3N2 et de rechercher les mécanismes potentiellement impliqués. Par ailleurs, nous avons évalué la capacité antivirale de la flagelline en association avec l'oseltamivir, une molécule antivirale de référence.

Les études précliniques ont montré un potentiel anti-infectieux de la flagelline en combinaison avec les antibiotiques dans des modèles d'infections respiratoires au pneumocoque (124). Ces études permettent d'envisager, chez l'homme, l'utilisation de la flagelline comme agent thérapeutique dans le contexte d'infections respiratoires graves telles que les pneumonies. Cependant la capacité stimulatrice de la flagelline dans un contexte inflammatoire, comme dans le cas d'une pneumonie, n'est pas connue. Dans une seconde partie, nous avons donc voulu évaluer la capacité des cellules sanguines de patients souffrant de pneumopathie franche lobaire aiguë à répondre à des agonistes de récepteurs de l'immunité innée dont notamment la flagelline. Nous avons donc mis en place une étude clinique en collaboration avec les services de pneumologie des hôpitaux du Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (GHICL).

TRAVAUX DE RECHERCHE

I. L'agoniste du *Toll-like receptor* 5 réduit les taux de transcrits M1 du virus de la grippe A indépendamment de l'interféron de type 1 et de l'interleukine-22 et améliore l'efficacité de l'oseltamivir

Plusieurs études de la littérature ont évalué le potentiel de stimulation de l'immunité innée avec différents agonistes de TLR pour contrôler l'infection par le virus de la grippe (Tableau 5). La plupart de ces études utilisent un traitement par un agoniste de TLR en prophylaxie avec l'agoniste administré par voie respiratoire (intranasale ou en aérosol). Dans certains cas, c'est la voie intramusculaire ou intrapéritonéale qui est utilisée. Wu et al. ont utilisé un agoniste du récepteur TLR7 et ont observé une amélioration significative de la survie chez les souris traitées dans un modèle d'infection par le virus H1N1 (102). Hammerbeck et al. ont traité des rats infectés par H3N2 par un composé agoniste de TLR7 et TLR8 et ont constaté une diminution significative des titres viraux au niveau pulmonaire (103). Lau et al. d'une part et Zhao et al. d'autre part ont administré un agoniste de TLR3 pour obtenir un effet protecteur contre le virus de la grippe A (104),(105). Tan et al. ont décrit un effet protecteur rapide de l'agoniste Pam2Cys par stimulation du récepteur TLR2 chez des souris infectées par le virus de la grippe (106). Mifsud et al. ont observé les mêmes effets dans leur modèle d'infection par le virus de la grippe (107),(108). Tuvim et al. ont démontré quant à eux un effet synergique des agonistes de TLR2/6 et TLR9 pour contrôler l'infection virale (109). Plusieurs équipes ont travaillé sur les effets du CpG, agoniste de TLR9. Norton et al. ainsi que Wong et al. ont administré la molécule par voie intranasale (110),(111), alors que Jiang et al. l'ont utilisée par voie intrapéritonéale (112). Les équipes de Barjesteh et al. et St Paul et al. ont quant à elles observé les effets de différents agonistes de TLR par voie intranasale et intramusculaire dans un modèle d'infection par le virus de la grippe H4N6 chez le poulet (113),(114).

Le but de notre étude est d'analyser le potentiel thérapeutique de la flagelline dans un modèle murin d'infection par le virus de la grippe H3N2 développé au laboratoire. Les résultats seront présentés sous forme d'un article dont la version anglaise a été soumise à *Antiviral Research*. Des résultats complémentaires seront exposés à la suite du manuscrit.

Tableau 5 : Utilisation des agonistes de TLR dans des modèles d'infection par le virus de la grippe

Molécule	Animal	Virus testés	Voie administration agoniste TLR	Type de traitement (Prophylactique P ou thérapeutique T)	Doses	Readout	Réf.
Agoniste TLR2 (Pam2Cys pegyle)	Souris	H1N1, H3N1	Intranasale	P (3j avant)	20 nmol	Survie Titres viraux	(107), (108)
Agoniste TLR2 (Pam2Cys pegyle)	Souris	H1N1, H3N1 H3N2	Intranasale	P (24h, 72h ou 7j avant)	20 nmol	Survie Titres viraux	(106)
Agoniste TLR2/6 et TLR9 (Pam2-ODN)	Souris	H3N2	Aérosol	P (1j ou 3j avant) ou T (1j après)	Aérosol : Pam2 : 10 mg/mL ODN2395 : 20 mg/mL	Survie Titres viraux	(109)
Agoniste TLR3 (Pika)	Souris	H1N1, H5N1, H6N1, H7N1, H9N2	Intranasale	P + T (6h avant + après 1x/j pendant 2 jours)	100 µg	Survie Titres viraux	(104)
Agoniste TLR3 (Poly (I:C))	Souris	H1N1	Intranasale	P (6h avant ou 6h et 48h avant)	20 µg	Survie Titres viraux	(105)
Agoniste TLR7 (UC-1V150/MSA)	Souris	H1N1	Intranasale	P (24h avant)	5 nmol	Survie	(102)
Agoniste TLR9 (CpG ODN)	Souris	H1N1	Intrapéritonéale	P (2j avant)	15 µg	Survie Titres viraux	(112)
Agoniste TLR9 (CpG ODN)	Souris	H1N1	Intranasale	P (24h avant)	5 µg (1 ou 2 doses)	Survie Titres viraux	(110)
Agoniste TLR9 (CpG ODN)	Souris	H1N1	Intranasale	P (4j avant)	5 µg	Survie	(111)
Agoniste TLR7 et TLR8 (3M-011)	Rat	H3N2	Intranasale	P (0h, 4h, 24h, 48h ou 72h avant) ou T (6h après)	0.01, 0.1, ou 1.0 mg/kg	Titres viraux	(103)
Agoniste TLR2/1 (Pam3CSK4) Agoniste TLR7 (R848) Agoniste TLR9 (TLR21) (CpG ODN) Agoniste TLR4 (LPS)	Poulet	H4N6	Intranasale et intramusculaire	P (18h avant)	20 ou 100 µg 20 ou 50 µg 10 ou 50 µg 100 ou 500 µg	Titres viraux	(113)
Agoniste TLR3 (Poly (I:C)) Agoniste TLR4 (LPS) Agoniste TLR9 (TLR21) (CpG ODN)	Poulet	H4N6	Intramusculaire	P (24h avant)	80 µg ou 400 µg 100 µg ou 500 µg 10 µg ou 50 µg	Titres viraux	(114)

I.1. Article : Toll-like receptor 5 agonist reduces Influenza A Virus M1 transcripts levels independently of type 1 interferon and interleukin-22 and improves the efficacy of oseltamivir

Anne-France Georgel^{a,b}, Delphine Cayet^a, Andrés Pizzorno^c, Manuel Rosa-Calatrava^{c,d}, Christophe Paget^{a,e}, Jean Dubuisson^a, François Trottein^a, Jean-Claude Sirard^{a,*}, Christophe Carnoy^{a,*}

^a Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR8204, CIIL–Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France;

^b Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille, Lille, France;

^c Laboratoire Virologie et Pathologie Humaine – VirPath Team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Inserm U1111, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

^d VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon 69008, France

^e INSERM U1100, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), Université de Tours, France.

Mots-clés : Influenza A virus, TLR5, flagellin, type I interferon, interleukin 22

Declaration of interest: none

* Corresponding authors: christophe.carnoy@univ-lille.fr and jean-claude.sirard@inserm.fr

Article soumis le 23 septembre 2018 à *Antiviral Research*.

I.1.1. Résumé

Les infections par le virus de la grippe restent une menace pour le système de soins en santé malgré les programmes de vaccination et les molécules antivirales commercialisées. L'immunomodulation par l'activation des récepteurs de l'immunité innée pourrait représenter une approche innovante contre le virus de la grippe. Cette étude a évalué la capacité de la flagelline, agoniste du *Toll-like receptor 5* (TLR5), à contrôler la réplication du virus de la grippe chez la souris. Premièrement, nous avons montré que l'administration nasale ou systémique de flagelline activait la transcription de gènes antiviraux dans le tissu pulmonaire. L'administration prophylactique ou thérapeutique de flagelline a entraîné la diminution de la réplication du virus de la grippe dans le poumon de souris infectées par le virus de la grippe A H3N2. L'effet de la flagelline sur la réplication virale a également été observé chez des souris *Ifnar^{-/-}* et *Il22^{-/-}* infectées par le virus de la grippe, suggérant un mécanisme indépendant de l'interféron de type I et de la signalisation interleukine 22. De plus, un traitement combinatoire associant oseltamivir, inhibiteur de neuraminidase, et flagelline était plus efficace que les traitements séparément pour réduire les taux d'ARN viraux pulmonaires. Cette étude souligne le potentiel thérapeutique de la flagelline pour contrôler la réplication du virus de la grippe

I.1.2. Introduction

Les virus de la grippe sont responsables d'infections saisonnières épidémiques et d'épidémies pandémiques et causent des maladies respiratoires chez l'homme avec un risque de complications sévères chez les sujets jeunes, âgés, immunodéprimés et atteints de pathologies cardiovasculaires et respiratoires chroniques. Chaque année, 3 à 5 millions de cas de maladies graves sont causées par le virus de la grippe entraînant 250 000 à 500 000 décès dans le monde (Horimoto and Kawaoka, 2005). Les options thérapeutiques sont limitées à la vaccination et quelques médicaments. Parmi eux, des inhibiteurs de la neuraminidase tel que l'oseltamivir sont largement utilisés pour le traitement, par voie orale, des pathologies aiguës non compliquées liées au virus de la grippe mais sont aussi recommandés en prophylaxie chez des patients à risque ayant été en contact avec des patients atteints par le virus de la grippe (Fiore et al., 2011).

En raison de l'étroite fenêtre thérapeutique des inhibiteurs de neuraminidase et de l'émergence de souches résistantes aux médicaments, de nouvelles stratégies antivirales sont nécessaires (Govorkova et al., 2013). La stimulation de l'immunité innée pourrait être une approche thérapeutique alternative aux traitements anti-infectieux actuels comme elle induit

une production locale de molécules anti-microbiennes et le recrutement de cellules effectrices impliquées dans le contrôle de l'infection (Hancock et al., 2012; Iwasaki and Pillai, 2014). Les « *Toll-like receptors* » (TLRs) sont des récepteurs de l'immunité innée impliqués dans la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes conservés (Kawai and Akira, 2010). L'activation des TLR par les composés microbiens entraîne une cascade de signalisation et favorise les réponses pro-inflammatoires impliquées dans la défense antimicrobienne (Kawai and Akira, 2010). Compte tenu de leur large distribution cellulaire et de leur rôle important dans l'immunité, les TLR sont devenus des cibles thérapeutiques dans la lutte contre les maladies infectieuses bactériennes et virales (Hancock et al., 2012; Savva and Roger, 2013; Hedayat et al., 2011; Mifsud et al., 2014).

Dans ce contexte, des modèles expérimentaux ont montré que divers agonistes de TLR pouvaient protéger contre les infections par le virus de la grippe : des agonistes de TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9, seul ou en traitement combinatoire, stimulent des réponses immunitaires innées capables de protéger contre des infections par le virus de la grippe A (IAV) aussi bien chez les mammifères que chez la volaille (Tan et al., 2012; Mifsud et al., 2016; Tuvim et al., 2012; Wong et al., 2009; Lau et al., 2010; Zhao et al., 2012; Jiang et al., 2011; Norton et al., 2010; Wu et al., 2007; Hammerbeck et al., 2007; Barjesteh et al., 2015). De façon intéressante, la plupart de ces agonistes sont administrés par la voie respiratoire en prophylaxie, suggérant que la stimulation locale d'une réponse immunitaire innée antigène indépendante peut contrôler la réplication virale.

TLR5 reconnaît la flagelline, la protéine structurale des flagelles bactériens et est exprimée à la surface des macrophages, cellules dendritiques et cellules épithéliales. Comme d'autres agonistes de TLR, la flagelline a des propriétés immunomodulatrices qui peuvent contrôler de nombreuses infections bactériennes (Munoz et al., 2010; Yu et al., 2010; Jarchum et al., 2011; Kinnebrew et al., 2010; Vijayan et al., 2018). Récemment, il a été démontré que des administrations répétées de flagelline protègent les souris contre les infections à rotavirus par un mécanisme dépendant de l'interleukine 22 (IL-22) et IL-18 (Zhang et al., 2014). L'administration systémique et prophylactique de flagelline protège aussi les souris contre une infection létale par le CMV (Hossain et al., 2014). Nous avons récemment démontré chez la souris que l'administration intranasale de flagelline améliore l'effet thérapeutique des antibiotiques dans le traitement des pneumonies post grippales (Porte et al., 2015), mais le rôle de la flagelline dans le contrôle de l'infection par le virus de la grippe n'a jamais été étudié. Cependant, la capacité de la flagelline d'induire la production de molécules anti-microbiennes et le recrutement de cellules immunitaires innées après une administration intranasale présage

d'un rôle potentiel de la flagelline contre les infections grippales (Porte et al., 2015; Vijayan et al., 2018; Van Maele et al., 2014a).

Dans cette étude, nous avons analysé la réponse antivirale par une administration respiratoire ou systémique de flagelline chez la souris, et testé la capacité de la flagelline à interférer avec la réplication du virus de la grippe A. Nous avons également évalué le rôle de l'interféron de type I et de l'IL-22 dans le mécanisme antiviral médié par la flagelline ainsi que l'impact potentiel de l'association de la flagelline avec l'oseltamivir sur la production de l'ARN du virus de la grippe A.

I.1.3. Matériel et méthodes

Modèle murin d'infection

Des souris femelles ou mâles C57BL/6J (âgées de 6 à 12 semaines) (Laboratoires Janvier, Saint-Berthevin, France) et des souris femelles ou mâles *Il22^{-/-}* et *Ifnar^{-/-}* (croisées avec des souris C57BL/6J) sont maintenues individuellement dans des cages ventilées et manipulées sous des hottes à flux laminaire vertical (classe II A2; Esco, Hatboro, PA). Toutes les expérimentations respectent les règlements institutionnels et nationaux actuels ainsi que les recommandations éthiques (B59-350009, Institut Pasteur de Lille numéro de protocole : 2015121722376405). Pour les infections par voie intranasale, les souris ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale de 1.25 mg de kétamine additionnée de 0.25 mg de xylazine dans 250 µl de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) puis infectées par voie intranasale avec 50 µl de PBS contenant 30 unités formant plaque (UFP) de la souche Scotland/20/74 du virus de la grippe A H3N2 hautement pathogène, adaptée à la souris (Ivanov et al., 2013; Paget et al., 2012). A différents temps, les souris ont été sacrifiées par injection intrapéritonéale de 5.47 mg de pentobarbital sodique dans 100 µl de PBS, et leurs poumons ont été récupérés aseptiquement.

Administration de la flagelline

La flagelline native (FliC, GenBank, accession no. [AAL20871](#)) a été isolée de la souche *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium SIN22, comme cela a été décrit précédemment (Nempont et al., 2008; Didierlaurent et al., 2008). Grâce au test du limulus (Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA), la concentration résiduelle en LPS a été déterminée inférieure à 20 pg par µg de flagelline. Pour s'assurer que la flagelline était principalement composée de monomères, elle a été chauffée pendant 10 minutes à 65°C avant d'être utilisée. La flagelline a été administrée soit par voie intranasale (5 µg de FliC dans 30 µl de PBS), sous légère

anesthésie par inhalation d'isoflurane (Axience, Pantin, France), soit par voie intrapéritonéale (5 µg de FliC dans 200 µl of PBS).

Administration d'oseltamivir

Des comprimés d'oseltamivir phosphate (Tamiflu® 30 mg, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany) ont été solubilisés dans 1 ml d'eau stérile pour obtenir une concentration du stock de 30 mg/ml, vortexés et soniqués dans un bain d'eau à température ambiante pendant 5 minutes. Les souris ont reçu l'oseltamivir par voie orale une fois par jour à la dose de 4 mg/kg/jour diluée dans l'eau stérile, dans un volume total de 200 µl.

L'analyse des ARNm viraux et murins

Les ARN totaux ont été extraits avec le kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Pour la détection des ARN de H3N2, 500 ng d'ARN totaux pulmonaires ont été rétrotranscrits avec la Reverse Transcriptase Superscript II (Invitrogen) en présence d'amorces spécifiques du virus ciblant le segment 7 qui code pour la protéine de matrice 1 (M1) (5' TCT AACCGAGGTCGAAACGTA 3'). L'ADN complémentaire a été amplifié par PCR temps réel de type Taqman en utilisant la sonde Taqman FAM-TTGTGTTTCACGCTCACCGTGCC-TAMRA avec l'amorce sens : AAGACCAATCCTGTACCTCTGA et l'amorce antisens : CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC. Un plasmide codant pour le gène M1 a été dilué par dilutions sériées afin d'établir la courbe standard (valeurs de Ct / nombre de copies du plasmide) (Meyer et al., 2017). L'équivalent de 12,5 ng d'ARN totaux pulmonaires a été complètement utilisé pour déterminer le nombre de transcrits de M1 dans le poumon des animaux infectés par quantification absolue (Meyer et al., 2017).

Pour la quantification de l'expression des gènes murins, les ARN totaux pulmonaires ont été rétrotranscrits avec le kit « high-capacity cDNA archive » et des amorces aléatoires (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'ADN complémentaire a été amplifié par PCR en temps réel à l'aide de SYBR Green en utilisant les amorces listées dans le **tableau supplémentaire 1**. La quantité relative d'ARNm (RQ) ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) a été déterminée en comparant, tout d'abord, les valeurs du cycle seuil (Ct) pour le gène d'intérêt et la β -actine (ΔC_t), gène de référence et deuxièmement, les valeurs du ΔC_t pour les groupes traités et non traités (mock) ($\Delta\Delta C_t$). La limite de détection (Ct) a été fixée à 35 cycles.

Les techniques de PCR ont été réalisées et analysées avec l'appareil QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Dosage de cytokines

Les taux d'IL-22 ont été mesurés par méthode immunoenzymatique (ELISA) dans le sérum en suivant les instructions du fournisseur (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Analyses statistiques

Les résultats sont présentés par la médiane +/- la déviation standard (SD). Les différences statistiques ont été analysées par le test de Mann-Whitney ou un ANOVA (one-way) suivi d'un test de Dunnett (GraphPad Prism5.0a) et considérées comme significatives pour des valeurs de $P < 0.05$.

Tableau supplémentaire 1 : Liste des amorces utilisées pour la qRT-PCR (Eurogentec®)

<i>β-Actine</i>	<i>Forward sequence</i> : CGTCATCCATGGCGAACTG <i>Reverse sequence</i> : GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<i>Ccl20</i>	<i>Forward sequence</i> : TTTTGGGATGGAATTGGACAC <i>Reverse sequence</i> : TGCAGGTGAAGCCTTCAACC
<i>Ch25h</i>	<i>Forward sequence</i> : CCGGATCACATTACCTGGTC <i>Reverse sequence</i> : AAGACCTGGGCTGTTCCAG
<i>Ifi204</i>	<i>Forward sequence</i> : GCCAGCCCTAAGATCTGTGA <i>Reverse sequence</i> : TCTTTCGGTTCACTGTTTTCTTG
<i>Ifi47</i>	<i>Forward sequence</i> : GCGTTTCCTCCATCTTCACT <i>Reverse sequence</i> : ACCGGGTCTGTTTCTCACTG
<i>Ifitm5</i>	<i>Forward sequence</i> : GGTCTGTCTTCAGCACGATG <i>Reverse sequence</i> : CAGCCATCTTCTGGTCTCG
<i>Ifitm6</i>	<i>Forward sequence</i> : CCGGATCACATTACCTGGTC <i>Reverse sequence</i> : CATGTCGCCACCATCTT
<i>Ifnb</i>	<i>Forward sequence</i> : CCTACAGGGCGGACTTCAAG <i>Reverse sequence</i> : GATGGCAAAGGCAGTGTA ACTCT
<i>Ifnl2</i>	<i>Forward sequence</i> : AGGTCTGGGAGA ACATGACTG <i>Reverse sequence</i> : CTGTGGCCTGAAGCTGTGTA
<i>Ifnl3</i>	<i>Forward sequence</i> : TCAGCCCTGACCACCATC <i>Reverse sequence</i> : CTGTGGCCTGAAGCTGTGTA
<i>Isg15</i>	<i>Forward sequence</i> : AGTCGACCCAGTCTCTGACTCT <i>Reverse sequence</i> : CCCAGCATCTTCACTTTA
<i>Rsad2</i>	<i>Forward sequence</i> : GTGGACGAAGACATGAATGAAC <i>Reverse sequence</i> : TCAATTAGGAGGCACTGGAAA
<i>Saa3</i>	<i>Forward sequence</i> : GCCTGGGCTGCTAAAGTCAT <i>Reverse sequence</i> : TGCTCCATGTCCCGTGAA

I.1.4. Résultats

La flagelline induit l'expression de gènes anti-viraux dans le poumon.

Précédemment, des analyses microarrays ont été réalisées sur des poumons de souris C57BL/6 2, 4 et 18h après l'administration intranasale d'une dose unique de flagelline. L'analyse transcriptionnelle des modifications induites par le traitement par flagelline a été comparée aux animaux traités par PBS (mock) et mis en évidence des voies de signalisation liées à la diapédèse et l'adhésion des granulocytes, la réponse en phase aiguë, ou la reconnaissance de microbes par des récepteurs PRR, parmi d'autres (<http://mace.ihes.fr>, accession no. 2176499768) (Fougeron et al., 2015). L'analyse transcriptomique a aussi révélé que la flagelline active des voies de signalisation impliquées dans la réponse antivirale, l'impact de la flagelline sur ces voies de signalisation étant plus important à 4h comparé à 2 ou 18h (**Tableau 1**). Nous nous sommes ensuite concentrés sur les gènes impliqués dans différentes voies de signalisation et avons identifié un ensemble de gènes dont l'expression est significativement augmentée lors de la stimulation par la flagelline (fold increase > 2) (**Tableau 2**). Différents profils d'expression des gènes ont été observés. Le gène codant pour la cholestérol 25-hydroxylase (*Ch25h*) qui transforme le cholestérol en une molécule soluble, le 25-hydroxycholesterol, qui bloque la fusion virale (Blanc, et al., 2013; Liu, et al., 2013), avait une expression augmentée à 2 et 4h en comparaison au groupe mock. L'expression de quelques gènes était progressivement augmentée entre 2 et 4h après le traitement. Cela concerne les gènes 47 et 204 induits par l'interféron (*interferon gamma inducible 47 et 204*) (*Ifi47* et *Ifi204*) codant pour une GTPase antivirale et un senseur de l'immunité innée antivirale (Collazo, et al., 2001; Conrady, et al., 2012), et les protéines transmembranaires induites par l'interféron 5 et 6 (*Ifitm5* and *Ifitm6*) qui appartiennent à une famille d'inhibiteurs de l'entrée du virus (Huang, et al., 2011; Brass et al., 2009). Enfin, l'expression d'autres gènes était exclusivement augmentée à 4h après le traitement. C'est le cas de gènes codant pour *radical S-adenosyl methionine domain containing 2* (*Rsad2*) et l'*interferon-stimulated gene 15 ubiquitin-like modifier* (*Isg15*) dont les produits interfèrent avec la formation des radeaux lipidiques à partir desquels les virus bourgeonnent (Wang et al., 2007) et ciblent les particules virales nouvellement formées, respectivement (Lenschow et al., 2007; Morales and Lenschow, 2013). Pour tous les gènes, l'expression basale a été récupérée après 18h indiquant un effet transitoire de la flagelline.

L'étude transcriptomique a été confirmée en testant l'expression des gènes identifiés par PCR en temps réel, dans le poumon 2 et 4h après l'instillation intranasale de flagelline (**Fig.**

1A). Nous avons également analysé la réponse transcriptionnelle des gènes sélectionnés après administration systémique de flagelline (**Fig. 1B**). De façon intéressante, la réponse transcriptomique pour les gènes sélectionnés était globalement similaire entre les deux voies d'administration de la flagelline, démontrant que la voie systémique d'administration de la flagelline peut activer des gènes antiviraux dans le tissu pulmonaire. Nous avons donc observé (i) une variation réduite de l'expression des gènes après une administration systémique en comparaison à la voie intranasale et (ii) un pic d'expression 4h après l'administration de flagelline ce qui confirme l'analyse transcriptomique. Comme attendu, la flagelline a été capable de stimuler plus de 50 fois l'expression de *Ccl20* et *Saa3*, marqueurs d'une stimulation effective de l'immunité innée dans le poumon par la flagelline (Van Maele et al., 2010).

Tableau 1 : Les voies de signalisation antivirales sont activées par la flagelline

<i>Canonical pathways</i>	<i>p-values</i> ^a		
	2h	4h	18h
<i>Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses</i>	3.55 10 ⁻⁹	7.08 10 ⁻¹⁰	7.24 10 ⁻⁴
<i>Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors</i>	4.68 10 ⁻⁷	3.31 10 ⁻⁹	4.92 10 ⁻¹
<i>Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response</i>	1.02 10 ⁻⁶	7.94 10 ⁻¹²	2.30 10 ⁻²
<i>Role of RIG1-like Receptors in Antiviral Innate Immunity</i>	3.63 10 ⁻⁶	9.33 10 ⁻⁶	1.12 10 ⁻¹
<i>NF-κB Activation by Viruses</i>	6.76 10 ⁻³	1.29 10 ⁻⁶	1.82 10 ⁻⁴

Les analyses par microarray pour l'étude de l'expression du génome complet ont été réalisées sur les poumons de souris C57BL/6 (n=3-5 par groupe) traitées par voie intranasale par flagelline en comparaison au groupe mock. Les animaux ont été sacrifiés 2h, 4h et 18h après le traitement par la flagelline (<http://mace.ihes.fr>; accession no. 2176499768) (Fougeron et al., 2015). Après une analyse NeoNORM, les listes de gènes contenant l'expression des moyennes, les valeurs de P et *standard fold changes* ont été utilisées pour l'analyse des voies de signalisation canoniques avec le logiciel *Ingenuity Pathway Analysis 1.0 software* (IPA, Ingenuity Systems).

Tableau 2 : L'administration intranasale de flagelline induit la transcription de gènes anti-viraux dans le poumon.

<i>Gene ID</i>	<i>Gene symbol</i>	<i>Gene name</i>	<i>Fold increase</i> ^a		
			2h	4h	18h
12642	<i>Ch25h</i>	<i>cholesterol 25-hydroxylase</i>	13.44	12.42	2.88
875318	<i>Ifi204</i>	<i>interferon gamma-inducible protein 16</i>	4.64	7.07	< 2
213002	<i>Ifitm6</i>	<i>interferon induced transmembrane protein 6</i>	4.23	7.82	< 2
73835	<i>Ifitm5</i>	<i>interferon induced transmembrane protein 5</i>	3.24	3.45	< 2
15953	<i>Ifi47</i>	<i>interferon gamma inducible protein 47</i>	3.08	4.42	< 2
58185	<i>Rsad2</i>	<i>radical S-adenosyl methionine domain containing 2</i>	< 2	10.94	< 2
100038882	<i>Isg15</i>	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i>	< 2	6.93	< 2

Les analyses par microarray pour l'étude de l'expression du génome complet ont été réalisées sur les poumons de souris C57BL/6 (n = 3-5 par groupe) traitées par voie intranasale par flagelline en comparaison au groupe mock. Les animaux ont été sacrifiés 2h, 4h et 18h après le traitement par la flagelline (<http://mace.ihes.fr>; accession no. 2176499768) (Fougeron et al., 2015). ^a Les valeurs de *fold increase* correspondent au différentiel d'expression des gènes aux différents temps comparée au groupe mock.

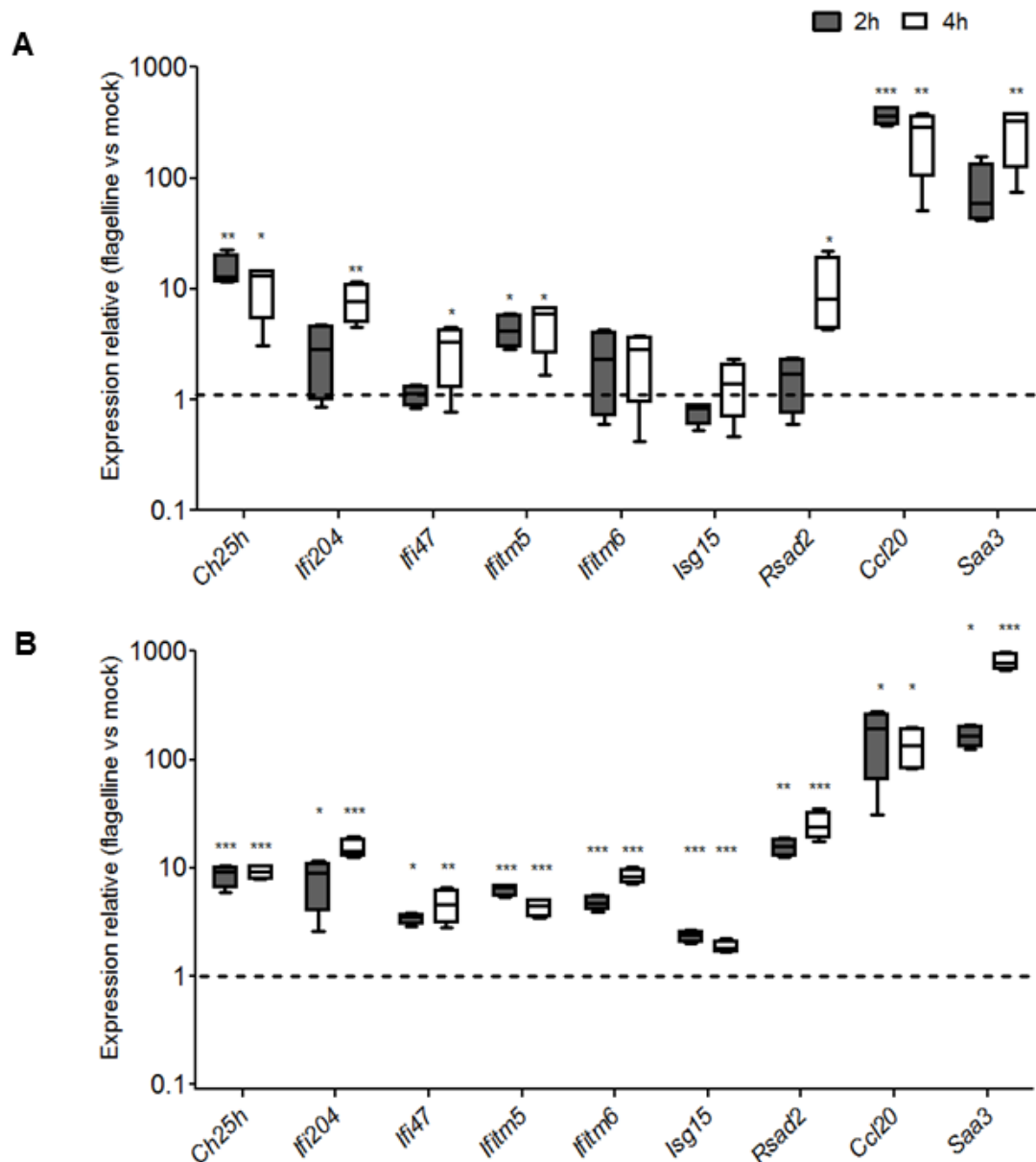


Figure 1 : L'administration intranasale ou systémique de flagelline active les gènes antiviraux dans le poumon.

Des souris C57BL/6 mâles (n=4) sont traitées par voie intranasale (A) ou intrapéritonéale (B) avec 5 µg de flagelline en PBS. Les poumons ont été récupérés à 2h ou 4h et l'ARNm a été quantifiée par RT-qPCR. L'expression relative (RQ) a été normalisée à l'expression des animaux mock (arbitrairement fixée à une valeur de 1). Les résultats sont représentés par la médiane avec la déviation standard. La significativité statistique a été évaluée par un ANOVA (one-way) suivi d'un test de Dunnett (* : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$, *** : $P < 0,001$).

Le traitement systémique ou mucosal de flagelline induit une diminution des taux d'ARN génomiques du virus de la grippe.

Nous avons donc testé dans un modèle expérimental d'infection si la réponse transcriptomique antivirale médiée par la flagelline était associée à une diminution de la réplication du virus de la grippe dans le poumon. Le modèle consiste en une administration intranasale d'une dose sub létale du virus de la grippe A H3N2 (IAV, 30 PFU), combinée avec des traitements par voie intranasale de 5 µg de flagelline (ou PBS en contrôle) toutes les 24h, en démarrant 12h avant l'infection (**Fig. 2A**). La réplication virale a été suivie par la mesure des taux d'ARN génomique de M1 dans des homogénats pulmonaires 24, 48 et 96h après l'infection, par une quantification absolue utilisant une PCR en temps réel Taqman avec une courbe de calibration. Nous avons trouvé une augmentation des taux d'ARN M1 H3N2 de 24 à 96h après l'infection indiquant donc une réplication virale efficiente (**Fig. 2B**). 48 heures après l'infection, le taux de copies d'ARN M1 dans le poumon d'animaux traités par la flagelline était 7,3 fois plus bas que chez les souris recevant du PBS, indiquant un effet de la flagelline sur la réplication virale de l'ARN viral. Une tendance similaire mais plus légère (diminution de 2,3 fois comparée aux souris traitées par PBS) a également été observée 96h après l'infection (**Fig. 2B**).

Comme la flagelline a montré des propriétés anti-virales par la voie systémique (Zhang et al., 2014; Hossain et al., 2014), nous avons aussi traité les animaux infectés par H3N2 avec 5 µg de flagelline par voie intrapéritonéale (**Fig. 2C**). De façon intéressante, quand les animaux infectés par le virus de la grippe étaient traités par la flagelline, nous avons observé une diminution de 18,3 fois des taux d'ARN viraux 48h après l'infection comparée au groupe PBS. Une diminution significative (1,9 fois) des taux d'ARN M1 a également été observée 96h après l'infection dans le groupe traité par flagelline. Ces résultats indiquent que l'administration systémique de flagelline a un effet plus fort sur la réplication virale que l'administration intranasale.

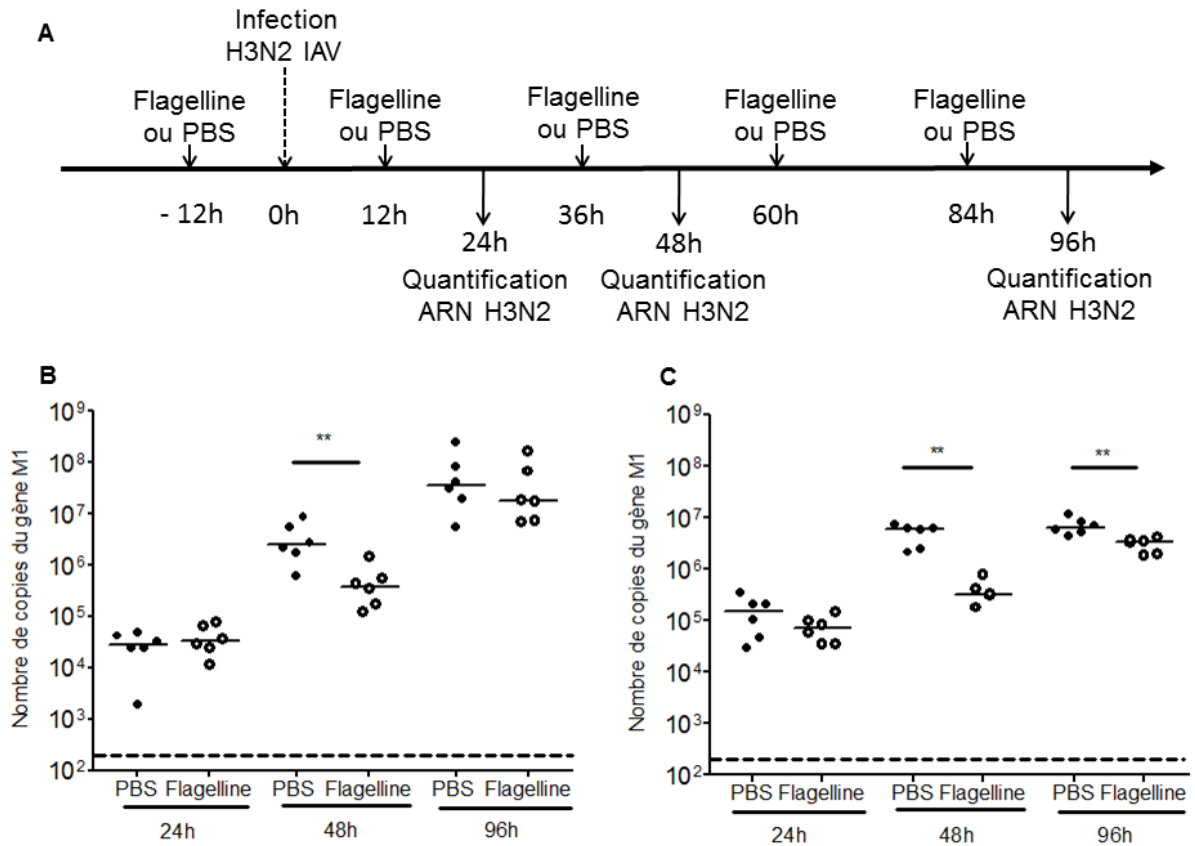
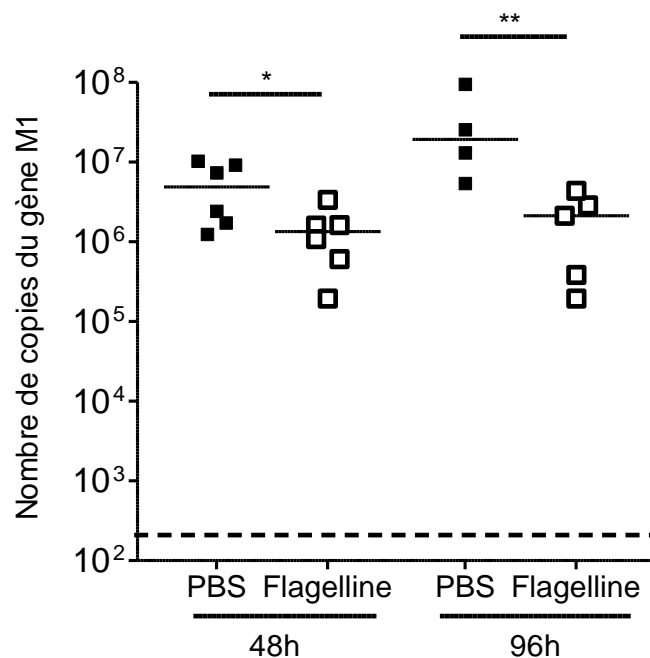


Figure 2 : L'administration mucosale et systémique de flagelline altère la réplication d'ARN viral dans le poumon.

(A) Des souris mâles C57BL/6 (n = 5 à 6) ont été infectées par voie intranasale avec H3N2 (30 PFU). Douze heures avant l'infection et 12, 36, 60 et 84h post-infection, les souris ont reçu 5 µg de flagelline par voie intranasale (B) ou intrapéritonéale (C). Les poumons ont été récupérés 24, 48 et 96h post infection pour quantification virale en réalisant une RT-PCR quantitative. Les valeurs correspondent au nombre absolu de copies d'ARN M1 viral pour 12,5 ng d'ARN totaux de poumon. La ligne en trait plein correspond à la médiane et la ligne en pointillée représente la limite de détection. Une expérience représentative parmi deux est présentée. La significativité statistique a été évaluée par un test de Mann et Whitney (** : P < 0,01).

La diminution des taux d'ARN viraux par administration de flagelline est indépendante de la voie de signalisation interféron de type I.

La plupart des gènes identifiés dans l'étude transcriptomique (**Tableau 2**) sont sous le contrôle de l'interféron de type I (IFN α et IFN β) ce qui suggère donc un rôle de ces interférons dans l'effet médié par la flagelline. Pour évaluer le rôle présumé de la signalisation IFN de type I, les taux d'ARN viraux ont été quantifiés après un traitement par la flagelline chez des souris ne possédant pas le récepteur IFN de type I (*Ifnar*^{-/-}). Ces souris ont été infectées par le virus de la grippe H3N2 et traitées par la flagelline par voie systémique avant de mesurer l'ARN viral dans les poumons comme indiqué précédemment (**Fig. 2A**). La flagelline a induit une diminution significative de 3,6 et 9 fois des ARN M1 du virus de la grippe A à 48 et 96h respectivement (**Fig. 3**). Ces résultats montrent que la signalisation interféron de type I n'est pas nécessaire pour la réduction de la réplication du virus de la grippe médiée par la flagelline. Cela est cohérent avec les données en microarray qui n'ont pas montré d'augmentation des transcrits IFN α ou IFN β spécifiques dans les poumons des animaux traités par la flagelline (<http://mace.ihes.fr>, accession no. 2176499768). De plus, l'administration par voie respiratoire ou systémique de flagelline n'a pas augmenté l'expression pulmonaire de *Ifnl2* ou *Ifnl3* codant pour l'interféron de type III qui était précédemment associée à l'élimination du virus de la grippe chez les souris (données non montrées) (Mordstein et al., 2008). Ensemble, ces résultats montrent fortement que les interférons ne sont pas associés à l'effet anti-viral médié par la flagelline.



Des souris *Ifnar*^{-/-} (n = 4 à 6) ont été infectées par voie intranasale avec H3N2 (30 PFU) et traitées par voie intrapéritonéale avec 5 µg de flagelline 12h avant l'infection et 12, 36, 60 et 84h après l'infection. Les poumons ont été récupérés 48 ou 96h après l'infection pour quantification virale en réalisant une RT-PCR quantitative. Les valeurs correspondent au nombre absolu de copies d'ARN M1 viral pour 12,5 ng d'ARN totaux de poumon. La ligne en trait plein correspond à la médiane et la ligne en pointillée représente la limite de détection. La significativité statistique a été évaluée par un test de Mann et Whitney (* : P < 0.05 ; ** : P < 0.01).

L'effet de la flagelline sur la réplication de l'ARN viral est indépendant de la signalisation IL-22.

L'administration systémique de flagelline chez la souris induit la production d'interleukine 22 (IL-22), une cytokine impliquée dans les mécanismes de défense de l'hôte au niveau des muqueuses incluant le tractus respiratoire et l'intestin (Van Maele et al., 2010; Van Maele et al., 2014b; Kinnebrew et al., 2012). Il a été précédemment démontré que la flagelline pouvait protéger contre une infection intestinale à rotavirus par la production d'IL-22 associée à la production d'IL-18 (Zhang et al., 2014). Nous avons donc évalué, dans un contexte d'infection respiratoire par le virus de la grippe, le rôle d'IL-22 dans l'administration de flagelline. Nous avons d'abord montré que l'administration systémique de flagelline induit une forte production d'IL-22 dans le sang 2h après l'administration à la fois chez les animaux non infectés et infectés par H3N2 (**Fig. 4A-B**). La contribution d'IL-22 dans l'effet antiviral médié par la flagelline a été ensuite analysée chez des souris *Il22^{-/-}* en mesurant les taux d'ARN viraux 48h post infection après traitements par la flagelline (**Fig. 4A**). Comme chez les souris IL-22 compétentes, les taux d'ARN IAV sont significativement plus bas (7,5 fois) chez les souris *Il22^{-/-}* traitées par la flagelline que les souris *Il22^{-/-}* ayant reçu du PBS (**Fig. 4C**). Ces résultats indiquent que l'IL-22, qui est produite par la stimulation de la flagelline, n'est pas requise pour l'effet de la flagelline sur la production d'ARN viral.

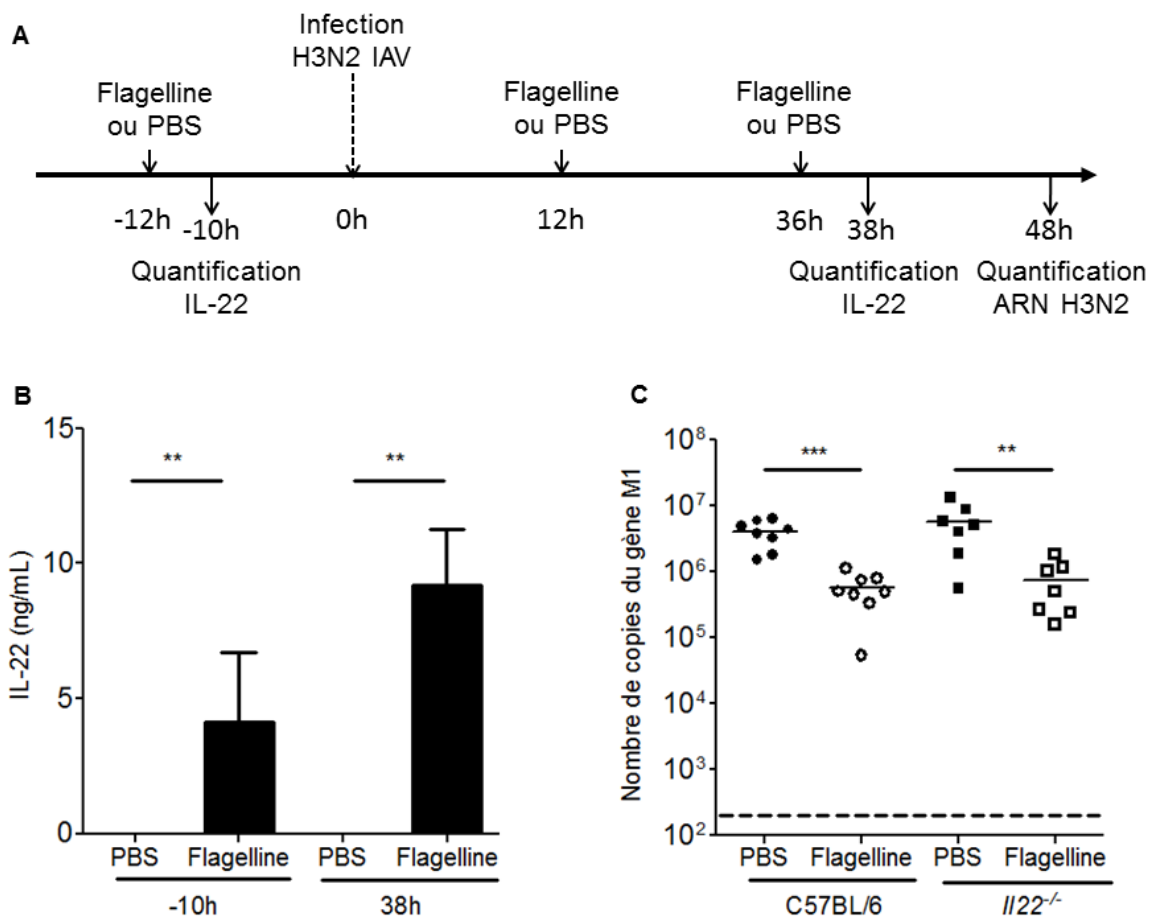


Figure 4 : L'IL-22 n'est pas requise pour la diminution des taux d'ARN M1 H3N2 médiée par la flagelline.

(A) Des souris mâles C57BL/6 ou *Il22*^{-/-} (n = 7) ont été infectées par voie intranasale avec H3N2 (30 PFU). Douze heures avant l'infection et 12h et 36h post-infection, les souris ont reçu par voie intrapéritonéale 5 µg de flagelline ou du PBS comme contrôle. (B) Le sang a été récupéré chez les souris C57BL/6 10h avant l'infection et 38h après l'infection virale pour un dosage des cytokines dans le sérum. Les taux d'IL-22 ont été mesurés par ELISA dans le sérum. Les résultats correspondent à la moyenne avec la déviation standard. La significativité statistique (** : P < 0.01) comparée au groupe PBS a été évaluée par un test de Mann et Whitney. (C) Les poumons ont été récupérés 48h après l'infection pour quantification virale en réalisant une RT-PCR quantitative. Les valeurs correspondent au nombre absolu de copies d'ARN M1 viral pour 12,5 ng d'ARN totaux de poumon. La ligne en trait plein correspond à la médiane et la ligne en pointillée représente la limite de détection. Une expérience représentative parmi deux est présentée. La significativité statistique a été évaluée par un test de Mann et Whitney (** : P < 0.01, *** : P < 0.001).

L'administration systémique de flagelline booste l'effet de l'oseltamivir

Nous avons ensuite investigué si la réduction de l'ARN viral induite par la flagelline pouvait être améliorée par la combinaison avec une drogue antivirale ciblant spécifiquement les virus tel que l'inhibiteur de neuraminidase oseltamivir. Cet agent antiviral de première ligne est recommandé en administration per os aux populations exposées à des individus infectés par le virus de la grippe soit en prophylaxie et/ou en thérapeutique. Les souris ont été traitées 12h avant l'infection par H3N2 puis 12 et 36 heures après l'infection soit par la flagelline, oseltamivir ou une combinaison des deux composés (**Fig. 5A**). Nous avons observé qu'à la fois l'oseltamivir par voie orale (4 mg/kg) et la flagelline par voie intranasale (5 µg) avaient des effets similaires sur la réplication virale (**Fig. 5B**). De façon intéressante, l'association de la flagelline et de l'oseltamivir a réduit de façon significative les taux d'ARN viraux par 12,3 et 9,4 fois, en comparaison à la flagelline ou l'oseltamivir seul, respectivement. Ses résultats suggèrent que le traitement combinatoire pourrait améliorer l'effet antiviral de chaque composé pris séparément.

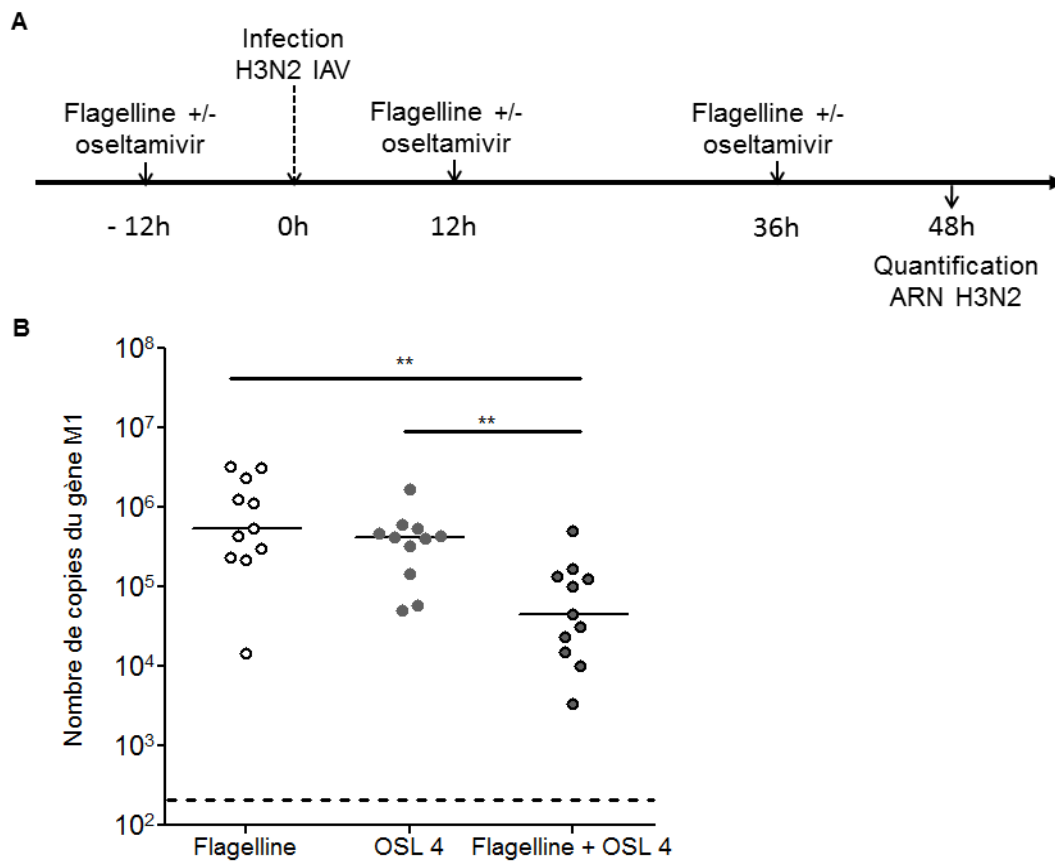


Figure 5 : L'administration systémique de flagelline booste l'effet de l'oseltamivir.

(A) Des souris mâles C57BL/6 (n = 11) ont été infectées par voie intranasale avec H3N2 (30 PFU). Douze heures avant l'infection et 12h et 36h après l'infection, les souris ont reçu soit 5 µg de flagelline par voie intrapéritonéale, 4 mg/kg d'oseltamivir (OSL 4) par voie orale, ou une combinaison de flagelline et oseltamivir. (B) Les poumons ont été récupérés 48h après l'infection pour quantification virale en réalisant une RT-PCR quantitative. Les valeurs correspondent au nombre absolu de copies d'ARN M1 viral pour 12,5 ng d'ARN totaux de poumon. La ligne en trait plein correspond à la médiane et la ligne en pointillée représente la limite de détection. La significativité statistique a été évaluée par un test de Mann et Whitney (** : P < 0.01).

I.1.5. Discussion

L'immunomodulation de l'immunité innée avec les agonistes de TLR représente une approche promettante pour contrôler les maladies infectieuses (Savva and Roger, 2013; Hedayat et al., 2011; Mifsud et al., 2014). Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois que le traitement de souris par la flagelline, agoniste de TLR5, altère la réplication du virus de la grippe dans le poumon, quelle que soit la voie d'administration (systémique ou respiratoire). Nous savons de plusieurs modèles infectieux que l'effet biologique de la flagelline est au moins en partie dépendant de la voie d'administration (Vijayan et al., 2018) : la voie mucoale stimule davantage l'épithélium entraînant le recrutement de polynucléaires neutrophiles et la production de molécules anti-microbiennes tandis que le traitement par voie systémique active les cellules dendritiques qui conduisent à l'activation des lymphocytes T helper et des cellules lymphoïdes innées de type 3.

Néanmoins, le mécanisme par lequel la flagelline réduit la réplication du virus influenza est encore inconnu. Alors que la flagelline affecte principalement la production d'ARN viral, nous pouvons supposer que l'agoniste de TLR5 affecte la transcription génomique et la réplication du virus de la grippe. La réplication du virus de la grippe A est un mécanisme complexe impliquant de nombreux facteurs de l'hôte (Villalon-Letelier et al., 2017). Cela pourrait être pertinent de savoir si ces molécules sont modulées par la stimulation de la flagelline et quelle(s) étape(s) de la production d'ARN viral serait (seraient) impactée(s) par la flagelline (réplication de l'ARN viral à sens négatif, production d'ARN complémentaire à sens positif ou transcription de l'ARN viral).

Nos résultats ont ainsi renforcé la preuve de concept que la flagelline est capable de déclencher des mécanismes de défense antiviraux (Zhang et al., 2014; Hossain et al., 2014). Hossain et al. ont montré dans un modèle hépatique colonisé par le CMV murin que la diminution de la charge virale par la flagelline est corrélée à la présence des cellules NK suggérant un rôle majeur de ces cellules (Hossain et al., 2014). Une analyse détaillée des populations cellulaires pulmonaires est nécessaire pour évaluer la participation des cellules NK mais aussi des autres cellules immunitaires dans le contrôle de la réplication du virus de la grippe A par la flagelline. Dans le cas de l'infection intestinale à rotavirus, Zhang et al. ont démontré que l'IL-22 était requise pour la protection médiée par la flagelline (Zhang et al., 2014). Dans notre cas, bien que la production d'IL-22 fût augmentée par l'administration de flagelline, les souris déficientes en IL-22 ont encore réussi à réduire l'ARN M1 par le traitement de la flagelline, indiquant que cette cytokine n'était pas nécessaire pour l'effet antiviral de la flagelline. Ces résultats sont concordants avec des études antérieures qui

montrent que l'IL-22, produite dans le sang et les poumons durant l'infection par le virus de la grippe, n'est pas impliquée dans le contrôle de la réplication du virus de la grippe (Guo and Topham, 2010; Ivanov et al., 2013).

De façon surprenante, nous avons également démontré que l'effet de la flagelline sur la réplication virale était indépendant de l'interféron de type I, encore reconnu comme la principale ligne de défense contre les virus. La réponse anti-influenza IFN de type I indépendante a également été démontrée avec les agonistes de TLR2 mais aussi avec l'association des agonistes de TLR2/6 et TLR9, suggérant par conséquent que les voies de signalisation antivirales induites par les TLR et TLR5 sont indépendantes de la réponse canonique interféron (Tan et al., 2012; Tuvim et al., 2012). Néanmoins, nous avons trouvé que la flagelline active plusieurs gènes ISG, ce qui pourrait indiquer la possibilité d'une réponse interféron indépendante mais TLR5 dépendante de ces gènes.

Nous avons précédemment démontré que l'administration de la flagelline par la voie respiratoire pouvait améliorer l'index thérapeutique des antibiotiques dans le contexte d'infection à pneumocoque et de pneumonies bactériennes post infection grippale (Porte et al., 2015). Ici, nous avons démontré que l'association de la flagelline et l'oseltamivir diminue fortement le taux d'ARN M1 viral, améliorant de façon significative l'effet antiviral de chaque traitement isolément. A cet égard, l'effet d'une thérapeutique combinant un agoniste de TLR et une molécule antivirale spécifique de virus de la grippe comme l'oseltamivir a bien été décrit par ailleurs. En effet, Lau et al. ont montré que la co-administration d'un agoniste de TLR3 avec l'oseltamivir a réduit les titres viraux pulmonaires chez les souris infectées avec le virus H5N1, comparé à l'oseltamivir seul (Lau et al., 2010). Plus récemment, Leiva-Suarez et al. ont reporté que l'administration par aérosol d'agonistes de TLR2/6 et de TLR9 associés à l'oseltamivir améliorait la survie des souris après une pneumonie avec une dose de létale du virus de la grippe A (Leiva-Juarez et al., 2018). Ensemble, nos données contribuent à souligner le potentiel thérapeutique de l'association de molécules avec différents modes d'action : un inhibiteur de neuraminidase avec un effet direct sur l'infectiosité virale mais avec une brève fenêtre thérapeutique et des stimulants de l'immunité innée agissant sur les cellules de l'hôte en induisant des voies de signalisation anti-virale avec un effet plus durable.

I.1.6. Remerciements

Ce travail a été financé par l'INSERM, le CNRS, l'Institut Pasteur de Lille, l'Université de Lille et Inserm-Transfert (CoPoC grant « Innatebiotic »). Nous remercions le Dr R. Le Goffic pour nous avoir fourni le plasmide pour la quantification de l'ARN viral.

I.1.7. Bibliographie

- Barjesteh, N., Shojadoost, B., Brisbin, J. T., Emam, M., Hodgins, D.C., Nagy, E., Sharif, S., 2015. Reduction of avian influenza virus shedding by administration of Toll-like receptor ligands to chickens. *Vaccine* 33, 4843-9.
- Blanc, M., Hsieh, W.Y., Robertson, K.A., Kropp, K.A., Forster, T., Shui, G., Lacaze, P., Watterson, S., Griffiths, S.J., Spann, N.J., Meljon, A., Talbot, S., Krishnan, K., Covey, D.F., Wenk, M.R., Craigon, M., Ruzsics, Z., Haas, J., Angulo, A., Griffiths, W.J., Glass, C.K., Wang, Y., Ghazal, P., 2013. The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-hydroxycholesterol to the interferon antiviral response. *Immunity* 38, 106-18.
- Brass, A.L., Huang, I.C., Benita, Y., John, S.P., Krishnan, M.N., Feeley, E.M., Ryan, B.J., Weyer, J.L., van der Weyden, L., Fikrig, E., Adams, D.J., Xavier, R.J., Farzan, M., Elledge, S.J., 2009. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139, 1243-54.
- Collazo, C.M., Yap, G.S., Sempowski, G.D., Lusby, K.C., Tessarollo, L., Vande Woude, G.F., Sher, A., Taylor, G.A., 2001. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J Exp Med* 194, 181-8.
- Conrady, C.D., Zheng, M., Fitzgerald, K.A., Liu, C., Carr, D.J., 2012. Resistance to HSV-1 infection in the epithelium resides with the novel innate sensor, IFI-16. *Mucosal Immunol* 5, 173-83.
- Didierlaurent, A., Goulding, J., Patel, S., Snelgrove, R., Low, L., Bebien, M., Lawrence, T., van Rijt, L.S., Lambrecht, B.N., Sirard, J.C., Hussell, T., 2008. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med* 205, 323-9.
- Fiore, A.E., Fry, A., Shay, D., Gubareva, L., Bresee, J.S., Uyeki, T. M., 2011. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza --- recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 60, 1-24.
- Fougeron, D., Van Maele, L., Songhet, P., Cayet, D., Hot, D., Van Rooijen, N., Mollenkopf, H.J., Hardt, W.D., Benecke, A.G., Sirard, J.C., 2015. Indirect Toll-like receptor 5-mediated

activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract. *Vaccine* 33, 3331-41.

Furuse, Y., Suzuki, A., Kamigaki, T., Oshitani, H., 2009. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. *Virology* 6, 67.

Govorkova, E.A., Baranovich, T., Seiler, P., Armstrong, J., Burnham, A., Guan, Y., Peiris, M., Webby, R.J., Webster, R.G., 2013. Antiviral resistance among highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses isolated worldwide in 2002-2012 shows need for continued monitoring. *Antiviral Res* 98, 297-304.

Guo, H. and Topham, D.J., 2010. Interleukin-22 (IL-22) production by pulmonary Natural Killer cells and the potential role of IL-22 during primary influenza virus infection. *J Virol* 84, 7750-9

Hammerbeck, D.M., Bursleson, G.R., Schuller, C.J., Vasilakos, J.P., Tomai, M., Egging, E., Cochran, F.R., Woulfe, S., Miller, R.L., 2007. Administration of a dual toll-like receptor 7 and toll-like receptor 8 agonist protects against influenza in rats. *Antiviral Res* 73, 1-11.

Hancock, R.E., Nijnik, A., Philpott, D.J., 2012. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol* 10, 243-54.

Hedayat, M., Netea, M.G., Rezaei, N., 2011. Targeting of Toll-like receptors: a decade of progress in combating infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 11, 702-12.

Horimoto, T., Kawaoka, Y., 2005. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* 3, 591-600.

Hossain, M.S., Ramachandiran, S., Gewirtz, A.T., Waller, E.K., 2014. Recombinant TLR5 agonist CBLB502 promotes NK cell-mediated anti-CMV immunity in mice. *PLoS One* 9, e96165.

Huang, I.C., Bailey, C.C., Weyer, J.L., Radoshitzky, S.R., Becker, M.M., Chiang, J.J., Brass, A.L., Ahmed, A.A., Chi, X., Dong, L., Longobardi, L.E., Boltz, D., Kuhn, J.H., Elledge, S.J., Bavari, S., Denison, M.R., Choe, H., Farzan, M., 2011. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathog* 7, e1001258.

Ivanov, S., Renneson, J., Fontaine, J., Barthelemy, A., Paget, C., Fernandez, E.M., Blanc, F., De Trez, C., Van Maele, L., Dumoutier, L., Huerre, M.R., Eberl, G., Si-Tahar, M., Gosset, P., Renauld, J.C., Sirard, J.C., Faveeuw, C., Trottein, F., 2013. Interleukin-22 reduces lung inflammation during influenza A virus infection and protects against secondary bacterial infection. *J Virol* 87, 6911-24.

Iwasaki, A., Pillai, P.S., 2014. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol* 14, 315-28.

Jarchum, I., Liu, M., Lipuma, L., Pamer, E.G., 2011. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infect Immun* 79, 1498-503.

Jiang, T., Zhao, H., Li, X.F., Deng, Y.Q., Liu, J., Xu, L.J., Han, J.F., Cao, R.Y., Qin, E.D., Qin, C.F., 2011. CpG oligodeoxynucleotides protect against the 2009 H1N1 pandemic influenza virus infection in a murine model. *Antiviral Res* 89, 124-6.

Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-84.

Kinnebrew, M.A., Ubeda, C., Zenewicz, L.A., Smith, N., Flavell, R.A., Pamer, E.G., 2010. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J Infect Dis* 201, 534-43.

Kinnebrew, M.A., Buffie, C.G., Diehl, G.E., Zenewicz, L.A., Leiner, I., Hohl, T.M., Flavell, R.A., Littman, D.R., Pamer, E.G., 2012. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* 36, 276-87.

Lau, Y.F., Tang, L.H., Ooi, E.E., Subbarao, K., 2010. Activation of the innate immune system provides broad-spectrum protection against influenza A viruses with pandemic potential in mice. *Virology* 406, 80-7.

Leiva-Juarez, M.M., Kirkpatrick, C.T., Gilbert, B.E., Scott, B., Tuvim, M.J., Dickey, B.F., Evans, S.E., Markesich, D., 2018. Combined aerosolized Toll-like receptor ligands are an effective therapeutic agent against influenza pneumonia when co-administered with oseltamivir. *Eur J Pharmacol* 818, 191-197.

Lenschow, D.J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N.V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R.E., Garcia-Sastre, A., Leib, D.A., Pekosz, A., Knobeloch, K. P., Horak, I., Virgin, H.W.t., 2007. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1371-6.

Liu, S.Y., Aliyari, R., Chikere, K., Li, G., Marsden, M.D., Smith, J.K., Pernet, O., Guo, H., Nusbaum, R., Zack, J.A., Freiberg, A.N., Su, L., Lee, B., Cheng, G., 2013. Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol. *Immunity* 38, 92-105.

Meyer, L., Leymarie, O., Chevalier, C., Esnault, E., Moroldo, M., Da Costa, B., Georgeault, S., Roingeard, P., Delmas, B., Quere, P., Le Goffic, R., 2017. Transcriptomic profiling of a chicken lung epithelial cell line (CLEC213) reveals a mitochondrial respiratory chain activity boost during influenza virus infection. *PLoS One* 12, e0176355.

- Mifsud, E.J., Tan, A. C., Jackson, D.C., 2014. TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. *Front Immunol* 5, 79.
- Mifsud, E.J., Tan, A.C., Reading, P.C., Jackson, D.C., 2016. Mapping the pulmonary environment of animals protected from virulent H1N1 influenza infection using the TLR-2 agonist Pam(2)Cys. *Immunol Cell Biol* 94, 169-76.
- Morales, D.J., Lenschow, D.J., 2013. The antiviral activities of ISG15. *J Mol Biol* 425, 4995-5008.
- Mordstein, M., Kochs, G., Dumoutier, L., Renaud, J. ., Paludan, S.R., Klucher, K., Staeheli, P., 2008. Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS Pathog* 4, e1000151.
- Munoz, N., Van Maele, L., Marques, J.M., Rial, A., Sirard, J.C., Chabalgoity, J.A., 2010. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun* 78, 4226-33.
- Nempont, C., Cayet, D., Rumbo, M., Bompard, C., Villeret, V., Sirard, J.C., 2008. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol* 181, 2036-43.
- Norton, E.B., Clements, J.D., Voss, T.G., Cardenas-Freytag, L., 2010. Prophylactic administration of bacterially derived immunomodulators improves the outcome of influenza virus infection in a murine model. *J Virol* 84, 2983-95.
- Paget, C., Ivanov, S., Fontaine, J., Renneson, J., Blanc, F., Pichavant, M., Dumoutier, L., Ryffel, B., Renaud, J.C., Gosset, P., Gosset, P., Si-Tahar, M., Faveeuw, C., Trottein, F., 2012. Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: potential role in protection against lung epithelial damages. *J Biol Chem* 287, 8816-29.
- Porte, R., Fougeron, D., Munoz-Wolf, N., Tabareau, J., Georgel, A.F., Wallet, F., Paget, C., Trottein, F., Chabalgoity, J.A., Carnoy, C., Sirard, J.C., 2015. A Toll-Like Receptor 5 Agonist Improves the Efficacy of Antibiotics in Treatment of Primary and Influenza Virus-Associated Pneumococcal Mouse Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 6064-72.
- Rossman, J.S., Lamb, R.A., 2011. Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411, 229-36.
- Savva, A., Roger, T., 2013. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front Immunol* 4, 387.

Tan, A.C., Mifsud, E.J., Zeng, W., Edenborough, K., McVernon, J., Brown, L.E., Jackson, D. C., 2012. Intranasal administration of the TLR2 agonist Pam2Cys provides rapid protection against influenza in mice. *Mol Pharm* 9, 2710-8.

Tuvim, M.J., Gilbert, B.E., Dickey, B.F., Evans, S.E., 2012. Synergistic TLR2/6 and TLR9 activation protects mice against lethal influenza pneumonia. *PLoS One* 7, e30596.

Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Songhet, P., Dumoutier, L., Ferrero, I., Janot, L., Erard, F., Bertout, J., Leger, H., Sebbane, F., Benecke, A., Renauld, J.C., Hardt, W.D., Ryffel, B., Sirard, J.C., 2010. TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *J Immunol* 185, 1177-85.

Van Maele, L., Fougeron, D., Janot, L., Didierlaurent, A., Cayet, D., Tabareau, J., Rumbo, M., Corvo-Chamaillard, S., Boulenouar, S., Jeffs, S., Vande Walle, L., Lamkanfi, M., Lemoine, Y., Erard, F., Hot, D., Hussell, T., Ryffel, B., Benecke, A.G., Sirard, J.C., 2014a. Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. *Mucosal Immunol* 7, 489-500.

Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Ivanov, S., Porte, R., Deruy, E., Chabalgoity, J.A., Renauld, J.C., Eberl, G., Benecke, A.G., Trottein, F., Faveeuw, C., Sirard, J.C., 2014b. Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Infect Dis* 210, 493-503.

Vijayan, A., Rumbo, M., Carnoy, C., Sirard, J.C., 2018. Compartmentalized Antimicrobial Defenses in Response to Flagellin. *Trends Microbiol* 26, 423-435.

Villalon-Letelier, F., Brooks, A. G., Saunders, P.M., Londrigan, S.L., Reading, P.C., 2017. Host Cell Restriction Factors that Limit Influenza A Infection. *Viruses* 9.

Wang, X., Hinson, E.R., Cresswell, P., 2007. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host Microbe* 2, 96-105.

Wong, J.P., Christopher, M.E., Viswanathan, S., Karpoff, N., Dai, X., Das, D., Sun, L.Q., Wang, M., Salazar, A. M., 2009. Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection. *Vaccine* 27, 3481-3.

Wu, C.C., Hayashi, T., Takabayashi, K., Sabet, M., Smee, D.F., Guiney, D.D., Cottam, H. B., Carson, D.A., 2007. Immunotherapeutic activity of a conjugate of a Toll-like receptor 7 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3990-5.

Yu, F.S., Cornicelli, M.D., Kovach, M.A., Newstead, M.W., Zeng, X., Kumar, A., Gao, N., Yoon, S.G., Gallo, R.L., Standiford, T.J., 2010. Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide. *J Immunol* 185, 1142-9.

Zhang, B., Chassaing, B., Shi, Z., Uchiyama, R., Zhang, Z., Denning, T.L., Crawford, S. E., Pruijssers, A.J., Iskarpatyoti, J.A., Estes, M.K., Dermody, T.S., Ouyang, W., Williams, I.R.,

Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A.T., 2014. Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science* 346, 861-5.

Zhao, J., Wohlford-Lenane, C., Zhao, J., Fleming, E., Lane, T.E., McCray, P.B., Jr., Perlman, S., 2012. Intranasal treatment with poly(I*C) protects aged mice from lethal respiratory virus infections. *J Virol* 86, 11416-24.

I.2. Résultats complémentaires

I.2.1. Matériels et méthodes

Détermination des titres viraux infectieux pulmonaires (collaboration Manuel Calatrava, Lyon)

Les souris ont été sacrifiées à différents temps. Les poumons ont été récupérés, pesés et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les poumons ont été homogénéisés avec un homogénéisateur Ultra-Turrax (IKA-Werke, Staufen, Germany) et les surnageants ont été conservés à -80°C jusqu'à titration virale par dilution finale. Brièvement, des dilutions sériées de 10 en 10 à partir des surnageants des poumons homogénéisés ont été préparées dans du Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM medium) supplémenté avec de la trypsine 1 mg/ml. Les dilutions ont par la suite été inoculées sur des monocouches cellulaires de type MDCK préparées dans des plaques de microtitration à 96 puits en utilisant 4 ou 8 puits par dilution. Les plaques ont été incubées à 37°C sous 5 % CO₂ et les titres viraux ont été déterminés 4 jours après l'inoculation. Le point final a été défini comme étant la dilution la plus élevée du virus qui a donné un effet cytopathogène dans 50 % des cellules inoculées. Les titres viraux ont été définis comme les doses infectant 50 % de la culture tissulaire (TCID₅₀)/g de tissu pulmonaire (115).

Détermination des poids des poumons et des souris

Les souris ont été pesées avant l'infection et avant le sacrifice. Les poumons des souris ont été pesés après le sacrifice, avant d'être broyés.

Analyses statistiques

Les résultats sont présentés par la médiane. Les différences statistiques ont été analysées par le test de Mann-Whitney (GraphPad Prism5.0a) et considérées comme significatives pour des valeurs de $P < 0.05$.

I.2.2. Résultats

Pour compléter la mesure des transcrits M1, nous avons déterminé les titres viraux infectieux pulmonaires pour rechercher si la flagelline avait un impact sur la diminution du nombre de particules virales produites dans le poumon. Tout d'abord, nous avons observé une augmentation du titre viral au cours de l'infection (augmentation des PFU entre 48h et 96h quelles que soient les conditions) (Figure 8). Par contre, contrairement aux résultats significatifs précédemment observés avec une diminution du nombre de transcrits M1 suite au traitement des souris infectées par la flagelline, nous n'avons pas observé de diminution significative du titre viral 48h et 96h après l'infection par le virus de la grippe H3N2 chez les souris traitées par la flagelline par voie systémique.

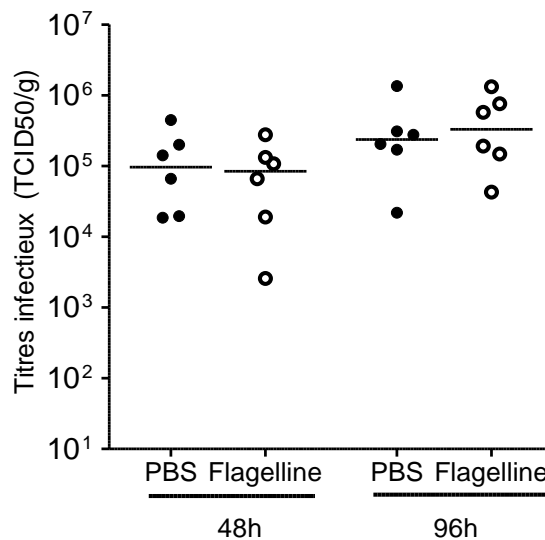


Figure 8 : L'administration systémique de flagelline ne modifie pas la production de virus H3N2 dans le poumon.

Des souris mâles C57BL/6 (n = 6) ont été infectées par voie intranasale avec H3N2 (30 PFU) et traitées par voie intrapéritonéale avec 5 µg de flagelline douze heures avant l'infection et 12, 36, 60 et 84h post-infection (selon le modèle décrit précédemment Fig. 2A de l'article). 48h et 96h post-infection, les poumons ont été récupérés et les titres viraux infectieux ont été évalués. La ligne en trait plein correspond à la médiane.

Nous avons également suivi l'évolution du poids des souris et mesuré le poids de leur poumon à la fin de l'infection. Nous avons observé une perte de poids significative chez les animaux qui reçoivent de la flagelline par voie intrapéritonéale et voie intranasale par rapport aux souris recevant du PBS (Figure 9A,C). L'effet observé est le même lorsque les animaux reçoivent le traitement combiné flagelline (voie intrapéritonéale) + oseltamivir (voie orale) par rapport aux souris recevant l'oseltamivir seul (données non montrées, P < 0.001).

Nous avons également mesuré le poids des poumons et observé que le poids du poumon rapporté au poids de la souris au moment du sacrifice était significativement plus élevé chez les souris traitées par la flagelline quelle que soit la voie d'administration (Figure 9B,D). Cet effet a été également retrouvé lorsque les animaux sont traités par flagelline (voie intrapéritonéale) + oseltamivir (voie orale) par rapport au traitement par oseltamivir seul (données non montrées, $P < 0.01$).

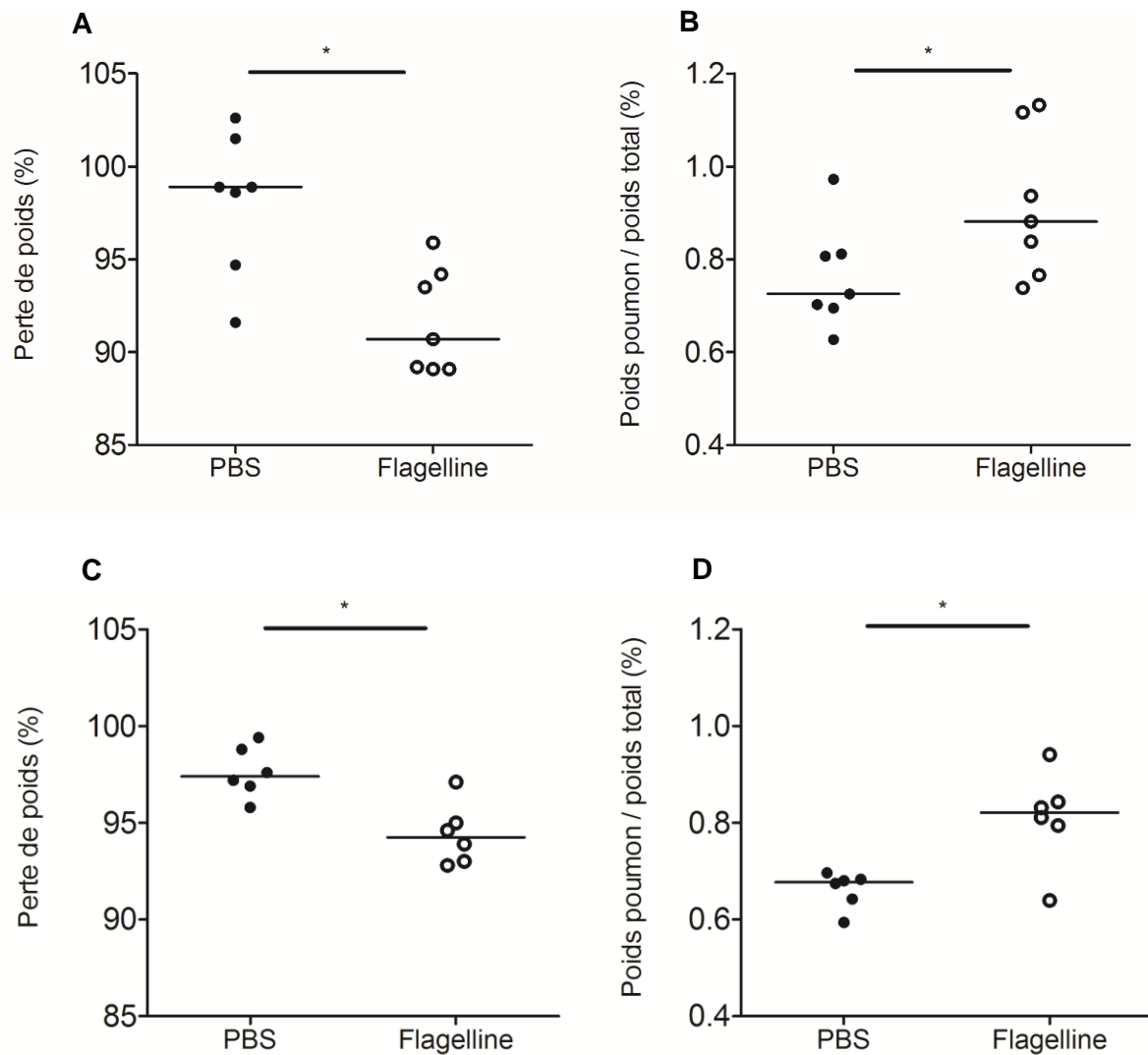


Figure 9 : La flagelline entraîne une perte de poids chez la souris mais augmente le poids de son poumon.

Des souris C57BL/6 mâles (n = 6 à 7) ont été infectées par voie intranasale avec H3N2 (30 PFU). Douze heures avant l'infection et 12h et 36h après l'infection, les souris ont reçu 5 µg de flagelline par voie intrapéritonéale (A,B) ou voie intranasale (C,D). Les souris ont été pesées avant l'infection. Les souris et leurs poumons ont également été pesés au moment du sacrifice, soit 48h après l'infection. (A,C) La perte de poids de la souris durant l'infection est évaluée en pourcentage ($= \frac{\text{poids de la souris au moment du sacrifice}}{\text{poids de la souris avant l'infection}} \times 100$). (B,D) Le poids du poumon est rapporté au poids de la souris au moment du sacrifice. La ligne en trait plein correspond à la médiane. La significativité statistique a été évaluée par un test de Mann et Whitney (* : $P < 0.05$).

I.2.3. Discussion

Notre étude a démontré un effet de la flagelline sur la réplication du virus influenza (diminution des transcrits M1). Cet effet a été observé après administration de traitements répétés de flagelline par voie intranasale et intrapéritonéale, l'effet étant plus marqué par la voie intrapéritonéale. Toutefois, l'effet sur la réplication virale ne semble pas se traduire par une réduction du nombre de particules virales. M1 est une protéine structurale abondante et impliquée dans l'organisation de l'enveloppe virale. Il se peut que la diminution du nombre de transcrits M1 observée ne soit pas suffisante pour que cela se traduise par une réduction du nombre de particules virales. La détection des transcrits M1 est une méthode de référence pour suivre la réplication virale au cours d'une infection (116),(117). Comme la combinaison flagelline + molécule antivirale oseltamivir permet d'obtenir une baisse plus importante des transcrits M1, il paraît important comme prochaine étape d'évaluer la capacité de cette association à réduire le nombre de particules virales lors de la bithérapie. Clairement, il faudra démontrer que la flagelline a un impact sur la charge virale si on veut envisager une utilisation thérapeutique de la flagelline dans les infections respiratoires induites par le virus de la grippe.

Nous avons observé une perte de poids significative chez les souris traitées par la flagelline. Cette diminution de poids est observée chez les animaux lorsque la flagelline est administrée par la voie intranasale ou intrapéritonéale (Figure 9A,C). De nombreux gènes sont activés lors d'une administration systémique ou muqueuse de la flagelline (90),(118). Une étude des gènes impliqués dans le métabolisme devrait permettre de proposer une hypothèse permettant d'expliquer cet effet. Il semble plus simple d'expliquer l'augmentation du poids du poumon lors du traitement par la flagelline. Elle est probablement liée à l'infiltration cellulaire et à l'accumulation de liquide liée à ce recrutement qui crée un oedème. Cette observation devrait se confirmer par l'analyse quantitative et qualitative des populations cellulaires pulmonaires par cytométrie en flux. Il est à noter que même lors d'une administration systémique de la flagelline, un oedème pulmonaire est observé, signifiant probablement un passage de la flagelline dans le poumon.

Comme évoqué plus haut, l'effet de la flagelline sur la réplication virale ne se traduit pas par une diminution de la charge virale dans les 96h après l'infection. Un effet de la flagelline plus tardivement n'a pas été évalué. En effet, la flagelline a été très largement décrite comme potentiel adjuvant dans le cadre de protocole de vaccination contre différents pathogènes (119),(120). Dans notre modèle d'infection, la flagelline pourrait donc avoir un effet de boost sur la réponse anticorps anti-virus influenza et ainsi permettre une protection contre une réinfection avec le même virus. Cette hypothèse pourrait être testée en comparant les taux d'anticorps anti H3N2 en présence ou en absence de flagelline 2 à 3 semaines après l'infection. Il serait aussi possible d'effectuer dans notre modèle une réinfection avec le virus H3N2 au moment de la résolution de l'infection (3 à 4 semaines après l'infection). Nous pourrions alors suivre la réplication virale et la charge virale plusieurs jours après la réinfection pour évaluer si une infection initiale en présence de flagelline permettrait de diminuer la présence du virus suite à une seconde infection.

Une étude récente a montré que l'oseltamivir, qui est actuellement indiqué chez l'homme par la voie orale, pourrait également exercer son effet antiviral lorsqu'il est administré par la voie respiratoire (121). Il serait intéressant d'évaluer dans notre modèle combinatoire (flagelline + oseltamivir) si l'administration des 2 composés par la voie respiratoire pourrait avoir un effet antiviral plus important que l'administration des 2 composés seuls. Ce traitement pourrait être comparé au traitement oseltamivir oral + flagelline systémique pour lequel nous avons observé un effet marqué sur la réplication virale.

En permettant un retour à l'homéostasie, le système immunitaire participe à la réparation du tissu pulmonaire endommagé par l'infection et la réponse inflammatoire de l'hôte. Par exemple, les cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le TGF- β (*transforming growth factor*) et l'IL-1RA (*IL-1 receptor antagonist*) sont généralement nécessaires et suffisantes pour réduire la réponse immunitaire innée et les dommages tissulaires liés à l'inflammation durant l'épisode de pneumonie. Ces processus biologiques impliqués dans la réparation tissulaire appelée « résilience tissulaire » doivent se mettre en place de façon équilibrée pour éviter une exacerbation de l'infection (23). Si les TLR induisent une réponse inflammatoire, il semblerait qu'ils puissent aussi jouer un rôle dans le remodelage tissulaire (122). Shaykhiev et al. ont démontré que les agonistes de TLR2 et TLR5 pouvaient stimuler directement la réparation cellulaire et augmenter la prolifération et la survie des cellules épithéliales indemnes. Ce mécanisme indépendant des cellules inflammatoires et des cytokines ferait intervenir le récepteur EGFR (123). Par contre, ces effets ne sont pas retrouvés avec d'autres TLR tels que TLR3, TLR7/8 et TLR9, qui entraînent au contraire la mort des cellules

épithéliales (123). La flagelline en stimulant son récepteur TLR5 pourrait donc avoir un effet sur le remodelage pulmonaire, ayant un effet protecteur pour le poumon permettant de conserver les capacités respiratoires. Des études histologiques du poumon chez des souris infectées par H3N2 et traitées ou non par la flagelline pourraient permettre d'évaluer le rôle de la flagelline dans la protection du tissu pulmonaire. Il faudrait cependant préalablement évaluer dans notre modèle d'infection sublétales avec H3N2, l'impact du virus sur le tissu pulmonaire.

Dans notre étude, nous avons travaillé avec une dose sublétales du virus H3N2 (30 PFU). Il serait intéressant d'analyser l'effet de la flagelline dans un modèle d'infection avec une dose létale (300 PFU). Dans ces conditions, il serait possible de comparer la survie des animaux traités par la flagelline avec ceux non traités. Les dommages histologiques étant particulièrement importants avec une dose létale, ce modèle permettrait d'analyser l'effet de la flagelline sur la protection du tissu pulmonaire.

II. ASTRAL : Analyse de la réponse immunitaire innée des cellules sanguines chez des patients atteints de pneumonies franches lobaires aiguës.

II.1. Introduction

Les pneumonies représentent une pathologie fréquente et sévère. Leur physiopathologie est un phénomène complexe qui peut entraîner des conséquences à long terme pour le patient au niveau pulmonaire et extrapulmonaire. La survenue de séquelles est liée aux dommages provoqués par l'inflammation mais sera limitée par l'effet protecteur du système immunitaire. De nombreux facteurs de risque participent à la survenue d'une pneumonie : l'âge, les comorbidités (BPCO, tabac, asthme notamment). Un cercle vicieux s'installe alors, les comorbidités favorisant la survenue de pneumonies aggravant elles-mêmes les comorbidités (23).

L'immunité innée pulmonaire est largement impliquée dans les mécanismes de défense mis en œuvre par l'hôte pour lutter contre les pathogènes. Les macrophages alvéolaires qui résident à la surface du tractus respiratoire inférieur sont des macrophages professionnels qui représentent la première ligne de défense antimicrobienne. Leur efficacité repose sur leur capacité microbicide directe et leur capacité à coordonner l'activité immunitaire des autres cellules. Les cellules épithéliales synthétisent différents composants (protéines du surfactant, lactoferrine, lysozyme notamment) qui inhibent les microbes. Elles participent également à la clairance mucociliaire. Les polynucléaires neutrophiles contribuent à la défense antimicrobienne par différents mécanismes : phagocytose, libération de facteurs toxiques tels que la myéloperoxydase (MPO), cathepsines, défensines et autres peptides antimicrobiens par dégranulation et la formation d'un filet d'ADN (NET : *neutrophil extracellular traps*). Les cytokines produites, notamment la chimiokine CCL2, entraînent le recrutement de macrophages. Les lymphocytes innés tels que les cellules NK et les cellules lymphoïdes innées ainsi que les plaquettes jouent également un rôle de défense anti-microbienne. Enfin, les récepteurs TLR de l'immunité innée présents à la surface des cellules épithéliales induisent une réponse innée par la production de nombreuses cytokines (23).

Des modèles de pneumopathies pré-cliniques ont montré que la flagelline permettait de protéger contre des infections respiratoires à *S. pneumoniae* et *P. aeruginosa*, deux pathogènes fréquemment associés aux pneumonies chez l'homme (94),(97). Cependant, ces études démontrent l'effet antibactérien de l'agoniste de TLR5 en prophylactique, c'est-à-dire quand la flagelline est administrée préalablement au challenge bactérien. Récemment, notre laboratoire a montré chez la souris qu'une administration intranasale de flagelline pouvait être utilisée en thérapeutique en association avec des antibiotiques dans le cadre d'une infection à pneumocoque et dans une pneumonie à *S. pneumoniae* post-grippale (124). Cette étude permet donc d'envisager une utilisation de la flagelline combinée avec des antibiotiques chez des patients atteints de pneumonies d'origine bactérienne. Même si la flagelline a montré son innocuité chez l'homme lors d'injection systémique par voie intramusculaire, elle n'a pas été testée par voie respiratoire (125),(126).

Plusieurs études ont évalué la capacité de cellules sanguines d'individus sains à répondre à différents agonistes de TLR. Une étude majeure du consortium « Milieu Intérieur » a démontré que la plupart des agonistes de TLR induisent une réponse immunitaire innée des cellules sanguines sur sang total chez des individus sains (cohorte de 1000 personnes) (127),(128),(129). Quoique la réponse aux agonistes de TLR présente de façon générale un caractère conservé (comme l'induction de la production des cytokines IL-6, IL-8 et TNF), il apparaît que l'amplitude et la signature d'activation d'autres cytokines soient spécifiques à chaque agoniste (127). Ma et al. ont démontré que l'activation de TLR5 des cellules mononucléées périphériques sanguines d'individus sains influençait l'expression de nombreuses molécules (130). Ces études sur cellules sanguines ont démontré la capacité des agonistes de TLR à activer les leucocytes à l'homéostasie. Cependant, la capacité activatrice des agonistes de TLR dans le contexte d'infections respiratoires chez l'homme n'a pas été évaluée à ce jour. Notre projet propose donc de définir la capacité des cellules sanguines de patients atteints de pneumopathie franche lobaire aiguë (PLFA) à répondre à une stimulation aux agonistes de TLR. Ces données cliniques seront essentielles pour définir la faisabilité d'une utilisation de ces molécules pour le traitement des infections respiratoires chez l'homme.

Avant la mise en œuvre d'une étude clinique, une étude préliminaire de faisabilité et de mise au point du protocole (pour tester plusieurs conditions expérimentales afin d'avoir un protocole compatible avec les échantillons obtenus) a été menée sur quelques patients sains. Une étude clinique dénommée ASTRAL (« Analyse de la réponse immunitaire innée des cellules sanguines chez des patients atteints de pneumonies franches lobaires aiguës ») a été mise en place en octobre 2017 pour répondre à la question posée.

II.2. Etude préliminaire

II.2.1. Etude de faisabilité

Une étude préliminaire a été réalisée pour évaluer la capacité de cellules mononucléées sanguines isolées de patients « sains » à répondre à la flagelline native FliC. Dans cette étude, les patients « sains » sont définis comme des personnes avec une formule sanguine sans hyperleucocytose ni leucopénie. Les prélèvements sont issus de patients hospitalisés au GHICL et ont été pris au hasard dans les échantillons de la routine du laboratoire.

Les cellules mononucléées de quatre patients « sains », âgés de 26 à 95 ans, ont été récupérées par réalisation d'un Ficoll à partir d'un prélèvement sanguin. Elles ont été incubées pendant deux heures en présence de PBS ou LPS (agoniste de TLR4, contrôle positif) ou flagelline native FliC (agoniste TLR5). Après deux heures d'incubation, l'activation transcriptionnelle de certains gènes a été évaluée (gènes de chimiokines, inflammatoires et anti-inflammatoires, anti-viraux) (Figure 10). Ces gènes ont été choisis parce qu'ils sont décrits comme des marqueurs de réponse à une stimulation par les agonistes de TLR.

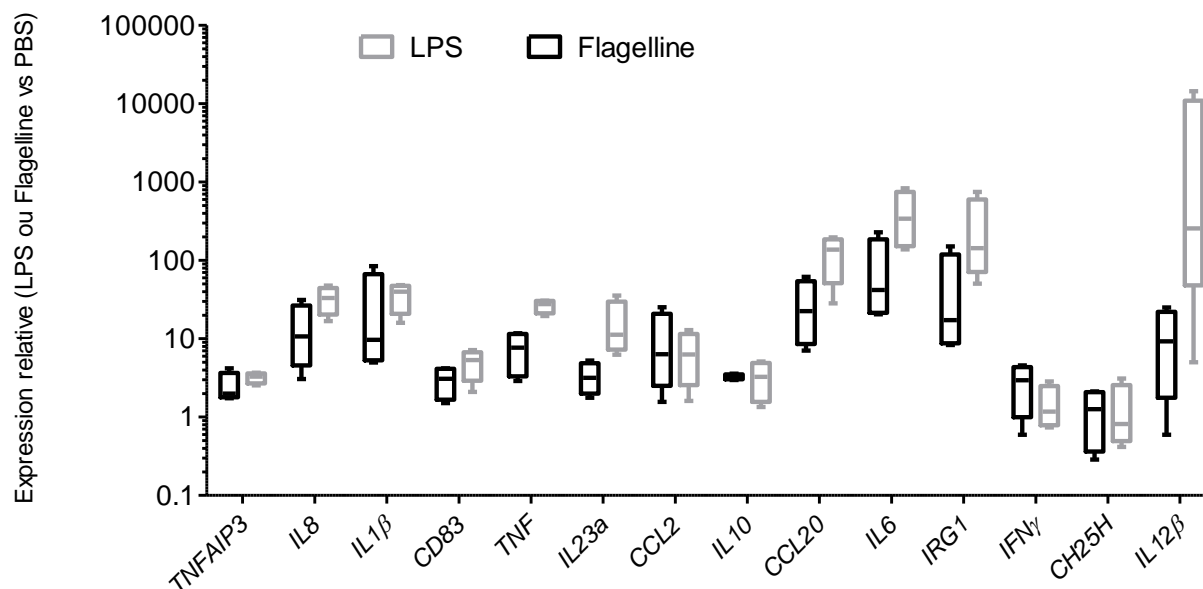


Figure 10 : Activation des PBMC de patients « sains » par des agonistes de TLR.

PBMC isolées de patients « sains » ($n = 4$) activées *in vitro* par la flagelline native FliC ($1 \mu\text{g/mL}$) ou le LPS ($0,1 \mu\text{g/mL}$) pendant 2 heures (500 000 cellules par puits). Les ARNm ont ensuite été extraits puis rétrotranscrits. L'expression relative d'ARNm (RQ) dans l'échantillon est exprimée pour la flagelline native FliC ou le LPS par rapport au PBS. Les résultats sont représentés par la médiane et la déviation standard.

Nous avons observé une très bonne réponse des cellules mononucléées sanguines au LPS et à la flagelline native FliC. Les gènes codant l'IL-6 et l'IL-8 sont parmi les mieux activés par la flagelline. Par contre, nous n'avons pas observé de réponse pour les gènes *IFN γ* et *CH25H*. Nous avons observé peu de variation d'un patient à l'autre : la réponse semble donc être homogène quel que soit l'âge (26, 30, 85 et 95 ans). Cette étude préliminaire nous a donc permis de valider la faisabilité d'une analyse à plus grande échelle sur une cohorte de patients atteints de PFLA.

II.2.2. Mise au point des conditions d'activation des PBMC par les agonistes TLR

Différentes conditions expérimentales ont été testées pour déterminer le délai pré-analytique acceptable pour la prise en charge du prélèvement sanguin ainsi que le nombre de cellules mononucléées sanguines nécessaires pour obtenir des résultats interprétables et la concentration d'agonistes à utiliser.

Une protéine recombinante FliC $_{\Delta 174-400}$ (ou FliC $\Delta 3$) a été produite, à partir de la flagelline native de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium FliC, avec un tag histidine comme décrit par Nempont et al. (131). Cette flagelline recombinante est déléetée des domaines D2 et D3 ce qui la rend moins immunogène et moins inflammatoire que la flagelline sauvage mais est toujours capable d'induire une réponse immunitaire innée via TLR5 (131). L'utilisation de cette protéine recombinante de la flagelline FliC $_{\Delta 174-400}$ par rapport à la flagelline native est donc privilégiée en thérapeutique. La flagelline FliC $\Delta 3$ a montré dans des études précliniques chez la souris des propriétés immunomodulatrices spécifiques de TLR5 (124),(131). Le laboratoire a ainsi déposé une famille de brevets (WO2009156405, WO20111614913, WO2015011254 et EP14307154.6) dans laquelle la flagelline FliC $_{\Delta 174-400}$ est le produit biologiquement actif. En tests précliniques chez la souris, la flagelline recombinante a montré une efficacité à augmenter de façon synergique l'activité des antibiotiques dans une infection expérimentale à pneumocoque.

Les conditions testées dans cette étude préliminaire ont donc été les suivantes :

- Mise en culture des cellules 3h ou 6h ou 24h après le prélèvement
- Nombre de cellules par puits : 100 000 ou 250 000 ou 500 000 par puits
- Concentration de flagelline : [FliCA3 finale] = 1000 ng/mL ou 100 ng/mL ou 10 ng/mL

La flagelline est habituellement utilisée à la concentration de 1000 ng/mL. Nous avons voulu évaluer si nous pouvions utiliser des quantités plus faibles de flagelline.

Le contrôle positif utilisé est le LPS à la concentration de 100 ng/mL.

Les prélèvements sont issus de patients dont la formule sanguine ne montrait pas d'hyperleucocytose ni de leucopénie et issus de la routine du laboratoire. Le prélèvement de chaque patient représente un délai pré-analytique (3h, 6h ou 24h après le prélèvement).

Les cellules mononucléées sanguines (PBMC) de trois patients (correspondant à une mise en culture 3h ou 6h ou 24h après le prélèvement) ont donc été isolées du sang total par centrifugation en gradient de densité en utilisant un tube SepMate (StemCell®). Les cellules ont été activées pendant deux heures par LPS ou flagelline FliCA3 (témoin : PBS) (mesure de l'activité transcriptionnelle de *Il8* et *Ccl20* – gène de ménage : β actine) ou vingt-quatre heures (dosage des cytokines IL-8 et CCL20). Seuls les résultats concernant l'expression et la production d'IL-8 sont montrés (Figure 11).

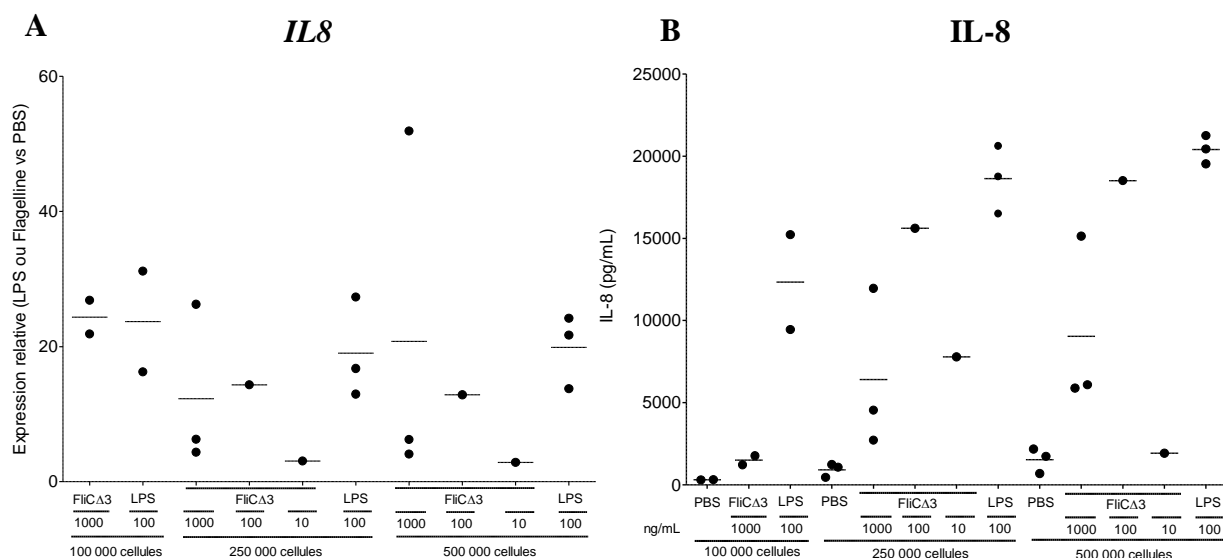


Figure 11 : Mesure du niveau d'expression du gène *IL8* (A) et de production de l'IL-8 (B) après activation des PBMC (différentes quantités de cellules) par LPS et flagelline.

PBMC isolées de patients « sains » (n = 1 à 3) activées *in vitro* par la flagelline FliCA3 (1000 ng/mL ou 100 ng/mL ou 10 ng/mL) ou le LPS (100 ng/mL) (100 000 ou 250 000 ou 500 000 cellules par puits). (A) 2h après l'activation, les ARNm ont ensuite été extraits puis rétrotranscrits. L'expression relative d'ARNm (RQ) dans l'échantillon pour *IL8* est exprimée pour la flagelline ou le LPS par rapport au PBS. (B) 24h après l'activation, l'IL-8 a été dosée par ELISA. Les résultats sont représentés par la moyenne. Chaque point représente un patient correspondant à un délai pré-analytique (mise en culture 3h, 6h, 24h après le prélèvement).

Tout d'abord, les cellules activées par le LPS présentent la meilleure activation, habituellement observée, ce qui valide le témoin positif. Nous avons constaté une discordance entre la production d'IL-8 et l'expression du gène quand les cellules sont activées par FliCA3. En effet, pour la concentration de 100 ng/mL de FliCA3, les taux d'IL-8 sont plus élevés que ne le montre l'activation du gène pour les quantités de cellules à 250 000 et 500 000 cellules. Nous avons observé le même effet pour la concentration de 10 ng/mL de FliCA3 pour 250 000 cellules. Ces constats peuvent être relativisés par rapport au nombre d'échantillons analysés par groupe (1 à 3). L'objectif de cette étude préliminaire était surtout d'analyser les conditions les plus favorables pour le protocole technique. Nous avons ensuite constaté une très bonne réponse des cellules mononucléées sanguines à la flagelline quels que soient la quantité de cellules et le délai de prise en charge du prélèvement. En effet, les conditions 250 000 et 500 000 cellules par puits, stimulées par la flagelline FliCA3 à 100 ng/mL, présentent une activation équivalente au LPS, témoin positif. A la condition 100 000 cellules / puits, l'activation reste suffisante. Nous avons donc fixé une quantité de cellules à 200 000 cellules par puits (réduite à 100 000 cellules si la quantité de cellules isolées n'est pas suffisante). N'observant pas de différence majeure entre les différents points d'étude (3, 6 ou 24 heures

après le prélèvement correspondant au délai pré-analytique), il sera donc possible de traiter les prélèvements jusqu'à 24 heures après leur réalisation.

Concernant la concentration de flagelline, les gènes sont moins activés pour une concentration de flagelline FliC Δ 3 à 10 ng/mL. Nous avons donc fixé une concentration de flagelline FliC Δ 3 à 100 ng/mL. A noter qu'à la concentration supérieure de flagelline FliC Δ 3 (1000 ng/mL), l'activation est moins efficace pouvant traduire une saturation du système.

II.3. Description de l'étude ASTRAL

L'équipe de l'Institut Pasteur de Lille et la Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (GHICL) collaborent depuis 2014 pour la mise en œuvre de l'étude clinique ASTRAL (« Analyse de la réponse immunitaire innée des cellules sanguines chez des patients atteints de pneumonies franches lobaires aiguës »). De longues démarches administratives ont été nécessaires pour aboutir à l'acceptation du CPP en avril 2017 et l'inclusion du premier patient en octobre 2017. Cette étude fait l'objet d'un financement par InsermTransfert.

II.3.1. Matériels et méthodes

II.3.1.1. Patients étudiés

L'étude clinique (IDRCB : 2017-A00450-53 / Protocole RT-12 ; NCT03231670) est une étude prospective, multicentrique, interventionnelle à risques et contraintes minimales avec constitution de collection biologique. Elle a reçu un avis favorable par le comité de protection des personnes « EST IV » (Référence : 17/17) le 11 avril 2017 (amendement MS1 du 10 avril 2018 pour l'intégration de l'hôpital Saint Vincent de Paul). Conformément à la réglementation en vigueur, l'ANSM a été informée de l'avis du CPP.

Des patients présentant une pneumopathie franche lobaire aiguë (services de Pneumologie de l'hôpital Saint Philibert et Saint Vincent de Paul – Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille) ont été inclus dans l'étude clinique selon les critères décrits dans le tableau 6. Le choix s'est porté sur la PLFA pour plusieurs raisons. Tout d'abord, cette pathologie est causée principalement par *S. pneumoniae* et est diagnostiquée sur des critères cliniques, radiologiques et biologiques bien définis (Tableau 2) permettant d'obtenir une population homogène. En effet, le diagnostic de PFLA repose sur des critères cliniques (début brutal,

fièvre, malaise général, point douloureux thoracique), radiologiques (opacité alvéolaire systématisée) et biologiques (syndrome inflammatoire avec hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles et augmentation de la CRP). Par contre, les éléments microbiologiques (présence de *S. pneumoniae* au niveau urinaire (antigénurie), respiratoire ou sanguin) ne sont pas toujours retrouvés. Les patients ont donc été inclus sur les 3 types de critères sans élément microbiologique systématiquement positif. Par ailleurs, sur l'année 2016, 49 cas de PFLA ont été diagnostiqués au sein du GHICL, ce qui permettait d'envisager un recrutement suffisant pour notre étude clinique.

Tableau 6 : Critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude clinique ASTRAL

Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
<p>Patients</p> <ul style="list-style-type: none"> • de plus de 18 ans • hospitalisés dans le service de pneumologie pour lesquels les critères cliniques, radiologiques et biologiques permettent de qualifier une pneumonie franche lobaire aiguë (PFLA). • bénéficiant d'un régime de sécurité sociale • acceptant de participer à l'étude 	<p>Patients</p> <ul style="list-style-type: none"> • sous tutelle ou curatelle • atteints d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), ou d'un sepsis • avec statut connu ou suspicion d'infection par le VIH, VHC, ou <i>Mycobacterium tuberculosis</i> • grossesse • transplantés sous immunosuppressions

Avant l'inclusion, un consentement écrit, libre et éclairé, a été obtenu auprès de chaque patient. Il est prévu d'inclure 38 patients sur une période de 3 ans (durée totale de l'étude : 48 mois). Ce chiffre a été choisi pour obtenir un nombre statistiquement relevant de patients dans un délai raisonnable en prenant également en compte les patients « perdus de vue » qui ne se présenteront pas à la seconde visite.

II.3.1.2. Critères de jugement de l'étude ASTRAL

L'objectif principal est d'analyser, au cours de la PFLA (visite 1) puis après résolution de la pneumopathie (visite 2), l'évolution du taux des transcrits spécifiques de l'IL-6 dans des cellules mononuclées du sang (PBMC), stimulées par l'agoniste du récepteur TLR5.

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- 1) Analyser l'évolution au cours puis après résolution de la pneumopathie :
 - a) la transcription des gènes de la réponse innée des PBMC stimulées par les agonistes de TLR2, TLR4, TLR5, TLR9
 - b) la production de médiateurs inflammatoires (IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p40, IL23, IFN α , IFN γ , TNF, CCL20, CCL2, CCL4 et IP10) dans les surnageants de PBMC stimulées par les agonistes de TLR2, TLR4, TLR5, TLR9
- 2) Identifier les polymorphismes génétiques des *Toll-like receptors* (TLR2, 4, 5 et 9) par génotypage des gènes à partir des PBMC.

II.3.1.3. Collecte et traitement des prélèvements sanguins

Le prélèvement sanguin est réalisé sur tube EDTA. Les PBMC sont isolées du sang total par centrifugation en gradient de densité en utilisant un tube SepMate (StemCell®). Les PBMC reprises dans du milieu RPMI sont déposées dans 2 plaques 48 puits afin d'obtenir une quantité de cellules de 100 000 à 200 000 par puits en fonction de la quantité isolée pour chaque patient. Les cellules sont ensuite activées par des agonistes de TLR (Tableau 7). Des puits sans agoniste TLR servent de témoins.

La première plaque (n°1) est incubée pendant 2 heures. Deux heures après l'activation, la plaque est centrifugée à 1600 rpm pendant 5 minutes. Le milieu de culture est éliminé. 100 μ L de RA1 + 2 % de TCEP sont ajoutés pour permettre la conservation des cellules. La plaque est congelée à -80°C pour analyse transcriptionnelle ultérieure.

La deuxième plaque (n°2), préparée en duplicat, est incubée pendant 24 heures à 37°C, 5 % CO₂. Vingt-quatre heures après l'activation, la plaque est centrifugée à 1600 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré et congelé à -80°C pour dosage ultérieur des cytokines. La plaque est également congelée à -80°C pour une future analyse des polymorphismes TLR.

Tableau 7 : Agonistes de TLR utilisés pour activer les PBMC humaines

	Pam3CSK4	CpG	LPS	MPL	FliC	FliCA3
Agonistes TLR	TLR2	TLR9	TLR4		TLR5	
Concentration finale	2,5 µg/mL	5 µg/mL	100 ng/mL	5 µg/mL	200 ng/mL	100 ng/mL

Pam3CSK4 est un lipopeptide tripalmitoylé synthétique (Invivogen®). Le CpG est issu de ODN 1826 type (référence IAX-200-002-M001 Adipogen®). Le LPS est produit à partir de la souche d'*Escherichia coli* 0111:B4 (référence IAX-100-012-M001 Adipogen®). Le MPL est produit à partir de la souche de *Salmonella minnesota R595* (référence IAX-100-002-M001 Adipogen®). La flagelline native Flic et la flagelline tronquée FliCA3 sont produites au laboratoire à partir de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium SIN22, comme cela a été décrit précédemment (131),(132).

A noter que la stabilité des agonistes congelés a été vérifiée en mesurant leur capacité activatrice sur cellules bronchiques humaines BEAS-2B (données non montrées).

II.3.1.4. Quantification de l'expression des ARNm

A partir de la plaque congelée n°1, les ARN totaux sanguins sont extraits avec le kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Duren, Germany) puis rétrotranscrits avec le kit « high-capacity cDNA archive » (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'amplification de l'ADN complémentaire est ensuite réalisée par PCR temps réel sur *Taqman Express plate Fast* à l'aide d'un mix *Taqman Fast Advanced Master* (référence : 4444557, ThermoFisher Scientific®) et du mélange sonde Taqman + amorces (Tableau 8) sur l'appareil QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Deux gènes de référence ont été utilisés : β -*ACTINE* et *18S*.

Tableau 8 : Liste du mélange (sonde Taqman + amorces) de chaque gène utilisé pour la PCR Temps réel *Taqman Express plate Fast*

<i>β-ACTINE</i>	Hs01060665_g1	<i>IL12B</i>	Hs01011519_m1
<i>18S</i>	Hs99999901_s1	<i>IL1B</i>	Hs01555410_m1
<i>CCL2</i>	Hs00234140_m1	<i>IL6</i>	Hs00985639_m1
<i>CCL20</i>	Hs00355476_m1	<i>IL8</i>	Hs00174103_m1
<i>IFNG</i>	Hs00989291_m1	<i>IRG1</i>	Hs00985781_m1
<i>IL10</i>	Hs00961622_m1	<i>TNF</i>	Hs01113624_g1

II.3.1.5. Dosage des cytokines par cytométrie en flux

Les cytokines étudiées sont les suivantes : IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL12p40, IL23, IFN α , IFN γ , TNF, CCL2, CCL4, CCL20 et IP10. Les cytokines sont dosées sur le surnageant recueilli de la plaque n°2 à l'aide des *Legend Plex multi Analyse Flox Assay kit* (Biolegend®) sur le cytomètre en flux Attune NXT. Ces dosages sont basés à la fois sur la capacité d'un cytomètre à détecter finement différents niveaux de fluorescence, et sur l'utilisation de billes couplées à des anticorps qui capturent spécifiquement différentes cytokines. Chaque bille du dosage possède une intensité de fluorescence unique, ce qui permet de mélanger et d'enregistrer différentes billes en même temps dans un seul tube. A la différence des ELISA qui permettent de quantifier une seule cytokine à la fois, ces dosages multiplex peuvent quantifier de multiples cytokines simultanément à partir d'un même échantillon. Les anticorps de détection sont directement marqués à la phycoérythrine (PE). L'intensité du signal de fluorescence PE proportionnelle à la quantité de cytokines détectée est mesurée par cytométrie en flux.

II.3.1.6. Données cliniques et biologiques

Les données cliniques et biologiques sont recueillies à l'aide d'un cahier d'observation (CRF : *Case Report Form*) reportées ensuite dans une base de données (Annexe 1). Les numérations formule sanguines sont obtenues par passage de l'échantillon sanguin (tube EDTA) sur l'automate XN-3000 (Sysmex®). Les examens microbiologiques sont réalisés dans le cadre de la pratique courante. Il s'agit habituellement pour le diagnostic de PFLA de :

- Prélèvements d'hémoculture en cas de fièvre
- Recherche de l'antigène de *S. pneumoniae* dans les urines (antigénurie)
- Examen cyto bactériologique des crachats (ECBC)

II.3.1.7. Analyses statistiques

L'analyse des données de l'étude sera essentiellement descriptive : les moyennes, variances, médianes, quantiles seront calculés pour les variables quantitatives. Les effectifs et fréquences seront calculés pour les variables qualitatives. Les évolutions avant/après résolution de la pneumopathie des taux des transcrits spécifiques de l'IL-6, des taux d'expression des gènes, et des dosages des médiateurs inflammatoires seront analysés par le test t de Student pour séries appariées si les différences sont normales, ou le test de Wilcoxon sinon. Nous considérons un seuil de significativité de 5 % pour toutes les analyses. Les analyses statistiques seront réalisées via le logiciel R et Excel. L'analyse statistique sera réalisée par la cellule de biostatistiques de la Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation (DRCI) du GHICL.

II.3.2. **Résultats**

Les résultats présentés ci-après correspondent à une analyse préliminaire des données issues des sept premiers patients inclus dans l'étude ASTRAL, en accord avec la DRCI du GHICL. Les données ont été extraites de la base de données par l'équipe de la DRCI du GHICL.

II.3.2.1. Description de la population

Les 7 patients étudiés (quatre hommes et trois femmes) présentent une moyenne d'âge de 65,3 ans (médiane de 66 ans [44 – 84 ans]). Le délai entre la première et la deuxième visite s'étale entre 42 jours (soit 6 semaines) et 95 jours (soit 13,5 semaines). Le diagnostic microbiologique (visite 1) montre : 2 antigénuries positives à *S. pneumoniae* dont 1 patient avec un ECBC positif à *S. pneumoniae*. Tous les patients étaient sous antibiotiques au moment du prélèvement de la visite 1 (4 patients traités par β -lactamines, 1 patient traité par macrolides et 2 patients traités par une association β -lactamines + macrolides). Aucun patient n'était sous traitement immunosuppresseur, seul un patient était traité par anti-inflammatoire non stéroïdien. Le syndrome inflammatoire à la visite 1 est mesuré par le dosage de la protéine réactive C (CRP) : la moyenne est de 237 mg/L et la médiane de 249 mg/L [136 - 385 mg/L]. La moyenne du taux de leucocytes au moment de la visite 1 est de 13,6 G/L et la médiane, 12,3

G/L [3,6 - 29,8 G/L]. La moyenne du taux de polynucléaires neutrophiles à la visite 1 est de 10,9 G/L et la médiane 10,1 [2,7 - 23 G/L]. La moyenne du taux de leucocytes au moment de la visite 2 est de 7,7 G/L et la médiane de 6 G/L [6,5 - 9,1 G/L] (sur 6 patients, une donnée manquante). La moyenne du taux de polynucléaires neutrophiles à la visite 2 est de 4,75 G/L et la médiane 4,7 [3,6 - 6 G/L] (sur 6 patients, une donnée manquante). Ce résultat signifie que, comme attendu, les patients ne présentent plus d'inflammation à la visite 2.

II.3.2.2. Analyse transcriptionnelle

Nous avons choisi de présenter l'analyse transcriptionnelle des gènes codant les interleukines IL-6 et IL-8 et de la chimiokine CCL20, qui sont parmi les médiateurs dont l'expression est fortement augmentée par la flagelline (Figure 12).

Les résultats de l'activation par le CpG ne sont pas présentés car aucune activation n'a été observée. Nous avons finalement constaté que l'agoniste du TLR9 choisi n'était pas capable d'activer le TLR9 humain.

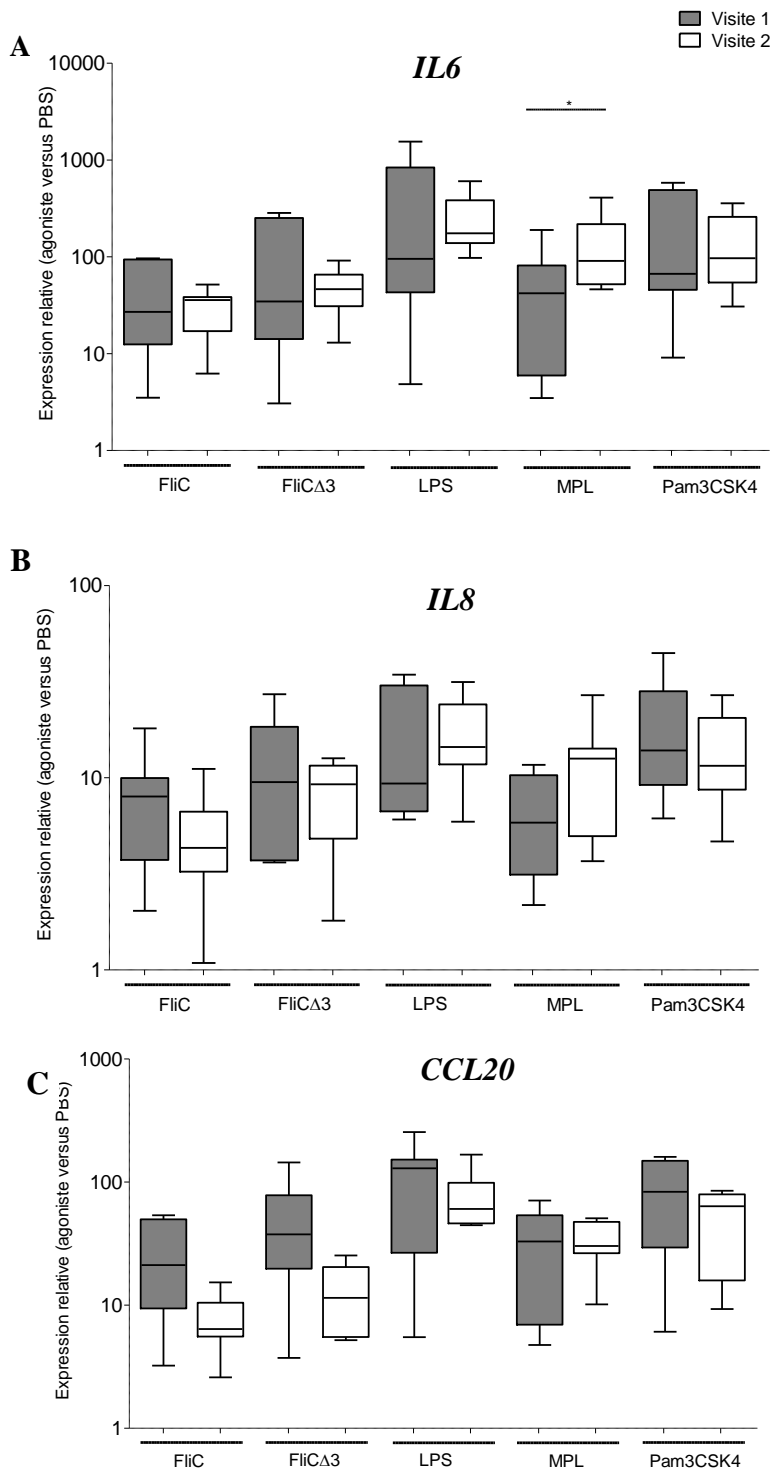


Figure 12 : Mesure de l'expression des gènes *IL6*, *IL8* et *CCL20* après activation des PBMC par les agonistes de TLR.

Les PBMC isolées de 7 patients à la visite 1 et visite 2 ont été activées *in vitro* par la flagelline FliC, la flagelline tronquée FliCΔ3, le LPS, le MPL et Pam3CSK4 pendant 2 heures. Les ARNm ont ensuite été extraits puis rétrotranscrits. L'expression relative d'ARNm (RQ) dans l'échantillon est exprimée pour les différents agonistes par rapport au PBS pour *IL6* (A), *IL8* (B) et *CCL20* (C). Les résultats sont représentés sous forme de boîtes à moustache (minimum, 1^{er} quartile, 2^{ème} quartile correspondant à la médiane, 3^{ème} quartile et maximum) avec la déviation standard. La significativité statistique a été évaluée par un test de Mann et Whitney (* : $P < 0,05$).

Nous observons une activation des gènes *IL6*, *IL8* et *CCL20* après stimulation des PBMC chez les patients atteints de PFLA (visite 1) et après résolution de l'infection (visite 2). Les profils sont semblables d'une visite à l'autre et relativement homogènes entre tous les patients. D'ailleurs, les RQ analysées de façon globale ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$) en réponse aux différents agonistes pour *IL8* et *CCL20*. Pour *IL6*, seule la réponse des PBMC au MPL est significativement différente entre les deux visites ($P < 0,05$) avec une réponse plus faible à la seconde visite. Nous n'observons pas de corrélation entre l'âge et l'activation du gène *IL6* par FliC et FliC Δ 3 (résultats non significatifs par le test de Spearman), ni de corrélation entre le sexe et l'activation du gène *IL6* par FliC et FliC Δ 3 (résultats non significatifs par le test de Mann et Whitney). L'analyse sur de nouveaux prélèvements devrait permettre de confirmer les tendances observées.

II.3.2.3. Dosage d'IL-6

Nous présentons ici le dosage de l'IL-6 qui correspond à l'objectif primaire de l'étude ASTRAL (Figure 13).

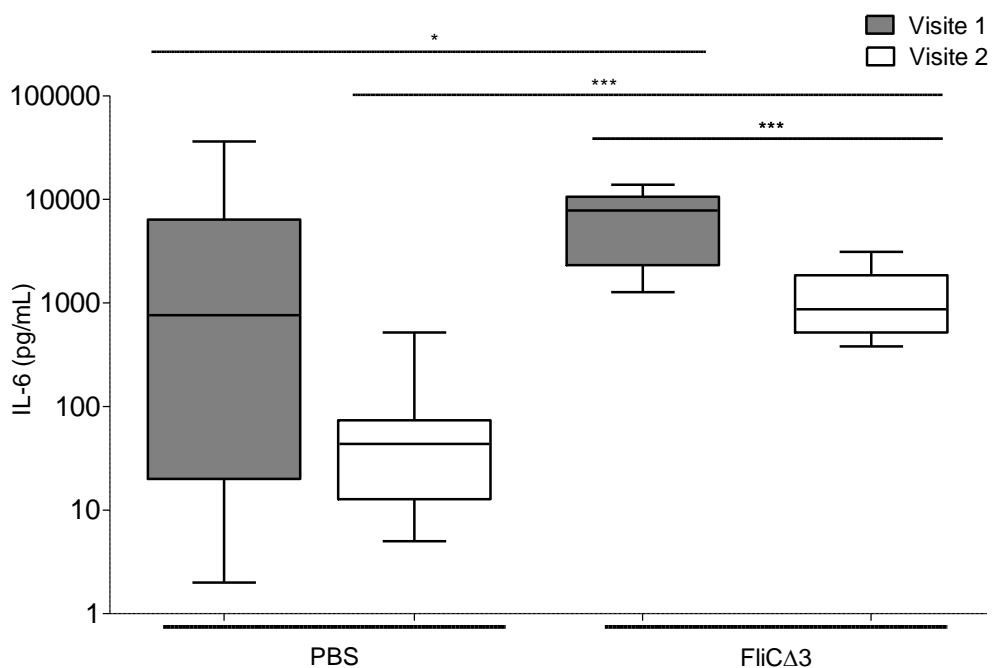


Figure 13 : Taux d'IL-6 après activation des PBMC par la flagelline FliC Δ 3

Les PBMC isolées de 7 patients à la visite 1 et visite 2 ont été activées *in vitro* par la flagelline FliC Δ 3 (dosages réalisés en duplicat pour chaque patient). Les surnageants ont ensuite été récupérés après 24h d'incubation à partir desquels a été dosée l'IL-6 par cytométrie en flux. Les résultats des 7 patients ont été poolés et sont représentés sous forme de boîtes à moustache (minimum, 1^{er} quartile, 2^{ème} quartile correspondant à la médiane, 3^{ème} quartile et maximum) avec la déviation standard. La significativité statistique a été évaluée par un test de Mann et Whitney (* : $P < 0,05$, *** : $P < 0,0001$).

En absence d'activation (groupe PBS), les taux d'IL-6 entre les visites 1 et 2 ne sont pas statistiquement différents même si la médiane est 14 fois plus basse à la visite 2 (Figure 13). Les taux élevés d'IL-6 à la visite 1 sont probablement liés à l'activation du système immunitaire en lien avec la pneumopathie. On observe également une grande disparité entre les patients lors de la visite 1. Par contre, à la visite 2, les taux sont plus bas et moins dispersés en lien avec la résolution de l'infection et le retour à la « ligne de base ».

Les taux d'IL-6 mesurés chez les patients dont les cellules sont activées par la flagelline FliC Δ 3 sont significativement différents entre les visites 1 et 2 ($P < 0,0001$) (diminution des taux par 9 entre les 2 visites) (Figure 13). La flagelline FliC Δ 3 permet donc d'activer les cellules sanguines même dans le contexte inflammatoire de la pneumopathie. Nous observons également une moindre dispersion des taux d'IL-6 par rapport au groupe PBS (donc le même niveau d'activation). Même si les taux d'IL-6 sont plus bas à la visite 2, ils sont significativement plus élevés qu'en l'absence d'activation ($P < 0,0001$) (Figure 13).

II.3.3. Discussion

L'étude ASTRAL s'intéresse à la réponse des PBMC de patients atteints de PFLA, l'une des plus fréquentes pneumonies aiguës communautaires bactériennes. Cette pathologie a été choisie car des études pré-cliniques ont montré le potentiel de la flagelline à traiter les infections respiratoires à *S. pneumoniae* (124),(133),(97). Par ailleurs, les critères de diagnostic de la PFLA étant bien définis, ils permettent d'obtenir une cohorte cliniquement homogène. Enfin, la flagelline FliC Δ 3 a été brevetée comme immunomodulateur anti-infectieux pour une utilisation par la voie respiratoire .

Le but du projet ASTRAL est donc d'évaluer si FliC Δ 3 est capable d'activer une réponse inflammatoire chez des patients présentant déjà un syndrome inflammatoire. L'étude de la réponse des PBMC à des agonistes TLR a déjà été analysée dans d'autres pathologies inflammatoires (134),(135). Dans le contexte d'asthme non infectieux, il a été montré que la production d'IL-6 par les PBMC, au stade d'exacerbation, était significativement plus élevée après la stimulation des TLR1/2 et TLR7/8, mais plus faible après la stimulation par les ligands de TLR3 et TLR9 (134). Dans cette étude, la flagelline induit la production d'IL-6 de manière équivalente au moment de l'exacerbation et en période de convalescence. Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas de différence significative dans l'expression des TLR (TLR1 à TLR9) à la surface des PBMC entre les patients asthmatiques (en phase d'exacerbation ou de

convalescence) et les témoins sains (134). Chez des enfants présentant une maladie inflammatoire de l'intestin non active, les PBMC activées par les agonistes de TLR4, TLR2/6, TLR3 et TLR7/8 produisent plus d'IL-6 que les cellules de témoins. La flagelline n'a pas été testée dans ce contexte (135). Ces études montrent que même dans des pathologies inflammatoires, les agonistes TLR peuvent activer les PBMC.

Le consortium « milieu intérieur » vise à analyser et définir, à partir d'une cohorte de 1000 personnes, la variabilité de la réponse du système immunitaire chez des individus sains et à déterminer les facteurs génétiques et environnementaux contribuant à l'hétérogénéité des phénotypes immunitaires. Au cours de l'une des nombreuses études effectuée par ce consortium, il a été montré que la flagelline et d'autres agonistes TLR avaient la capacité d'activer les PBMC à partir du sang total d'individus sains et notamment la production d'IL-6 (127),(136). En revanche, l'étude de Ma et al. a montré, lors de l'activation de PBMC d'individus sains par la flagelline, une faible expression d'*IL6* contrairement à l'expression des gènes codant les cytokines IL-12, TNF et TGF- β et les chimiokines CCL19, CCL20, CXCL6 et CXCL12 (130).

Les résultats obtenus pour les 7 patients restent préliminaires, cependant des tendances apparaissent et restent à confirmer. Tout d'abord, nous observons au niveau ARNm (*IL6*, *IL8*, *CCL20*) et cytokine (IL-6) des variations interindividuelles plus importantes à la visite 1 comparativement à la visite 2. Même si nous avons focalisé notre étude sur un groupe homogène de pneumonie, il semble que les patients soient dans des états cliniques différents, liés notamment à l'historique du patient au moment du diagnostic, la présence ou non de *S. pneumoniae* et le traitement ou non par antibiotique ou anti-inflammatoire. Ces variations pourraient influencer les capacités de réponse des PBMC. La visite 2, au moins 6 semaines après le diagnostic, met en évidence une baisse du taux de leucocytes, de polynucléaires neutrophiles et d'IL-6, signifiant une diminution du syndrome inflammatoire et un retour au moins partiel à l'homéostasie. La stratégie d'ASTRAL qui est de suivre le patient sur deux visites, permet donc d'avoir le niveau de base de réponse de chaque patient lors de la visite 2, chaque patient étant son propre témoin.

Tous les agonistes testés (Pam3CSK4, LPS, MPL, flagelline) activent les PBMC, avec une tendance de réponse plus forte pour le LPS. Il ne semble donc pas possible de distinguer une signature particulière pour un agoniste donné. L'analyse combinée des 10 gènes sélectionnés et des 13 cytokines produites pourrait permettre de distinguer des profils d'activation spécifique à un agoniste, comme cela a été le cas dans l'étude de Duffy et al. (127). En effet, ces auteurs ont été capables, grâce à une analyse à haut débit, de discriminer les agonistes TLR en fonction de

signatures protéiques.

Il faut garder à l'esprit qu'ASTRAL vise à analyser la réponse des cellules périphériques aux agonistes TLR chez des patients atteints d'une pathologie respiratoire. Nous ne pouvons pas exclure que les cellules pulmonaires aient un profil d'activation différent. Une étude sur des aspirations endotrachéales (AET) avait initialement été entreprise. Malheureusement, la forte hétérogénéité des échantillons (type de prélèvement, quantité / qualité de cellules obtenues, difficulté de remise en culture...) ne nous a pas permis d'envisager une stimulation de ces cellules par des agonistes TLR. Compte tenu de ces difficultés, nous avons donc décidé d'utiliser les PMBC pour évaluer la capacité de réponse des cellules de patients atteints de pneumonie. Le sang, même s'il n'est pas un organe immunologique, est utilisé comme reflet de ce qui passe dans l'ensemble de l'organisme (137).

Il est également prévu dans le projet ASTRAL une étude du polymorphisme des TLR2, 4, 5 et 9 des patients à partir des PBMC. En effet, le polymorphisme sur ces récepteurs innés, peut avoir un impact sur la réponse immunitaire avec des conséquences infectieuses (138),(139),(140),(141),(74). Une mutation avec perte de fonction dans TLR5 (remplacement de la séquence codant pour Arg392 par un codon stop) entraîne un défaut de reconnaissance de la flagelline et est retrouvée dans environ 10 % de la population européenne (139). Les personnes homozygotes pour cette mutation présentent une susceptibilité accrue aux infections causées par *L. pneumophila* et aux infections urinaires (142). Compte tenu de la fréquence de cette mutation, on peut donc s'attendre à trouver dans notre cohorte ASTRAL quelques patients qui ne répondront pas à la flagelline.

Globalement, cette étude préliminaire sur un peu moins de 20 % des inclusions prévues, permet donc de constater une activation des leucocytes de patients atteints de pneumonie. On peut raisonnablement s'attendre à une confirmation lorsque l'inclusion sera complète. L'étude ASTRAL devrait donc jeter les bases d'un futur projet plus ambitieux qui consisterait à utiliser chez l'homme la flagelline par aérosol comme traitement des pneumonies en association avec des antibiotiques.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était d'évaluer les capacités antimicrobiennes et inflammatoires de la flagelline, agoniste de TLR5, à la fois dans un modèle expérimental d'infection respiratoire par le virus de la grippe chez la souris et dans une étude clinique chez des patients atteints de PFLA.

Les résultats obtenus dans notre modèle d'infection respiratoire par le virus de la grippe ont montré la capacité de la flagelline à induire une diminution des transcrits viraux surtout lors d'un traitement par voie systémique par un mécanisme indépendant des interférons de type I et de l'IL-22. D'autres expérimentations devront être réalisées pour mettre en évidence le mécanisme impliqué dans l'effet de la flagelline. L'association de la flagelline à l'oseltamivir a permis d'amplifier cet effet qui doit maintenant être confirmé par une quantification des particules virales. Pour être valorisé, ces résultats devront être complétés avec la flagelline tronquée FliC Δ 3, la mieux adaptée à une future utilisation chez l'homme.

Dans notre étude clinique ASTRAL, les résultats de l'analyse préliminaire sur sept patients atteints de PFLA montrent la capacité des cellules mononucléées sanguines de ces patients, quels que soient leur âge ou leur sexe à être activées par des agonistes des récepteurs TLR au moment du diagnostic de pneumonie. L'effet est notamment démontré avec la flagelline FliC Δ 3. Ces résultats, qui devront être confirmés par l'étude complète des 30 patients inclus, ouvrent néanmoins des perspectives sur l'utilisation de la flagelline en thérapeutique chez des patients infectés. En effet, si l'utilisation d'agonistes de TLR comme anti-infectieux n'est pas innovante, en revanche l'administration par voie mucoale, permettant une localisation de l'effet à la muqueuse en évitant les effets systémiques, représente une nouvelle approche.

Cette thèse a permis d'apporter de nouvelles données expérimentales sur la capacité de la flagelline à immunomoduler la réponse immunitaire innée. Ce travail participe à une meilleure connaissance des propriétés de la flagelline qui permettra à terme d'envisager une étude clinique chez l'homme dans le contexte d'infections respiratoires. La flagelline présente de nombreux atouts comme immunomodulateur antimicrobien :

- Tout d'abord, en activant différents médiateurs solubles ou cellulaires de l'immunité innée, la flagelline rend très peu probable le développement de bactéries résistantes aux multiples mécanismes immunitaires anti-infectieux impliqués.
- Les études pré-cliniques montrent pour la flagelline un spectre d'activité antimicrobien large puisqu'il a été démontré des effets de l'agoniste contre des bactéries à Gram

positif (96),(97), à Gram négatif (84),(93),(94),(95), des virus (99),(100) et des champignons (101).

- La flagelline a déjà été testée chez l'homme, et a montré une bonne tolérance qui laisse présager une possible utilisation chez des patients atteints de pneumonie (125),(126).
- Grâce à ses propriétés adjuvantes, la flagelline peut induire une immunité adaptative spécifique du pathogène, évitant ainsi les réinfections (119).
- De par sa capacité à activer des gènes impliqués dans le remodelage tissulaire, la flagelline pourrait restaurer l'homéostasie immunitaire et favoriser la réparation tissulaire (90). Cet aspect reste à être démontré expérimentalement.
- La flagelline est une protéine dégradée en quelques heures une fois instillée dans le poumon (133). Cela permet d'éviter l'accumulation de l'immunostimulant, tout en activant l'inflammation locale. Cette stratégie « hit and run » permet d'éviter l'emballement d'une réponse qui pourrait s'avérer délétère pour le tissu pulmonaire.
- Enfin, la flagelline recombinante Flic Δ 3, protégée par plusieurs brevets, peut être produite au laboratoire en grande quantité, avec un degré de pureté acceptable, à l'aide de techniques classiques de purification de protéines. Les propriétés biochimiques de cette flagelline permettent d'envisager sereinement la préparation de lots compatibles avec une utilisation chez l'homme.

En conclusion, cette thèse aura permis de montrer pour la première fois un effet anti-virus influenza de la flagelline (manuscrit soumis) et de mettre en place un essai clinique qui devrait donner lieu, après inclusion de tous les patients et analyse des résultats, à une seconde publication. Cette étude clinique pourrait permettre d'envisager une utilisation de la flagelline dans les infections respiratoires chez l'homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Fartoukh M, Ricard JD. Management of nosocomial pneumonia. *Rev Mal Respir.* 2009 Apr;26(4):463-7.
2. Chastre J, Wolff M, Fagon JY, Chevret S, Thomas F, Wermert D, Clementi E, Gonzalez J, Jusserand D, Asfar P, Perrin D, Fieux F, Aubas S. Comparison of 8 vs 15 days of antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia in adults: a randomized trial. *Jama.* 2003 Nov 19;290(19):2588-98.
3. Claustre J, Pison C. Infections respiratoires basses. *Larevuedupraticienfr - La Revue du Praticien - Médecine Générale*; 2016. p. 109-14.
4. Catherinot E, Bron C, Rivaud E, Couderc L-J. Infections respiratoires basses communautaires. *La pneumologie fondée sur les preuves: Société de pneumologie de langue française*; 2013. p. 3-40.
5. Caramori G, Casolari P, Barczyk A, Durham AL, Di Stefano A, Adcock I. COPD immunopathology. *Semin Immunopathol.* 2016 Jul;38(4):497-515.
6. Fuhrman C, Delmas MplgéercdlS. Épidémiologie descriptive de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) en France. *Revue des Maladies Respiratoires.* 2010;27(2):160-8.
7. Spilf, Afssaps, SPLF. Antibiothérapie par voie générale dans les infections respiratoires basses. Société de pathologie infectieuse de langue française, Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, Société Française de Pneumologie. Mise au point 2010.
8. Wintenberger C, Guery B, Bonnet E, Castan B, Cohen R, Diamantis S, Lesprit P, Maulin L, Pean Y, Peju E, Piroth L, Stahl JP, Strady C, Varon E, Vuotto F, Gauzit R. Proposal for shorter antibiotic therapies. *Med Mal Infect.* 2017 Mar;47(2):92-141.
9. HCSP. Calendrier des vaccinations. Haut conseil de la santé publique. 2018.
10. Melbye H, Berdal BP. Acute bronchitis in adults. Clinical findings, microorganisms and use of antibiotics. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1994 Mar 10;114(7):814-7.
11. Boldy DA, Skidmore SJ, Ayres JG. Acute bronchitis in the community: clinical features, infective factors, changes in pulmonary function and bronchial reactivity to histamine. *Respir Med.* 1990 Sep;84(5):377-85.
12. Hall CB, Geiman JM, Biggar R, Kotok DI, Hogan PM, Douglas GR, Jr. Respiratory syncytial virus infections within families. *N Engl J Med.* 1976 Feb 19;294(8):414-9.
13. Jonsson JS, Sigurdsson JA, Kristinsson KG, Guthnadottir M, Magnusson S. Acute bronchitis in adults. How close do we come to its aetiology in general practice? *Scand J Prim Health Care.* 1997 Sep;15(3):156-60.

14. Nicholson KG, Kent J, Hammersley V, Cancio E. Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective, population based study of disease burden. *Bmj*. 1997 Oct 25;315(7115):1060-4.
15. Agius G, Dindinaud G, Biggar RJ, Peyre R, Vaillant V, Ranger S, Poupet JY, Cisse MF, Castets M. An epidemic of respiratory syncytial virus in elderly people: clinical and serological findings. *J Med Virol*. 1990 Feb;30(2):117-27.
16. Gonzales R, Sande MA. Uncomplicated acute bronchitis. *Ann Intern Med*. 2000 Dec 19;133(12):981-91.
17. Gonzales R, Bartlett JG, Besser RE, Cooper RJ, Hickner JM, Hoffman JR, Sande MA. Principles of appropriate antibiotic use for treatment of acute respiratory tract infections in adults: background, specific aims, and methods. *Ann Emerg Med*. 2001 Jun;37(6):690-7.
18. Snow V, Mottur-Pilson C, Gonzales R. Principles of appropriate antibiotic use for treatment of acute bronchitis in adults. *Ann Intern Med*. 2001 Mar 20;134(6):518-20.
19. Spilf. Prise en charge des infections des voies respiratoires basses de l'adulte immunocompétent. *Med Mal Infect - Société de pathologie infectieuse de langue française XVe Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse*. 2006;36:235-44.
20. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Garau J, Huchon G, Ieven M, Ortqvist A, Schaberg T, Torres A, van der Heijden G, Read R, Verheij TJ. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections--summary. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Nov;17 Suppl 6:1-24.
21. Blanquer J, Blanquer R, Borrás R, Nauffal D, Morales P, Menendez R, Subias I, Herrero L, Redon J, Pascual J. Aetiology of community acquired pneumonia in Valencia, Spain: a multicentre prospective study. *Thorax*. 1991 Jul;46(7):508-11.
22. Trosini-Desert V, Germaud P, Dautzenberg B. Tobacco smoke and risk of bacterial infection. *Rev Mal Respir*. 2004 Jun;21(3 Pt 1):539-47.
23. Quinton LJ, Walkey AJ, Mizgerd JP. Integrative Physiology of Pneumonia. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1417-64.
24. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, Lewis SA, Macfarlane JT. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax*. 2003 May;58(5):377-82.
25. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Jr., Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*. 2007 Mar 1;44 Suppl 2:S27-72.

26. Godet C, Beraud G, Cadranet J. Bacterial pneumonia in HIV-infected patients (excluding mycobacterial infection). *Rev Mal Respir.* 2012 Oct;29(8):1058-66.
27. Cantarelli P, Debin M, Turbelin C, Poletto C, Blanchon T, Falchi A, Hanslik T, Bonmarin I, Levy-Bruhl D, Micheletti A, Paolotti D, Vespignani A, Edmunds J, Eames K, Smallenburg R, Koppeschaar C, Franco AO, Faustino V, Carnahan A, Rehn M, Colizza V. The representativeness of a European multi-center network for influenza-like-illness participatory surveillance. *BMC Public Health.* 2014 Sep 20;14:984.
28. Gabas T, Leruez-Ville M, Le Mercier D, Lortholary O, Lecuit M, Charlier C. Influenza and pregnancy. *Presse Med.* 2015 Jun;44(6 Pt 1):639-46.
29. Paules C, Subbarao K. Influenza. *Lancet.* 2017 Aug 12;390(10095):697-708.
30. Stouffer AL, Acharya R, Salom D, Levine AS, Di Costanzo L, Soto CS, Tereshko V, Nanda V, Stayrook S, DeGrado WF. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature.* 2008 Jan 31;451(7178):596-9.
31. Schnell JR, Chou JJ. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature.* 2008 Jan 31;451(7178):591-5.
32. Dreitlein WB, Maratos J, Brocavich J. Zanamivir and oseltamivir: two new options for the treatment and prevention of influenza. *Clin Ther.* 2001 Mar;23(3):327-55.
33. Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Aug;3(8):591-600.
34. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008 Sep 12;26 Suppl 4:D49-53.
35. Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol.* 2008 Oct;89(Pt 10):2359-76.
36. Paterson D, Fodor E. Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP). *PLoS Pathog.* 2012;8(12):e1003019.
37. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol.* 2014 Apr;22(4):183-91.
38. Air GM. Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Dec;78(12):7639-43.
39. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* 2005 Mar;79(5):2814-22.
40. Jakubcova L, Holly J, Vareckova E. The role of fusion activity of influenza A viruses in their biological properties. *Acta Virol.* 2016 Jun;60(2):121-35.

41. Sediri H, Schwalm F, Gabriel G, Klenk HD. Adaptive mutation PB2 D701N promotes nuclear import of influenza vRNPs in mammalian cells. *Eur J Cell Biol.* 2015 Jul-Sep;94(7-9):368-74.
42. Ruigrok RW, Crepin T, Hart DJ, Cusack S. Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery. *Curr Opin Struct Biol.* 2010 Feb;20(1):104-13.
43. Chenavas S, Guilligay D, Cusack S, Hart DJ, Ruigrok RWH, Crépin T. Avancées dans l'étude structurale et la compréhension moléculaire du mécanisme de transcription du virus de la grippe. *Virologie.* 2010;14(6):435-45.
44. Pohl MO, Lanz C, Stertz S. Late stages of the influenza A virus replication cycle—a tight interplay between virus and host. *J Gen Virol.* 2018 Sep;97(9):2058-72.
45. Al Faress S, Cartet G, Ferraris O, Norder H, Valette M, Lina B. Divergent genetic evolution of hemagglutinin in influenza A H1N1 and A H1N2 subtypes isolated in the south-France since the winter of 2001-2002. *J Clin Virol.* 2005 Jul;33(3):230-6.
46. Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quinones-Falconi F, Bautista E, Ramirez-Venegas A, Rojas-Serrano J, Ormsby CE, Corrales A, Higuera A, Mondragon E, Cordova-Villalobos JA. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med.* 2009 Aug 13;361(7):680-9.
47. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol.* 2011 Dec;1(6):519-25.
48. Villalon-Letelier F, Brooks AG, Saunders PM, Londrigan SL, Reading PC. Host Cell Restriction Factors that Limit Influenza A Infection. *Viruses.* 2017 Dec 7;9(12).
49. Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, van der Weyden L, Fikrig E, Adams DJ, Xavier RJ, Farzan M, Elledge SJ. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell.* 2009 Dec 24;139(7):1243-54.
50. Bailey CC, Huang IC, Kam C, Farzan M. Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice. *PLoS Pathog.* 2012 Sep;8(9):e1002909.
51. Fu B, Wang L, Li S, Dorf ME. ZMPSTE24 defends against influenza and other pathogenic viruses. *J Exp Med.* 2017 Apr 3;214(4):919-29.
52. Xiao H, Killip MJ, Staeheli P, Randall RE, Jackson D. The human interferon-induced MxA protein inhibits early stages of influenza A virus infection by retaining the incoming viral genome in the cytoplasm. *J Virol.* 2013 Dec;87(23):13053-8.
53. Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol.* 1992 Apr;66(4):2564-9.

54. Zimmermann P, Manz B, Haller O, Schwemmler M, Kochs G. The viral nucleoprotein determines Mx sensitivity of influenza A viruses. *J Virol*. 2011 Aug;85(16):8133-40.
55. Zhu Z, Shi Z, Yan W, Wei J, Shao D, Deng X, Wang S, Li B, Tong G, Ma Z. Nonstructural protein 1 of influenza A virus interacts with human guanylate-binding protein 1 to antagonize antiviral activity. *PLoS One*. 2013;8(2):e55920.
56. Min JY, Krug RM. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 2;103(18):7100-5.
57. Zhao C, Hsiang TY, Kuo RL, Krug RM. ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 2;107(5):2253-8.
58. Di Pietro A, Kajaste-Rudnitski A, Oteiza A, Nicora L, Towers GJ, Mechti N, Vicenzi E. TRIM22 inhibits influenza A virus infection by targeting the viral nucleoprotein for degradation. *J Virol*. 2013 Apr;87(8):4523-33.
59. Fu B, Wang L, Ding H, Schwamborn JC, Li S, Dorf ME. TRIM32 Senses and Restricts Influenza A Virus by Ubiquitination of PB1 Polymerase. *PLoS Pathog*. 2015 Jun;11(6):e1004960.
60. Fan Y, Mok CK, Chan MC, Zhang Y, Nal B, Kien F, Bruzzone R, Sanyal S. Cell Cycle-independent Role of Cyclin D3 in Host Restriction of Influenza Virus Infection. *J Biol Chem*. 2017 Mar 24;292(12):5070-88.
61. Wang X, Hinson ER, Cresswell P. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host Microbe*. 2007 Aug 16;2(2):96-105.
62. Dittmann M, Hoffmann HH, Scull MA, Gilmore RH, Bell KL, Ciancanelli M, Wilson SJ, Crotta S, Yu Y, Flatley B, Xiao JW, Casanova JL, Wack A, Bieniasz PD, Rice CM. A serpin shapes the extracellular environment to prevent influenza A virus maturation. *Cell*. 2015 Feb 12;160(4):631-43.
63. Varon E, J B. Rapport d'activité. CNR des pneumocoques. 2017.
64. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Flamm RK. Frequency and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria isolated from patients with pneumonia hospitalized in ICUs of US medical centres (2015-17). *J Antimicrob Chemother*. 2018 Jul 27.
65. ONERBA. Rapport d'activité. 2015.
66. Dong G, Peng C, Luo J, Wang C, Han L, Wu B, Ji G, He H. Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902-2013): frequency and distribution of M2 gene mutations. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119115.

67. Lackenby A, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Leang SK, Lee RTC, Lo J, Lollis L, Maurer-Stroh S, Odagiri T, Pereyaslov D, Takashita E, Wang D, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016-2017. *Antiviral Res.* 2018 Sep;157:38-46.
68. Porte R, Georgel AF, Sirard JC, Carnoy C. Les *Toll-like receptors* : des cibles thérapeutiques anti-infectieuses. *Feuillets de biologie.* 2017;335.
69. Hancock RE, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Mar 16;10(4):243-54.
70. Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front Immunol.* 2013;4:387.
71. Hedayat M, Netea MG, Rezaei N. Targeting of Toll-like receptors: a decade of progress in combating infectious diseases. *Lancet Infect Dis.* 2011 Sep;11(9):702-12.
72. Mifsud EJ, Tan AC, Jackson DC. TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. *Front Immunol.* 2014;5:79.
73. Espinosa E, Chillet P. *Immunologie*; 2010.p. 61-2.
74. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int Immunopharmacol.* 2018 Jun;59:391-412.
75. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014;5:461.
76. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):373-84.
77. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 2010 Jan 15;327(5963):291-5.
78. Bonam SR, Partidos CD, Halmuthur SKM, Muller S. An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy. *Trends Pharmacol Sci.* 2017 Sep;38(9):771-93.
79. Reed SG, Hsu FC, Carter D, Orr MT. The science of vaccine adjuvants: advances in TLR4 ligand adjuvants. *Curr Opin Immunol.* 2016 Aug;41:85-90.
80. Vacchelli E, Eggermont A, Sautes-Fridman C, Galon J, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2013 Aug 1;2(8):e25238.
81. Beatson SA, Minamino T, Pallen MJ. Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiol.* 2006 Apr;14(4):151-5.

82. Liu F, Yang J, Zhang Y, Zhou D, Chen Y, Gai W, Shi W, Li Q, Tien P, Yan H. Recombinant flagellins with partial deletions of the hypervariable domain lose antigenicity but not mucosal adjuvancy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Feb 19;392(4):582-7.
83. Eaves-Pyles TD, Wong HR, Odoms K, Pyles RB. Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *J Immunol*. 2001 Dec 15;167(12):7009-16.
84. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, Logan SM, Aderem A. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 28;102(26):9247-52.
85. Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol*. 2004 Nov;12(11):509-17.
86. Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, Guo Z, Kumagai Y, Yamamoto M, Kato H, Sougawa N, Matsui H, Kuwata H, Hemmi H, Coban C, Kawai T, Ishii KJ, Takeuchi O, Miyasaka M, Takeda K, Akira S. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol*. 2006 Aug;7(8):868-74.
87. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*. 2001 Aug 15;167(4):1882-5.
88. Sierro F, Dubois B, Coste A, Kaiserlian D, Kraehenbuhl JP, Sirard JC. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13722-7.
89. Yoon SI, Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL, Wilson IA. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science*. 2012 Feb 17;335(6070):859-64.
90. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Songhet P, Dumoutier L, Ferrero I, Janot L, Erard F, Bertout J, Leger H, Sebbane F, Benecke A, Renauld JC, Hardt WD, Ryffel B, Sirard JC. TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *J Immunol*. 2010 Jul 15;185(2):1177-85.
91. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, Liu L, Shao F. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature*. 2011 Sep 29;477(7366):596-600.
92. Lightfield KL, Persson J, Trinidad NJ, Brubaker SW, Kofoed EM, Sauer JD, Dunipace EA, Warren SE, Miao EA, Vance RE. Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. *Infect Immun*. 2011 Apr;79(4):1606-14.

93. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, Frias A, Sloane VM, Xu J, Neish AS, Rojas M, Gewirtz AT. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol.* 2008 Jun 15;180(12):8280-5.
94. Yu FS, Cornicelli MD, Kovach MA, Newstead MW, Zeng X, Kumar A, Gao N, Yoon SG, Gallo RL, Standiford TJ. Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide. *J Immunol.* 2010 Jul 15;185(2):1142-9.
95. Kumar A, Gao N, Standiford TJ, Gallo RL, Yu FS. Topical flagellin protects the injured corneas from *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect.* 2010 Nov;12(12-13):978-89.
96. Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J Infect Dis.* 2010 Feb 15;201(4):534-43.
97. Munoz N, Van Maele L, Marques JM, Rial A, Sirard JC, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun.* 2010 Oct;78(10):4226-33.
98. Jarchum I, Liu M, Lipuma L, Pamer EG. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infect Immun.* 2011 Apr;79(4):1498-503.
99. Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, Denning TL, Crawford SE, Pruijssers AJ, Iskarpatyoti JA, Estes MK, Dermody TS, Ouyang W, Williams IR, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT. Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science.* 2014 Nov 14;346(6211):861-5.
100. Hossain MS, Ramachandiran S, Gewirtz AT, Waller EK. Recombinant TLR5 agonist CBLB502 promotes NK cell-mediated anti-CMV immunity in mice. *PLoS One.* 2014;9(5):e96165.
101. Gao N, Kumar A, Guo H, Wu X, Wheeler M, Yu FS. Topical flagellin-mediated innate defense against *Candida albicans* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 May 10;52(6):3074-82.
102. Wu CC, Hayashi T, Takabayashi K, Sabet M, Smee DF, Guiney DD, Cottam HB, Carson DA. Immunotherapeutic activity of a conjugate of a Toll-like receptor 7 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 6;104(10):3990-5.
103. Hammerbeck DM, Burleson GR, Schuller CJ, Vasilakos JP, Tomai M, Egging E, Cochran FR, Woulfe S, Miller RL. Administration of a dual toll-like receptor 7 and toll-like receptor 8 agonist protects against influenza in rats. *Antiviral Res.* 2007 Jan;73(1):1-11.

104. Lau YF, Tang LH, Ooi EE, Subbarao K. Activation of the innate immune system provides broad-spectrum protection against influenza A viruses with pandemic potential in mice. *Virology*. 2010 Oct 10;406(1):80-7.
105. Zhao J, Wohlford-Lenane C, Zhao J, Fleming E, Lane TE, McCray PB, Jr., Perlman S. Intranasal treatment with poly(I*³C) protects aged mice from lethal respiratory virus infections. *J Virol*. 2012 Nov;86(21):11416-24.
106. Tan AC, Mifsud EJ, Zeng W, Edenborough K, McVernon J, Brown LE, Jackson DC. Intranasal administration of the TLR2 agonist Pam2Cys provides rapid protection against influenza in mice. *Mol Pharm*. 2012 Sep 4;9(9):2710-8.
107. Mifsud EJ, Tan AC, Brown LE, Chua BY, Jackson DC. Generation of Adaptive Immune Responses Following Influenza Virus Challenge is Not Compromised by Pre-Treatment with the TLR-2 Agonist Pam2Cys. *Front Immunol*. 2015;6:290.
108. Mifsud EJ, Tan AC, Reading PC, Jackson DC. Mapping the pulmonary environment of animals protected from virulent H1N1 influenza infection using the TLR-2 agonist Pam(2)Cys. *Immunol Cell Biol*. 2016 Feb;94(2):169-76.
109. Tuvim MJ, Gilbert BE, Dickey BF, Evans SE. Synergistic TLR2/6 and TLR9 activation protects mice against lethal influenza pneumonia. *PLoS One*. 2012;7(1):e30596.
110. Norton EB, Clements JD, Voss TG, Cardenas-Freytag L. Prophylactic administration of bacterially derived immunomodulators improves the outcome of influenza virus infection in a murine model. *J Virol*. 2010 Mar;84(6):2983-95.
111. Wong JP, Christopher ME, Viswanathan S, Karpoff N, Dai X, Das D, Sun LQ, Wang M, Salazar AM. Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection. *Vaccine*. 2009 May 26;27(25-26):3481-3.
112. Jiang T, Zhao H, Li XF, Deng YQ, Liu J, Xu LJ, Han JF, Cao RY, Qin ED, Qin CF. CpG oligodeoxynucleotides protect against the 2009 H1N1 pandemic influenza virus infection in a murine model. *Antiviral Res*. 2011 Jan;89(1):124-6.
113. Barjesteh N, Shojadoost B, Brisbin JT, Emam M, Hodgins DC, Nagy E, Sharif S. Reduction of avian influenza virus shedding by administration of Toll-like receptor ligands to chickens. *Vaccine*. 2015 Sep 11;33(38):4843-9.
114. St Paul M, Mallick AI, Read LR, Villanueva AI, Parvizi P, Abdul-Careem MF, Nagy E, Sharif S. Prophylactic treatment with Toll-like receptor ligands enhances host immunity to avian influenza virus in chickens. *Vaccine*. 2012 Jun 22;30(30):4524-31.

115. Petiot E, Proust A, Traversier A, Durous L, Dappozze F, Gras M, Guillard C, Balloul JM, Rosa-Calatrava M. Influenza viruses production: Evaluation of a novel avian cell line DuckCelt(R)-T17. *Vaccine*. 2018 May 29.
116. Meyer L, Leymarie O, Chevalier C, Esnault E, Moroldo M, Da Costa B, Georgeault S, Roingard P, Delmas B, Quere P, Le Goffic R. Transcriptomic profiling of a chicken lung epithelial cell line (CLEC213) reveals a mitochondrial respiratory chain activity boost during influenza virus infection. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176355.
117. Terrier O, Carron C, De Chassey B, Dubois J, Traversier A, Julien T, Cartet G, Proust A, Hacot S, Ressenkoff D, Lotteau V, Lina B, Diaz JJ, Moules V, Rosa-Calatrava M. Nucleolin interacts with influenza A nucleoprotein and contributes to viral ribonucleoprotein complexes nuclear trafficking and efficient influenza viral replication. *Sci Rep*. 2016 Jul 4;6:29006.
118. Fougeron D, Van Maele L, Songhet P, Cayet D, Hot D, Van Rooijen N, Mollenkopf HJ, Hardt WD, Benecke AG, Sirard JC. Indirect Toll-like receptor 5-mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract. *Vaccine*. 2015 Jun 26;33(29):3331-41.
119. Rumbo M, Carnoy C, Sirard JC. Flagellins as adjuvants of vaccines. *Immunopotentiators in Modern Vaccines*, second edition, Virgil E.J.C. SCHIJNS and Derek T. O'HAGAN, Academic Press; 2017.129-47
120. Hajam IA, Dar PA, Shahnawaz I, Jaume JC, Lee JH. Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med*. 2017 Sep 1;49(9):e373.
121. Leyva-Grado VH, Palese P. Aerosol administration increases the efficacy of oseltamivir for the treatment of mice infected with influenza viruses. *Antiviral Res*. 2017 Jun;142:12-5.
122. Micera A, Balzamino BO, Di Zazzo A, Biamonte F, Sica G, Bonini S. Toll-Like Receptors and Tissue Remodeling: The Pro/Cons Recent Findings. *J Cell Physiol*. 2016 Mar;231(3):531-44.
123. Shaykhiev R, Behr J, Bals R. Microbial patterns signaling via Toll-like receptors 2 and 5 contribute to epithelial repair, growth and survival. *PLoS One*. 2008 Jan 2;3(1):e1393.
124. Porte R, Fougeron D, Munoz-Wolf N, Tabareau J, Georgel AF, Wallet F, Paget C, Trottein F, Chabalgoity JA, Carnoy C, Sirard JC. A Toll-Like Receptor 5 Agonist Improves the Efficacy of Antibiotics in Treatment of Primary and Influenza Virus-Associated Pneumococcal Mouse Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Oct;59(10):6064-72.

125. Tussey L, Strout C, Davis M, Johnson C, Lucksinger G, Umlauf S, Song L, Liu G, Abraham K, White CJ. Phase 1 Safety and Immunogenicity Study of a Quadrivalent Seasonal Flu Vaccine Comprising Recombinant Hemagglutinin-Flagellin Fusion Proteins. *Open Forum Infect Dis.* 2016 Jan;3(1):ofw015.
126. Taylor DN, Treanor JJ, Sheldon EA, Johnson C, Umlauf S, Song L, Kavita U, Liu G, Tussey L, Ozer K, Hofstaetter T, Shaw A. Development of VAX128, a recombinant hemagglutinin (HA) influenza-flagellin fusion vaccine with improved safety and immune response. *Vaccine.* 2012 Aug 24;30(39):5761-9.
127. Duffy D, Rouilly V, Libri V, Hasan M, Beitz B, David M, Urrutia A, Bisiaux A, Labrie ST, Dubois A, Boneca IG, Delval C, Thomas S, Rogge L, Schmolz M, Quintana-Murci L, Albert ML. Functional analysis via standardized whole-blood stimulation systems defines the boundaries of a healthy immune response to complex stimuli. *Immunity.* 2014 Mar 20;40(3):436-50.
128. Thomas S, Rouilly V, Patin E, Alanio C, Dubois A, Delval C, Marquier LG, Fauchoux N, Sayegrih S, Vray M, Duffy D, Quintana-Murci L, Albert ML. The Milieu Interieur study - an integrative approach for study of human immunological variance. *Clin Immunol.* 2015 Apr;157(2):277-93.
129. Bowdish DME. The Aging Lung: Is lung health good health for older adults? *Chest.* 2018 Sep 22.
130. Ma YU, Zhang LI, Li Q. Expression levels of cytokines and chemokines increase in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by activation of the Toll-like receptor 5 pathway. *Exp Ther Med.* 2016 Feb;11(2):588-92.
131. Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard JC. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol.* 2008 Aug 1;181(3):2036-43.
132. Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebien M, Lawrence T, van Rijt LS, Lambrecht BN, Sirard JC, Hussell T. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med.* 2008 Feb 18;205(2):323-9.
133. Van Maele L, Fougeron D, Janot L, Didierlaurent A, Cayet D, Tabareau J, Rumbo M, Corvo-Chamaillard S, Boulenouar S, Jeffs S, Vande Walle L, Lamkanfi M, Lemoine Y, Erard F, Hot D, Hussell T, Ryffel B, Benecke AG, Sirard JC. Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. *Mucosal Immunol.* 2014 May;7(3):489-500.

134. Lee WI, Yao TC, Yeh KW, Chen LC, Ou LS, Huang JL. Stronger Toll-like receptor 1/2, 4, and 7/8 but less 9 responses in peripheral blood mononuclear cells in non-infectious exacerbated asthmatic children. *Immunobiology*. 2013 Feb;218(2):192-200.
135. Jyonouchi H, Geng L, Cushing-Ruby A, Monteiro IM. Aberrant responses to TLR agonists in pediatric IBD patients; the possible association with increased production of Th1/Th17 cytokines in response to candida, a luminal antigen. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010 Jun;21(4 Pt 2):e747-55.
136. Urrutia A, Duffy D, Rouilly V, Posseme C, Djebali R, Illanes G, Libri V, Albaud B, Gentien D, Piasecka B, Hasan M, Fontes M, Quintana-Murci L, Albert ML. Standardized Whole-Blood Transcriptional Profiling Enables the Deconvolution of Complex Induced Immune Responses. *Cell Rep*. 2016 Sep 6;16(10):2777-91.
137. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol*. 2016 Jan;17(1):21-9.
138. Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:447-91.
139. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, Beutler B, Schroeder L, Nachman A, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*. 2003 Nov 17;198(10):1563-72.
140. Picard C, Casanova JL, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkappaBalpha deficiency. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jul;24(3):490-7.
141. Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol*. 2012 May 18;13(6):535-42.
142. Hawn TR, Scholes D, Li SS, Wang H, Yang Y, Roberts PL, Stapleton AE, Janer M, Aderem A, Stamm WE, Zhao LP, Hooton TM. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women. *PLoS One*. 2009 Jun 22;4(6):e5990.

ANNEXES

Annexe n°1 : Cahier d'observation de l'étude clinique ASTRAL.....	110
Annexe n°2 : Publications et Communications en lien avec le sujet.....	116

Annexe n°1 : Cahier d'observation de l'étude clinique ASTRAL

Protocole ASTRAL

n° Protocole : RT-12

n° IDRCB : 2017-A00450-53

« Analyse de la réponse immunitaire innée des cellules sanguines chez des patients atteints de pneumonie franche lobaire aiguë »

Cahier d'observation

Numéro du patient : |_|_|_|

(N° inclusion)

Nom de l'investigateur : _____

Promoteur : Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille, 115 rue du Grand But, BP
249, 59462 Lomme Cedex

Investigateur Coordonnateur : Pr. Anne Decoster
Chef du laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Saint Philibert, GHICL, Rue du Grand But, 59000
Lille

Email : decoster.anne@ghicl.net

FAX D'INCLUSION			
Protocole	ASTRAL	N° protocole :	RT-12
		Investigateur :	

Identification du patient : |_|_|_|_|
N°Pat

Date de la visite : |_|_|_| / |_|_|_| / |_|_|_|_|_|_|
JJ MM AAAA

Date de signature du consentement : |_|_|_| / |_|_|_| / |_|_|_|_|_|_|
JJ MM AAAA

Critères d'inclusion		
Patients de plus de 18 ans	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Patient hospitalisés dans le service de pneumologie pour lesquels les critères cliniques, radiologiques et biologiques permettent de qualifier une pneumonie franche lobaire aiguë (PFLA).	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Patient couvert par l'assurance maladie française.	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Acceptant de participer à l'étude	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non

Critères de non inclusion		
Patient sous tutelle ou curatelle	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
atteints d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), ou d'un sepsis (sévère)	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
avec statut connu ou suspicion d'infection par le VIH, VHC, ou <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
transplantés sous immunosuppressions	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
Femme enceinte	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non

Veillez retourner ce formulaire par FAX au Département de Recherche Médicale du GHICL au : 03 20 22 57 67

Ou par mail : vitagliano.jean-jacques@ghicl.net

Investigateur : _____

Date : |_|_|/|_|_|/|_|_|_|_|

Signature :

Données Médicales

Sexe : Masculin Féminin

Age : | _ | _ |

Poids : | _ | _ | _ | kg

Taille : | _ | _ | _ | cm

Statut vaccinal :

Vaccin pneumocoque oui non

Si oui date de dernière vaccination : | _ | _ | / | _ | _ | _ | _ |

Type de vaccin : Prevenar 13 Pneumo 23

Vaccination antigrippale oui non

Si oui date de dernière vaccination : | _ | _ | / | _ | _ | _ | _ |

✓ Conduite addictive :

Tabagisme oui non

Si oui,

Actif consommation en paquet/année : | _ | _ | _ |

Sevré depuis quand (*mois et année*) : | _ | _ | / | _ | _ | _ | _ |

Consommation en paquet/année : | _ | _ | _ |

Cannabis oui non

Si oui,

Consommation : | _ | _ | jour semaine

Depuis quand : | _ | _ | années

Antécédents médicaux respiratoires

Date du dernier évènement

<input type="checkbox"/> PFLA	_ _ / _ _ _ _
<input type="checkbox"/> Autre pneumonie	_ _ / _ _ _ _
<input type="checkbox"/> Bronchite chronique	_ _ / _ _ _ _
<input type="checkbox"/> Asthme	_ _ / _ _ _ _
<input type="checkbox"/> BPCO	_ _ / _ _ _ _
<input type="checkbox"/> Cancer du poumon	_ _ / _ _ _ _
<input type="checkbox"/> Autre :	_ _ / _ _ _ _

Données cliniques :

Signes généraux : Asthénie Hyperthermie

Signes Fonctionnels : Toux Expectoration purulente

Dyspnée

Présence d'un Foyer Auscultatoire : Oui Non

Données radiologiques :

Condensation systématisée : Oui Non

Numération formule sanguine

Hématies |_|_|, |_|_| $10^{12}/L$
Leucocytes |_|_|, |_|_| $10^9/L$
Hémoglobine |_|_|, |_|_| g/dL
Hématocrite |_|_| %
VGM |_|_|_|, |_|_| fL
TCMH |_|_|, |_|_| pg
CCMH |_|_|, |_|_| g/dL
Plaquettes |_|_|_| $10^9/L$
Neutrophiles |_|_|, |_|_| $10^9/L$
Eosinophiles |_|_|, |_|_| $10^9/L$
Basophiles |_|_|, |_|_| $10^9/L$
Lymphocytes |_|_|, |_|_| $10^9/L$
Monocytes |_|_|, |_|_| $10^9/L$

CRP |_|_|_|_| mg/L

Prélèvement respiratoire

Type de prélèvement :

Détection *Streptococcus pneumoniae* oui non
Si oui, charge bactérienne : |_|_| 10^4 10^5 10^6 10^7
Ou $>10^7$

Autre pathogène :

Charge bactérienne : |_|_| 10^4 10^5 10^6 10^7
Ou $>10^7$

Flore commensale : oui non
Si oui bactérie la plus représentée

Charge bactérienne : |_|_| 10^4 10^5 10^6 10^7
Ou $>10^7$

Autres prélèvements

Antigénurie pneumocoque : positif négatif

Hémoculture : positif pour *S. pneumoniae* négatif pour *S. pneumoniae*
Autre germe en cas d'hémoculture positive:

✓ **Traitements en cours au moment du prélèvement :**

Antibiotique oui non

Si oui le(s)quel(s) :

β -lactamine

Macrolide

Quinolone

Autre

Date d'initiation du traitement : |_|_|/|_|_|/|_|_|_|_|

Heure d'initiation du traitement : |_|_| : |_|_|

Durée du traitement : |_|_| jours

Immunosuppresseur / anti-inflammatoire oui non

Si oui quelle classe des Immunosuppresseur / anti-inflammatoire ?

Anti-inflammatoire stéroïdien

Anti-inflammatoire non stéroïdien

Inhibiteur de cytokines

Alkylant (cyclophosphamide, busulfan...)

Antimétabolites (azathioprine)

Date d'initiation du traitement : |_|_|/|_|_|/|_|_|_|_|

Durée du traitement : |_|_| jours

au long cours

Pathologies associées (choix multiple) :

Diabète oui non

Hypercholestérolémie oui non

Pathologie neurologique oui non

Pathologie hépatique / gastro oui non

Pathologie rénale oui non

Pathologie cardiologique oui non

Cancer oui non

Maladie autoimmune oui non

Prélèvement

Sang V1 :

Date du prélèvement: |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Prélèvement technique (ARN) congelé à -80°C le : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Prélèvement technique (ELISA) congelé à -80°C le : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Plaquette cellules congelée à -80°C le : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Prélèvement Respiratoire V1 :

Oui Non

Date : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Type de prélèvement :

.....
Prélèvement congelé à -80°C le : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Sang V2:

Date du prélèvement : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Prélèvement technique (ARN) congelé à -80°C le : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Prélèvement technique (ELISA) congelé à -80°C le : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Numération formule sanguine V2

Hématies |_|_| , |_|_| $10^{12}/L$

Leucocytes |_|_| , |_|_| $10^9/L$

Hémoglobine |_|_| , |_|_| g/dL

Hématocrite |_|_| %

VGM |_|_|_| , |_|_| fL

TCMH |_|_| , |_|_| pg

CCMH |_|_| , |_|_| g/dL

Plaquettes |_|_|_| $10^9/L$

Neutrophiles |_|_| , |_|_| $10^9/L$

Eosinophiles |_|_| , |_|_| $10^9/L$

Basophiles |_|_| , |_|_| $10^9/L$

Lymphocytes |_|_| , |_|_| $10^9/L$

Monocytes |_|_| , |_|_| $10^9/L$

Annexe n°2 : Publications et Communications en relation avec le sujet

Publications

Porte R, Fougeron D, Munoz-Wolf N, Tabareau J, **Georgel AF**, Wallet F, Paget C, Trottein F, Chabalgoity JA, Carnoy C, Sirard JC.

A Toll-Like Receptor 5 Agonist Improves the Efficacy of Antibiotics in Treatment of Primary and Influenza Virus-Associated Pneumococcal Mouse Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(10):6064-72.

Porte R., Matarazzo L., **Georgel AF**, Sirard JC. Carnoy C.

Les Toll-like receptors : des cibles thérapeutiques anti-infectieuses. Feuillet de Biologie, 2017, 335, 19-27.

Communications

Porte R*, Fougeron D., Munoz N., Tabareau J., **Georgel A-F.**, Wallet F., Chabalgoity J. A., Sirard J-C. and Carnoy C.

Toll-like receptor 5 agonist improves antibiotic treatments of pneumococcal infections. **International Congress of Mucosal Immunology**, Berlin, Germany, 14-18 Juillet 2015.

Porte R*, Fougeron D., Munoz N., Tabareau J., **Georgel A-F.**, Wallet F., Paget C., Trottein F. Chabalgoity J. A., Carnoy C and Sirard J-C.

A toll-like receptor 5 agonist improves the efficacy of antibiotic in the treatments of pneumococcal infections.

Gordon Research Conference “Biology of Acute Respiratory Infection”, Galveston, Texas, 21-26 Février 2016.

Georgel A-F, Cayet D., Ayari A., Paget C., Trottein F., Sirard J.C., Carnoy C.

Antiviral properties of the Toll-like receptor 5 (TLR5) agonist in respiratory infections.

16^{ème} Journée André Verbert, colloque annuel des Doctorants, Lille, 7 septembre 2016.