



HAL
open science

Isolement et caractérisation de nouvelles espèces de Torque Teno Mini Virus (TTMV) : implication potentielle dans la pathogenèse de la pneumonie

Johanna Galmès

► **To cite this version:**

Johanna Galmès. Isolement et caractérisation de nouvelles espèces de Torque Teno Mini Virus (TTMV) : implication potentielle dans la pathogenèse de la pneumonie. Biologie cellulaire. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2013. Français. NNT : 2013ENSL0809 . tel-00923721

HAL Id: tel-00923721

<https://theses.hal.science/tel-00923721>

Submitted on 4 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

2 0 1 3 E N S L 0 8 0 9

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon

Discipline : Sciences de la vie

Préparée au Laboratoire des Pathogènes Émergents de la Fondation Mérieux

École doctorale : Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le 03 Avril 2013

par **Johanna GALMÈS**

**Isolement et caractérisation de nouvelles espèces de Torque
Teno Mini Virus (TTMV) : implication potentielle dans la
pathogénèse de la pneumonie**

Thèse dirigée par : Gláucia PARANHOS-BACCALÀ

Co-encadrée par : Jean-Noël TELLES

Après l'avis de : Henri AGUT
Philippe BIAGINI

Devant la commission d'examen formée de :

Pr. Renaud MAHIEUX	Président du Jury
Pr. Henri AGUT	Rapporteur
Dr Philippe BIAGINI	Rapporteur
Pr. Etienne JAVOUHEY	Examineur
Dr Anna SALVETTI	Examineur
Dr Gláucia PARANHOS-BACCALÀ	Directeur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury, les rapporteurs Mr Henri Agut (Professeur dans le service de virologie du groupement hospitalier Pitié-Salpêtrière à Paris), et Mr Philippe Biagini (Directeur de Recherche à l'EFS Alpes-Méditerranée), les examinateurs Mr Etienne Javouhey (Chef de service Urgences et Réanimation Pédiatrique à l'Hôpital Femme Mère Enfant à Lyon), Mme Anna Salvetti (Directrice de Recherche au Centre International de Recherche en Infectiologie, CIRI, à Lyon), et le Président du Jury Mr Renaud Mahieux (Professeur au CIRI à Lyon), pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail. Je vous prie de trouver dans ces quelques lignes, l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de la Direction Scientifique de la Fondation Mérieux (FMx), et financé par celle-ci. Je souhaite ici exprimer toute ma gratitude à la famille Mérieux, et plus particulièrement, à Mr Alain Mérieux (Président), et Mr Benoît Miribel (Directeur Général), pour leur soutien aux activités de recherche visant à lutter contre les maladies infectieuses. Je remercie tout le personnel de la FMx, tant au Siège qu'aux Pensières, ou expatriés à travers le monde, pour les bons moments échangés lors des SEMEQ. J'ai une pensée particulière pour Amal (bonne chance à toi pour la suite, et merci pour ton sourire), pour Francine (le contrôle de gestion semble un peu moins obscur depuis ton arrivée, ta patience y est pour beaucoup), et pour Annie (merci de ne pas m'avoir oubliée mois après mois).

Je souhaite également remercier Guy Vernet, Directeur scientifique de la FMx pendant la durée de ma thèse, qui a accepté de me faire confiance pour réaliser une thèse dans son département. Guy, j'espère que ce nouveau départ au Centre Pasteur du Cameroun sera enrichissant et épanouissant, tant sur le plan professionnel que personnel.

Je souhaite particulièrement remercier Gláucia Paranhos-Baccalà, Directrice des Recherches de la FMx pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, le Laboratoire des Pathogènes Émergents (LPE), lors de mon master Pro il y a quelques années, et avoir ensuite cru en moi pour réaliser cette thèse un peu challenge sur les Anello. Gláucia, merci à toi pour ta confiance et la grande liberté que tu m'as donnée durant ces 3 belles années, pour ta passion pour la Recherche, qui tu le sais m'a toujours impressionnée et motivée au jour le jour, pour ton enthousiasme sans faille dans ce projet et pour ton soutien. Tu es une personne formidable et j'ai eu de la chance d'avoir une encadrante comme toi.

J'ai également une pensée pour Jean-Noël Telles, qui a co-encadré ce travail, relu avec attention ce manuscrit, et apporté son expérience technique, particulièrement au début de ce projet, pour la mise au point des outils moléculaires de détection du TTMV. Merci d'avoir toléré mes nombreux retards de rendu des rapports d'activité et d'avoir contribué à améliorer mon anglais : je ne prononcerai plus jamais « The Town » de la même manière !

Ce travail n'aurait pas eu la même consistance, ni la même saveur, sans le soutien, l'aide, la bonne humeur, l'enthousiasme et les nombreux conseils de toute l'équipe du LPE :

Flo-Flo monte sur la table... Merci pour tous les bons moments passés ensemble, pour les meetings GABRIEL, scientifiquement et "ludiquement" intéressants, et pour tes conseils pertinents sur ce projet.

Louis. « Et ben Louis, ouvre les yeux » ! Merci pour nos différents échanges, toujours sympathiques. Que tes envies d'Afrique se concrétisent et t'apportent bonheur et sérénité.

Yann, « the desperate globe-trotter » ! Merci pour ta bonne humeur et ton humour communicatifs.

Valentina, la belle amazone. Merci à toi pour ton enthousiasme débordant et ton sourire rayonnant, qui n'ont pas manqué de me motiver lors de tes visites parmi nous.

Yoyo, merci de ta gentillesse, de ta disponibilité et de ta réactivité (les commandes n'ont jamais été aussi rapides !).

Jean-Luc, bénis soient tes saucissons, tes légumes du jardin et ta cave... Ton professionnalisme apporte beaucoup à l'équipe (oui oui, toutes les couleurs sont importantes mais les bleus, ça aide pour faire tenir une réunion en 1h !), et l'environnement te remercie grandement de m'avoir rappelé 2-3 notions fondamentales de chimie !

Marie, mon soutien du grand-Est... J'aime ta façon d'être et ton amour des choses simples. Merci pour ton soutien et tes encouragements réguliers. Bonne chance pour tes débuts en enseignement, je n'ai nul doute que tu excelleras en la matière.

Marie-Madeleine, l'ange protecteur du LPE, qui n'est même pas du LPE d'ailleurs ! Merci de ta douceur apaisante.

Anne-Cécile, la force zen... Merci pour ta gentillesse et tes encouragements réguliers.

Alain, le malgache du labo, tat tat ta da ! Ce projet te doit beaucoup. Merci de m'avoir formée aux techniques de "*pathogen discovery*", de m'avoir apporté ton aide pour les manips de PCR et de clonage, et d'avoir séquencé le 1^{er} génome des TTMV-LY.

Léticia, la chercheuse qui trouve, du moins je te le souhaite profondément ! Récemment arrivée mais déjà tellement indispensable. Ta douceur, ta bonté et ton soutien ont égayé et ensoleillé mes journées. Tu es un bel exemple d'investissement et de persévérance. Je te souhaite beaucoup de projets financés et un bel avenir.

Milen, ou l'incarnation de la tolérance... « T'écoutes quoi ? C'est nul. Tu lis quoi ? C'est nul. Tu joues encore à des jeux de société/vidéos ! C'est pour les enfants. » J'adore ! Je te charrie mais te remercie sincèrement pour ta franchise, ta gentillesse, la qualité de ton raisonnement scientifique, et, bien évidemment, encore plus pour ton aide pour les manips de BIO MOL de fin de thèse...

Petite Marie, la nouvelle Raquel même si tu es bien plus que ça désormais ! Championne du monde des galères, ton sourire et ta bonne humeur à toute épreuve sont incroyablement dynamisants... Ces quelques mois à tes côtés ont été très sympathiques. Je te souhaite beaucoup de réussite pour ta thèse, ce sur quoi je n'ai aucun doute.

Stef. Si j'en suis là, c'est un peu grâce à toi. Tu m'as encadré/supporté durant mon stage de master et transmis tes savoir-faire. Merci pour ça et pour tout le reste : tes conseils, nos fou-rires, tes jours avec et tes jours sans, mes jours avec et mes jours sans, et bien sûr ton interprétation mémorable de « Pas de Boogie Woogie ». Tu seras un papa formidable.

Jhoff, le *serial lover* de la Tour ! Comment te remercier assez pour cette année de co-thésards ? Les moments de galère, de joie, de doute, créent des liens particuliers. Merci pour ton aide, nos

échanges scientifiques et techniques, ta bonne humeur, ta tête décalquée du lundi... du mardi, du mercredi, du jeudi et du vendredi aussi en fait ! Moi qui ne suis pas une grande passionnée en général, j'aime à te voir t'enthousiasmer et t'investir à fond pour tout. Courage pour la suite, reste-toi et ça marchera.

Mélina... Je n'aurai pas assez de mots pour te remercier de ton soutien infaillible durant ces 3 années. De caractères bien différents, je crois qu'on a su trouver un équilibre très enrichissant pour nous 2, donc merci pour tous les bons moments passés ensemble au labo et en dehors, pour ton investissement dans la vie du labo qui nous simplifie la vie à tous, pour tes conseils avisés, et surtout pour ton amitié. Tu restes la gardienne du temple, prends soin de toi.

Sandra, notre pâtissière hors norme. Ton passage dans l'équipe a été une période formidable pour nous tous, et a donné lieu à une belle rencontre pour moi. Je te remercie profondément pour ton aide précieuse sur toutes les parties culture, cytométrie et immuno de ce projet. Ton amitié, ta gentillesse, ton dynamisme et ton humour ont été un moteur pendant ces années de thèse. Je te souhaite tout le bonheur du monde, les Clermontois ont de la chance de t'avoir.

Raquel, ma franco-anglo-hispano-italo-lusophone préférée ! Les années thèse avec toi ont été passionnantes, drôles, stimulantes, ... Merci pour ton ouverture d'esprit et ta capacité à ouvrir le mien, pour mon initiation à la culture cell, au FACS, aux mécanismes de l'apoptose et de l'autophagie, pour ton naturel joyeux, pour ta sensibilité et bien sur pour nous avoir fait découvrir ton Portugal natal avec passion ! Que j'aime partager avec toi tes voyages et ta vision du monde... Que ta route soit remplie d'aussi belles rencontres que la tienne l'a été pour moi.

Elodie, la p'tiote. Merci de ton innocence et de ta joie de vivre, c'est toujours un plaisir de passer du temps avec toi.

Louise, j'ai marché sur tes traces dans la caractérisation de nouveaux pathogènes. Merci pour ta sincérité et ton écoute durant les 1^{ers} mois de cette thèse. Tu as été un bel exemple et j'ai été fière de suivre ta voie.

Audrey, laisse-moi t'exprimer toute ma gratitude pour m'avoir conduit sur le chemin de la thèse et m'avoir permis, en convaincant Gláucia, de m'y aventurer. Ta confiance et ton amitié m'ont été d'un grand soutien. J'espère que tu trouveras rapidement l'équilibre que tu souhaites. Merci aussi à toi Armand, pour les bons moments de détente passés ensemble.

J'aimerais maintenant remercier chaleureusement toutes les personnes qui gravitent autour de moi au jour le jour, et dont les sourires et l'enthousiasme rendent les journées plus agréables : Christophe, Olivier, et Sébastien du CRSSA, Stéphane et l'équipe P4, Thibault et Sébastien du FACS, le personnel de la laverie, ainsi que les étudiants/contractuels passés et futurs : Anna, Marie-Charlotte, Célia, Gaëlle, Ilhame, Amandine et Charlotte. Merci à Thomas pour sa participation à ce projet et pour m'avoir appris que le management, ça s'apprend.

Merci à mes anciens collègues du PBES pour leurs encouragements, notamment Julie et Nadine, et à Denise de m'avoir fait confiance dans mes fonctions et m'avoir permis de concevoir et d'animer le TD de génétique.

Merci enfin à toutes les personnes qui ont collaboré à la réussite de ce projet : Steven Li et l'équipe du CICML, Dr C. Legras-Lachuer et l'équipe de ProfileXpert, Dr I. Chemin, et Pr M. Eloit.

Et parce que tout ne se limite pas au laboratoire...

Charlotte & Nadhim, vraiment merci pour tout ! Pour le partage de la vie de thésarde, pour toutes les soirées/WE/semaines de jeux, pour le naturel que l'on a d'être ensemble... Vous avez embelli notre vie lyonnaise...

Je ne pourrais continuer sans citer Tom & Djen, Ben, Bébert, Perrine, Laura et toute la bande de la fac. Merci à tous pour votre amitié précieuse et pour tous les merveilleux moments passés ensemble. Mes années étudiantes ont été formidables et m'ont porté jusqu'ici, parce que vous étiez à mes côtés.

Amaury & Pauline, je ne sais pas quels mots définissent au mieux notre amitié... En tout cas, merci d'être là, vous participez grandement à notre équilibre.

Merci à mes amis et amies de toujours et pour toujours, Julie, Lilou, Thilde, Pika, Delf, Aurore, Didine, Alex, Finette. Votre amitié m'est extrêmement précieuse, elle m'a sans conteste portée pendant ces 3 ans.

Un énorme merci également à mes parents et à mes 2 frères, qui m'ont toujours soutenue, encouragée, aidée, supportée, bref, merci d'avoir toujours été là pour moi... Merci aussi à toi, Aude, pour ta gentillesse et pour rendre mon frère heureux. Merci au reste de ma grande famille que j'adore pour leur soutien indéfectible. Merci à ma belle-famille pour m'avoir accueillie parmi eux, et de me permettre de me sentir chez eux comme chez moi.

Je terminerai par les remerciements les plus importants. Ils sont pour toi mon Chéri. Merci du fond du cœur d'avoir décidé, il y a 10 ans, de mettre ta main dans la mienne. Merci d'avoir toujours cru en moi, d'avoir partagé et raisonné mes doutes. Merci aussi pour ton attention et tes attentions, notamment les coquillettes/jambon du lundi, du mardi, du mercredi... et tous ces petits instants de notre vie à deux qui font mon bonheur. Merci enfin de vouloir partager avec moi le reste de ta vie.

TABLE DES MATIERES

PARTIE A INTRODUCTION

1	LA PNEUMONIE, UNE INFLAMMATION AIGÛE DES POUMONS _____	PAGE 23 _____
	1.1- LES POUMONS ET LES VOIES RESPIRATOIRES	24
	1.1.1- Anatomie de l'appareil respiratoire	25
	1.1.2- Histologie de l'appareil respiratoire	27
	1.1.3- Physiologie de l'appareil respiratoire	31
	1.1.4- Les défenses antimicrobiennes de l'appareil respiratoire	33
	1.2- L'INFLAMMATION, UNE REACTION DE DEFENSE DU SYSTEME IMMUNITAIRE	41
	1.2.1- L'immunité innée.....	41
	1.2.2- L'immunité adaptative	46
	1.2.3- L'inflammation	51
2	LA PNEUMONIE, UN FLEAU OUBLIE _____	PAGE 61 _____
	2.1- LES PATHOGENES RESPIRATOIRES	64
	2.1.1- Les bactéries.....	64
	2.1.2- Les virus.....	68
	2.1.3- Les pathogènes émergents.....	71
	2.2- LE DIAGNOSTIC DE LA PNEUMONIE.....	75
	2.2.1- Le diagnostic clinique	75
	2.2.2- Le diagnostic étiologique	77
3	LES ANELLOVIRIDAE _____	PAGE 87 _____
	3.1- LA FAMILLE DES ANELLOVIRIDAE	88
	3.1.1- Le virion.....	88
	3.1.2- Positionnement taxonomique	89
	3.1.3- Phylogénie.....	90
	3.2- CARACTERISTIQUES DES ANELLOVIRIDAE	91
	3.2.1- Organisation génomique	91
	3.2.2- Transcription	93
	3.2.3- Les protéines virales.....	93
	3.2.4- Réplication des <i>Anelloviridae</i>	95
	3.2.5- Variabilité génétique	97
	3.3- ÉPIDEMIOLOGIE DES ANELLOVIRIDAE	98
	3.3.1- Les méthodes de détection	98
	3.3.2- Prévalences	99
	3.3.3- Modes de transmission.....	100
	3.3.4- Compartiments biologiques et environnementaux	100
	3.4- L'IMPLICATION DES ANELLOVIRIDAE DANS LA SANTE DE L'HOTE	101
	3.4.1- Immunologie des infections	101
	3.4.2- Pathologies potentiellement associées aux <i>Anelloviridae</i>	103
	PROJET DE THESE _____	PAGE 106 _____

TABLE DES MATIERES

PARTIE B RESULTATS ET DISCUSSION

4 DE NOUVELLES ESPECES DE TTMV ISOLEES DANS LES EPANCHEMENTS PLEURAUX D'ENFANTS ATTEINTS DE PNEUMONIE SEVERE _____ PAGE 111 _____

4.1- CONTEXTE ET OBJECTIF	113
4.2- METHODES	113
4.2.1- Patients et échantillons	113
4.2.2- Détection moléculaire des pathogènes respiratoires	114
4.2.3- Isolement des nouveaux génomes de TTMV par RT-PCR aléatoire et caractérisation génomique.....	114
4.2.4- Culture cellulaire, transfections et infections des lignées A549 et HEK293T....	115
4.2.5- Quantification des TTMV-LY et évaluation du taux de réplication	116
4.3- RESULTATS	119
4.3.1- Identification et caractérisation de nouveaux génomes de TTMV	119
4.3.2- Réplication <i>in vitro</i>	121
4.4- DISCUSSION	124
4.5- PUBLICATION SOUS PRESSE.....	128

5 ETUDE DE LA REPONSE DES CELLULES EPITHELIALES ALVEOLAIRES A L'INFECTION PAR LES TTMV-LY _____ PAGE 129 _____

5.1- Contexte et objectif	130
5.2- Méthodes.....	130
5.2.1- Infection des cellules épithéliales alvéolaires par les TTMV-LY.....	130
5.2.2- Quantification de la sécrétion de médiateurs inflammatoires	130
5.2.3- Extraction des ARN totaux	131
5.2.4- Etude du transcriptome des cellules A549	131
5.2.5- Quantification de l'expression génique	131
5.3- Résultats	133
5.3.1- Les TTMV-LY sont capables de moduler la réponse immunitaire innée des cellules épithéliales alvéolaires.	133
5.3.2- Les TTMV-LY sont capables de moduler l'expression de certains gènes dans les cellules épithéliales alvéolaires.....	135
5.4- DISCUSSION	137
5.5- PUBLICATION EN PREPARATION	142

6 ETUDE DE LA REPONSE DES APC A L'INFECTION PAR LES TTMV-LY _____ PAGE 143 _____

6.1- CONTEXTE ET OBJECTIF	144
6.2- METHODES	144
6.2.1- Préparation des DCi et des macrophages	144
6.2.2- Infection des DCi et des macrophages	145
6.2.3- Quantification des médiateurs inflammatoires	146
6.3- RESULTATS	146
6.3.1- Expression des molécules du CMH et de co-stimulation par les DC	146
6.3.2- Production de médiateurs de l'inflammation par les DC et les macrophages.....	147
6.4- DISCUSSION	149
6.5- PUBLICATION EN PREPARATION	153

TABLE DES MATIERES

PARTIE C CONCLUSIONS

7	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	PAGE 157
	7.1- DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	158
	7.1.1- Les TTMV-LY, des nouveaux <i>Betatorquevirus</i>	158
	7.1.2- Les TTMV-LY, des virus respiratoires ?.....	159
	7.1.3- Les TTMV-LY et la régulation du cycle cellulaire	160
	7.1.4- Les TTMV-LY et l'inflammation	161
	7.2- CONCLUSION.....	164
	BIBLIOGRAPHIE	PAGE 166

LISTE DES FIGURES

1	Figure 1 : La pneumonie, une inflammation aiguë des alvéoles	24
	Figure 2 : L'appareil respiratoire.	25
	Figure 3 : L'arbre broncho-pulmonaire.....	26
	Figure 4 : Structure histologique de la paroi des voies aériennes	27
	Figure 5 : Représentation schématisée de l'épithélium respiratoire.....	29
	Figure 6 : Structure histologique d'une alvéole pulmonaire	30
	Figure 7 : Les défenses de l'épithélium respiratoire	34
	Figure 8 : Spécificités et fonctions des récepteurs de type Toll (TLR).....	39
	Figure 9 : Principaux mécanismes de l'immunité innée et adaptative.	41
	Figure 10 : Les classes de lymphocytes.	47
	Figure 11 : Différenciation des LT auxiliaires.	49
	Figure 12 : Diapédèse leucocytaire.	53
	Figure 13 : Résolution des inflammations aiguës et chroniques	57
	Figure 14 : Les inflammations de l'appareil respiratoire	59
2	Figure 15 : Incidence de la pneumonie infantile par pays.....	63
	Figure 16 : Répartition des décès dus à la pneumonie	63
	Figure 17 : Causes de mortalités néonatales et infantiles.....	63
	Figure 18 : Les principaux virus responsables des pneumonies et leurs récepteurs cellulaires	68
	Figure 19 : Radiographies des poumons	75
	Figure 20 : Principe de la PCR soustractive pour la détection de nouveaux pathogènes.....	81
	Figure 21 : La PCR aléatoire.....	82
	Figure 22 : Amplification du génome entier grâce à la polymérase $\phi 29$	83
	Figure 23 : Principe des techniques de séquençage de nouvelle génération.	84
	Figure 24 : Caractéristiques techniques des appareils de séquençage de nouvelle génération. ...	85
3	Figure 25 : Microscopie électronique de particules de TTV agrégées dans un échantillon sanguin.	88
	Figure 26 : Classification des virus à ADN simple brin et leurs principaux hôtes	89
	Figure 27 : Arbre phylogénétique de la famille des <i>Anelloviridae</i> ,	91
	Figure 28 : Organisation génomique des <i>Anelloviridae</i> et du CAV.....	92
	Figure 29 : Motifs moléculaires communs au sein des AV.	92
	Figure 30 : La région 5'-UTR contient des éléments de régulation de la transcription,.....	93
	Figure 31 : Transcription et traduction chez les AV (TTV-HEL32).....	94
	Figure 32 : Mécanisme de réplication de type "cercle roulant".	97
	Figure 33 : Zone conservée entre isolats AV humains et animaux.	99
	Figure 34 : Nombre d'articles publiés sur les <i>Anelloviridae</i> par année.	101
4	Figure 35 : Impact des coinfections dans la sévérité de la pneumonie.	112
	Figure 36 : Etiologie des pneumonies (CAP+PPE) en fonction du type de prélèvement respiratoire testé :	112
	Figure 37 : Clonage des TTMV-LY dans le vecteur pCR-2.1	115

	Figure 38 : Méthodes de détection des TTMV-LY dans les cellules et les surnageants après transfection.....	117
	Figure 39 : Représentation schématique des génomes des TTMV-LY.....	118
	Figure 40 : Alignement multiple des régions 5'UTR de génomes de TTMV	118
	Figure 41 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences oligonucléotidiques de l'ORF1 des TTMV-LY1, -LY2, -LY3 et des <i>Betatorquevirus</i>	120
	Figure 42 : Réplication des génomes TTMV-LY après transfection dans les cellules A549 et HEK293T.	120
	Figure 43 : Détection par PCR inverse des génomes recircularisés.....	122
	Figure 44 : Infection des cellules A549 et HEK293T avec les particules virales néo-synthétisées.	122
	Figure 45 : Cinétique de l'infection par les TTMV-LY.....	124
5	Figure 46 : Dérégulation de l'expression génique dans les différentes conditions testées	134
	Figure 47 : Modulation de l'expression génique dans les cellules épithéliales alvéolaires,	136
	Figure 48 : Effets potentiels d'une surexpression de la protéine TPL2 par les TTMV-LY.....	139
	Figure 49 : Régulation du cycle cellulaire et implication possible des TTMV-LY.	140
6	Figure 50 : Expression des molécules du CMH et de co-stimulation par les DC, en réponse aux TTMV-LY.....	147
	Figure 51 : Sécrétion de médiateurs inflammatoires par les DC (a) et les macrophages (b)	148
	Figure 52 : Effet d'une infection massive par les TTMV-LY.....	148
	Figure 53 : Processus de maturation des DC.....	150
7	Figure 54 : Implication des TTMV-LY dans le processus inflammatoire.	162
	Figure 55 : Régulation différentielle de la réponse inflammatoire	163

LISTE DES TABLEAUX

	Tableau 1 : Amorces et sondes oligonucléotidiques utilisées dans cette étude.....	116
	Tableau 2 : Caractéristiques génétiques des nouveaux génomes de TTMV	118
	Tableau 3 : Prévalence des <i>Betatorquevirus</i> dans les IRA.....	121
	Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'étude de l'expression génique	132
	Tableau 5 : Sécrétion de médiateurs inflammatoires dans le surnageant de cellules A549, 6 heures après infection.....	133
	Tableau 6 : Gènes dont l'expression est la plus dérégulée par les TTMV-LY, après 6h d'infection	134

LISTE DES ABREVIATIONS

Les abréviations sont ici définies au singulier, mais sont utilisées dans ce manuscrit au singulier et au pluriel, indifféremment.

Sigle	Signification
A549	Lignée de cellules épithéliales alvéolaires
ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique (sb : simple brin ; db : double brin)
ADNc	ADN complémentaire
ADV	Adénovirus
APC	Cellule présentatrice d'antigène
ARN	Acide ribonucléique (sb : simple brin ; db : double brin)
ARNc	ARN complémentaire
ARNm	ARN messager
ATI	Cellules épithéliales alvéolaires de type I
ATII	Cellules épithéliales alvéolaires de type II
ATP	Adénosine tri-phosphate
AV	Anellovirus
BALT	<i>Bronchus-associated lymphoid tissue</i>
BCR	Récepteur des lymphocytes B
BET	Bromure d'éthidium
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
BPI	<i>Bactericidal/permeability-increasing protein</i>
CAM	Protéine d'adhésion cellulaire
CAP	Pneumonie (<i>community-acquired pneumonia</i>)
CAV	Virus de l'anémie infectieuse du poulet (<i>chicken anemia virus</i>)
CD	Cluster de différenciation
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CLIP	<i>CLass II Invariant chain Peptide</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité (-I : de classe I, -II : de classe II)
CMV	Cytomégalovirus
CRP	Protéine réactive C
DC	Cellule dendritique
DCi	Cellule dendritique immature
EBV	Virus d'Epstein-Barr
ECBC	Examen cytbactériologique des crachats
ECP	Protéine cationique de l'éosinophile
EG	Equivalent génome
EP	Epanchement pleural
EPO	<i>Eosinophil peroxydase</i>
ESGP	<i>Eosinophil Specific Granule Proteins</i>
ExoIII	Exonuléase III
FC	Fold Change : facteur d'augmentation

ABREVIATIONS

Sigle	Signification
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
GABRIEL	Global Approach for Biological Research on Infectious Epidemics in Low income countries
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HA	Hémagglutinine
HBV	Virus de l'hépatite B
HBoV	Bocavirus humain
HCV	Virus de l'hépatite C
HCoV	Coronavirus humain
HEK293T	Lignée de cellules embryonnaires de rein humain
Hib	<i>Haemophilus influenzae b</i>
HHV	Herpèsvirus humain
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HLA	Antigènes des leucocytes humains
HRV	Rhinovirus humain
HSV	Virus de l'herpès
HPeV	Paréchovirus
HPMV	Métapneumovirus humain
HVR	Région hypervariable
ICTV	Comité international pour la taxonomie des virus
IFN	Interféron
IL	Interleukine
INF	Virus influenza
Ig	Immunoglobine (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM)
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
IRA	Infection respiratoire aigüe
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
KRAS	Gène <i>v-Ki-ras2</i> Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LB	Lymphocyte B
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LT	Lymphocyte T
LTA	Acide lipotéichoïque
LTc	LT cytotoxique
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
MAC	Complexe d'attaque membranaire
MAP	<i>Mitogen activated proteins</i>
MAP3K8	Gène codant pour la MAP Kinase Kinase Kinase 8
MAPK8	Gène codant pour la MAP Kinase 8
MBL	<i>Mannose-binding lectin</i>
MBP	<i>Major Basic Protein</i>
MCET	<i>Mast Cell Extracellular Trap</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>

Sigle	Signification
MDA	<i>Multiple displacement amplification</i>
MIP1 α et β	<i>Macrophage inflammatory protein 1</i>
MMP	Métalloprotéase matricielle
MRR	<i>Macrophage mannose receptor</i>
NA	Neuraminidase
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NGS	Séquençage de nouvelle génération
NLR	<i>Nucleotide oligomerization domain receptors</i>
NO	Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique
NSP	Protéase à sérine du neutrophile
NTHi	<i>Haemophilus influenzae</i> non typables
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONU	Organisme des Nations Unies
ORF	Cadre ouvert de lecture (<i>open reading frame</i>)
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PBMC	Cellules mononucléées du sang (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoérythrine
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PCV	Circovirus porcin
PDGF-BB	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PEER	<i>Primer Extension Enrichment Reaction</i>
PIV	Virus parainfluenza
PNE	Polynucléaires éosinophiles
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PNP	Prélèvement nasopharyngé
PPE	Pleuro-pneumopathie ou pleurésie purulente (<i>parapneumonic empyema</i>)
PPM1L	Gène codant pour la protéine phosphatase 1L, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dépendante
PPP2R2B	Gène codant pour la sous-unité régulatrice B de la protéine phosphatase 2A
PRR	Récepteur de reconnaissance des motifs moléculaires
qPCR	PCR quantitative
RANTES	<i>Regulated and normal T cell expressed and secreted</i>
RCA	<i>Rolling-circle amplification</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RDA	PCR soustractive (<i>representational difference analysis</i>)
RLR	<i>RIG-I-Like Receptor</i>
RNS	Dérivés réactifs de l'azote
ROI	Intermédiaires réactifs de l'oxygène
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène (ROI + ozone)
RPL5	Gène codant pour la protéine ribosomale L5
RPMIc	Milieu de culture RPMI complet
RSV	Virus respiratoire syncytial
RT	Transcription inverse (reverse transcription)
SARS	Syndrome respiratoire aigu sévère
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aigüe

ABREVIATIONS

Sigle	Signification
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SISPA	<i>Sequence-independent single-primer amplification</i>
SLPI	<i>Secretory leukocyte protease inhibitor</i>
SNC	Système nerveux central
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
SV40	Virus simien 40
SVF	Sérum de veau fœtal
TCR	Récepteur des lymphocytes B
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	<i>Tumor Necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TTMDV	Torque Teno Midi Virus
TTMV	Torque Teno Mini Virus
TTMV-LY	Génomes de TTMV isolés dans cette étude
TTSuV	Torque Teno Sus Virus
TTV	Torque Teno Virus
UNICEF	Fonds des Nations unies pour l'enfance
UTR	Région non-traduite (<i>untranslated region</i>)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIDISCA	<i>Virus-Discovery-cDNA-AFLP (amplified fragment length polymorphism)</i>

Partie A

Introduction

A

L'essor des techniques de biologie moléculaire et de la virologie classique a permis, lors de ces dernières décennies, de découvrir de nombreux virus, et notamment des virus associés à des pathologies respiratoires. Ces virus représentent un important problème de santé publique, car ils sont à l'origine d'insuffisances respiratoires sévères chez les enfants et les adultes immunodéprimés (1). Malgré l'identification de différents virus impliqués dans des pathologies respiratoires bien définies, un pourcentage important d'insuffisances respiratoires demeure sans étiologie ou sont mal diagnostiquées. En dehors du fait que les tests de diagnostic existant à l'heure actuelle ne permettent pas de couvrir simultanément l'ensemble des agents étiologiques, il semble désormais acquis par la communauté scientifique que de nouveaux agents viraux (découverte ou redécouverte d'un virus humain 'ancien', nouvelle zoonose, recombinant ou variant majeur récent, ...) existent et qu'ils sont probablement associés à des manifestations cliniques respiratoires multiples, telles que les pneumopathies et les bronchiolites.

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre de l'identification et de la caractérisation de nouveaux agents infectieux chez les patients atteints de syndromes respiratoires. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à un virus, le Torque Teno Mini Virus (TTMV). Notre équipe a en effet isolé plusieurs génomes de ce virus dans des prélèvements respiratoires d'enfants hospitalisés à la suite d'une pleuro-pneumopathie, ce qui a soulevé différentes questions. Ces virus sont-ils déjà décrits ou s'agit-il de nouveaux variants ? Ces virus sont-ils pathogènes et auquel cas, quelle peut-être leur implication dans la pathogenèse de cette maladie ? Comment notre système immunitaire réagit-il face à ces virus ? Ces questions constitueront le fil conducteur de ce manuscrit. Dans la partie résultats, nous nous focaliserons sur le TTMV, de son identification à sa caractérisation génétique, biologique et immunologique. Néanmoins, l'introduction sera plus générale et définira le cadre de cette étude.

Le premier chapitre sera consacré à la description physiologique de la pneumonie. Au travers de ce chapitre, nous détaillerons le fonctionnement et la structure de l'appareil respiratoire, ainsi que les différents mécanismes de défense de l'organisme assurant le maintien de son intégrité. A partir de ces éléments de compréhension, nous nous attacherons à décrire quelles sont les conditions pour qu'une pneumonie survienne.

Ceci nous conduira au second chapitre, où nous nous focaliserons sur la description étiologique de la pneumonie, ce « fléau oublié », qui tue chaque année plus de 2 millions d'enfants de moins de 5 ans dans le monde (2). Nous verrons comment l'utilisation de protocoles de découverte de nouveaux pathogènes, émergents ou ré-émergents, a conduit à l'identification de nouveaux virus respiratoires permettant d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients.

Pour finir, nous présenterons l'état des connaissances sur le TTMV et sa famille virale, les *Anelloviridae*. Nous discuterons ainsi de l'implication de ces virus dans la santé de l'hôte, ce qui nous mènera à formuler la problématique de ce projet de thèse et les moyens mis en œuvre pour y répondre.

LA PNEUMONIE, UNE INFLAMMATION AIGÛE DES POUMONS

1.1	LES POUMONS ET LES VOIES RESPIRATOIRES	24
	1.1.1- Anatomie de l'appareil respiratoire.....	25
	a- Les voies aériennes supérieures - 25	
	b- L'appareil broncho-pulmonaire - 26	
	1.1.2- Histologie de l'appareil respiratoire	27
	a- Les voies de conduction de l'air - 27	
	b- L'acinus pulmonaire - 30	
	1.1.3- Physiologie de l'appareil respiratoire	31
	a- Conduction de l'air - 31	
	b- Conditionnement de l'air - 32	
	c- Filtration et purification de l'air - 32	
	1.1.4- Les défenses antimicrobiennes de l'appareil respiratoire	33
	a- Les barrières physiologiques - 34	
	b- Les barrières physiques - 36	
	c- Les barrières immunologiques - 37	
1.2	L'INFLAMMATION, UNE REACTION DE DEFENSE DU SYSTEME IMMUNITAIRE	41
	1.2.1- L'immunité innée.....	41
	a- Les cellules de l'immunité innée - 42	
	b- Les cytokines de l'immunité innée - 45	
	1.2.2- L'immunité adaptative	46
	a- Les effecteurs de l'immunité adaptative - 47	
	b- Le processus de présentation de l'antigène par les APC - 50	
	1.2.3- L'inflammation.....	51
	a- L'inflammation aigüe - 52	
	b- L'inflammation chronique - 56	
	c- Les pathologies inflammatoires pulmonaires - 57	

La pneumonie se définit comme une infection respiratoire aigüe du tissu pulmonaire, et plus particulièrement des alvéoles. Elle peut être due à plusieurs types de germes, les bactéries, les virus ou les champignons. Lorsque ces germes pénètrent dans les alvéoles, ils provoquent une inflammation. Les alvéoles se remplissent alors de pus et d'exsudat (Figure 1), ce qui provoque les symptômes de la pneumonie.

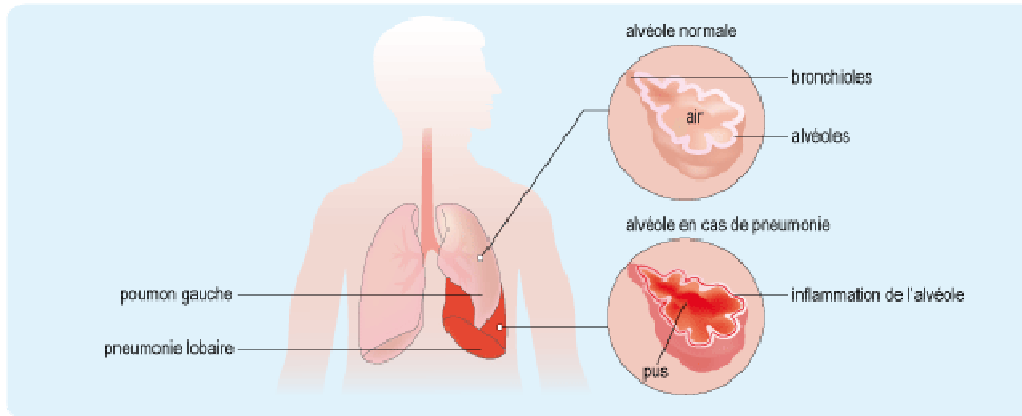


Figure 1 : La pneumonie, une inflammation aigüe des alvéoles (3)

Au cours de ce chapitre, nous verrons dans un premier temps le fonctionnement de l'appareil respiratoire, responsable d'une exposition continue du tissu pulmonaire à un grand nombre d'agents nocifs. Nous aborderons ensuite les moyens de défense du poumon et de l'organisme pour se protéger de ces agressions. Nous nous intéresserons alors à l'inflammation, réaction complexe du système immunitaire, qui présente une fonction protectrice en contrôlant les infections et en favorisant la cicatrisation des tissus, mais qui peut également être à l'origine de lésions tissulaires comme observé dans le cas de la pneumonie.

1.1- Les poumons et les voies respiratoires

L'Homme possède deux poumons, gauche et droit, séparés l'un de l'autre par le médiastin, posés sur le diaphragme et entourés par la cage thoracique. Ce sont deux masses spongieuses, rosées, élastiques, divisées en lobes pulmonaires (3 pour le poumon droit et 2 pour le gauche) que l'on distingue grâce à la présence d'entailles profondes, les scissures. Les poumons sont entourés d'un double feuillet protecteur, la plèvre. Le premier feuillet, externe ou pariétal, adhère à la paroi thoracique tandis que le second feuillet, interne ou viscéral, adhère aux poumons. La cavité pleurale, espace virtuel séparant les 2 feuillets, contient un film de liquide séreux qui lubrifie les surfaces pleurales et permet aux feuillets pleuraux de glisser librement l'un sur l'autre pendant la respiration.

La respiration est un mécanisme physiologique permettant les échanges gazeux, et ainsi l'oxygénation des tissus de l'organisme. Cette fonction, fondamentale à la vie, est assurée par les poumons, et plus globalement par l'appareil respiratoire. Celui-ci est

formé de deux constituants principaux: un système de conduction permettant le transfert et le conditionnement de l'air inspiré jusqu'au milieu d'échange et le milieu d'échange en lui-même qu'est le tissu pulmonaire.

1.1.1-Anatomie de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire se divise en deux parties séparées par le pharynx : les voies aériennes supérieures et l'appareil broncho-pulmonaire.

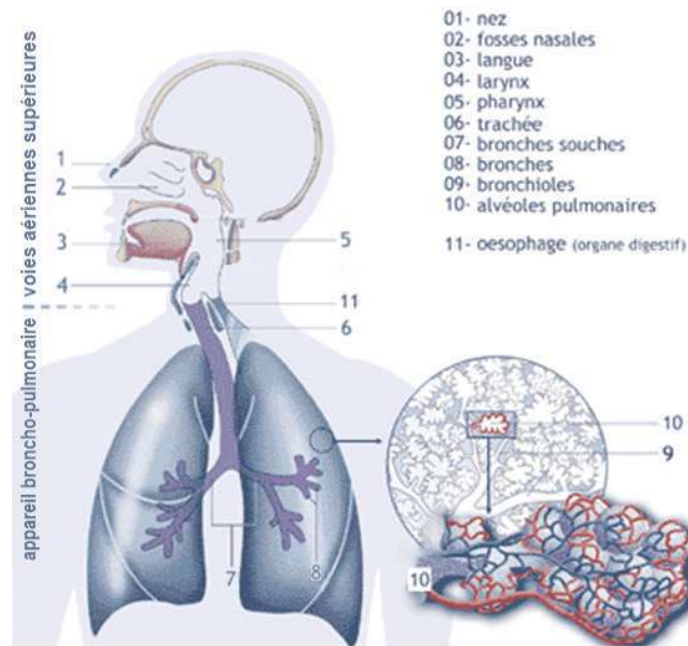


Figure 2 : L'appareil respiratoire. Adapté de (4)

a- Les voies aériennes supérieures

Les voies aériennes supérieures comprennent une série de cavités communicantes : le nez, les fosses nasales, et le rhinopharynx, qui permettent d'acheminer l'air jusqu'au poumon. Ces voies, formées de structures tubulaires flexibles, filtrent, humidifient et règlent la température de l'air inspiré.

Au niveau de la cavité nasale, les cornets vont permettre de réchauffer l'air inspiré à 37°C, mais aussi de l'humidifier en le saturant à 100% en vapeur d'eau. Les cornets nasaux, au nombre de trois par narine (voir Figure 2), sont des superpositions d'os longs, étroits et courbes, recouverts d'une épaisse couche de tissu, très vascularisée, érectile et glandulaire. Leur rôle est de conditionner l'air inspiré et de ralentir le flux aérien afin de favoriser les échanges thermodynamiques avec la muqueuse respiratoire.

La cavité nasale est par ailleurs tapissée de poils courts et épais appelés vibrisses, qui vont permettre de bloquer, au niveau du nez, les particules de taille supérieure à 10µm, et les empêcher d'aller plus profondément dans l'appareil respiratoire. Nous reviendrons plus tard sur la fonction d'épuration du système pulmonaire.

b- L'appareil broncho-pulmonaire

L'appareil broncho-pulmonaire commence par le larynx, continue par la trachée dans le thorax, pour se diviser en deux bronches souches. Ces dernières se divisent en bronches lobaires, qui, elles-mêmes, vont successivement se diviser 2 par 2 pour terminer dans les alvéoles. On parle ainsi de dichotomie bronchique. À chaque division, la surface d'échange avec l'air inspirée augmente. En arrivant en zone respiratoire, cette augmentation de la surface d'échange bronchique permet une hématoxe efficace en lien avec la réduction de la vitesse de circulation de l'air inspiré.

L'arbre bronchique est ainsi constitué de : 2 bronches souches, 5 bronches lobaires, 20 segmentaires et environ 3000 bronchioles lobulaires (Figure 3).

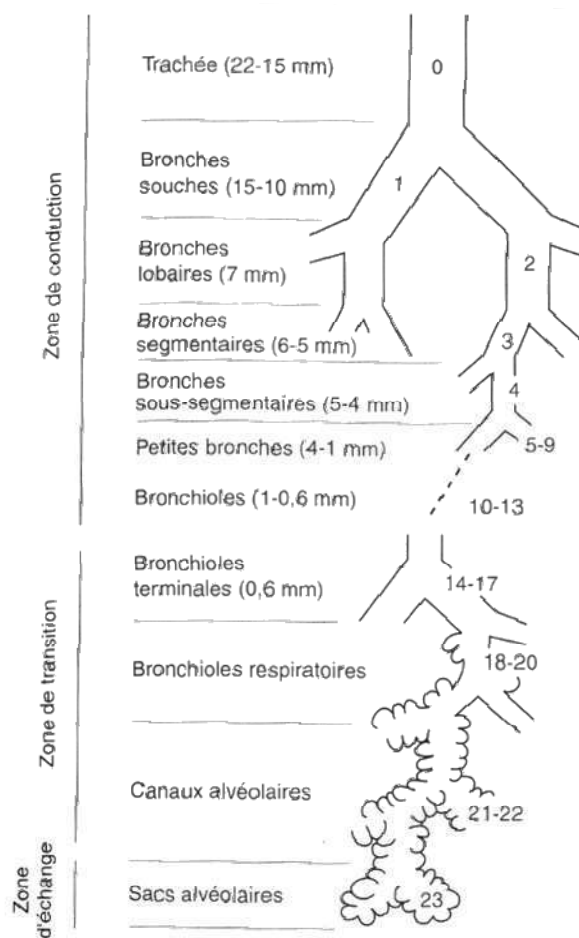


Figure 3 : L'arbre broncho-pulmonaire (5)

Ces différentes structures vont former trois zones successives en fonction de leur rôle dans la respiration. De la fin de la trachée aux bronchioles, on trouve la zone de conduction. Cette zone ne possède pas d'alvéoles, et ne participe pas aux échanges gazeux. Les bronchioles respiratoires forment la zone de transition. Pouvant être partiellement alvéolées, elles participent aux échanges gazeux en plus d'être des voies de conduction. Les lobules alvéolaires forment la zone respiratoire ou d'échange.

Les alvéoles pulmonaires, en contact étroit avec les capillaires pulmonaires, sont le siège des échanges gazeux (O_2 , N_2 , CO_2). Une alvéole mesure environ 0,2 mm de diamètre. Les fibres de la paroi étant élastiques, son diamètre peut passer à 0,1 mm en cas d'expiration forcée et atteindre 0,3 à 0,5 mm lors d'une inspiration forcée. Un organisme compte en moyenne 700 millions d'alvéoles représentant une surface de contact d'environ 100 à 150 m².

1.1.2-Histologie de l'appareil respiratoire

a- Les voies de conduction de l'air

La structure histologique de la paroi des voies aériennes est très bien adaptée à la conduction car elle permet d'associer rigidité, flexibilité et extensibilité. Elle est formée de différentes couches (muqueuse, musculuse, glandulaire et cartilagineuse, Figure 4), dont la composition et la répartition varient de la trachée à la bronchiole afin de s'adapter au mieux au diamètre des voies aériennes et à leur fonction.

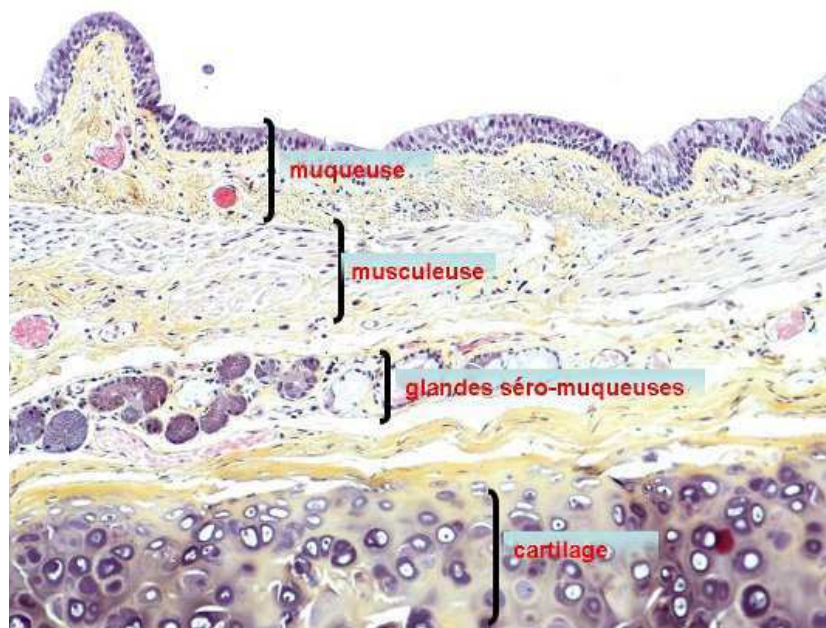


Figure 4 : Structure histologique de la paroi des voies aériennes (6)

La muqueuse

La muqueuse tapisse la lumière bronchique. Elle est composée : i) d'un épithélium de type respiratoire, pseudo-stratifié cilié, ii) d'une lame basale (tout épithélium repose sur une lame basale constituée par un tissu conjonctif dense, orienté, bitendu), et iii) d'un chorion conjonctif (*lamina propria*) constitué de fibres collagènes et élastiques, contenant une quantité variable de glandes et des vaisseaux capillaires sanguins et lymphatiques. Les fibres élastiques permettent une certaine flexibilité et un retour à la normale après dilatation des bronches.

L'épithélium respiratoire est le même de la trachée aux bronches terminales, seules son épaisseur et la répartition des cellules varient (Figure 5). Il est principalement composé de 5 types de cellules :

- Les cellules ciliées, les plus abondantes. Elles possèdent des cils (200-300/cellule) à leur pôle apical, mesurant 5-7 μ m de long pour 0,25 μ m de diamètre, et battant à une fréquence régulière de 10 à 20 battements par seconde.
- Les cellules caliciformes (1 pour environ 5 cellules ciliées). Elles ont un noyau refoulé vers la base par des vacuoles supra-nucléaires contenant du mucigène qui participe, avec les sécrétions des glandes séro-muqueuses à la formation du mucus (10 à 20 ml/j). Celui-ci permet d'emprisonner les impuretés de l'air inspiré et d'absorber certains gaz (SO₂, ozone...) et possède des propriétés rhéologiques et antibactériennes. Il se compose à 95% d'eau et d'électrolytes, 2% de mucines, 1% de protéines, 1% de lipides, et 1% de sels inorganiques.
- Les cellules basales. Ce sont des petites cellules situées dans la partie profonde de l'épithélium, contre la membrane basale. Elles sont très importantes dans le renouvellement cellulaire (cellule de réserve) car elles sont capables de remplacer n'importe quel autre type de cellule bronchique.
- Les cellules neuroendocrines, minoritaires (3 à 5 % des cellules épithéliales). Ces cellules se groupent pour former des corps neuro-épithéliaux : chémorécepteurs capables de détecter les variations de teneur en O₂ ou CO₂ de l'air.
- Les cellules de Clara. Ce sont des cellules pyramidales dont le pôle apical est garni de microvillosités. Elles ont pour fonction de produire et sécréter des protéines (antiprotéases, oxydases) et l'apoprotéine du surfactant, de protéger les voies respiratoires, et de participer au renouvellement des cellules broncho-alvéolaires.

De la trachée jusqu'aux bronchioles, l'épithélium respiratoire est pseudo-stratifié : toutes les cellules sont ancrées à la lame basale, et seules certaines d'entre elles s'allongent jusqu'à la lumière bronchique. Cet épithélium est principalement constitué de cellules basales, ciliées, muco-sécrétrices et neuroendocrines. L'épithélium respiratoire bordant les bronchioles les plus proximales est toujours pseudo-stratifié et comprend quelques rares cellules basales, des cellules ciliées et des cellules de Clara. Les bronchioles les plus distales sont bordées par un épithélium monostratifié, cubique, dépourvu de cellules basales.

L'épithélium respiratoire est recouvert d'une fine couche de liquide dont l'épaisseur conditionne la qualité et la fonction du mucus, et donc les processus d'épuration dans les bronches, ainsi que la qualité des échanges de gaz au niveau alvéolaire. Le contrôle de la quantité et la qualité de ce film liquidien est conditionné par une régulation fine des

transports d'ions et d'eau transépithéliaux. Au niveau trachéal et bronchique, cette couche de fluide est le liquide périciliaire.

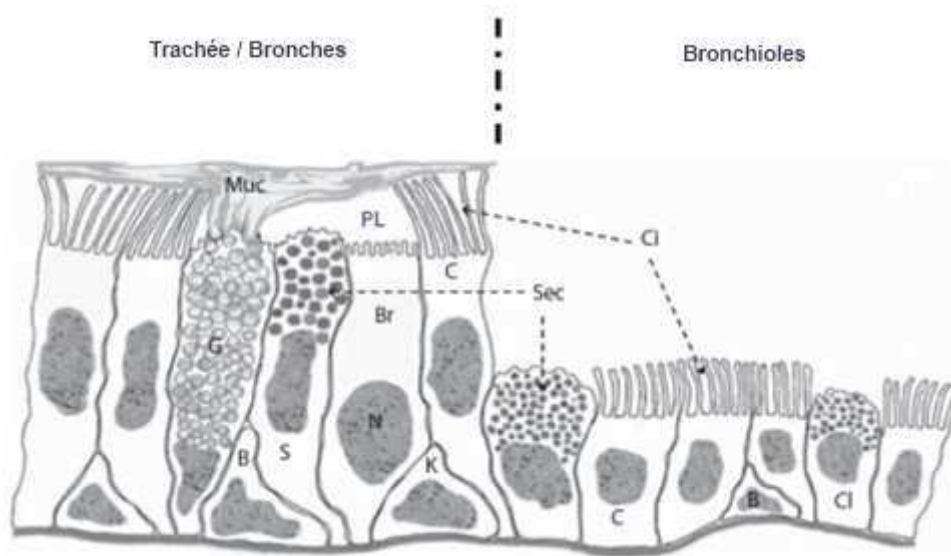


Figure 5 : Représentation schématique de l'épithélium respiratoire. De la trachée aux bronches, l'épithélium pseudo-stratifié est composé de cellules ciliées (C), de cellules caliciformes (G), de cellules neuroendocrines (K), de cellules basales (B) ainsi que de cellules séreuses (S) et de "cellules en brosse" (Br). Au niveau des bronchioles, les cellules ciliées (C) sont bordées de cellules de Clara (Cl) et partiellement de cellules basales (B). Muc = mucus; Ci = cils ; N = noyau ; Sec = granules de sécrétion ; PL : Liquide périciliaire. Tiré de (7)

La musculature

La musculature est une couche de fibres musculaires lisses. Au niveau de la trachée et des bronches souches, la musculature tapisse essentiellement la face postérieure dépourvue de cartilage. Dans les bronches de plus petit calibre, elle se positionne entre la muqueuse et le cartilage sous forme d'une structure spiralée permettant d'entraîner une constriction et un raccourcissement de la bronche lors de la contraction musculaire. La contraction musculaire permet de réguler le flux aérien lors de l'inspiration et de l'expiration.

Les glandes séro-muqueuses

Entre la musculature et le cartilage se retrouvent des trajets nerveux, vasculaires et lymphatiques et des glandes séro-muqueuses s'ouvrant dans la lumière bronchique. La sécrétion des glandes séreuses humidifie l'air préalablement purifié par le mucus et les cils et possède des propriétés antibactériennes. Ces glandes disparaissent à l'étage bronchiolaire.

Le cartilage

La couche cartilagineuse est variable de la trachée à la bronchiole. Elle assure la rigidité des voies et évite l'occlusion complète des lumières bronchiques. La trachée est maintenue par une armature de 16 à 20 anneaux cartilagineux. Les bronches extrapulmonaires sont encerclées par un seul anneau cartilagineux. Les bronches intrapulmonaires acquièrent une armature cartilagineuse en plaques irrégulières réparties sur

toute la circonférence. La quantité de plaques diminue au fur et à mesure de la diminution du diamètre bronchique et disparaît au niveau des bronchioles (dont le diamètre est ≤ 2 mm).

b- L'acinus pulmonaire

Un acinus est constitué d'une bronchiole respiratoire donnant naissance à 3 à 6 canaux alvéolaires. Chaque canal alvéolaire se divise lui même 2 à 3 fois. Chaque canal alvéolaire final s'ouvre au niveau de l'atrium sur 2 ou 3 sacs alvéolaires. A ce niveau, le muscle disparaît, l'armature est uniquement faite de fibres collagènes et élastiques. Les fibres élastiques permettent aux alvéoles de s'élargir lors de l'inspiration. Les alvéoles se contractent ensuite "passivement" lors de l'expiration. Les fibres collagènes évitent une trop grande distension des cloisons alvéolaires et donc leur rupture.

La structure histologique des alvéoles est adaptée à leur fonction essentielle : l'échange oxygène/gaz carbonique. L'épithélium alvéolaire se compose ainsi de 2 types de cellules : les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II (Figure 6). A l'état normal, les principaux éléments cellulaires retrouvés dans la lumière alvéolaire sont les macrophages qui se déplacent sur la paroi alvéolaire, immergés dans le surfactant. Le macrophage alvéolaire est un composant important du système de défense du tissu pulmonaire, comme nous le verrons au paragraphe 1.1.4-c-.

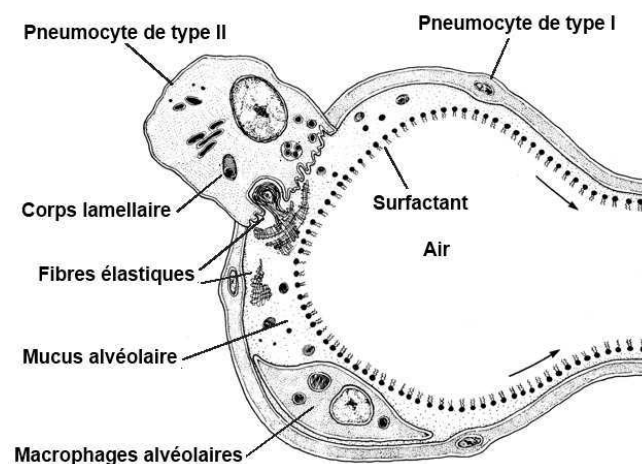


Figure 6 : Structure histologique d'une alvéole pulmonaire

Les pneumocytes de type I (Alveolar epithelial type I cell, ATI) ou membraneux

Les ATI recouvrent 97% de la paroi alvéolaire. Ce sont des cellules très minces et étalées, qui, *via* leurs extensions cytoplasmiques, vont former un voile souple, très fin (0,1 à 0,2 μm d'épaisseur) et de grande surface (environ 400 μm^2 pour chaque cellule). Les ATI sont impliqués dans de multiples fonctions essentielles pour le maintien de l'homéostasie de l'alvéole, comme le transport transépithélial d'eau et d'ions ou le contrôle de la prolifération cellulaire (8).

De plus, les ATI étant étroitement accolés aux cellules endothéliales des vaisseaux capillaires, la fusion des membranes basales des deux types cellulaires permet la formation de la **barrière alvéolo-capillaire**. Cette barrière est perméable aux gaz, ainsi l'oxygène qui est amené dans la lumière alvéolaire lors de l'inspiration passe à travers la barrière dans la circulation capillaire et sera transporté dans tout l'organisme par la circulation vasculaire. A l'inverse, le gaz carbonique, ramené aux poumons par la circulation capillaire, passe à travers la barrière alvéolo-capillaire et est éliminé lors de l'expiration.

Les pneumocytes de type II (Alveolar epithelial type II cell, ATII) ou granuleux

Les ATII sont des cellules plus volumineuses cubo-cylindriques. Ils représentent 60% des cellules mais ne recouvrent que 7% de la surface. Leur cytoplasme renferme de nombreux organites arrondis, les corps lamellaires, sécrétant le surfactant pulmonaire.

Le surfactant est composé de phospholipides et de protéines à propriétés tensio-actives. Il recouvre la surface alvéolaire et son rôle principal est de réduire la tension superficielle air/liquide en fluidifiant le mucus se trouvant à la surface des alvéoles pulmonaires, et empêchant ainsi l'alvéole de se collaber. Le surfactant joue en outre également un rôle dans le transport épithélial de fluides (pH, concentration calcique) et dans les mécanismes de défenses contre les micro-organismes (9).

Les ATII ont également des capacités de présentation antigénique et de sécrétion de cytokines et donc rôle important dans les processus inflammatoires pulmonaires. De plus, contrairement aux pneumocytes de type I, ils peuvent se diviser et se transdifférencier en perdant leurs corps lamellaires et en s'aplatissant pour remplacer les ATI quand ces derniers meurent. Ils jouent donc un rôle de cellules souches permettant le renouvellement et la restauration de l'épithélium (restauration d'entretien ou cicatricielle à la suite d'une lésion).

1.1.3-Physiologie de l'appareil respiratoire

Comme nous venons de le voir, les échanges gazeux s'effectuent au niveau de la barrière alvéolo-capillaire. L'appareil respiratoire a donc pour fonction la conduction, le conditionnement et la purification de l'air extérieur jusqu'à celle-ci.

a- Conduction de l'air

La conduction de l'air est assurée grâce à la contraction des muscles respiratoires et à l'élasticité bronchique et alvéolaire.

La ventilation se déroule de façon inconsciente et rythmique grâce à l'activité de certains neurones du tronc cérébral. Lors de l'inspiration, la contraction du diaphragme augmente le diamètre vertical de la cage thoracique et des muscles intercostaux externes, ainsi que le diamètre antéropostérieur, ce qui entraîne une diminution de la pression à

l'intérieur des poumons et donc une entrée d'air. Le volume alvéolaire augmentant, il entraîne un abaissement de la pression alvéolaire en-dessous de la pression barométrique. Cela a pour conséquence de conduire les gaz jusqu'aux alvéoles. En fin d'inspiration, la pression alvéolaire devient égale à la pression barométrique. L'expiration résulte des forces de rappel élastiques liées au relâchement des muscles inspiratoires, qui font revenir la cage thoracique à son volume de début d'inspiration et donc chassent l'air des poumons.

De la même manière, au niveau alvéolaire, les échanges gazeux entre les alvéoles et le sang s'effectuent en fonction des différences de pressions partielles. La pression partielle des alvéoles étant de 100 mmHg pour l'O₂ et de 40 mmHg pour le CO₂, quand respectivement elle est de 40 mmHg et de 46 mmHg dans le capillaire, l'oxygène va des alvéoles jusqu'au sang et le dioxyde de carbone fait le chemin inverse (10).

b- Conditionnement de l'air

La respiration met en présence l'air atmosphérique, plutôt sec et éventuellement froid, et un épithélium respiratoire fin, humide et parfois chaud. Pour garder toute son efficacité dans les échanges gazeux, l'épithélium respiratoire doit être constamment maintenu dans des conditions physiologiques, c'est pourquoi l'air extérieur va être réchauffé (ou refroidi) à 37°C et saturé à 100% en vapeur d'eau avant d'atteindre les poumons. Ce conditionnement de l'air a lieu principalement au niveau des cornets nasaux (surface très vascularisée) et des voies aériennes supérieures (muqueuse respiratoire).

Une humidification insuffisante de l'air inspiré a pour conséquence une déshydratation du fluide recouvrant l'épithélium respiratoire. Ceci peut conduire à un dysfonctionnement des cils, ainsi qu'à un assèchement et un épaississement du mucus, qui peut alors obstruer les voies aériennes par des bouchons muqueux.

c- Filtration et purification de l'air

La description de l'anatomie des voies de conduction de l'air a montré que ces voies étaient très étroites. Ainsi, la présence d'impuretés, même très fines, dans ces circuits pourrait venir les obstruer complètement ou en partie selon le niveau bronchique considéré. Une épuration de l'air inspiré est donc indispensable au bon fonctionnement de notre système respiratoire. Celle-ci est assurée tout au long des voies aériennes, tant pour éliminer les particules qui peuvent les colmater, que pour dissoudre la pollution sous forme gazeuse avant son passage dans le sang. Cette épuration est à la fois mécanique et biologique.

Mécanique

Le poumon est un véritable filtre qui protège les 70 m² de surface d'échange alvéolaire. Les particules vont ainsi être successivement éliminées en fonction de leur taille ou diamètre, de leur forme ou de leur densité : i) dépôt : au niveau du naso-pharynx, les particules supérieures à 10µm vont être retenues par les vibrisses et la muqueuse

nasale ; ii) impaction : au niveau des voies aériennes supérieures où le courant aérien est fort, les particules de 2 à 10 μ m vont se déposer dans le mucus par inertie de façon proportionnelle à leur masse et à leur vitesse ; iii) sédimentation : au niveau de l'arbre trachéo-bronchique, lorsque le débit aérien est faible, les particules de 0,3 à 2 μ m vont sédimenter par gravité dans le mucus ; iv) interception : lorsque le diamètre de la particule est supérieur à celui de la bronchiole ; v) diffusion : au niveau des alvéoles, les particules dont le diamètre est inférieur à 0,3 μ m peuvent rejoindre la circulation sanguine par un mouvement semblable à celui observé pour les molécules de gaz.

La majorité des particules dont le diamètre est inférieur à 0,3 μ m restent en suspension, puis sont expirées. Nous verrons en détail dans le paragraphe 1.1.4-a comment les particules piégées dans le mucus vont pouvoir être éliminées par les différents mécanismes de défense pulmonaire.

Biologique

Les impuretés vont également pouvoir être éliminées de l'appareil respiratoire, par des mécanismes biologiques assurés par les plasmocytes du chorion de la muqueuse respiratoire, ainsi que par les macrophages alvéolaires.

Les plasmocytes sont des cellules de l'immunité, qui ont la capacité de produire des anticorps, les immunoglobines A (IgA). Etant donné que les poussières et autres particules sont assimilables à des antigènes, elles vont pouvoir être neutralisées par les IgA. Cette neutralisation implique à la fois le domaine variable et le domaine constant des IgA. Le domaine variable des IgA se fixe dans des régions spécifiques des particules antigéniques et empêche, par gêne stérique, leur interaction avec des récepteurs de l'épithélium. Le domaine constant des IgA, quant à lui, contient des motifs polysaccharidiques mimant des récepteurs de l'épithélium sur lesquels les antigènes pourraient se fixer. Les complexes formés sont maintenus dans le mucus puis éliminés.

Les macrophages alvéolaires participent à l'immunité en tant que défense non-spécifique. Ils vont pouvoir neutraliser les particules de diamètre inférieur à 1 μ m par leur capacité de phagocytose (capture et ingestion de la particule) et permettre ainsi leur élimination. Les macrophages vont également représenter le principal système de défense de l'espace alvéolaire contre les pathogènes, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant.

1.1.4-Les défenses antimicrobiennes de l'appareil respiratoire

Les poumons ont une situation unique dans l'organisme car ils sont en relation directe et constante avec l'environnement extérieur. L'appareil respiratoire représente ainsi la plus grande surface de l'organisme exposée à l'environnement extérieur et ses agents nocifs et pathogènes. L'organisme emploie de nombreux moyens de défense pour le protéger, que nous allons détailler dans les prochains paragraphes (Figure 7).

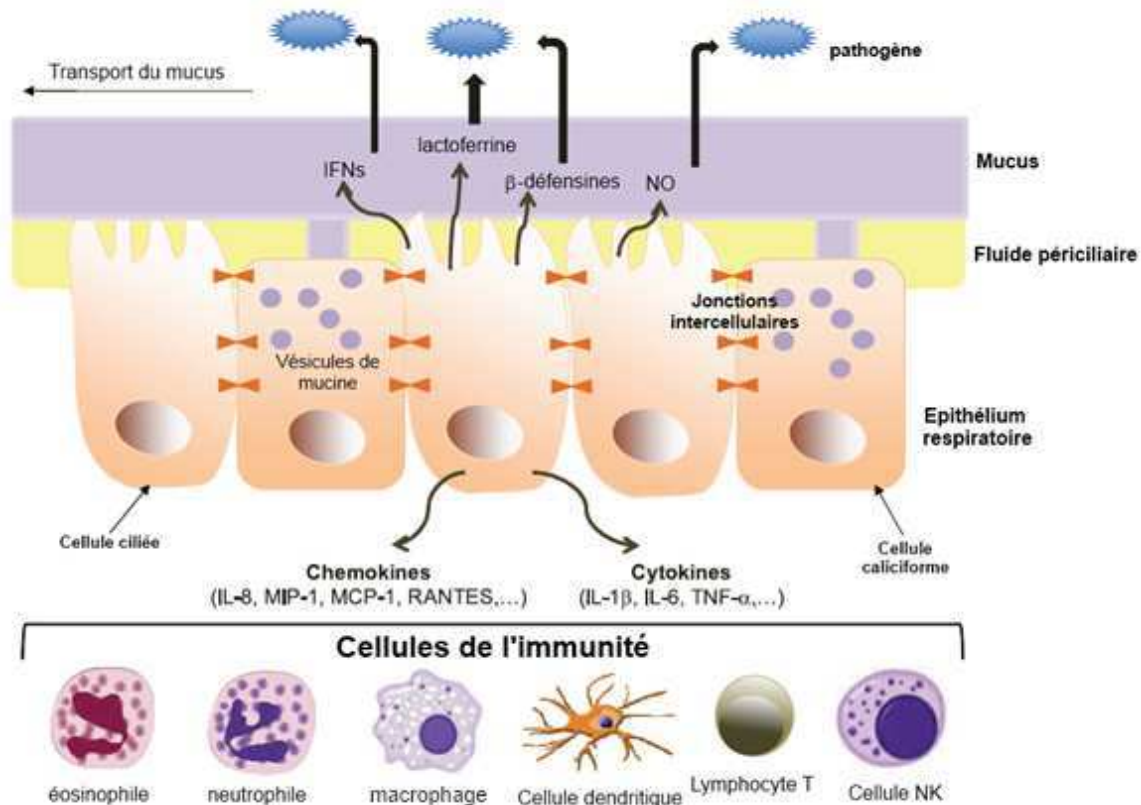


Figure 7 : Les défenses de l'épithélium respiratoire : des barrières physiologiques, physiques et immunologiques (adapté de (11)).

a- Les barrières physiologiques

La première ligne de défense des voies aériennes est constituée par le liquide de surface, le mucus et le surfactant, qui forment un filtre continu à l'interface épithélium/air et servent de barrière physique vis-à-vis des particules nocives inhalées et des bactéries et virus qui s'y trouvent piégés. Une fois piégés, ces derniers vont pouvoir être éliminés grâce à différents mécanismes, comme la clairance muco-ciliaire, les réflexes de toux et d'éternuement et la sécrétion de molécules de défense.

L'escalator muco-ciliaire

L'escalator muco-ciliaire est le système de clairance des conduits aériens. Cet escalator est composé d'un tapis, le mucus, d'un moteur, les cils, et nécessite un couplage efficace de ces deux composants pour fonctionner correctement.

Le mucus forme un revêtement continu tapissant toutes les voies de conduction. Il est assimilable à un gel viscoélastique hétérogène avec 2 couches : une couche profonde aqueuse, très fluide, de 6 à 7µm d'épaisseur, en contact avec le pôle apical des cellules ciliées ; et une couche visqueuse superficielle, de 0,5 à 2µm d'épaisseur, piège à particules et microorganismes. Outre son rôle de barrière physique, le mucus respiratoire, en raison de sa constitution biochimique, participe à la défense antibactérienne de l'épithélium des voies aériennes. Les mucines, principales glycoprotéines le constituant, lui confèrent ses propriétés rhéologiques et jouent ainsi un rôle majeur dans l'épuration

muco-ciliaire. De plus, l'hétérogénéité de leurs chaînes de glycanes représente un éventail de récepteurs permettant la reconnaissance et l'adhérence bactériennes, empêchant ainsi les bactéries d'atteindre la surface des cellules épithéliales.

Les cellules ciliées participent à l'épuration muco-ciliaire en évacuant le mucus grâce au battement actif de leurs cils. Ces cils vibratiles sont animés d'un mouvement synchrone, qui se décompose en 3 phases : i) la phase de propulsion (active, ATP dépendante) : le cil, rigide, se projette en avant. En atteignant la phase visqueuse, les forces de frottements vont l'amener à transmettre son énergie cinétique, propulsant ainsi le mucus vers l'avant ; ii) la phase de récupération : le cil revient à sa position antérieure de départ. En se pliant en « S » il va rester intégralement dans la couche aqueuse où, les forces de frottement étant très faibles, le cil ne va pratiquement pas transmettre d'énergie au mucus, évitant ainsi un retour en arrière ; iii) la phase de repos permettant la reconstitution des réserves en ATP.

La fréquence moyenne du battement ciliaire est de 15 à 20 Hz, mais tout comme la taille des cils, elle augmente progressivement des bronchioles distales à la trachée. Globalement, les vagues de contraction des cils se propagent à la surface de l'épithélium respiratoire. Le mucus remonte ainsi à la manière d'un tapis roulant (1 cm/min) vers le naso-pharynx, où son accumulation déclenche le réflexe de déglutition et son élimination vers l'estomac.

Les molécules de défense du mucus et du surfactant

Le mucus contient de nombreuses molécules protectrices possédant des activités antimicrobiennes (bactéricide, virucide, bactériostatique, ...) (12) :

- Le lysozyme peut agir comme une opsonine favorisant la phagocytose des bactéries, ou comme une enzyme lytique capable de lyser des bactéries, en particulier celles à Gram+, indépendamment de leur pouvoir pathogène.
- La lactoferrine et la bronchotransferrine chélatent le fer, nécessaire à la croissance des agents pathogènes.
- La phospholipase A2 est capable d'hydrolyser les phospholipides de la membrane bactérienne (13).
- La lactoperoxydase catalyse l'oxydation du thiocyanate en libérant des ions et des molécules (dérivés d'oxygène) qui dénaturent les protéines bactériennes.
- L'inhibiteur de leucoprotéase sécrétoire (SLPI, *Secretory LeucoProtease Inhibitor*) protège l'épithélium des sérine-protéases endogènes.
- Les défensines, peptides lytiques, sont capables de se lier à la membrane bactérienne et d'y créer des pores. Leur expression est régulée par les facteurs de transcription NF- κ B et Sp-1, et activée par la matrilysine exprimée constitutivement par les cellules épithéliales des voies aériennes.

Les collectines du surfactant (SP-A, SP-B, SP-D), synthétisées par les cellules épithéliales alvéolaires et les cellules de Clara, assurent, elles-aussi, une fonction antimicrobienne et sont capables de moduler l'inflammation des voies aériennes. Cette dernière fonction est également exercée par la protéine CC10, produite par les cellules de Clara. D'autres nombreux produits antimicrobiens sont par ailleurs sécrétés dans le surfactant : β -défensines, lipocaline et oxyde nitrique (14).

Les réflexes : toux et éternuement

L'appareil pulmonaire possède d'autres mécanismes de défenses physiques tels que l'éternuement ou la toux, qui permettent une élimination rapide et efficace des agents déclencheurs.

La toux (mécanisme de respiration profonde suivie d'une expiration forcée avec une glotte fermée qui s'ouvre subitement pour produire la phase expulsive) va éliminer les débris et le mucus plus ou moins infecté. Elle permet ainsi de se débarrasser rapidement des corps étrangers, mais aussi de l'hypersécrétion de mucus observée lors d'une irritation ou d'une infection, en propulsant le tout vers le pharynx et la bouche.

L'éternuement (mécanisme d'expiration brusque et bruyante, semi-autonome ou involontaire) est provoqué par un mouvement subi et convulsif des muscles inspireurs, en réponse à un stimulus mécanique (accumulation du mucus) ou chimique (impuretés) détecté par les récepteurs sensitifs de la muqueuse nasale.

b- Les barrières physiques

La seconde ligne de défense des voies aériennes est assurée par quatre principaux types de complexes jonctionnels intercellulaires responsables de l'étanchéité de l'épithélium : les jonctions serrées, les jonctions intermédiaires, les jonctions communicantes et les desmosomes.

Les jonctions serrées sont les plus importantes pour le maintien de l'intégrité épithéliale. Formant un réseau autour du pôle apicolatéral des cellules épithéliales, elles rendent ainsi l'épithélium imperméable aux agents extérieurs. Ces complexes sont principalement constitués de protéines telles que les ZO (*zonula occludens* 1 et 2), les claudines et l'occludine, qui interagissent avec le cytosquelette d'actine des cellules. Les jonctions serrées permettent également la polarisation de l'épithélium et régulent la perméabilité transépithéliale en sélectionnant le passage de molécules par la voie paracellulaire. La dégradation des jonctions serrées par les facteurs de virulence bactériens peut rendre le pôle basolatéral des cellules accessible aux agents pathogènes. Situées en contrebas des jonctions serrées, les jonctions intermédiaires permettent l'adhésion des cellules épithéliales voisines. Les jonctions communicantes sont des canaux qui permettent la diffusion des petits métabolites, des seconds messagers, des ions, et d'autres molécules (< 1 kDa) entre les cellules voisines. Les desmosomes sont des

jonctions intercellulaires qui permettent une forte adhérence entre les cellules conférant ainsi une résistance mécanique aux tissus.

Ces complexes agissent comme une barrière contre l'entrée et la diffusion des pathogènes dans la sous-muqueuse des voies respiratoires. Ils empêchent, par exemple, l'accès à des récepteurs viraux situés sur la membrane épithéliale basolatérale, qui sont d'importants sites de fixation et d'entrée pour différents virus (11).

c- Les barrières immunologiques

Lorsque les défenses mécaniques et physiques sont dépassées, ou qu'elles sont inefficaces, la lutte contre les micro-organismes est alors assurée par le système immunitaire respiratoire. Pour que le système immunitaire entre en action, il doit être stimulé. Dans ce but, l'organisme dispose de différents effecteurs, dits de l'immunité innée : les cellules présentatrices d'antigènes (APC, *Antigen-Presenting Cells*), ainsi que différents récepteurs situés à la surface des cellules (épithéliales et immunitaires), dans le cytoplasme, ou au niveau d'organites cellulaires (lysosomes et endosomes).

Les APC

Les APC capturent les antigènes, les transportent dans les tissus lymphoïdes périphériques et les présentent aux lymphocytes, enclenchant ainsi une réponse ciblée grâce à la reconnaissance de signatures spécifiques. Elles permettent ainsi de passer d'une réponse immunitaire non spécifique (destruction d'un organisme du non-soi) à une réponse immunitaire spécifique (destruction d'un organisme précis). Le processus de présentation de l'antigène aux lymphocytes est décrit dans le paragraphe 1.2.2-b- . Les APC regroupent des cellules dendritiques (DC, *Dendritic Cells*), de Langerhans, des macrophages, des lymphocytes B (LB), et des cellules épithéliales.

Les DC et les cellules de Langerhans sont les APC principales de l'arbre trachéo-bronchique. On retrouve les DC dans les parois vasculaires des capillaires pulmonaires, le feuillet viscéral de la plèvre, le tissu conjonctif péribronchiolaire, et dans les tissus lymphoïdes associés à la muqueuses bronchique (*Bronchus Associated Lymphoid Tissue*, BALT). Elles possèdent de longs prolongements cytoplasmiques, et sont très efficaces pour faire débiter une réponse immunitaire primaire. Une fois les antigènes captés, elles migrent vers les tissus lymphoïdes régionaux *via* les vaisseaux lymphatiques afférents.

Les macrophages se situent dans la lumière et la muqueuse des voies aériennes, mais ils représentent surtout 90% des cellules immunitaires à la surface alvéolaire. Une fois activés, une partie d'entre eux remontent jusqu'à l'escalator muco-ciliaire pour être éliminés. D'autres passent la paroi alvéolaire afin de gagner la structure lymphatique. Les macrophages sont particulièrement efficaces contre les bactéries car ils contiennent des lysosomes ayant une action bactériolytique. Les macrophages secrètent également des protéines solubles appelées cytokines, qui déclenchent l'inflammation et les réponses lymphocytaires (15).

Les cellules épithéliales, en réponse à certaines de ces cytokines, vont exprimer à leur surface les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II, qui vont permettre à ces cellules de présenter les antigènes aux lymphocytes T (LT) et ainsi d'orienter la réponse immunitaire adaptative (16).

Les récepteurs cellulaires des micro-organismes

Les composants de l'immunité innée reconnaissent des structures qui sont partagées par différentes classes de microbes, et qui ne sont pas présentes sur les cellules de l'hôte. Ces structures microbiennes sont désignées sous le terme de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, *Pathogen Associated Molecular Pattern*). Parmi elles, citons la flagelline des flagelles bactériens, les lipopolysaccharides bactériens (LPS ou endotoxine) des bactéries à Gram-, les acides lipotéichoïques (LTA, *LipoTeichoic Acid*) et les peptidoglycanes des bactéries à Gram+, les résidus mannoses terminaux des glycoprotéines bactériennes, les lipopeptides, les motifs nucléotidiques CpG non méthylés de l'ADN bactérien, les oses de surface des levures et moisissures, et l'ARN double brin (ARNdb) présent chez de nombreux virus. Les récepteurs qui reconnaissent ces structures partagées sont appelés récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR, *Pathogen Recognition Receptor*). Les PRR sont de 3 types suivant leur localisation : i) les PRR solubles se situent dans les fluides corporels ; ii) les PRR membranaires se situent à la surface des cellules ou des organites cellulaires ; et iii) les PRR cytoplasmiques se situent dans le cytoplasme.

Les PRR solubles jouent un rôle important dans la phagocytose, dans l'activation du complément, et dans l'activation de la réaction inflammatoire. Le plus souvent les PRR solubles sont des opsonines. Parmi eux, citons les composants du complément, les protéines MBL (*Mannane Binding Lectin*) spécifiques des résidus mannose, la protéine réactive C (CRP, *C-Reactive Protein*) synthétisée lors d'une réaction inflammatoire par le foie, et les protéines LBP (*LPS-binding protein*) reconnaissant les LPS.

Les PRR membranaires sont eux beaucoup plus diversifiés et sont impliqués dans la phagocytose, dans l'activation de la réponse inflammatoire, dans l'activation de la réponse antivirale, ou dans le transfert à d'autres PRR. Ils regroupent les récepteurs MMR (*Macrophage Mannose Receptor*) interagissant avec un grand nombre de bactéries Gram+ et Gram- et des champignons, les récepteurs scavengers (récepteurs poubelles) spécifiques des ligands polyanioniques dont l'ARNdb, les LPS, et les LTA, et les plus importants, les récepteurs de type Toll (TLR, *Toll Like Receptors*).

Les récepteurs de type Toll (TLR, *Toll-Like Receptor*) sont des glycoprotéines membranaires de type I, comportant un domaine extracellulaire récepteur du signal de danger et composé de nombreux motifs riches en leucine (LRR, *Leucin-Rich Repeats*), un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire contenant un domaine de mort (*death domain*) permettant la transduction du signal d'activation. Une dizaine de TLR ont

été identifiés et séparés en deux groupes principaux. Les TLR-1, -2, -4, -5, -6 sont situés au niveau de la membranaire plasmique et sont impliqués dans la reconnaissance des composants de la paroi des agents infectieux. Les TLR-3, -7, -8, -9 sont situés au niveau des endosomes et reconnaissent les composants viraux et bactériens, surtout les acides nucléiques. Les TLR-3, -7, -9 reconnaissent ainsi, respectivement, les ARN db viraux, les ARN simples brins viraux et les motifs CpG bactériens (Figure 8).

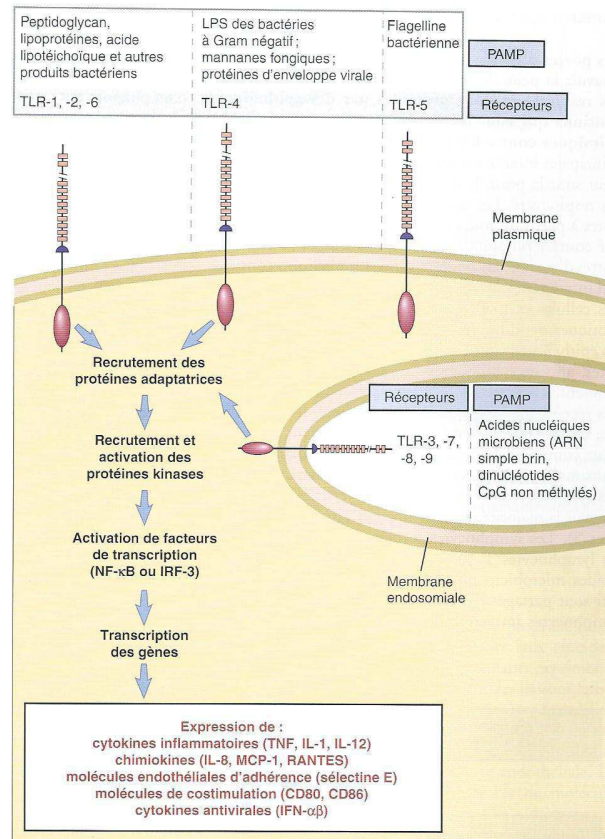


Figure 8 : Spécificités et fonctions des récepteurs de type Toll (TLR), tiré de (17)

L'activation des TLR par leurs différents agonistes va entraîner une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la mise en place d'une réponse antimicrobienne, *via* l'activation de facteurs de transcription comme le NF-κB, AP-1 et les facteurs de transcription IRF (*Interferon Regulatory Factor*) -3, -5 et -7, et la production de médiateurs solubles (cytokines/chimiokines inflammatoires ou antivirales) qui participent collectivement à la réponse inflammatoire aigüe lors de l'infection. L'activation des macrophages alvéolaires par les TLR conduit ainsi, par exemple, à la production de plusieurs cytokines, comme les interleukines (IL) IL-6 et IL-1β et le facteur de nécrose tumorale (TNF, *Tumor Necrosis Factor*), et les chimiokines (IL-8, *Monocyte Chemoattractant Protein* MCP-1, *Regulated And Normal T-cell Expressed and Secreted* RANTES), qui vont faciliter le recrutement des neutrophiles sur le site de l'infection. Lorsque les pathogènes ne sont pas éliminés par la réponse immunitaire innée, les TLR jouent également un rôle dans la mise en place du système immunitaire adaptatif. Les TLR activent les DC, l'expression de molécules de co-stimulation va alors augmenter et

les DC vont produire des cytokines qui vont activer les LT. Les TLR vont également permettre l'induction de la production d'immunoglobulines, les IgG, importantes dans les mécanismes d'opsonisation et d'activation du complément (18).

Si la famille des TLR constitue l'essentiel des récepteurs de l'immunité innée, il existe également deux autres familles qui sont elles cytoplasmiques et qui sont impliqués dans la reconnaissance de composants bactériens et viraux intracellulaires. Les PRR cytoplasmiques correspondent aux récepteurs NLR (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors*) et RLR (*RIG-I-Like Receptors*). Les récepteurs NLR sont une famille d'une vingtaine de protéines situées dans le cytoplasme et reconnaissant presque exclusivement des composants bactériens. Ils recrutent des caspases qui clivent certaines cytokines, en particulier les cytokines inflammatoires comme l'IL-1 se trouvant sous la forme inactive dans le cytoplasme et étant ainsi activées (19). Les récepteurs RLR reconnaissent essentiellement des acides nucléiques viraux, et vont activer toutes les voies de signalisation : NF- κ B, MAP-kinases et interférons (20).

Conclusion

Avec 12 000 litres d'air inspiré chaque jour, le poumon est l'organe le plus exposé à l'environnement extérieur et ses agents nocifs et pathogènes. Dans cette première partie du chapitre, nous avons pu voir que l'appareil respiratoire est organisé structurellement et histologiquement pour assurer sa principale fonction : faire parvenir un air d'une qualité optimale au niveau de la barrière alvéolo-capillaire, siège des échanges gazeux. Nous avons également pu mettre en évidence que l'appareil respiratoire dispose de plusieurs niveaux de défense afin d'assurer son intégrité.

Les barrières mécaniques et physiques vont être responsables de la première ligne de défense lors du contact avec un pathogène. Nous avons ainsi pu voir le rôle central du mucus et de l'escalator muco-ciliaire dans l'épuration des voies de conduction, véritable piège à particules et micro-organismes.

Les barrières immunologiques constituent la seconde ligne de défense de l'appareil respiratoire. Dans ce cadre, nous avons montré que la reconnaissance d'agents du non-soi par les cellules de l'immunité ou de l'épithélium respiratoire va entraîner l'activation des composants de l'immunité innée et, si besoin, des composants de l'immunité adaptative conduisant à la neutralisation et à l'élimination de ces agents.

1.2-L'inflammation, une réaction de défense du système immunitaire

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons vu que la défense de l'appareil respiratoire faisait appel à différents composants de l'immunité innée et de l'immunité acquise. Nous allons maintenant nous concentrer sur ces acteurs du système immunitaire et définir les mécanismes conduisant à la mise en place de la réaction inflammatoire.

Les vertébrés possèdent des systèmes de défense immunitaire très sophistiqués contre les agents pathogènes et nocifs. Deux branches de l'immunité ont été identifiées, l'inné et l'adaptatif. Les défenses immunitaires innées existent chez tous les organismes multicellulaires, alors que seuls les vertébrés sont capables d'avoir une réponse immunitaire adaptative. Ces deux systèmes n'opèrent pas indépendamment l'un de l'autre, ils fonctionnent en interaction et en coopération pour mettre en place la réponse la plus efficace (Figure 9).

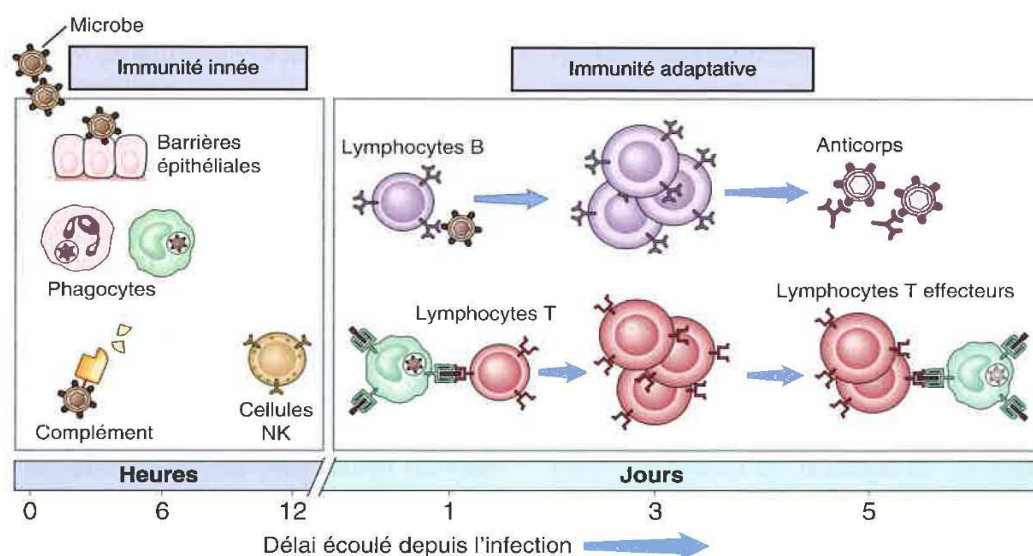


Figure 9 : Principaux mécanismes de l'immunité innée et adaptative. Les mécanismes de l'immunité innée assurent la défense initiale contre les infections. Certains des mécanismes empêchent les infections (par exemple les barrières épithéliales), tandis que d'autres éliminent les micro-organismes (par exemple les phagocytes, les cellules NK et le système du complément). Les réponses immunitaires adaptatives se développent plus tardivement et sont assurées par les lymphocytes et leurs produits. Les anticorps bloquent les infections et éliminent les microbes, et les LT éliminent les microbes intracellulaires. Les cinétiques des réponses immunitaires innées et adaptatives sont des approximations et peuvent varier en fonction des infections. Tiré de (17)

1.2.1-L'immunité innée

Le système immunitaire inné, le plus ancien d'un point de vue évolutif, constitue une première barrière de défense mise en place lors de la période critique qui se situe juste après l'exposition de l'hôte à un pathogène. Ce système se caractérise par sa rapidité de mise en place, son absence de spécificité par rapport à l'agent pathogène et l'absence de

mémorisation de la rencontre avec l'agent agresseur. En général, la plupart des micro-organismes rencontrés par un individu sain sont aisément éliminés en quelques jours par ces mécanismes de défense non spécifique (21).

Après pénétration dans l'organisme, les agents pathogènes sont reconnus par les récepteurs de l'immunité innée, les PRR, dirigés spécifiquement contre des structures conservées entre les différentes classes de pathogènes, les PAMP, non présentes sur les cellules de l'hôte. Ces récepteurs et leurs propriétés ont été largement décrits au paragraphe 1.1.4-c- et ne seront donc pas détaillés à nouveau.

a- Les cellules de l'immunité innée

Le système immunitaire inné est constitué d'épithéliums, de cellules en circulation et présentes dans les tissus ainsi que de plusieurs protéines plasmatiques. Ces éléments jouent des rôles différents mais complémentaires dans le blocage de l'entrée des micro-organismes et dans l'élimination de ceux qui ont réussi à pénétrer dans les tissus de l'hôte.

Les cellules épithéliales

Comme nous l'avons vu pour l'épithélium respiratoire, tous les épithéliums de l'organisme constituent des barrières physiques (continuité assurée par les complexes de jonctions intercellulaires) et chimiques (production de peptides antibactériens) contre les infections (22). En outre, les épithéliums contiennent un certain type de lymphocytes, les lymphocytes intraépithéliaux LT $\gamma\delta$, qui expriment un récepteur à l'antigène particulier (constitué de 2 chaînes γ et δ) présentant une spécificité limitée. Ils libèrent des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines qui leur confèrent un rôle dans la réparation tissulaire et la régulation de l'inflammation. Ils peuvent lyser des cellules infectées et tumorales (23).

Les phagocytes : neutrophiles et monocytes/macrophages

Les deux types de phagocytes circulants, les neutrophiles et les monocytes, sont des cellules sanguines qui sont recrutées au niveau des sites d'infection où ils reconnaissent et ingèrent les micro-organismes afin de les détruire à l'intérieur de la cellule. Les neutrophiles (ou polynucléaires neutrophiles, PNN) sont les leucocytes les plus nombreux du sang. Ils sont le premier type cellulaire à répondre à la plupart des infections bactériennes et fongiques. La production de neutrophiles est stimulée par des cytokines, désignées par le terme de facteurs stimulant la formation de colonies (G-CSF, *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* et GM-CSF, *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*), qui sont produites par de nombreux types cellulaires en réponse aux infections, et agissent sur les cellules souches de la moelle osseuse pour stimuler la prolifération et la maturation des précurseurs des PNN. Les PNN phagocytent les micro-organismes dans la circulation, et ils pénètrent rapidement dans les tissus extravasculaires

au niveau des sites d'infection, où ils phagocytent les micro-organismes puis ils meurent après seulement quelques heures. En plus du mécanisme de phagocytose, les PNN disposent d'autres moyens pour combattre les agents pathogènes. Ils sont en effet capables : i) de produire des puissants oxydants, dérivés de l'oxygène ou de l'azote (ROS, *Reactive Oxygen Species* et RNS, *Reactive Nitrogen Species*), ii) de libérer des peptides antibactériens contenus dans des granules présents dans leur cytoplasme, et iii) de former les pièges neutrophiliques extracellulaires (NET, *Neutrophil Extracellular Traps*) (24). Les NET sont des filaments d'ADN dans lesquels se mélangent les protéines microbicides contenues dans les différents granules des neutrophiles et des histones. Ces NET formant une structure visqueuse vont prévenir la dissémination microbienne, en piégeant les micro-organismes, et permettent d'établir des concentrations importantes de substances antimicrobiennes au voisinage des neutrophiles.

Les monocytes peuvent également phagocyter des micro-organismes dans le sang et les tissus. Ils sont moins nombreux que les PNN mais ils peuvent survivre dans les tissus extravasculaires pendant des périodes beaucoup plus longues. Dans les tissus, les monocytes se différencient en macrophages et ils y exercent la même fonction. Outre leur capacité d'ingestion des particules, les macrophages produisent des cytokines qui recrutent et activent les leucocytes, et vont pouvoir, si nécessaire, présenter l'antigène les LT afin d'amplifier la réponse immunitaire.

Les phagocytes migrent vers les foyers infectieux extravasculaires en se liant, *via* les intégrines présentes à leur surface, aux sélectines, des molécules d'adhérence exprimées par les cellules endothéliales. La neutralisation des agents pathogènes et nocifs par les PNN et les monocytes s'effectue donc par phagocytose. Celle-ci s'effectue en 3 étapes. D'abord, la particule inerte ou infectieuse est ingérée par endocytose : la membrane cytoplasmique du phagocyte forme des pseudopodes qui englobent l'antigène sous forme de phagosome. Celui-ci va alors fusionner avec le lysosome pour former le phagolysosome. Simultanément à la reconnaissance et à l'ingestion de la particule, les PRR vont émettre des signaux intracellulaires, activant ainsi différentes enzymes. Parmi elles, une oxydase va convertir l'oxygène moléculaire en radicaux oxygénés (ROI, *Reactive Oxygen Intermediate*) toxiques pour les micro-organismes, et une synthase inductible du monoxyde d'azote (NO) catalyse la conversion d'arginine en NO microbicide. La digestion des particules a alors lieu, au sein des phagolysosomes, grâce à l'action combinée des protéases lysosomiales, des ROI et du NO (25).

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques, différenciées à partir des monocytes circulants, sont des cellules également douées de phagocytose. Elles vont épurer les sites inflammatoires des cellules apoptotiques et nécrotiques. Comme nous l'avons vu précédemment, les DC sont des APC, capables d'activer les LT naïfs. Elles sont responsables du maintien de la tolérance au soi et font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les

cellules dendritiques immatures sont caractérisées par une forte capacité d'internalisation et une faible capacité de stimulation des LT. Après activation par phagocytose de l'agent pathogène, elles vont sécréter différentes cytokines comme l'INF- γ et l'IL-6 qui orienteront essentiellement les lymphocytes vers une réponse cellulaire de type Th1, et les cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 vers une réponse humorale de type Th2. Ces cytokines vont également permettre le recrutement des PNN et des macrophages (26).

Les cellules NK

Les cellules tueuses naturelles (NK, *Natural Killer*), retrouvées au niveau de la circulation sanguine et dans de nombreux tissus dont la rate, les poumons, le foie, etc, ont une activité cytotoxique non spécifique et sont impliquées dans les défenses immunitaires. Elles produisent un grand nombre de cytokines importantes dans l'immunité, notamment de l'interféron (IFN) et jouent ainsi un rôle dans la régulation immunitaire. Les cellules NK semblent utiliser des processus semblables à ceux mis en place par les lymphocytes T cytotoxiques (LTc), qui peuvent être subdivisés en trois principaux mécanismes. Les granules présents dans le cytoplasme des cellules NK contiennent de la perforine et des granzymes qui seront libérés après fixation de la cellule cible à une cellule NK. Les LTc ne contiennent pas ces granules avant d'avoir été activés. Les cellules NK possèdent également des récepteurs à domaine de mort, les TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*), les TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) et les Fas-Ligand, qui vont permettre d'induire l'apoptose des cellules cibles. Et enfin, ces cellules possèdent le marqueur CD16 à leur surface, qui est un récepteur du fragment Fc des IgG. Ainsi, les cellules ou organismes recouverts d'anticorps pourront être reconnus par les cellules NK et seront alors lysés. Ce mécanisme est connu sous le nom de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, *Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity*). Les cellules NK prennent pour cible de destruction les cellules infectées ou tumorales ayant une expression aberrante du CMH de classe I (CMH-I). La régulation de la cytotoxicité des NK se fait par l'expression des molécules du CMH-I sur les cellules cibles. De manière générale, la présence de CMH-I fournit un signal inhibiteur aux NK et c'est l'absence ou l'altération des molécules de CMH-I à la surface des cellules infectées ou tumorales qui permet leur activation (27).

Les autres classes de lymphocytes

Les cellules NK-T, dont certaines expriment des molécules de surface typique des cellules NK, sont présentes dans les épithéliums et les organes lymphoïdes et ont une activité cytolytique spontanée comme les cellules NK. Elles reconnaissent les lipides microbiens liés à une molécule apparentée au CMH-I, appelée CD1. Ces cellules régulent l'immunité par leur libération de cytokines et participent, entre autre, à l'auto-immunité en assurant le maintien de la tolérance aux antigènes de l'hôte (28).

Certaines sous-populations de LB, les lymphocytes B-1 par exemple, sont capables de répondre à des micro-organismes et aux toxines bactériennes en produisant des anticorps précoces. La plupart des IgM circulants se trouvant dans le sang des individus normaux, sont les produits des lymphocytes B-1, et un grand nombre de ces anticorps sont spécifiques des glucides présents dans les parois bactériennes. Ainsi, certaines populations de lymphocytes réagissent comme si elles participaient à l'immunité adaptative (production d'anticorps) mais elles ont des caractéristiques de l'immunité innée (rapidité des interventions et diversité limitée de reconnaissance de l'antigène) (29).

Le système du complément

Le système du complément est un ensemble de protéines du sérum et de la surface cellulaire qui interagissent les unes avec les autres, ainsi qu'avec d'autres molécules du système immunitaire pour générer des effecteurs importants des réponses immunitaires innées ou adaptatives. Il existe 3 voies d'activation du complément qui diffèrent par la manière dont elles sont initiées. La voie classique est activée par les complexes antigène-anticorps, la voie alternative par les surfaces microbiennes et la voie des lectines par les lectines plasmatiques qui se lient aux micro-organismes. Chaque voie d'activation du complément est composée d'une cascade d'enzymes protéolytiques qui produit des médiateurs inflammatoires et des opsonines, et entraîne la formation d'un complexe lytique qui s'insère dans les membranes cellulaires, nommé complexe d'attaque membranaire (MAC, *Membran Attack Complex*). Les composants centraux du complément sont les protéines plasmatiques C3 et C5, qui est clivée en fragments (C3a, C3b, C5a, C5b) par des enzymes produites dans les étapes initiales. Le système du complément exerce 3 fonctions dans les défenses de l'hôte. En premier lieu, la protéine C3b recouvre les micro-organismes (opsonisation) et favorise ainsi leur prise en charge par les phagocytes. En second lieu, certains fragments, notamment C3a et C5a, sont chimiotactiques pour les phagocytes et favorisent le recrutement leucocytaire (inflammation) au site d'activation du complément. En troisième lieu, l'activation du complément entraîne la formation du MAC causant une lyse osmotique ou la mort apoptotique de l'agent infectieux (30).

b- Les cytokines de l'immunité innée

Les cytokines sont des protéines régulatrices solubles, de faible masse moléculaire, ou des glycoprotéines sécrétées par les cellules immunitaires et par de nombreuses autres cellules de l'organisme en réponse à différents stimulus. Ces molécules participent à la régulation du développement des cellules immunitaires effectrices, et certaines possèdent par elles-mêmes des fonctions effectrices directes.

Les cytokines de l'immunité innée exercent des fonctions variées dans les défenses de l'hôte. Le TNF, l'IL-1 et les chimiokines (cytokines chimiotactiques) sont les principales cytokines participant au recrutement des PNN et des monocytes sanguins dans

les foyers infectieux. Les DC et les macrophages produisent également de l'IL-12, en réponse au LPS et à d'autres molécules microbiennes, qui va stimuler la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK, qui à son tour active les macrophages permettant une amplification de la réponse antimicrobienne. Dans les infections virales, les DC, les macrophages et les autres cellules infectées produisent des interférons de type I, les IFN- α et - β , qui inhibent la réplication virale et empêchent la propagation de l'infection aux cellules non infectées.

1.2.2-L'immunité adaptative

Bien que la réponse immunitaire innée soit en mesure de combattre de manière efficace un grand nombre d'infections, de nombreux pathogènes sont capables d'y échapper ou de la surpasser. La défense contre ces agents infectieux incombe alors à la réponse immunitaire adaptative, qui fait intervenir les lymphocytes et leurs produits, notamment les anticorps. L'immunité adaptative possède quatre propriétés caractéristiques : spécificité antigénique, diversité, mémoire immunitaire et reconnaissance du soi et du non-soi.

La spécificité antigénique du système immunitaire permet la distinction de millions d'antigènes ou de parties d'antigènes différents. Cette spécificité et cette diversité remarquable reposent sur le fait que les lymphocytes expriment des récepteurs de manière clonale, chaque clone exprimant un récepteur d'antigène qui diffère des autres clones. Ces récepteurs permettent la reconnaissance de nombreuses structures spécifiquement différentes sur des antigènes étrangers. Pour ce faire, plusieurs mécanismes de réarrangements et de recombinaisons aléatoires ont été recensés : la recombinaison aléatoire des segments géniques codant pour les sous-unités des différents récepteurs de surface ; l'imprécision de la jonction qui doit se faire entre les différents segments de gènes qui doivent être raccordés ; les multiples combinaisons possibles d'appariement des différentes chaînes des récepteurs ; et pour les récepteurs des LB, l'apparition de mutations somatiques dans les régions variables des chaînes des Ig. Cette stratégie permet la reconnaissance de nombreux antigènes et la mise en place de la réponse, qui se traduit par l'activation des cellules et l'expansion clonale ainsi que la formation des cellules mémoires. La mémoire immunitaire permet, lors d'une seconde rencontre de l'organisme avec l'antigène, une réponse beaucoup plus rapide et une protection pouvant durer toute la vie contre de nombreux agents infectieux. Le système immunitaire ne répond normalement qu'aux antigènes étrangers, suggérant qu'il est capable d'une reconnaissance du soi et du non soi. Néanmoins, des mécanismes d'élimination des récepteurs auto-réactifs peuvent être mis en place afin d'éviter une réponse inappropriée aux molécules du soi qui pourrait être fatale.

a- Les effecteurs de l'immunité adaptative

Les lymphocytes sont les seules cellules qui portent des récepteurs spécifiques d'antigènes, et sont par conséquent les médiateurs essentiels de l'immunité adaptative. Bien que tous les lymphocytes soient morphologiquement similaires, leurs fonctions et leurs phénotypes sont extrêmement hétérogènes, et ils sont capables de réponses et d'actions biologiques complexes. A l'heure actuelle, ces cellules sont souvent distinguées par leurs protéines de surface, nommées CD (*Cluster of Differentiation*), qui peuvent être identifiées par différents anticorps monoclonaux. Les trois principaux types de lymphocytes sont les LB, les LT et les cellules NK, ces dernières participant également à l'immunité innée (Figure 10). En fonction de l'agent pathogène impliqué et des médiateurs sécrétés par les cellules de l'immunité innée, la réponse immune adaptative va pouvoir être modulée en 2 types de réponses :

- La réponse humorale agit contre les agents pathogènes extracellulaires, et fait intervenir les LB.
- La réponse cellulaire agit contre les cellules infectées par un agent pathogène et les cellules cancéreuses, et fait intervenir les LT.

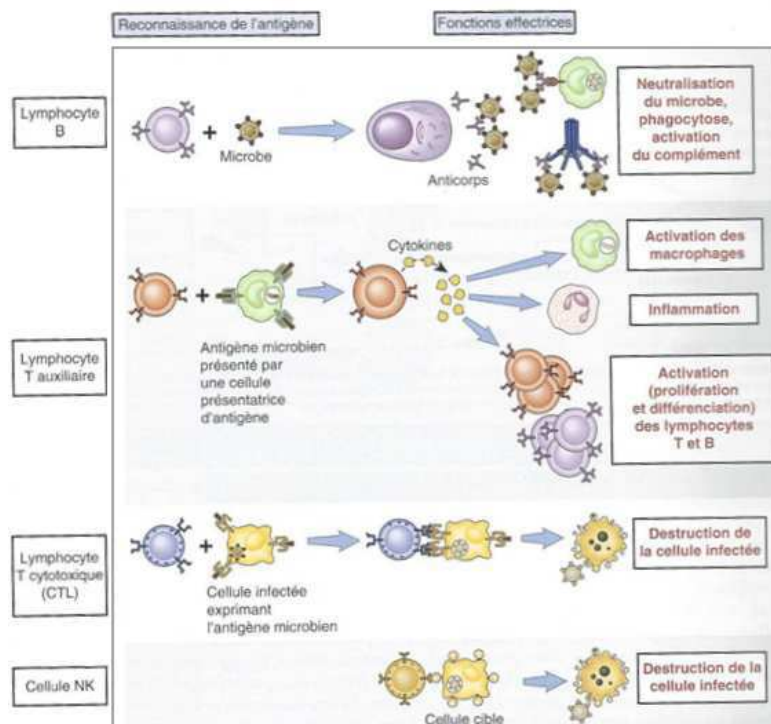


Figure 10 : Les classes de lymphocytes. Tiré de (17)

Les lymphocytes B, médiateurs de l'immunité humorale

L'immunité humorale a pour principal moyen d'action des immunoglobulines produites par les plasmocytes (forme effectrice des LB), les anticorps. Les LB arrivent à maturation au sein de la moelle osseuse puis migrent dans les tissus lymphoïdes. Ils expriment sur leur membrane des récepteurs de liaison spécifiques à un antigène, appelé

anticorps membranaire ou BCR (*B-cell Receptor*). Lorsqu'un LB naïf rencontre pour la première fois l'antigène natif reconnu par son BCR, la liaison antigène-anticorps provoque la division rapide de la cellule (expansion clonale) et sa différenciation en LB mémoire ou en plasmocyte. Les LB mémoire ont une durée de vie plus longue que les LB naïfs et expriment le même BCR que le LB naïf dont ils sont issus. La mémoire permet d'optimiser la capacité du système immunitaire à combattre les infections persistantes et récurrentes. Les plasmocytes n'expriment plus le BCR mais produisent l'anticorps sous une forme sécrétée.

Les anticorps ont trois fonctions essentielles. La neutralisation consiste en la fixation des anticorps membranaires sur des pathogènes extracellulaires ou leurs toxines, empêchant ainsi leur accès aux cellules qu'ils pourraient infecter et détruire. Les anticorps sécrétés peuvent également se fixer sur les pathogènes et rendent les phagocytes aptes à ingérer et détruire la bactérie ou le virus par reconnaissance de la partie constante Fc des anticorps qui recouvrent le pathogène, on parle d'opsonisation. L'opsonisation regroupe d'ailleurs tous les processus par lesquels une molécule (anticorps ou opsonines non spécifiques comme les facteurs du complément) recouvre la membrane d'une cellule cible (bactérie, cellule infectée) pour favoriser sa phagocytose. Enfin, les anticorps complexés à un antigène activent la voie classique du complément.

Les anticorps sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines composées de 2 chaînes lourdes H identiques et de 2 chaînes légères L identiques jointes par des ponts disulfures, avec pour chaque chaîne une partie constante (Fc) et une partie variable (Fv). Les régions variables sont impliquées dans les fonctions de reconnaissance de l'antigène, tandis que la région constante est responsable des fonctions effectrices de l'anticorps. Il existe ainsi 5 classes d'anticorps : IgG, IgA, IgM, IgE et IgD, dont les propriétés diffèrent. Les LB naïfs expriment 2 classes d'anticorps liés à la membrane, les IgM et les IgD, qui servent de récepteurs mais présentent peu d'affinité pour l'antigène. Au cours de leur différenciation, les LB peuvent commencer à produire des anticorps présentant différentes classes de chaînes lourdes, passant de l'IgM à l'IgG, à l'IgE ou à l'IgA, c'est la commutation de classe. Ces Ig présentent un plus grand nombre de sites de liaison à l'antigène et donc une plus grande affinité. En complément, l'exposition répétée à un antigène protéique entraîne, dans les centres germinatifs, la production et la sélection d'anticorps avec une affinité croissante pour l'antigène (maturation d'affinité), permettant une élimination plus efficace des agents pathogènes impliqués.

Les lymphocytes T, médiateurs de l'immunité cellulaire

Les LT proviennent eux aussi de la moelle osseuse mais, à la différence des LB, ils migrent vers le thymus où ils mûrissent. Lors de la maturation thymique, le LT acquiert l'expression de son récepteur spécifique d'un antigène appelé TCR (*T-Cell Receptor*). Le LT ne reconnaît l'antigène que si celui-ci est présenté par les APC sur des molécules du

CMH. Lorsqu'un LT naïf rencontre un complexe peptide/CMH à la surface d'une APC, il prolifère et se différencie en LT mémoire ou en LT effecteur.

Les LT naïfs exprimant le co-récepteur CD8 deviennent des LT cytotoxiques. Les LT CD8⁺ reconnaissant des complexes CMH-I se différencient en L_Tc qui vont lyser les cellules agressées et sécréter des cytokines, notamment de l'IFN- γ et de l'IL-2.

Les LT naïfs exprimant le co-récepteur CD4 deviennent, quand à eux, des LT auxiliaires (Th, *T-helper*). Les lymphocytes Th se différencient en sous-populations : les LT régulateurs (LTreg), les lymphocytes Th1, les lymphocytes Th2 et les lymphocytes Th17. Le sort de la descendance des cellules CD4⁺ naïves dépend des signaux provenant de l'environnement local, particulièrement dépendant de la sensibilisation de l'APC. En l'absence de pathogène, la présence de TGF β , et l'absence de cytokines inhibitrices, favorise le développement de LTreg adaptatives exprimant Foxp3. En début d'infection, l'IL-6 produite par les DC, associée au TGF β , induit des cellules Th17 qui expriment le facteur de transcription ROR- γ T, produisent de l'IL-17 impliquée dans le recrutement de neutrophiles, et interviennent ainsi dans la régulation des réponses inflammatoires et dans la lutte antibactérienne (31). Plus tard, les DC et les autres APC produisent un panel de cytokines, orientant ainsi la réponse immunitaire vers des voies distinctes : Th1 ou Th2. Les cellules Th1 sont ainsi définies par leur capacité à produire l'IL-2 et l'IFN- γ , favorisant la mise en place d'une réponse cellulaire cytotoxique spécifique des pathogènes intracellulaires, tandis que les cellules Th2 sécrètent un panel de cytokines différent, incluant l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13, qui va orienter le système immunitaire vers une réponse humorale. Ces cytokines agissent de manière spécifique en activant les protéines STAT (32). Les cellules Th1 et Th2 expriment respectivement les facteurs de transcription T-bet et GATA-3 (Figure 11).

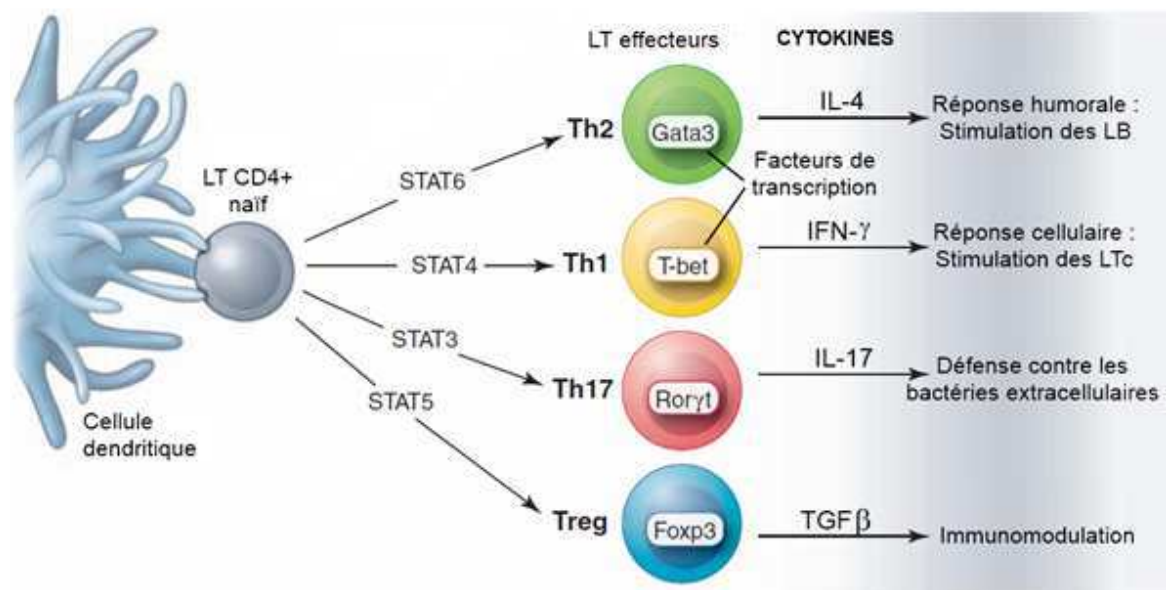


Figure 11 : Différenciation des LT auxiliaires. Adapté de (33)

b- Le processus de présentation de l'antigène par les APC

L'activation des LT auxiliaires est un évènement crucial dans l'induction d'une réponse immunitaire adaptative. Comme nous venons de le voir, contrairement aux cellules B qui lient directement l'antigène, les LT ne reconnaissent l'antigène qu'en association avec des produits du CMH exprimés à la surface des APC. Cet évènement de reconnaissance est appelé présentation de l'antigène.

Le CMH est un locus génique dont les gènes codent pour les molécules d'histocompatibilité. Les gènes du CMH sont répartis en trois classes :

- Les gènes de classe 1 codent pour les molécules de classe 1 du CMH, ou CMH-I. Les plus importants sont les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C qui codent pour les molécules du même nom. Les molécules du CMH-I permettent la présentation du peptide antigénique aux LT CD8+.
- Les gènes de classe 2 codent pour les molécules de classe 2 du CMH, ou CMH-II. Les plus importantes sont les gènes HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR qui codent pour les molécules du même nom. Les molécules du CMH-II permettent la présentation du peptide antigénique aux LT CD4+.
- Les gènes de classe 3 codent pour des molécules n'intervenant pas dans la présentation de l'antigène mais codant pour d'autres molécules jouant un rôle dans les défenses immunitaires.

Les molécules du CMH ne lient que des peptides et non d'autres types d'antigènes. Ainsi seuls les antigènes protéiques vont pouvoir être reconnus par les LT.

Présentation par les molécules du CMH-I

Les molécules du CMH-I vont présenter les peptides antigéniques produits dans la cellule, correspondant soit aux antigènes du soi (protéines tumorales), soit aux antigènes provenant de virus mais synthétisés par la cellule. Autrement dit, ne sont pris en charge par les molécules du CMH-I que les peptides endogènes provenant du cytoplasme. Les molécules antigéniques vont être dégradées par le protéasome en peptides de taille bien définie (9 acides aminés).

Les 2 chaînes polypeptidiques composant les molécules du CMH-I vont être synthétisées, de manière indépendante, dans le réticulum endoplasmique (RE) de la cellule nucléée. La chaîne α et la chaîne β 2-microglobuline vont alors former un complexe avec des protéines chaperonnes (calréticuline, calnexine, tapasine) afin de maintenir une conformation permettant l'association au peptide antigénique. Ce complexe protéique s'associe ensuite à deux molécules, TAP-1 et TAP-2, présentes dans la membrane du RE pour former un canal permettant le passage des peptides antigéniques formés dans le cytoplasme. Une fois dans la lumière du RE, le peptide antigénique se fixe

dans la région de liaison au peptide antigénique, les protéines chaperonnes se détachent du complexe qui migre vers la membrane plasmique *via* l'appareil de Golgi.

Présentation par les molécules du CMH-II

Les molécules du CMH-II vont présenter les peptides antigéniques produits à l'extérieur de la cellule, correspondant soit à des agents pathogènes soit à des corps apoptotiques. Ainsi seuls les peptides exogènes provenant du milieu extracellulaire et internalisés par endocytose sont pris en charge par ces molécules. L'antigène sera cette fois-ci dégradé par le système endo-lysosomal en peptides de taille variable (entre 12 et 25 acides aminés).

A leur tour, les 2 chaînes polypeptidiques composant les molécules du CMH-II vont être synthétisées, de manière indépendante, dans le RE de l'APC et vont former un complexe avec une protéine désignée par le terme chaîne invariante. Cette chaîne invariante possède un segment transmembranaire et une séquence CLIP (*CLass II Invariant chain Peptide*), capable de s'associer avec la région de liaison au peptide antigénique. Dès lors que ce complexe est formé, il migre vers l'appareil de Golgi dans une vésicule d'endocytose. Celle-ci fusionne ensuite avec la vésicule endosomiale contenant les peptides dégradés. Au niveau de ces vésicules se trouvent d'autres molécules jouant un rôle indispensable dans l'expression des molécules du CMH-II à la membrane plasmique, ce sont les protéines HLA-DM. En effet, elles permettent le remplacement du fragment CLIP par un fragment antigénique. La structure en cavité ouverte des molécules du CMH-II permet une certaine variabilité dans la taille du peptide qui s'y associera. Une fois le peptide chargé, le complexe est envoyé à la membrane plasmique de l'APC.

1.2.3-L'inflammation

L'inflammation ou réaction inflammatoire correspond à l'ensemble des phénomènes réactionnels qui se produisent en un point donné, en réponse à des dommages cellulaires ou tissulaires. Les causes de l'inflammation sont nombreuses et variées : infection (bactérie, virus, parasites, champignons), agents physiques (traumatisme, chaleur, froid, radiations), agents chimiques (caustiques, toxines, venins), corps étrangers (exogènes ou endogènes). Le processus inflammatoire comprend :

- des phénomènes généraux, exprimés biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement de façon variable, le plus souvent par de la fièvre et éventuellement une altération de l'état général.
- des phénomènes locaux : l'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé. Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire mais ils peuvent être altérés par l'agression qui

déclenche l'inflammation puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation.

a- L'inflammation aiguë

L'inflammation commence par une réaction de reconnaissance, faisant intervenir certaines cellules de l'organisme (monocytes, macrophages, lymphocytes) ou des protéines circulantes (anticorps, protéines du complément, ...). A la phase de reconnaissance fait suite la mise en jeu séquentielle de tout un ensemble de cellules et de médiateurs dont l'ordre d'intervention est complexe et variable. Certains médiateurs, comme les prostaglandines et les cytokines, sont produits par différents types cellulaires, agissent sur plusieurs types cellulaires et contrôlent parfois leur propre production par régulation rétroactive. Quel que soit son siège et la nature de l'agent pathogène, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs. Néanmoins, les différentes étapes présentent des variations liées à la nature de l'agent pathogène, l'organe où elle se déroule, le terrain physiologique de l'hôte : tous ces éléments conditionnent l'intensité, la durée de la réaction inflammatoire et l'aspect lésionnel. La réaction inflammatoire aiguë est un processus dynamique comportant plusieurs étapes successives : la phase vasculaire, la phase cellulaire, la détersion et la phase de résolution.

La phase vasculaire

Elle se traduit cliniquement par les quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation aiguë : rougeur, chaleur, tuméfaction, douleur. Elle comporte trois phénomènes : une congestion active, un œdème inflammatoire (l'exsudat), et une diapédèse leucocytaire.

La congestion active est une modification du calibre vasculaire qui apparaît très rapidement, après une brève vasoconstriction, et consiste en une vasodilatation artériolaire puis capillaire dans la zone atteinte. Localement, il en résulte une augmentation de l'apport sanguin et un ralentissement du courant circulatoire. Les petits vaisseaux sont dilatés et gorgés d'hématies. La congestion est déclenchée par un mécanisme nerveux (nerfs vasomoteurs) et l'action de médiateurs chimiques.

L'œdème inflammatoire correspond au passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses, d'un liquide, appelé exsudat, fait d'eau et de protéines plasmatiques. Sa traduction clinique est un gonflement des tissus qui, en comprimant des terminaisons nerveuses, est responsable de la douleur (également provoquée par certains médiateurs chimiques). L'œdème inflammatoire résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation, et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques, dont l'histamine. L'œdème va permettre un apport local de médiateurs chimiques et de moyens de défense (immunoglobulines, facteurs de la coagulation, facteurs du complément), une dilution des

toxines accumulées dans la lésion, une limitation du foyer inflammatoire par une barrière de fibrine (à partir du fibrinogène plasmatique), évitant la diffusion de micro-organismes infectieux, et un ralentissement du courant circulaire par hémococoncentration, ce qui favorise le phénomène suivant, la diapédèse leucocytaire (Figure 12).

La diapédèse leucocytaire consiste en la migration des leucocytes en dehors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel. Elle intéresse d'abord les polynucléaires (pendant les 6 à 24 premières heures), puis un peu plus tard (en 24 à 48 heures) les monocytes et les lymphocytes. Il s'agit d'une traversée active des parois vasculaires qui comporte plusieurs étapes : i) la margination des leucocytes à proximité des cellules endothéliales, favorisée par le ralentissement du courant circulaire, ii) l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales, par la mise en jeu de molécules d'adhésion (intégrines, sélectines, *Cell Adhesion Molecules* : ICAM, VCAM) présentes sur la membrane des leucocytes et sur l'endothélium, et iii) le passage trans-endothélial des leucocytes. Les leucocytes émettent des pseudopodes qui s'insinuent entre les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales puis ils traversent la membrane basale grâce à une dépolymérisation transitoire provoquée par leurs enzymes.

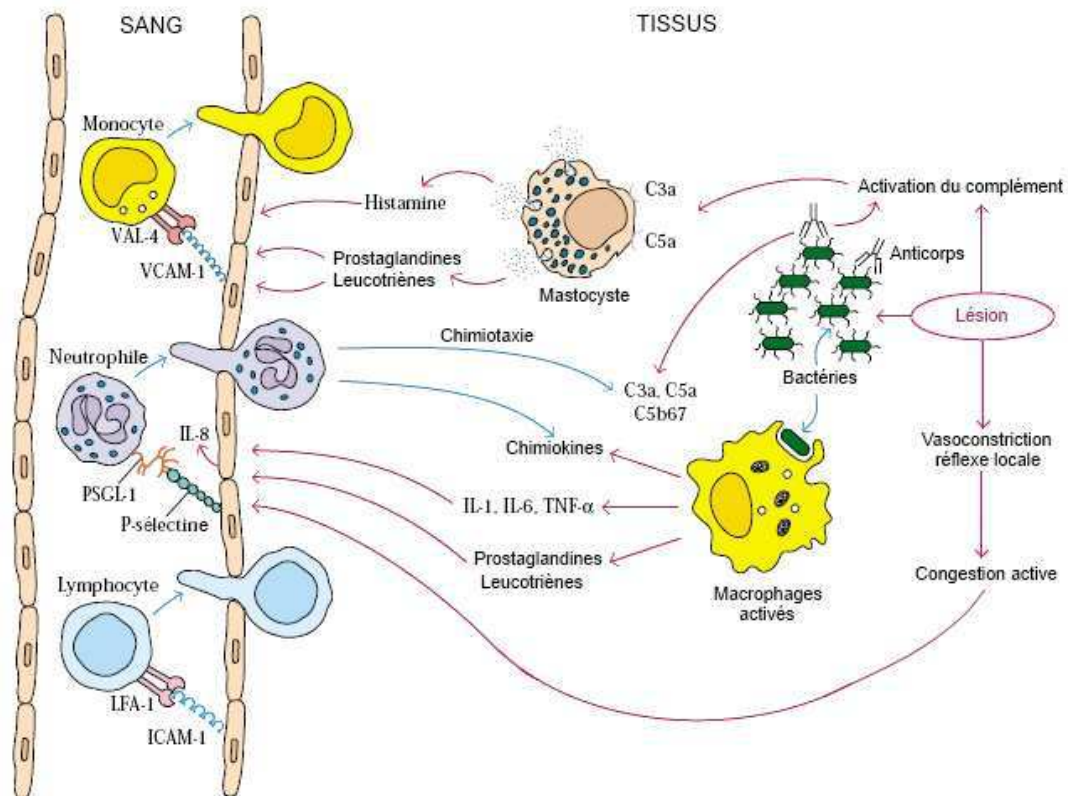


Figure 12 : Diapédèse leucocytaire. Adapté de (34)

En plus des leucocytes déjà abordés dans ce manuscrit (monocytes, lymphocytes et PNN), la réaction inflammatoire va faire intervenir d'autres types de leucocytes, les basophiles et les éosinophiles, ainsi que des cellules granuleuses, les mastocytes. Les **basophiles** sont les plus rares des leucocytes circulants (0,5%) mais ils sont avec les mastocytes, les cellules portant le plus de récepteurs membranaires aux IgE, impliqués

dans la réaction d'hypersensibilité immédiate et les chocs anaphylactiques (réactions allergiques exacerbées). Après activation, ils vont sécréter différentes molécules, en particulier de l'histamine. L'histamine va augmenter la perméabilité des capillaires sanguins, ouvrant ainsi la voie à la diapédèse des autres cellules de l'inflammation comme les neutrophiles, les lymphocytes et vont activer le complément. Les basophiles vont plutôt orienter la réponse immunitaire vers une réponse Th2, *via* la production d'IL-4 et d'IL-9 (35). Les **éosinophiles** (ou polynucléaires éosinophiles, PNE) représentent 2 à 5% des leucocytes circulants et jouent un rôle dans l'immunité antiparasitaire. Ils vont s'attaquer aux parasites de l'organisme, sans les phagocyter. Après fixation, les PNE vont déverser le contenu de leurs granules contenant des substances toxiques : les ESPG (*Eosinophil Specific Granule Proteins*), comme les protéines MBP-1 et MBP-2 (*Major Basic Protein-1 et -2*) et des enzymes comme l'EPO (*Eosinophil peroxydase*), capable de former des ROS en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), et l'ECP (*Eosinophil Cationic Protein*), une RNase présentant des activités antiparasitaires et antibactériennes. Les PNE sécrètent un grand nombre de cytokines et de chimiokines dont le GM-CSF, l'IL-3, l'IL-5 et l'éotaxine, qui vont avoir des actions autocrines sur la différenciation et la multiplication cellulaire, mais aussi sur le recrutement des macrophages et des PNN (36). Les **mastocytes**, riches en histamine et en récepteurs aux IgE, sécrètent de l'héparine, des chondroïtines sulfates et des protéases (tryptase, chymase, cathepsine G et carboxypeptidase A), aux propriétés antibactériennes et antiparasitaires. Comme les neutrophiles, les mastocytes sont également capables de former des pièges extracellulaires (MCET, *Mast Cell Extracellular Traps*). Les mastocytes sécrètent différents médiateurs de l'inflammation : de la sérotonine (neuromédiateur), des leucotriènes et des prostaglandines impliqués respectivement dans la broncho-constriction et la contraction des muscles lisses, et des cytokines. Ils vont libérer les mêmes cytokines (IL-4 et IL-9) que les basophiles qui vont entraîner leur auto-activation, favoriser le recrutement des neutrophiles, ainsi qu'activer et orienter la réponse immunitaire vers un type humoral. Il a par ailleurs été montré que les mastocytes pouvaient réguler l'environnement pro-inflammatoire en sécrétant de l'IL-10, puissante cytokine anti-inflammatoire, ce qui confère aux mastocytes un rôle important dans le contrôle de la réaction inflammatoire (37).

La phase cellulaire

La phase cellulaire correspond à l'afflux extravasculaire des leucocytes, et se caractérise par la formation du granulome inflammatoire. Le foyer inflammatoire s'enrichit rapidement en cellules provenant :

- du sang (polynucléaires, monocytes et lymphocytes). Après diapédèse, ces cellules quittent le territoire péri-vasculaire et migrent vers le foyer lésionnel par chimiotactisme. Les agents chimiotactiques, produits par les tissus altérés, par des bactéries et par les leucocytes déjà présents dans le foyer inflammatoire

(leucotriène B₄, IL-8, C5a, ...), se fixent sur des récepteurs membranaires des leucocytes, ce qui conduit à l'activation du cytosquelette et à la mobilisation du leucocyte.

- du tissu conjonctif local (fibroblastes, cellules endothéliales, et macrophages résidents). Localement des cellules vont se multiplier (fibroblastes, lymphocytes, cellules endothéliales, et à un moindre degré macrophages) et des cellules vont se transformer ou se différencier.

La conséquence est une accumulation de polynucléaires dont les enzymes sont libérées dans le foyer inflammatoire. Les neutrophiles, comme les macrophages, sont capables de phagocyter les différents pathogènes pour les détruire. Ils sont également capables de libérer dans l'environnement extracellulaire des molécules à activité antimicrobienne comme les ROS et les RNS, des peptides cationiques (lysozyme, BPI *Bactericidal/Permeability-Increased protein*, cathelicidine), des protéases à serine (NSP, *Neutrophil Serine Proteinases*) mais aussi des molécules pro-inflammatoires (cytokines et metalloprotéases matricielles (MMP, *Matrix MetalloProteinases*). On observe également une modification des fibroblastes en myofibroblastes, qui acquièrent ainsi des propriétés contractiles et de synthèse des constituants de la matrice extracellulaire.

Détersion

Elle succède progressivement à la phase vasculaire, et est contemporaine de la phase cellulaire. La détersion peut être comparée à un nettoyage du foyer lésionnel : c'est l'élimination des tissus nécrosés (issus de l'agression initiale ou du processus inflammatoire lui-même), des agents pathogènes et du liquide d'exsudat. On peut alors observer la formation, sur le lieu de l'infection, d'un liquide jaunâtre, le pus, qui va contenir des granulocytes neutrophiles ou des macrophages, des débris cellulaires, des cellules mortes ou mourantes. La détersion s'effectue selon 2 mécanismes : i) la détersion interne, où les tissus nécrosés et certains agents pathogènes (micro-organismes infectieux, corps étrangers) sont éliminés par phagocytose, tandis que le liquide d'œdème et le pus sont drainés dans la circulation lymphatique et résorbés par les macrophages (pinocytose) ; ii) la détersion externe, qui peut être spontanée (liquéfaction de matériel nécrosé et élimination par fistulisation à la peau ou dans un conduit bronchique, urinaire, intestinal), ou chirurgicale, parage souvent indispensable lorsque les lésions sont trop étendues ou souillées.

Résolution de l'inflammation et réparation tissulaire

Lorsque les pathogènes sont éliminés, la réponse inflammatoire va diminuer d'intensité. Il va y avoir un équilibre entre les cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires. Cet équilibre va induire une diminution de l'expression des intégrines au niveau des cellules endothéliales, ce qui va permettre de diminuer le recrutement des différents leucocytes. Les neutrophiles présents sur le site vont entrer en apoptose et vont

être éliminés par phagocytose par les macrophages. Contrairement à la nécrose, l'apoptose permet aux neutrophiles de ne pas libérer leurs granules dans le milieu extracellulaire et donc de diminuer l'état inflammatoire. Dans certaines conditions, les neutrophiles vont retarder ce processus apoptotique, faisant persister l'état inflammatoire. La phagocytose des neutrophiles apoptotiques va alors entraîner une vive diminution de la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-8 et le TNF- α par les macrophages, participant ainsi à la résolution de l'inflammation.

La réparation tissulaire suit une détersion complète. Elle peut aboutir à une cicatrice si le tissu lésé ne peut se régénérer ou lorsque la destruction tissulaire a été très importante et/ou prolongée. Le processus de réparation implique de nombreux facteurs de croissance et des interactions complexes entre les cellules et la matrice extracellulaire pour réguler les proliférations et biosynthèses cellulaires. Les étapes de la réparation tissulaire sont les suivantes : i) constitution d'un nouveau tissu conjonctif (bourgeon charnu) qui va remplacer les tissus détruits au cours de l'inflammation et qui va évoluer vers ii) la constitution d'une cicatrice, formée d'un tissu conjonctif fibreux prenant la place des tissus détruits, ou vers iii) la régénération épithéliale. Celle-ci apparaît parallèlement à la réparation conjonctive. Les cellules épithéliales détruites sont remplacées par la prolifération des cellules épithéliales saines situées autour du foyer inflammatoire.

b- L'inflammation chronique

L'environnement pro-inflammatoire va permettre l'élimination des pathogènes mais peut devenir délétère pour l'organisme si cet état inflammatoire persiste. En effet, les métabolites toxiques (ROS, RNS) et les protéases, en particulier les NSP, libérés dans l'espace extracellulaire, sont capables de détruire les protéines de structure des parois cellulaires comme l'élastine et le collagène, ainsi que des constituants majeurs de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et les laminines, causant ainsi des lésions tissulaires et libérant des petits peptides chimio-attractants qui vont induire un nouveau recrutement de neutrophiles et la perpétuation de l'état inflammatoire, on parle alors d'inflammation chronique (Figure 13).

Les inflammations chroniques n'ont aucune tendance à la guérison spontanée et évoluent en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années, à l'origine de nombreuses pathologies. Ce ne sont pas toujours les mêmes mécanismes qui sont mis en jeu : dans de rares cas, il peut y avoir persistance du stimulus inflammatoire (agent infectieux, physique ou toxique persistant), mais souvent, il est difficile de mettre en évidence le stimulus déclenchant, comme c'est le cas des allergies ou des maladies auto-immunes, où une altération de la régulation du système immunitaire est souvent observée.

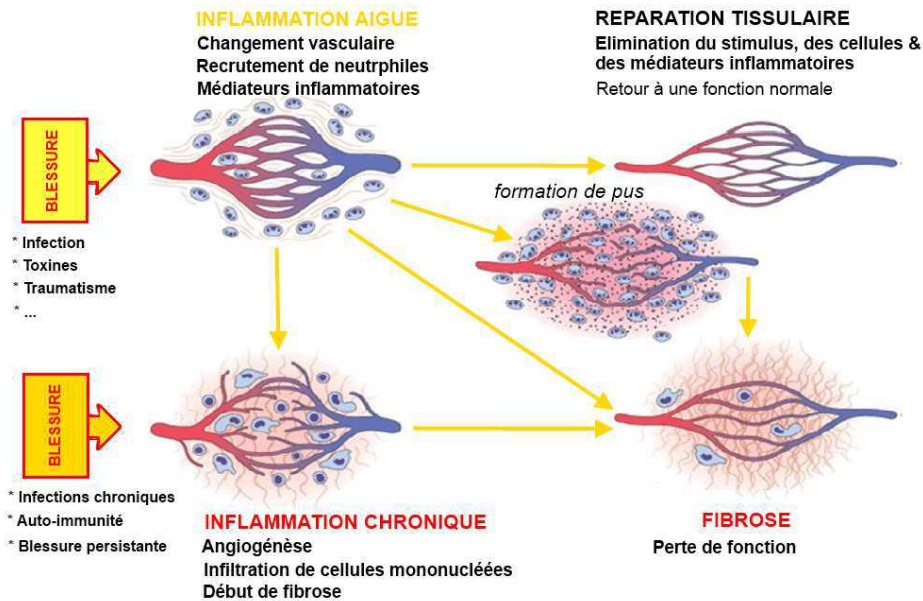


Figure 13 : Résolution des inflammations aiguës et chroniques

c- Les pathologies inflammatoires pulmonaires

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique pour l'organisme puisqu'elle lui permet d'éliminer les agents pathogènes et de réparer les lésions tissulaires. Cependant, il arrive que celle-ci devienne néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, d'anomalies dans la régulation du processus inflammatoire, d'anomalies quantitatives ou qualitatives des cellules intervenant dans l'inflammation. Une dérégulation de la réaction inflammatoire conduit ainsi à une grande variété de pathologies humaines, pouvant toucher tous les organes de l'organisme. Le poumon constituant le centre d'intérêt de cette revue bibliographique, seules les pathologies inflammatoires pulmonaires vont être abordées dans la suite de ce chapitre.

La fibrose pulmonaire

La fibrose pulmonaire fait partie des pneumopathies interstitielles. Elle se caractérise par un dépôt excessif de collagène et de fibrine au niveau des alvéoles et du tissu interstitiel pulmonaire, qui vont former des cicatrices fibreuses. Ce processus fibrosant est modulé par le recrutement de leucocytes et la libération de protéases, la production de cytokines (TNF- α), de chimiokines (IL-8) et de facteurs de croissance (TGF- β). Les fibroblastes jouent également un rôle important dans cette pathologie. On trouve différentes formes de cette pathologie qui peuvent être bénignes et d'autres plus invalidantes. Elles peuvent évoluer rapidement jusqu'à induire l'incapacité totale et la mort.

Les pathologies chroniques de l'appareil respiratoire

- L'asthme

L'asthme est une des maladies chroniques les plus fréquentes. C'est un désordre inflammatoire qui s'accompagne de remaniements durables de la structure des voies aériennes. Cette inflammation est secondaire à un infiltrat de cellules inflammatoires, en particulier les mastocytes et les éosinophiles, qui vont stimuler la production d'endothélines par les cellules endothéliales. Ces endothélines vont engendrer une réaction de broncho-constriction et de vasoconstriction, une hyperplasie des muscles lisses, une hypersécrétion de mucus et la production de NO, qui vont conduire à différents symptômes : toux, oppression thoracique et dyspnée (38).

- Les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO)

Les BPCO (bronchite chronique, emphysème) sont des pathologies caractérisées par une réduction progressive, non réversible, des débits respiratoires, associée à une distension permanente des alvéoles pulmonaires. Les BPCO sont caractérisées par une inflammation chronique pulmonaire, due à l'accumulation de macrophages, de LT, notamment de LT CD8+ et de neutrophiles. Dans l'évolution de la pathologie, des modifications anatomopathologiques caractéristiques peuvent être observées comme une hypersécrétion de mucus et un dysfonctionnement ciliaire, responsables de la toux et de l'expectoration chronique, et une dyspnée résultant de l'obstruction des voies aériennes supérieures, du processus de fibrose des petites voies aériennes et de l'apparition d'un emphysème (destruction des parois alvéolaires et du parenchyme pulmonaire).

- La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique touchant l'ensemble des organes revêtus d'un épithélium glandulaire. C'est une maladie génétique létale à transmission autosomique récessive, la plus fréquente dans les populations de type caucasienne. Elle est liée à des mutations du gène CFTR, entraînant une altération fonctionnelle de la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*). La protéine CFTR, située au pôle apical des cellules épithéliales, se comporte comme un canal ionique, participant ainsi au maintien de l'homéostasie des épithéliums. Le non-fonctionnement du canal CFTR va entraîner une déshydratation du mucus, à l'origine d'altérations sévères et précoces de la clairance muco-ciliaire, une hyperplasie des glandes sero-muqueuses et la formation de bouchons muqueux dans les voies aériennes. Ces conditions pathologiques sont favorables à une colonisation bactérienne, qui va être à l'origine d'une inflammation chronique des bronches. L'état inflammatoire permanent s'explique de plusieurs façons : soit par cette infection bactérienne chronique, soit par l'existence de phénotypes différents des neutrophiles chez les patients atteints de mucoviscidose comparés aux patients sains. Les neutrophiles des patients atteints de mucoviscidose seraient ainsi plus résistants à l'apoptose, retardant leur phagocytose lors

de la résolution de l'inflammation (39).

Les pathologies aiguës de l'appareil respiratoire

- Les exacerbations de BPCO

Ces exacerbations sont des aggravations temporaires, qualitatives et quantitatives de l'inflammation chronique des voies aériennes, attribuées à des microorganismes et aux facteurs environnementaux (fumée de cigarette, gaz, pollution). Le recrutement des neutrophiles et des éosinophiles, au cours des phases d'exacerbation, est à l'origine de fortes réactions inflammatoires, qui peuvent conduire à une incapacité respiratoire (40)).

- Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)

Le SDRA est une inflammation pulmonaire aiguë et persistante qui a pour conséquence une chute radicale de la compliance pulmonaire et de la capacité d'échanges gazeux au niveau de la membrane alvéolo-capillaire. Cette pathologie est caractérisée par la diminution de la production des protéines du surfactant, le recrutement massif de macrophages et de PNN, la production et la libération excessive de médiateurs inflammatoires, ainsi que la production et le dépôt de collagène de type III, la prolifération et l'invasion des fibroblastes au niveau des alvéoles pulmonaires. Ces différents processus causent un état inflammatoire sévère et la destruction du tissu pulmonaire pouvant conduire à une hypoxémie et une défaillance multi-viscérale entraînant la mort.

- Les infections respiratoires aiguës (IRA)

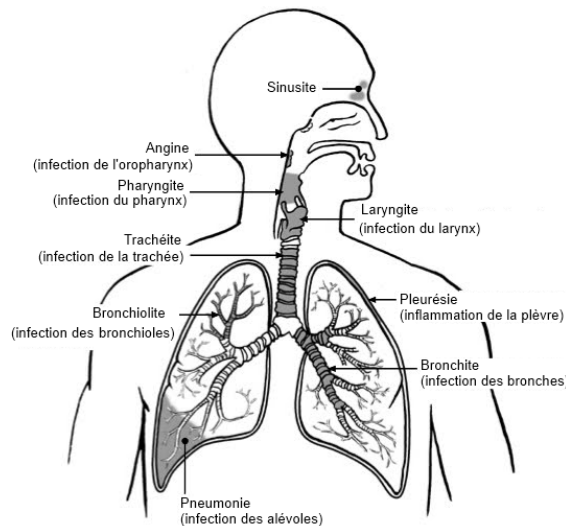


Figure 14 : Les inflammations de l'appareil respiratoire

Les poumons inhalent constamment des micro-organismes qui peuvent être à l'origine de pathologies infectieuses graves pouvant causer la mort. Les IRA représentent un grave problème de santé publique chez les enfants de moins de 5 ans, principalement dans les pays en voie de développement où les IRA sont la principale cause de mortalité, mais aussi dans les pays développés en tant que cause importante de morbidité et de

consultation des services de santé. Les IRA peuvent être plus ou moins graves en fonction : i) du niveau de l'atteinte de l'arbre respiratoire (haute ou basse) : les infections respiratoires hautes (rhume, grippe, rhinopharyngite, angines, laryngotrachéite) sont généralement plus bénignes que les infections respiratoires basses (bronchite, bronchiolite, pneumonie) (Figure 14) ; ii) de la nature et de la virulence de l'agent pathogène impliqué ; iii) de facteurs propres à l'hôte : âge, sexe, statut immunitaire ; iv) et de différents facteurs parmi lesquels l'environnement (saison, climat), ou la rapidité de la prise en charge du patient. Dans certains cas, les IRA peuvent aboutir en une septicémie (association d'une bactériémie et d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique) ou un dysfonctionnement multi-viscéral.

Les pneumonies, touchant le tissu alvéolaire, et les broncho-pneumonies représentent 70 à 80 % des admissions hospitalières pour une IRA. Les symptômes les plus courants de la pneumonie sont les suivants : une montée de fièvre soudaine pouvant atteindre 41 °C et des frissons importants ; un souffle court, une respiration et un pouls rapides ; une toux sèche puis, après quelques jours, grasse et accompagnée de sécrétions jaunâtres ou verdâtres ; une douleur thoracique qui s'intensifie durant la toux et les inspirations profondes ; une dégradation de l'état général (fatigue, perte d'appétit) ; des douleurs musculaires ; des maux de tête ainsi qu'une respiration sifflante.

Conclusion

L'inflammation est une réaction complexe du système immunitaire inné dans les tissus vascularisés, en réponse à une infection ou à des lésions tissulaires. L'inflammation débute par des changements vasculaires qui favorisent le recrutement des leucocytes (neutrophiles et monocytes) au niveau du foyer inflammatoire. La production de médiateurs inflammatoires par les cellules immunes innées va alors permettre l'activation d'une multitude d'effecteurs, qui vont permettre de neutraliser et détruire les agents pathogènes, ainsi que de mettre en place des mécanismes de réparation tissulaire. Les réponses immunitaires adaptatives locales peuvent également être mobilisées afin de réguler l'inflammation.

Alors que l'inflammation présente une fonction protectrice en contrôlant les infections et en favorisant la cicatrisation des tissus, elle peut également être à l'origine de lésions tissulaires et de pathologies. Ainsi, au niveau pulmonaire, différentes atteintes respiratoires résultent de processus inflammatoires. Ainsi, nous avons pu voir que la pneumonie est la conséquence d'une inflammation alvéolaire, en réponse à une infection. Dans la section suivante, nous allons véritablement nous focaliser sur celle-ci. Nous verrons ainsi qu'une multitude de pathogènes sont impliqués dans la pathogenèse de cette maladie, ce qui mènera à nous intéresser aux différentes méthodes de diagnostic clinique et étiologique dont disposent les cliniciens afin de traiter au mieux les patients souffrant de cette pathologie.

LA PNEUMONIE, UN FLEAU OUBLIE

2.1	LES PATHOGENES RESPIRATOIRES	64
	2.1.1- <i>Les bactéries</i>	64
	a- <i>Streptococcus pneumoniae</i> - 64	
	b- <i>Haemophilus influenzae b</i> - 65	
	c- <i>Staphylococcus aureus</i> - 66	
	d- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> - 66	
	e- <i>Chlamydia pneumoniae</i> - 67	
	f- <i>Legionella pneumophila</i> et autres espèces de <i>Legionella</i> - 67	
	2.1.2- <i>Les virus</i>	68
	a- <i>Le virus Influenza</i> - 68	
	b- <i>Le Virus Respiratoire Syncytial</i> - 69	
	c- <i>Les virus parainfluenza</i> - 69	
	d- <i>Les adénovirus</i> - 70	
	e- <i>Les coronavirus OC43 et 229E</i> - 70	
	f- <i>Les Rhinovirus</i> - 70	
	2.1.3- <i>Les pathogènes émergents</i>	71
	a- <i>Moraxella catarrhalis</i> - 71	
	b- <i>Klebsiella pneumoniae</i> - 71	
	c- <i>Bordetella pertussis</i> - 72	
	d- <i>Le Metapneumovirus humain</i> - 72	
	e- <i>Le Bocavirus</i> - 72	
	f- <i>Les nouveaux virus influenza</i> - 73	
	g- <i>Les nouveaux coronavirus</i> - 73	
	h- <i>Les Picornaviridae</i> - 73	
	i- <i>Les polyomavirus KI et WU</i> - 74	
	j- <i>Le Torque Teno Virus</i> - 74	
2.2	LE DIAGNOSTIC DE LA PNEUMONIE	75
	2.2.1- <i>Le diagnostic clinique</i>	75
	a- <i>Les symptômes</i> - 75	
	b- <i>Les complications de la pneumonie</i> - 76	
	c- <i>Le traitement</i> - 76	
	2.2.2- <i>Le diagnostic étiologique</i>	77
	a- <i>Les méthodes non moléculaires</i> - 77	
	b- <i>Les méthodes moléculaires</i> - 79	

La pneumonie est la principale cause simple de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans. L'incidence dans cette tranche d'âge est estimée à 0,29 épisode/enfant/an dans les pays en développement et à 0,05 épisode/enfant/an dans les pays développés (Figure 15). Il en résulte environ 156 millions nouveaux épisodes de pneumonie chaque année dans le monde, dont 151 millions dans les pays en développement. La plupart des cas se produisent en Inde (43 millions), en Chine (21 millions), au Pakistan (10 millions) et également en grand nombre au Bangladesh, en Indonésie et au Nigéria (6 millions pour chacun de ces pays) (41). En France, la pneumonie touche 5 à 12 personnes pour 1 000 par an (3). Parmi l'ensemble des cas communautaires, 7 à 13% sont assez graves pour menacer le pronostic vital et nécessiter une hospitalisation. La pneumonie est responsable d'environ 19% des décès d'enfants de moins de 5 ans, dont plus de 70% se produisent en Afrique sub-saharienne et en Asie du Sud-Est (Figure 16). Toutefois, ce chiffre ne tient pas compte des décès par pneumonie qui surviennent pendant la période néonatale, c'est-à-dire au cours des quatre premières semaines après la naissance. Selon les estimations, 26 % des décès de nouveau-nés, soit 10 % des décès d'enfants de moins de 5 ans, sont provoqués par des infections graves survenant au cours de la période néonatale, dont une bonne partie a pour origine une pneumonie ou une septicémie (Figure 17) (42).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, de nombreuses défenses naturelles protègent l'enfant en bonne santé des agents pathogènes susceptibles de pénétrer dans ses poumons et de provoquer une pneumonie. En revanche, un enfant ou un nourrisson, dont le système immunitaire est affaibli, a moins de défenses. Les enfants dénutris, notamment ceux qui ne sont pas allaités exclusivement au sein ou qui ont une carence en zinc, sont davantage exposés au risque, tout comme les enfants et les nourrissons qui souffrent d'autres maladies, telles que le SIDA ou la rougeole. Certains facteurs environnementaux, comme l'entassement des familles dans des logements exigus, le tabagisme des parents ou la pollution de l'air à l'intérieur des locaux, pourraient augmenter le risque pour l'enfant de contracter une pneumonie et en aggraver les conséquences (2).

La réduction de la mortalité infantile représente un des enjeux majeurs des politiques mondiales de santé publique et constitue, à cet effet, l'un des Objectifs du Millénaire pour le Développement, adopté en 2000 par 193 membres de l'Organisation des Nations Unies (ONU) (43). Afin d'atteindre cet objectif consistant à réduire de deux tiers la mortalité infantile, d'ici 2015, la lutte contre la pneumonie est au centre des préoccupations.

Pour réduire la mortalité, il est essentiel d'éviter que les enfants ne contractent cette maladie. La prévention passe principalement par une nutrition adéquate, l'éducation à l'hygiène, la lutte contre la pollution de l'air à l'intérieur des locaux, mais aussi l'augmentation de la couverture vaccinale et la prescription de traitements adaptés. Ces deux dernières mesures nécessitent de connaître précisément les agents pathogènes mis en cause et mettent en avant l'importance de l'établissement d'un diagnostic fiable.

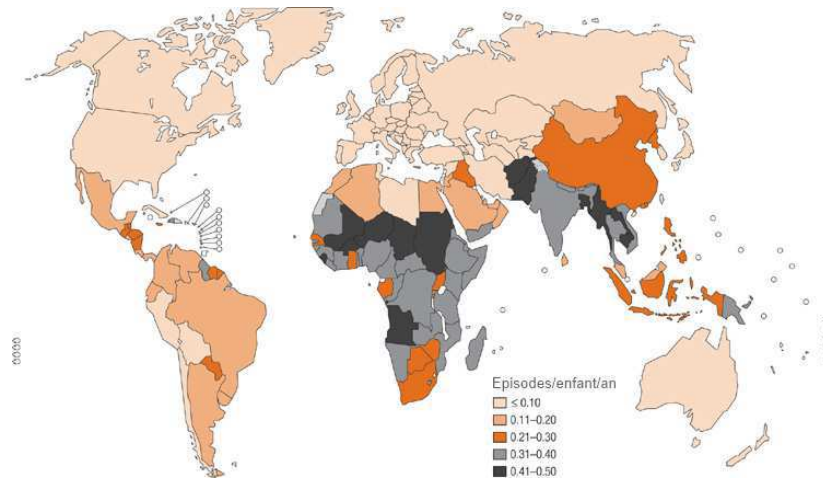


Figure 15 : Incidence de la pneumonie infantile par pays. Adapté de (41)

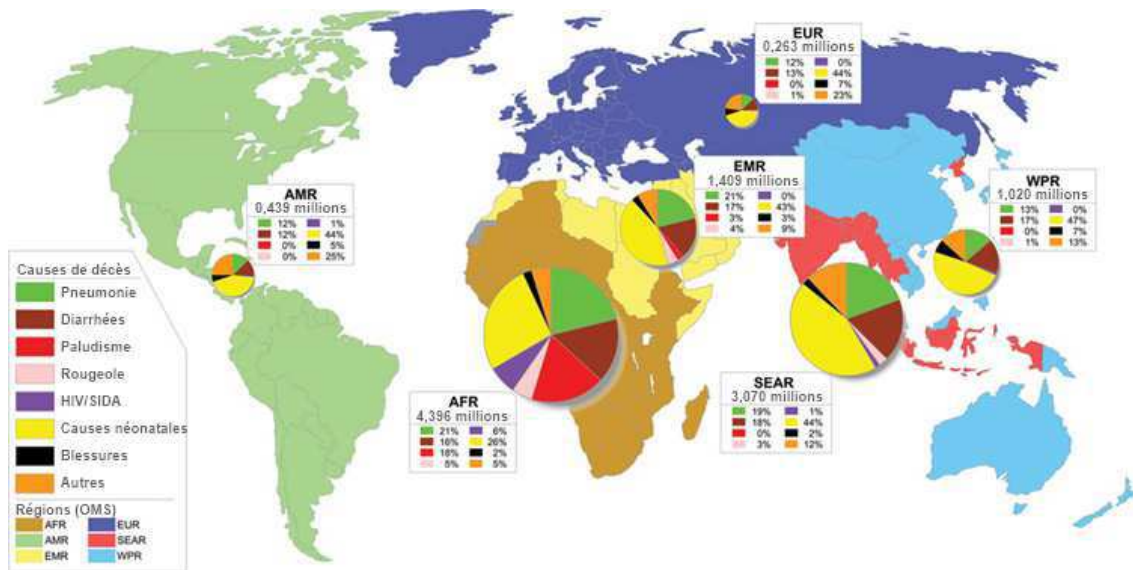


Figure 16 : Répartition des décès dus à la pneumonie et aux autres causes chez les enfants âgés de moins de 5 ans, par région OMS. Le nombre total de décès infantiles est indiqué pour chaque région, ainsi que la part attribuable à chacune des causes : pneumonie, diarrhées, paludisme, rougeole, HIV/SIDA, causes néonatales, blessures et autres. Les régions définies par l'OMS sont les suivantes : région de l'Afrique (AFR), région des Amériques (AMR), région de l'Asie du Sud-Est (SEAR), région de l'Europe (EUR), région de la Méditerranée orientale (EMR), et région du Pacifique occidental (WPR). Adapté de (41)

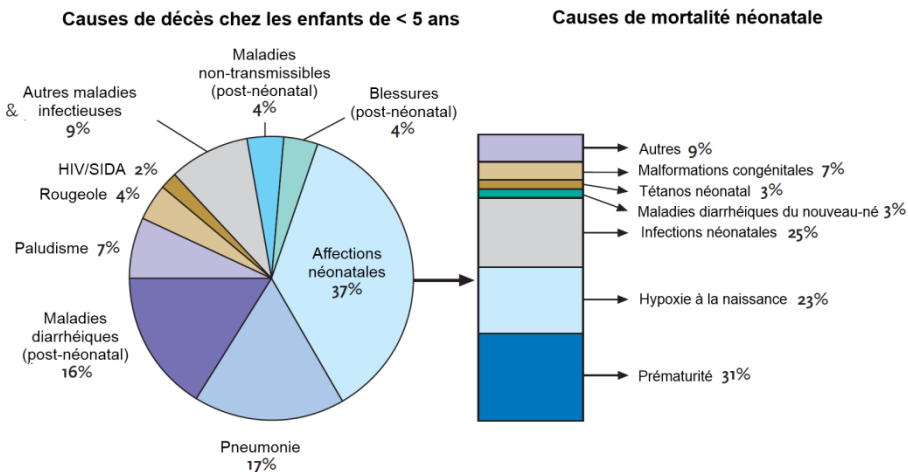


Figure 17 : Causes de mortalités néonatales et infantiles. Adapté de (42)

2.1- Les pathogènes respiratoires

Nous disposons de relativement peu de données sur les agents pathogènes responsables de la pneumonie et les informations disponibles sont souvent difficiles à interpréter. On sait que, dans les pays en développement, les formes sévères de pneumonie de l'enfant sont principalement dues à *Streptococcus pneumoniae*. Dans une moindre mesure, on trouve aussi des cas de pneumonie bactérienne bénins, mais les cas d'origine virale sont probablement plus nombreux. *Haemophilus influenzae* de type b (Hib) est un autre agent pathogène bactérien fréquemment responsable. Enfin, d'autres pneumopathies prenant l'allure d'une pneumonie peuvent être provoquées par des virus, des bactéries moins courantes ou des champignons (44). Nous allons maintenant faire un état des lieux des pathogènes décrits pour être des agents responsables des pneumonies et des infections respiratoires basses. Nous verrons en effet par la suite que le diagnostic clinique précis de la pneumonie est difficile à établir, donc qu'un pathogène impliqué dans une IRA est également susceptible de provoquer une pneumonie.

2.1.1- Les bactéries

La pneumonie typique, dont les symptômes ont précédemment été décrits, est généralement causée par les bactéries *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, ou *Staphylococcus aureus*. Dans de plus rares cas, on observe des cas de pneumonies atypiques qui se manifestent par des symptômes qui peuvent être moins prononcés que la pneumonie typique. Par exemple, certaines personnes atteintes de pneumonie n'ont ni fièvre, ni douleurs thoraciques. La pneumonie fait alors penser à une infection respiratoire, comme une bronchite, une sinusite ou une grippe. Parmi les bactéries qui causent la pneumonie atypique, on retrouve *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* et *Legionella pneumophila* (45, 46).

a- *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae (ou pneumocoque) est l'agent pathogène le plus répandu dans les pneumonies. C'est une bactérie diplocoque à Gram+, à multiplication extracellulaire, dont la paroi est constituée d'un peptidoglycane et des LTA. C'est un hôte normal habituellement retrouvé dans le nasopharynx chez de nombreux porteurs sains, à raison de 30-50% d'enfants et de 5-10% d'adultes. L'importance de la colonisation est soumise à des variations saisonnières avec des pics en période hivernale, qui est la période de forte incidence des infections pulmonaires. Le passage de l'état de commensalisme à un état pathogène n'est pas élucidé. Cependant, de nombreux facteurs de pathogénicité et plus de 125 gènes ont été décrits comme étant impliqués dans la virulence. Les principaux facteurs de virulence peuvent être divisés en deux groupes :

- Le premier groupe est constitué par des composants de surface (la capsule, les protéines de surface PspA et PspC, protéine liant le facteur H du système du complément, C3-protéase) qui jouent un rôle important au début de l'infection en inhibant la phagocytose. Cette inhibition de la phagocytose est, en grande partie, due à une inhibition de l'activation du système du complément (47).
- Le deuxième groupe rassemble des composants (polysaccharides lié au peptidoglycane, pneumolysine) qui interviennent à un stade plus tardif de l'infection et qui sont libérés à la suite d'une désintégration des cellules bactériennes provoquée principalement par l'autolysine. Ces facteurs de virulence provoquent d'intenses manifestations inflammatoires (48).

D'autres facteurs comme CbpA, PsaA ou la neuraminidase participent à l'adhésion, à la colonisation et aux premières étapes de l'infection (49). On distingue plus de 91 sérotypes capsulaires différents. Parmi eux, seulement 23 causent la plupart des infections à pneumocoques et peuvent être à l'origine de pneumonies bactériémiques très invasives (principalement les sérotypes 14, 16 et 19). Certains sérotypes (23F, 19F, 6B, 14), fréquemment rencontrés dans la population, ont souvent été associés à une résistance aux antibiotiques (50). Il existe deux types de vaccins anti-pneumococciques : i) un vaccin conjugué immunisant pour 13 sérotypes (PCV13), et un vaccin polysaccharidique, immunisant pour 23 sérotypes (PCV23), recommandé par l'OMS. Des données sur des essais récents de vaccins indiquent qu'en Afrique, cette bactérie pourrait être responsable de plus de 50 % des cas de pneumonie sévère et probablement d'une part encore plus importante des décès. Il est possible que cette proportion varie selon les régions.

b- Haemophilus influenzae b

H. influenzae est un petit bacille à Gram négatif, à multiplication extracellulaire, dont la croissance nécessite la présence des facteurs X (hémine) et V (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). C'est une bactérie aéro-anaérobie, immobile et parfois capsulée. La capsule polysaccharidique est anti-phagocytaire et représente le facteur majeur de virulence. Parmi les autres facteurs de virulence, Hib présente un lipo-oligosaccharide cytotoxique et ciliotoxique stimulant la réponse inflammatoire, des adhésines, et des IgA protéases (51).

Il existe 6 sérotypes capsulaires (a, b, c, d, e, f), mais également des souches dépourvues de capsules, désignées sous le terme de non-typables (NTHi). Le sérotype b, résistant à la phagocytose, est à l'origine de 90% des infections invasives. Les souches non-encapsulées, bien que peu invasives, sont une cause de pneumonies (52). L'infection débute par la colonisation du tractus respiratoire : les bactéries adhèrent aux cellules épithéliales et au mucus et stimulent la production de mucus, d'histamine, et de médiateurs pro-inflammatoires (IL-8, IL-6, TNF- α). Puis, les bactéries envahissent l'épithélium respiratoire et peuvent disséminer donnant des septicémies avec métastases.

L'immunité anti-Hib est humorale, avec production d'anticorps anti-capsulaires, anti-adhésines et anti-oligosaccharides. *H. influenzae* est une bactérie de la flore commensale du pharynx strictement inféodée à l'homme qui est le seul réservoir connu. L'incidence des infections pulmonaires à *H. influenzae* chez l'enfant est probablement inférieure 2 %. Chez l'adulte, l'incidence est difficile à déterminer dans la mesure où l'infection respiratoire à *H. influenzae* est fréquemment associée à *S. pneumoniae* (53).

Il existe trois vaccins conjugués dirigés contre Hib. La couverture vaccinale des pays développés est de 92 %, alors qu'elle n'est que de 42 % dans les pays en voie de développement et 8 % dans les pays les plus pauvres. Des études sur les vaccins, effectuées au Bangladesh, au Chili et en Gambie, semblent indiquer que Hib est à l'origine d'environ 20 % des cas de pneumonie sévère, cette proportion pouvant varier selon les régions (2).

c- *Staphylococcus aureus*

S. aureus, ou staphylocoque doré, est l'une des causes la plus commune d'infection opportuniste dans les milieux hospitalier et communautaire. C'est une bactérie Gram+, immobile, qui se présente comme un coque, associée par groupes en amas ou en chaînes. Son pouvoir pathogène résulte de plusieurs sécrétions particulières : i) des enzymes (coagulase, fibrinolysine, phosphatase, hyaluronidase, désoxyribonucléase, protéase), qui, du fait des lésions qu'elles provoquent sur les muqueuses de l'organisme lui confèrent son pouvoir invasif, et ii) des toxines (entérotoxines, staphylolysines et leucocidines) qui lui confèrent son pouvoir toxique. *S. aureus* est commensale de l'homme et se révèle être un pathogène opportuniste dans certains emplacements ou dans certaines circonstances. Sa fréquence est d'environ 2 % des pneumonies communautaires et concerne essentiellement des sujets présentant une déficience immunitaire et qui ont été hospitalisés ou soumis à une ventilation assistée de manière prolongée. La pneumonie à staphylocoques augmente au moment des épidémies de grippe (54).

d- *Mycoplasma pneumoniae*

M. pneumoniae est une bactérie de très petite taille (0,2 à 0,3 µm le plus souvent), dépourvue de paroi cellulaire rigide, ce qui lui confère une morphologie variable et une capacité à passer à travers les filtres. Il s'agit de bactéries intracellulaires facultatives, capables de croître en milieux acellulaires. Le genre *Mycoplasma* se différencie des autres genres bactériens par la richesse de sa membrane en stérols, l'absence d'homologie de son ADN avec d'autres bactéries connues, et son génome de très petite taille avec un faible pourcentage de GC. Les souches virulentes de *M. pneumoniae* ont une affinité très importante pour l'épithélium respiratoire, auquel elles adhèrent. Cette affinité dépend de la protéine P1 de *M. pneumoniae* qui interagit avec les résidus d'acide neuraminique des cellules épithéliales. Une fois fixée, *M. pneumoniae* est capable de produire des ROS, provoquant le dysfonctionnement des cellules ciliées et une desquamation massive de la

surface épithéliale suivie d'une inflammation péribronchiolaire à prédominance de polynucléaires neutrophiles. La plupart de ces infections sont asymptomatiques ou provoquent une infection respiratoire sans atteinte du parenchyme pulmonaire. Les infections surviennent à tout âge, avec une incidence plus forte chez les enfants et l'adulte jeune (5 -25 ans) (55).

e- *Chlamydomphila pneumoniae*

C. pneumoniae est une bactérie parasite obligatoire à Gram- de petite taille du genre *Chlamydomphila*. Les 3 espèces *C. psittaci*, *C. trachomatis* et *C. pneumoniae* sont responsables d'infections pulmonaires, mais cette dernière est la plus fréquemment retrouvée. Dans le milieu extracellulaire, les bactéries sont incapables de se diviser et adoptent une forme dense appelée corps élémentaires. Les corps élémentaires interagissent spécifiquement et sont phagocytés par les cellules épithéliales de l'hôte. Dans le phagosome, la bactérie se réorganise en une forme plus grande et moins dense, les corps réticulés qui se divisent dans la cellule en formant des inclusions cytoplasmiques. Cette croissance est associée à une inhibition de la fusion phagolysosomale. Les corps réticulés osmotiquement très instables ne peuvent eux-mêmes infecter une cellule adjacente mais les vacuoles les contenant peuvent se répartir entre les cellules, qui continuent de se diviser. Malgré cette relative bonne tolérance des cellules à l'infection, la lyse cellulaire survient avec libération de corps élémentaires qui contribuent à la diffusion à l'épithélium et à la pérennisation de l'infection. La présence de *Chlamydomphila* intracellulaires suscite une réaction inflammatoire dans l'épithélium qui contribue aux lésions épithéliales, avec un afflux de macrophages et de LTC qui détruisent les cellules infectées exprimant les antigènes de *Chlamydomphila*.

La plupart des infections restent asymptomatiques et l'incidence exacte des infections respiratoires à *C. pneumoniae* est difficile à établir, et se situerait aux alentours des 1% (56).

f- *Legionella pneumophila* et autres espèces de *Legionella*

Les *Legionella* sont des petits bacilles non-capsulés à Gram-, aérobies, à croissance intracellulaire facultative, qui peuvent se répliquer dans les monocytes respiratoires. Au moins 48 espèces, comprenant 70 sérogroupes distincts, ont été identifiées, et *L. pneumophila* est de loin la plus fréquemment rencontrée dans les cas d'infection pulmonaire grave, la légionellose. Il existe 2 formes cliniques d'infection à *L. pneumophila* : la maladie des légionnaires, une forme grave et potentiellement mortelle de pneumonie, et la fièvre de Pontiac, une infection pseudo-grippale à début brutal, d'évolution bénigne. La légionellose survient volontiers chez les patients ayant un déficit de l'immunité cellulaire : greffés, patients atteints de SIDA, patients immunodéprimés. Dans ces cas, les *Legionella* échappent au système immunitaire en inhibant la fusion phagolysosomale des macrophages et en se multipliant au sein des phagosomes jusqu'à la

lyse cellulaire. Elles continuent ensuite leur prolifération par l'infection de nouveaux macrophages. Ces bactéries sécrètent de nombreuses enzymes (hémolysines, protéase, phosphatases, endonucléases) qui ne semblent pas être directement toxiques pour le tissu pulmonaire.

Il ne semble pas exister de portage sain et les principales sources de contamination pour l'homme sont les systèmes d'air conditionné, les circuits de distribution d'eau chaude, les bains bouillonnants, les eaux thermales. Des études prospectives, visant à identifier l'étiologie microbienne des pneumonies, ont montré que *L. pneumophila* a été identifiée comme l'agent pathogène chez 1,9% des patients non hospitalisés, 4,9% des patients hospitalisés et 7,9% des patients en soins intensifs (57).

2.1.2- Les virus

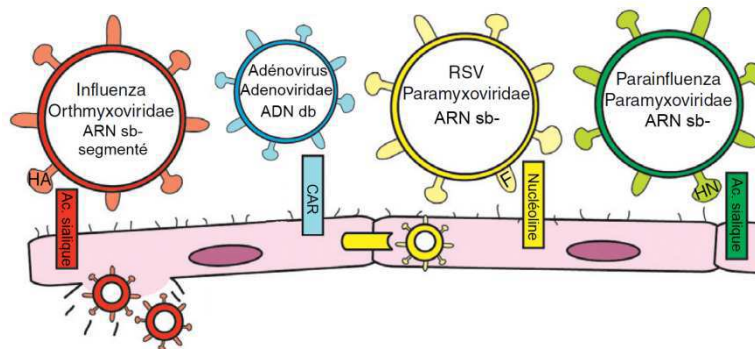


Figure 18 : Les principaux virus responsables des pneumonies et leurs récepteurs cellulaires

Les virus aussi bien à ARN qu'à ADN sont responsables d'une large proportion des pneumonies infantiles. La fréquence des pneumonies virales diminue chez les jeunes et les adultes en bonne santé, mais ré-augmente sensiblement chez les personnes âgées (58). Les études portant sur l'étiologie des pneumonies communautaires font régulièrement état de la présence des virus en tant que deuxième cause la plus fréquente, derrière *S. pneumoniae*, allant de 13 à 50% des cas diagnostiqués (59, 60). Les 4 étiologies les plus fréquentes de pneumonie virale chez les enfants et les adultes immunocompétents sont les virus influenza, le virus respiratoire syncytial (RSV, *Respiratory Syncytial Virus*), l'adénovirus et le virus parainfluenza (PIV), qui produisent tous des manifestations cliniques et radiologiques courantes (61) (Figure 18). D'autres sont plus rarement impliqués comme les rhinovirus, les entérovirus, et les coronavirus OC43 ou 229E, ou sont classiquement associés à d'autres pathologies comme le virus de la rougeole ou certains herpesvirus comme HSV-1, HHV-6 et -7, EBV et CMV, causant respectivement l'herpès, la roséole, le lymphome de Burkitt et le syndrome mononucléosique (62).

a- Les virus Influenza

Les virus influenza appartiennent à la famille *Orthomyxoviridae* et au genre *Influenzavirus*. Trois types de virus influenza (INF) ont pu être distingués (A, B et C) en

fonction de leurs déterminants antigéniques spécifiques et peuvent causer une maladie respiratoire aiguë. Ces virus sont les agents causatifs de la grippe. Le virion est filamenteux ou sphérique, de 80 à 120 nm, avec un revêtement à double couche lipidique dérivée de la cellule hôte modifiée possédant les glycoprotéines hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA). La nucléocapside a une symétrie hélicoïdale constituée par huit fragments d'ARN monocaténaire associés à la nucléoprotéine et à trois polymérases. Les virus influenza A et B, qui sont largement distribués, ont des poussées saisonnières dans les climats tempérés. La propagation du virus dans une zone géographique donnée est rapide et la période d'incubation du virus est de 1 à 4 jours. La cause principale de la récurrence des épidémies de grippe est due à l'apparition continue de nouvelles souches mutées qui ne sont pas reconnues par le système immunitaire des individus et qui causent des maladies chez des personnes de tout âge. Les virus influenza de types A et B sont responsables de plus de la moitié de tous les cas de pneumonies communautaires virales, en particulier pendant les épidémies de grippe (58).

b- Le Virus Respiratoire Syncytial

Ce virus appartient à la famille des *Paramyxoviridae* et au genre *Pneumovirus*. Le virion pléomorphe possède une capsid et son diamètre varie entre 150 et 300 nm. Son génome de 15,2 kb est une chaîne simple brin d'ARN de polarité négative. Deux groupes majeurs antigéniques, A et B, ont été décrits et diffèrent majoritairement par la séquence protéique de leur glycoprotéine G. Tous deux peuvent circuler simultanément dans la population et l'importance clinique ou épidémiologique d'un groupe antigénique par rapport à l'autre n'est pas encore claire (63). Le RSV est l'agent des bronchiolites, une pathologie touchant principalement les enfants âgés de 6 semaines à 6 mois. L'infection primaire par le RSV peut se manifester sous la forme d'une infection respiratoire des voies inférieures, telle que la pneumonie, la bronchiolite, la trachéo-bronchiolite ou une infection des voies respiratoires supérieures, souvent accompagnée de fièvre ou d'une otite moyenne. L'infection est rarement asymptomatique (58).

c- Les virus parainfluenza

Les virus parainfluenza (PIV) sont classifiés dans la famille des *Paramyxoviridae* et dans le genre *Paramyxovirus*. Ce sont des virus à ARN ayant une nucléocapside avec un revêtement qui dérive de la membrane de la cellule hôte. Les particules virales sont pléiomorphes, d'une taille de 100 à 200 nm, avec des spicules qui ont des fonctions d'hémagglutinine et de neuraminidase. Ces virus sont capables de fusionner des cellules et d'hémolyser certains types d'érythrocytes, ce qui les distingue des virus INF. Quatre types de 1 à 4 ont été identifiés. Ces virus causent des infections respiratoires fréquentes, dont la gravité est variable en fonction du type de virus et de facteurs propres à l'hôte. Les types 1, 2 et 3 sont reconnus comme les principaux agents causatifs du croup (ou laryngo-trachéobronchite). Le PIV-3 peut aussi causer des pneumonies et des bronchiolites chez

les enfants. Ces virus provoquent une maladie grave chez les nourrissons, comme le RSV, mais cette gravité diminue à partir de l'âge de trois ans (64).

d- Les adénovirus

La famille *Adenoviridae* comprend un grand nombre d'espèces d'origine humaine et animale. La classification actuelle a regroupé les nombreux membres de la famille sous deux genres : *Mastadénovirus* et *Aviadénovirus*. Le genre *Mastadénovirus* comprend les adénovirus humains et beaucoup d'adénovirus animaux. Les adénovirus sont caractérisés par la spécificité de leur espèce hôte et par leur grande variabilité génétique. Ils infectent généralement leurs hôtes à travers la conjonctive oculaire ou la muqueuse digestive. A ce jour, 51 espèces ou sérotypes différents d'adénovirus humains ont été reconnus et regroupés en six sous-genres (du A au F). Toutes les particules virales des adénovirus possèdent une structure à la symétrie icosaédrique, sans enveloppe et ont un diamètre moyen de 80 nm. Le génome viral est constitué d'ADN bicaténaire. La réplication de l'ADN, la transcription ainsi que la maturation des adénovirus sont réalisées dans le noyau cellulaire. C'est dans celui-ci qu'a lieu une accumulation de protéines structurales dans des corps d'inclusion, caractéristiques des cellules alvéolaires pendant les pneumonies par adénovirus. Les adénovirus sont responsables de 5% des cas d'infection respiratoire d'enfants âgés de moins de 4 ans et de 10% des infections respiratoires qui requièrent une hospitalisation chez le même groupe d'âge (65). Ils peuvent causer des pharyngites, des conjonctivites, le croup et des bronchiolites, mais les pneumonies aiguës sont, sans aucun doute, les manifestations cliniques plus graves, surtout chez les jeunes enfants chez lesquels elles peuvent être fatales (66).

e- Les coronavirus OC43 et 229E

Les coronavirus OC43 et 229E appartiennent à la famille des *Coronaviridae* et au genre *Coronavirus*. Les particules virales sont pléiomorphiques ayant un diamètre compris entre 80 nm à 150 nm. Ce sont des virus à ARN se développant dans le cytoplasme des cellules infectées. Les coronavirus causent des rhumes chez les enfants et les adultes. Leur période d'incubation est plus prolongée et leur durée est plus courte que dans le cas des rhinovirus, mais les symptômes sont similaires. Ils ne provoquent que très rarement des maladies respiratoires graves dans les voies inférieures bien que des exceptions aient été démontrées. Ces virus sont plus fréquemment retrouvés en hiver et au printemps. Ils peuvent être à l'origine de 35% du total des infections respiratoires virales des voies supérieures dans les époques d'épidémie (58).

f- Les Rhinovirus

Les rhinovirus appartiennent à la famille des *Picornaviridae*. Plus de 100 types différents ont été recensés (67). Les particules virales font entre 20 et 27 nm de diamètre et elles contiennent quatre protéines structurales qui forment une capsid à la symétrie icosaédrique. La synthèse et la maturation du virus ont lieu dans le cytoplasme. Ils sont la

principale cause connue du rhume commun. Ils infectent uniquement les êtres humains et certains primates supérieurs. Les rhinovirus ont une distribution mondiale et circulent en automne et au printemps. Les sérotypes actuels sont lentement remplacés par des types antigéniques différents. Ces virus sont responsables de plus de 50% des infections respiratoires virales. Les infections commencent dès la petite enfance et continuent pendant toute la vie. La durée moyenne de la maladie est de 7 jours environ (68).

2.1.3- Les pathogènes émergents

En marge de ces pathogènes largement reconnus par la communauté scientifique comme des agents étiologiques de pneumonies, certains autres sont toujours débattus ou n'ont été décrits que récemment. Ces pathogènes, viraux ou bactériens, sont réunis sous le terme de pathogènes émergents et leur nombre augmente constamment (69). En effet, l'émergence de pathogènes est un phénomène courant qui peut être dû à une multitude de phénomènes : la mutation ou la recombinaison d'un virus existant (ex : Influenza), l'exposition de populations naïves à un virus existant (déplacement de populations ou d'un vecteur hôte), le franchissement de la barrière des espèces (ex : virus de l'immunodéficience humaine HIV), ou l'invasion de nouveaux environnements (jungles, mers). Ce paragraphe présente une liste non-exhaustive de ces pathogènes en lien avec des IRA.

a- Moraxella catarrhalis

Le genre *Moraxella* fait partie de la famille des *Moraxellaceae*. Ces bactéries sont des bâtonnets bacillaires et coccoïdes Gram-, aérobies, habituellement regroupés en courtes chaînes ou en paires. Ce sont des parasites normalement présents dans l'oropharynx, les muqueuses, la peau et les voies génitales, mais elles peuvent causer certaines maladies chez les humains. *M. catarrhalis* est l'espèce la plus souvent isolée et est à l'origine de cas graves d'otites moyennes, de cas de sinusites, d'infections des voies respiratoires supérieures et inférieures pouvant conduire à une pneumonie (70).

b- Klebsiella pneumoniae

Les espèces du genre *Klebsiella* sont des bactéries Gram- en forme de bâtonnet, non mobiles et généralement encapsulées, qui appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ces bactéries forment souvent des colonies mucoïdes. Le genre comprend 77 antigènes capsulaires (antigènes K) donnant naissance à différents sérogroupes. *K. pneumoniae* détermine des infections respiratoires (pneumonies, abcès pulmonaires, pleurésies), des infections intestinales et urinaires. Elle a un effet cytotoxique sur les épithéliums des voies aériennes et peut être responsable d'infections nosocomiales. Les facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae* comprennent des adhésines, des sidérophores, des polysaccharides capsulaires anti-phagocytaires, des lipopolysaccharides de surface cellulaire et des toxines, qui jouent chacun un rôle

particulier dans la pathogenèse (71).

c- *Bordetella pertussis*

B. pertussis est un bacille immobile à Gram-, à multiplication extracellulaire, qui possède une fine capsule et dont l'homme est le seul réservoir. Elle représente le principal agent de la coqueluche, une infection bronchique avec toux, qui cause la mort d'environ 600 000 enfants par an dans le monde. Après inhalation, *B. pertussis* colonise la trachée ou les bronches et s'y fixe grâce à des adhésines, dont les récepteurs sont présents sur les cils vibratiles des cellules trachéales ciliées, provoquant leur paralysie. Le germe se multiplie alors à l'extérieur des tissus et synthétise des toxines qui vont agir ensemble et interagir avec le système immunitaire. De récentes études ont montré que cette bactérie pourrait également causer des pneumonies, principalement chez l'adulte (72).

d- Le Metapneumovirus humain

Le métapneumovirus humain (hMPV) a été isolé pour la première fois aux Pays-Bas en 2001, à partir de prélèvements respiratoires. Appartenant à la famille des *Paramyxoviridae* et au genre *Pneumovirinae*, le hMPV est un virus à ARN non segmenté simple brin de polarité négative. Le virus semble être dispersé dans le monde entier et avoir une répartition saisonnière avec une incidence comparable à celle de la grippe pendant l'hiver. Il a récemment été identifié comme une cause majeure des infections respiratoires dans le monde et certaines études attribuent à ce virus 12% des infections globales du tractus respiratoire (73, 74). Par rapport au RSV, l'infection par hMPV a tendance à se produire chez les enfants plus âgés et à provoquer une maladie qui est moins sévère. Des co-infections par deux virus peuvent se produire, et sont généralement associées à une aggravation de la maladie (75).

e- Le Bocavirus

Le bocavirus humain (HBoV) a été récemment identifié chez des enfants présentant une atteinte respiratoire aiguë. Des analyses phylogénétiques ont montré que ce virus était génétiquement apparenté au parvovirus bovin et au virus canin, deux membres de la famille des *Parvoviridae* définissant le genre *Bocavirus*. Des études indiquent que le HBoV est détecté avec une fréquence de l'ordre de 5 % - 10%, chez des jeunes enfants atteints de pathologies respiratoires aiguës. L'incidence de ce virus paraît plus importante en saison hivernale et printanière. Les tableaux cliniques rencontrés sont très similaires à ceux observés avec les autres virus respiratoires et il semblerait que le HBoV provoque préférentiellement des infections respiratoires basses (76). Cependant, le HBoV est souvent co-détecté avec d'autres virus respiratoires et son rôle dans l'établissement de pathologies respiratoires reste controversé (77).

f- Les nouveaux virus influenza

La pathogénicité des virus influenza dépend de leur composition en neuraminidase et en hémagglutinine et de nouveaux réassortants apparaissent régulièrement. Les virus influenza A sous-type H1N1 sont ainsi responsables de près de la moitié de toutes les infections de grippe humaine. Courant mars 2009, un virus H1N1 est réapparu au Mexique sous une forme génétique inédite et s'est propagé rapidement autour de la planète. Contrairement aux craintes initiales, alimentées par des épisodes antérieurs de grippe aviaire, ce virus était relativement peu pathogène. Néanmoins, sa distribution a fait classer la grippe A (H1N1) de 2009 comme une pandémie selon l'OMS (78).

g- Les nouveaux coronavirus

Le coronavirus, HCoV-SARS, responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS, *Severe Acute Respiratory Syndrome*), a été rapidement identifié après l'émergence, début 2003, de cas de pneumonies sévères en Chine, au Vietnam et à Singapour. Le coronavirus NL63 (HCoV-NL63) a lui été identifié en 2004 aux Pays-Bas. Il a été clairement associé avec le croup et la bronchiolite et occasionnellement avec des cas de pneumonie. Le coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1) a été détecté pour la première fois à Hong-Kong en 2005, puis détecté dans plusieurs échantillons respiratoires d'étiologie non déterminée. Ces coronavirus semblent avoir un rôle significatif dans les IRA avec une prévalence proche des 2%, mais restent une cause peu commune d'hospitalisation (79). Plus récemment, un nouveau coronavirus a émergé au Moyen-Orient et causé la mort de 5 personnes à la suite d'une pneumonie sévère (80).

h- Les *Picornaviridae*

Les virus de la famille des *Picornaviridae* sont des virus de petite taille (20 à 30nm), non-enveloppés, avec un génome à ARN simple brin de polarité positive. De nombreux virus de cette famille sont retrouvés dans des cas d'IRA, de manière fréquente comme avec les entérovirus ou les rhinovirus, ou plus rarement (coxsackievirus, paréchovirus HPeV, cardiovirus (81)), avec une émergence régulière de nouveaux variants (82).

Les nouveaux entérovirus

Actuellement, il existe 10 espèces d'entérovirus regroupant une centaine de sérotypes. Les entérovirus sont responsables d'un large spectre de symptômes, bénins ou sévères: paralysies flasques aiguës, méningites aseptiques, syndrome pieds-mains-bouche, angine, maladies respiratoires, cardiopathies aiguës ou chroniques, etc. Un nouveau génotype (EV104) a été identifié en Suisse en 2010 à partir d'échantillons respiratoires puis associé aux rhinopharyngites chroniques suite à une étude épidémiologique. L'EV109 a, lui, été découvert au Nicaragua chez un enfant souffrant d'IRA. A l'heure actuelle, le rôle de ces nouveaux entérovirus est toujours en cours d'investigation, grâce à la conduite d'études épidémiologiques et cliniques de grande ampleur (69).

Les rhinovirus C et D

Grâce au développement des méthodes de biologie moléculaire, deux nouveaux groupes de rhinovirus, C et D, ont été détectés dans des infections respiratoires. Le rhinovirus C apparaît d'ailleurs pour avoir une importance clinique significative entraînant régulièrement des hospitalisations (83).

i- Les polyomavirus KI et WU

Les polyomavirus (PyV) font partie de la famille des *Polyomaviridae*. Ce sont des virus non-enveloppés dont le génome, constitué d'ADN bicaténaire circulaire, est encapsidé. Les trois virus principaux sont, chez le singe : le Simian virus 40 (SV40), et chez l'humain : les BK polyomavirus (BKPyV) et les JC polyomavirus (JCPyV). Sept nouveaux polyomavirus ont été découverts entre 2007 et 2011. Deux d'entre eux ont été détectés dans le tractus respiratoire : le KI- et le WU-PyV, nommés en fonction de l'institut où ils ont été isolés (Karolinska Institute et Washington University). Des études de prévalence ont montré que les KIPyV et WUPyV étaient principalement détectés dans les échantillons d'enfants atteints d'IRA, comme la bronchiolite ou la pneumonie, ainsi que dans des échantillons provenant d'enfants souffrant d'asthme exacerbé (84). Cependant, leur implication en tant qu'agents causatifs des IRA reste débattue (85).

j- Le Torque Teno Virus

L'ADN du Torque Teno Virus (TTV) a été détecté dans différents tissus et sécrétions mais son lien dans les pathologies humaines est toujours controversé. Le TTV appartient à la famille des *Anelloviridae*. Ce sont des virus non-enveloppés, à ADN monocaténaire circulaire de polarité négative. Le TTV serait capable de se répliquer dans différents tissus, incluant le tractus respiratoire (1). Cette famille virale est au centre de ce projet de thèse, c'est pourquoi ses propriétés biologiques et pathologiques seront détaillées dans le chapitre suivant.

Conclusion

De nombreux pathogènes sont ainsi potentiellement impliqués dans les cas de pneumonies et les manifestations cliniques sont souvent assez similaires, ce qui pose un réel problème pour la prise en charge et le traitement rapide des patients. En effet, le traitement par antibiothérapie d'une pathologie bactérienne, diffère grandement de celui des pathologies virales. En cas d'IRA, une antibiothérapie empirique est le plus souvent prescrite mais des antibiotiques seraient ainsi utilisés à tort dans près de 55 % des cas (86). Cette utilisation abusive représente un coût économique important et contribue à augmenter la résistance bactérienne, véritable enjeu des politiques de santé de ces dernières années.

En complément, les connaissances sur l'épidémiologie des infections respiratoires s'affinent constamment, notamment en raison de la découverte de nouveaux virus jusque-là non identifiés. À côté des virus nouvellement décrits mais qui sévissent probablement depuis longtemps, comme le hMPV ou les nouveaux coronavirus, des virus émergent régulièrement, le plus souvent issus de recombinaisons génétiques entre des virus animaux et des virus humains de la même famille, tels que le SARS ou le H1N1 pandémique, et sont une source de préoccupation majeure.

Il y a donc un véritable besoin de disposer de techniques de diagnostic sensibles, spécifiques et rapides permettant le dépistage des pathogènes connus mais également de nouveaux pathogènes potentiels.

2.2- Le diagnostic de la pneumonie

2.2.1- Le diagnostic clinique

a- Les symptômes

Il n'est pas toujours facile, parmi les infections des voies respiratoires basses, de distinguer la pneumonie d'une bronchite aiguë ou d'une exacerbation de bronchite chronique : les symptômes habituels de fatigue, fièvre, céphalées, toux productive ou non étant communs aux 3 affections. Seuls les frissons, la douleur thoracique et la dyspnée sont plus fréquents dans la pneumonie. Ainsi, après l'examen clinique des symptômes, il est nécessaire de recourir à une radiographie du thorax, de face et de profil, qui montre une opacité au niveau des hiles ou des lobes pulmonaires (Figure 19) (87).



Figure 19 : Radiographies des poumons d'un patient sain (A) ou de patients atteints de pneumonies (B et C). La radiographie aux rayons X montre des infiltrations alvéolaires au niveau du lobe moyen droit et du lobe gauche inférieur, suite à une infection par un bocavirus d'un enfant d'un an (B) ou, au niveau du bas du lobe gauche suite à une infection causée par le hMPV et *H. influenzae* d'un enfant de 7 ans (C). Tiré de (62)

Différents outils ont été développés afin d'évaluer le degré de sévérité d'une maladie et d'orienter la prise en charge des patients, leur hospitalisation ou leur admission en soins intensifs. Il existe des scores de gravité généralistes (APACHE II, (88)) ou spécifiques d'une pathologie. Dans le cas de la pneumonie, le score de Fine (PSI, *Pneumonia Severity Index*) et le score CURB-65 (*Confusion, Urea, Respiratory rate,*

Blood pressure, Age) ont été développés et validés pour prédire la mortalité à 30 jours associée à une pneumonie (89). Différents biomarqueurs ont également été décrits permettant de prévoir l'évolution d'une pneumonie vers une forme sévère : la procalcitonine (PCT), la CRP, la copeptine, la forme inactive du peptide atrial natriurétique (ANF, atrial natriuretic peptide), la pro-adrénomédulline, le cortisol et les D-dimères (90). Parmi eux, l'augmentation des taux de PCT (<0,1 ng/ml chez une personne saine) et de CRP (<3mg/ml chez une personne saine et >10mg/ml en cas d'inflammation) sont actuellement les plus employés (91).

b- Les complications de la pneumonie

En l'absence de traitement adapté, la pneumonie peut évoluer vers une bactériémie, une pleuro-pneumopathie, un pneumothorax, ou une méningite. La bactériémie provient à la suite d'une dissémination de germes particulièrement invasifs dans le sang et peut entraîner des méningites ou un choc septique. La pleuro-pneumopathie est caractérisée par la formation d'un épanchement pleural, où l'exsudat inflammatoire va envahir l'espace. Initialement peu inflammatoire, dépourvu en germes et en PNN, il peut devenir purulent, très inflammatoire. L'hospitalisation devient nécessaire afin d'évacuer le pus par des ponctions répétées de l'espace pleural, ou par la mise en place d'un drain (92, 93). L'abcès pulmonaire est une lésion nécrotique contenant du pus au sein du parenchyme pulmonaire et nécessite une hospitalisation. Cette lésion met en communication l'espace pleural et l'atmosphère (pneumothorax : décollement de la plèvre pariétale et viscérale), ce qui peut entraîner un affaissement du poumon, avec des conséquences respiratoires et hémodynamiques parfois graves et urgentes pouvant aller jusqu'à la mort.

c- Le traitement

La plupart des cas de pneumonie peuvent être traités sans hospitalisation.

Typiquement, en l'absence d'un agent étiologique identifié, une antibiothérapie est prescrite. Le choix des antibiotiques dépend de la nature de la pneumonie, des micro-organismes les plus courants dans la zone géographique locale, ainsi que du statut immunitaire et de l'état de santé de l'individu. L'amoxicilline, ou l'érythromycine en cas d'allergie, est l'antibiotique sélectionné pour la plupart des patients atteints de pneumonie d'origine communautaire. Les macrolides, comme la clarithromycine, et les fluoroquinolones sont généralement prescrits en seconde intention. La durée du traitement est traditionnellement de 7 à 10 jours.

Dans le cas de pneumonies virales provoquées par les virus influenza, les anti-grippaux (Tamiflu®, Relenza®) peuvent être efficaces s'ils sont administrés dans les 24h qui suivent le début des symptômes. Dans les autres cas, le repos et une bonne hydratation sont les traitements les plus efficaces. En cas d'aggravation des symptômes, une oxygénothérapie est habituellement prescrite (94).

2.2.2-Le diagnostic étiologique

Le diagnostic étiologique de la pneumonie a plusieurs buts complémentaires. Dans un premier temps, il permet au clinicien d'adapter le traitement au pathogène impliqué. Dans ce but, des examens sanguins peuvent être pratiqués. L'analyse d'un échantillon de sang par la technique d'hémoculture permet de mettre en évidence un ajout bactérien dans le sang, tel que *S. pneumoniae* ou *Hib*. Celui-ci est habituellement complété par la mesure du taux dans le sang des polynucléaires, souvent élevé dans ce type d'infection. Une mesure des gaz du sang peut également être réalisée pour préciser la gravité de l'infection. Des analyses d'expectorations (ECBC, Examen CytoBactériologique des Crachats), de prélèvements naso-pharyngés ou obtenus par des techniques plus invasives (lavages broncho-alvéolaires, liquides pleuraux), peuvent se révéler très utiles mais demandent plus de temps pour être réalisées. Dans un second temps, le diagnostic étiologique permet de conduire des études épidémiologiques à grande échelle. L'épidémiologie étudie la répartition dans l'espace et dans le temps des pathogènes, et sert de fondements à la logique des interventions faites dans l'intérêt de la santé publique et de la médecine préventive.

De manière conventionnelle, le diagnostic repose sur des méthodes de culture du pathogène ou de reconnaissance de l'antigène, mais ces 20 dernières années ont vu le développement de méthodes moléculaires toujours plus élaborées. Nous allons maintenant passer en revue les différentes techniques utilisées en routine dans les laboratoires d'analyses médicales ou de recherche, ainsi que les plus novatrices, pour le moment restreintes aux laboratoires de recherche.

a- Les méthodes non moléculaires

Les méthodes non moléculaires reposent sur la détection du micro-organisme ou de ses antigènes.

La culture

Afin d'identifier la présence de bactéries dans un prélèvement respiratoire, celui-ci va être inoculé sur un milieu nutritif permettant la croissance des germes. Les bactéries vont alors être isolées et le pathogène spécifiquement identifié, grâce à l'utilisation de milieux sélectifs, de tests enzymatiques ou de tests de résistance à certains antibiotiques.

L'identification des virus nécessite la culture de cellules permissives. Cette technique de diagnostic est la plus classique mais aussi la plus longue et la plus coûteuse. La culture cellulaire consiste à inoculer les prélèvements respiratoires sur une nappe cellulaire et à guetter l'apparition d'un effet cytopathogène lié à la multiplication virale. Cet effet survient plusieurs jours voire plusieurs semaines après l'inoculation et retarde d'autant le diagnostic. Chaque virus ayant un tropisme cellulaire propre, il n'y a pas de système de culture universel et le laboratoire doit entretenir plusieurs lignées pour obtenir la

multiplication d'un grand nombre de virus. Par exemple, les virus grippaux se multiplient sur cellules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), les RSV et les adénovirus se multiplient sur des fibroblastes embryonnaires de poumon d'origine humaine, les virus parainfluenza sur les cellules de la lignée Hep-2. Par ailleurs, pour obtenir une bonne sensibilité avec la culture cellulaire, le prélèvement respiratoire doit être acheminé rapidement au laboratoire ou prélevé dans un milieu de transport pour éviter que les virus ne soient inactivés. Malgré sa complexité, la culture cellulaire est longtemps restée la méthode de diagnostic de référence des infections respiratoires virales et les performances des autres outils diagnostiques ont été évaluées par comparaison avec cette technique (95, 96).

La microscopie

L'examen des tissus infectés par microscopie peut se révéler un atout pour l'identification d'agents pathogènes. Bien que largement dépassée en terme de sensibilité (10^5 - 10^6 particules/ml) par rapport aux méthodes moléculaires ou de détection de l'antigène, elle fait particulièrement ses preuves dans le cadre de l'identification de nouveaux pathogènes dont le tropisme demeure inconnu. Le HCoV-SARS a ainsi été mis en évidence comme un nouveau coronavirus par microscopie électronique à transmission, de même que certains adénovirus (97).

La détection des antigènes

Les techniques de diagnostic des infections respiratoires reposent sur la mise en évidence des protéines virales ou bactériennes directement dans les prélèvements. L'avantage majeur de ces techniques par rapport à la culture cellulaire est qu'elles peuvent être pratiquées sur un prélèvement dans lequel les virus sont inactivés, il y a donc moins de contrainte dans les délais d'acheminement au laboratoire. Deux types de techniques sont très utilisés :

- l'immunofluorescence directe consiste à détecter la présence d'antigènes dans les prélèvements à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques du pathogène, liés à la fluorescéine. Dans cette technique, les cellules respiratoires récupérées après centrifugation du prélèvement sont déposées dans les différentes cupules d'une lame, puis les anticorps monoclonaux spécifiques des virus/bactéries respiratoires recherchés sont déposés sur ces cupules. Des inclusions colorées sont retrouvées dans les cellules infectées lors de la lecture des lames au microscope à fluorescence. Cette technique doit être réalisée par un technicien expérimenté, car la lecture des lames, souvent délicate, implique l'utilisation d'un microscope à fluorescence et reste réservée aux laboratoires spécialisés. La sensibilité de la technique d'immunofluorescence directe est généralement un peu inférieure à celle de la culture cellulaire. Cette méthode peut également servir au dépistage d'anticorps dans le sérum.

- l'immunochromatographie sur membrane consiste à détecter la présence d'antigènes à l'aide d'anticorps spécifiques (anti-RSV, antigrippaux ou antipneumococcique) adsorbés sur la membrane. L'industriel prépare des bandelettes sur lesquelles est pré-absorbé un anticorps monoclonal spécifique du pathogène recherché, cet anticorps étant marqué par une enzyme. Le prélèvement respiratoire est mélangé par le manipulateur à quelques gouttes d'un tampon de lyse fourni dans la trousse de diagnostic, permettant de détruire les cellules respiratoires et de libérer les antigènes. Le mélange est déposé sur la bandelette ainsi que le substrat de l'enzyme. Lorsque le pathogène est présent dans le prélèvement, un complexe antigène–anticorps se forme et une bande colorée liée à la réaction enzyme–substrat apparaît sur la bandelette. Ces tests rapides permettent d'obtenir un résultat en 10 à 30 minutes et peuvent être pratiqués par un expérimentateur non spécialisé au laboratoire de biologie médicale ou directement au cabinet médical. Des tests rapides sont ainsi disponibles pour le diagnostic de *S. pneumoniae* (Binax Now® *S. pneumoniae*), de la grippe (Binax Now® FluA–Now® FluB), et de l'infection par le RSV (Binax Now® RSV). Les tests rapides de diagnostic ont une sensibilité inférieure à celle de la culture variant de 75 à 95 % selon les études et à celle de la PCR (45 à 75 %) (98–100).

b- Les méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires reposent sur la détection des génomes, après une lyse des micro-organismes (101–103). Les génomes viraux et bactériens peuvent être détectés : i) par hybridation à l'aide de sondes nucléiques complémentaires de leur séquence, ii) par amplification de leurs acides nucléiques à l'aide d'amorces spécifiques ou dégénérées, ou iii) par séquençage direct.

L'hybridation à l'aide de sondes

La détection des acides nucléiques par hybridation repose sur l'utilisation de sondes d'acides nucléiques spécifiques des pathogènes recherchés. Ces sondes vont être directement marquées par radioactivité ou par un fluorochrome, ou couplées à une molécule 'rapporteur'. Les sondes marquées sont mises au contact des acides nucléiques de l'échantillon clinique et, s'il y a complémentarité, le niveau d'hybridation de chacune des sondes est mesuré, selon le système de marquage employé, permettant l'identification des pathogènes. Même si des études ont décrit par le passé l'utilisation des sondes directement à partir de l'échantillon clinique (104), une amplification préalable des acides nucléiques est désormais réalisée afin d'en augmenter la sensibilité. Différents supports de greffage des sondes ont été commercialisés, comme les puces (Affymetrix) ou les microsphères (Luminex Corp.) (105, 106). Cette technologie est très prometteuse : elle permet en effet de rechercher en une seule analyse la présence de l'ensemble des micro-organismes connus pour être responsables de pathologies respiratoires. Ces technologies, très répandues dans les études d'expression génique ou d'épidémiologie moléculaire,

semblent, à l'heure actuelle, avoir été mises de côté dans le cadre de l'établissement d'un diagnostic étiologique, en raison du coût important des instruments et de leurs réactifs.

Le facteur limitant aux techniques de détection directes est la quantité d'acides nucléiques viraux présents dans l'échantillon, c'est pourquoi de nombreuses méthodes d'amplification d'acides nucléiques ont été développées, de façon à amplifier les pathogènes de manière ciblée ou non.

L'amplification ciblée des pathogènes

Les techniques d'amplification génique consistent à copier un segment du génome à l'aide d'amorces spécifiques. Plusieurs méthodes ont été mises au point au cours du temps, avec plus ou moins de succès. La technique la plus commune est la réaction de polymérisation en chaîne (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). L'amplification est réalisée par une enzyme Taq polymérase thermostable, à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques d'une région du génome recherché. Les produits d'amplification, ou amplicons, sont mis en évidence par différentes techniques reposant sur l'utilisation d'agents intercalants (Bromure d'éthydiu, SYBR Green) ou de sondes oligonucléotidiques spécifiques de l'amplicon, marquées par un fluorochrome. La technique la plus ancienne et la moins chère est l'électrophorèse sur gel d'agarose qui permet la discrimination des amplicons en fonction de leur taille. Cette technique dite en point final a été progressivement remplacée par des techniques en temps réel où l'amplification des acides nucléiques et la détection sont simultanées. L'utilisation d'échantillons standardisés permet en outre une quantification des échantillons. Avec cette technique, une émission de fluorescence a lieu lorsque la sonde s'hybride avec l'ADN cible présent dans l'échantillon. L'émission de fluorescence est détectée à chaque cycle de PCR; la quantité de fluorescence émise est ainsi proportionnelle à la quantité de cible présente dans l'échantillon. Ce suivi en temps réel permet d'augmenter la sensibilité des techniques de biologie moléculaire et d'augmenter le nombre de pathogènes détectés simultanément, grâce à l'utilisation de fluorochromes différents. Une étape de transcription inverse (RT, *Reverse Transcription*) est ajoutée pour la détection des virus à ARN, on parle alors de RT-PCR. Une autre technique, la MassTag PCR, consiste à détecter les génomes en fonction du poids moléculaire d'un "tag" couplé aux amorces d'amplification (107). La RT-PCR en temps réel est actuellement la méthode la plus courante en routine pour la détection des pathogènes respiratoires (108).

L'amplification non-ciblée des pathogènes

Comme nous l'avons vu précédemment, le panel des pathogènes respiratoires s'élargit au cours du temps en fonction de la découverte ou de l'émergence de nouveaux pathogènes, c'est pourquoi il est intéressant de disposer de techniques de détection des pathogènes indépendantes de la séquence nucléotidiques de ceux-ci. Après amplification et marquage, les génomes pourront alors être identifiés par séquençage. L'utilisation de

ces techniques est généralement restreinte aux laboratoires de recherche.

Plusieurs méthodes dérivées de la PCR ont ainsi été développées dans les années 90, et consistent, d'une part, à ajouter des sites de liaison pour les amorces à des fragments d'ADN, les adaptateurs, et, d'autre part, à enrichir les séquences par amplification. Les deux méthodes les plus connues sont : la PCR soustractive (RDA, *Representational Differential Analysis*) et l'amplification à une seule amorce indépendante de la séquence (SISPA, *Sequence Independent Single Primer Amplification*). Bien que la RDA ait été utilisée avec succès pour découvrir plusieurs virus, dont l'herpèsvirus HHV-8 ou le TTV (109), les méthodes de type SISPA ont été plus populaires dans les dernières années.

La méthode de PCR soustractive consiste à comparer les gènes exprimés dans un tissu cible ou *tester* (infecté) par rapport à un tissu contrôle ou *driver* (sain). Elle se déroule en plusieurs étapes : i) synthèse d'ADNc bicaténaire et clivage en petits fragments par digestion enzymatique, ii) amplification des fragments par PCR, et iii) hybridation soustractive. La digestion enzymatique par *DpnII* permet de créer des extrémités 5'-P protubérantes sur lesquelles les adaptateurs vont pouvoir être fixés par ligature. Les tissus *tester* et *helper* sont alors mélangés dans un rapport 1/100, dénaturés puis réhybridés en formant 3 types d'hybrides : les séquences *tester/tester*, *tester/helper* et *helper/helper*. L'excès d'ADN *helper*, va permettre, après amplification, d'enrichir l'échantillon spécifiquement en séquences pathogènes (non présentes dans le tissu *helper*). A l'issue de l'amplification, les ADN monocaténares sont éliminés et la procédure est réitérée plusieurs fois (Figure 20). Une fois les échantillons suffisamment enrichis, les amplicons peuvent être clonés pour la construction d'une librairie, soit clonés directement (110). L'utilisation de cette technique est limitée par le fait qu'il faut disposer de deux sources d'acides nucléiques les plus similaires possibles afin d'isoler de nouvelles séquences d'intérêt bactériologique et virologique, et que la sensibilité sur les séquences peu exprimées reste insuffisante.

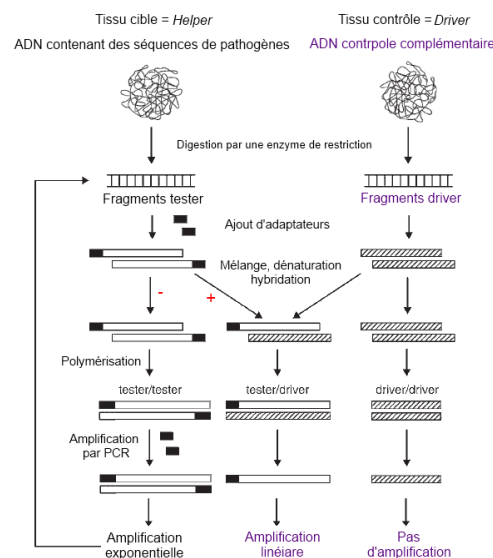


Figure 20 : Principe de la PCR soustractive pour la détection de nouveaux pathogènes. Adapté de (111)

Plusieurs méthodes d'enrichissement de l'échantillon ont été mises au point afin d'améliorer les performances de la RDA, comme la SPAD-RDA (*Selectively primed adaptive driver*, (112)), ou la PEER-RDA (*Primer Extension Enrichment Reaction*). Cette dernière technique a montré de bons résultats afin d'identifier des pathogènes viraux après inoculation de lignées cellulaires avec des prélèvements cliniques (113).

Brièvement, dans le cas de la méthode SISPA, des amorces *linker* de séquence connue sont attachées aux extrémités opposées d'ADN bicaténaire dans un échantillon d'ADN, après digestion enzymatique. Ces séquences *linker* fournissent ensuite les séquences terminales communes pour une amplification, en utilisant une amorce complémentaire des séquences *linker*. Généralement, la méthode SISPA est mise en œuvre pendant 20-30 cycles d'amplification, en utilisant un cycle thermique permettant d'obtenir successivement une dénaturation et une polymérisation initiée par une amorce du second brin d'ADN. De nombreuses variations à ce protocole ont été décrites ces dernières années. La méthode VIDISCA (*Virus-Discovery-cDNA-AFLP*), qui utilise deux adaptateurs/amorces au lieu d'une pendant l'étape d'amplification par PCR, lui conférant une meilleure spécificité et sensibilité, a ainsi permis l'identification du coronavirus HCoV-NL63 (114). Une autre variation de la SISPA est la RT-PCR avec des amorces aléatoires (RT-PCR aléatoire, *random RT-PCR*). Celle-ci utilise une première amorce, contenant en 5' une séquence connue d'environ 20 bases (incluant un site de restriction pour permettre un clonage ultérieur) et une séquence dégénérée de 6 ou 7 bases en 3', qui va pouvoir se fixer aléatoirement sur le génome. La PCR est réalisée avec une seconde amorce, complémentaire de la séquence connue en 5' (Figure 21). Ce protocole, qui permet de s'affranchir de l'étape de ligature des *linker*, a permis la découverte du bocavirus (115).

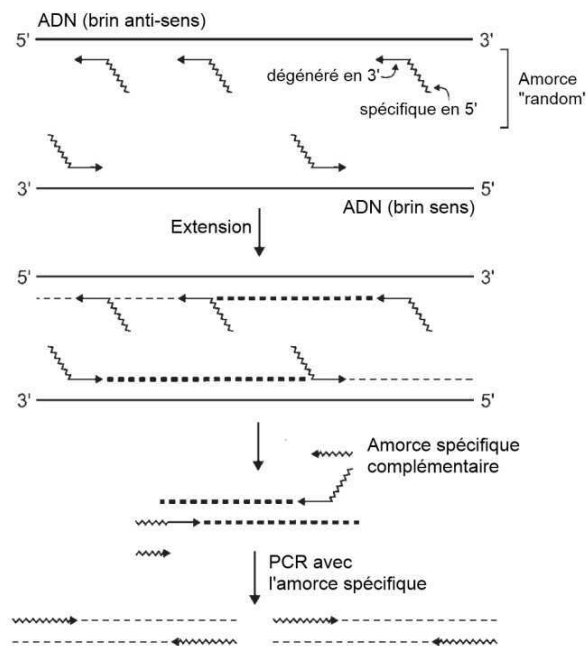


Figure 21 : La PCR aléatoire. Adapté de (111)

De même que pour la RDA, des techniques permettant d'augmenter la sensibilité ont été développées et visent généralement à augmenter la concentration d'ADN viral ou bactérien avant sa détection. Elles sont nommées méthodes d'amplification du génome entier (WGA, *Whole Genome Amplification*). Parmi elles, la technique d'amplification par déplacement multiple (MDA, *Multiple Displacement Amplification*) est la plus couramment employée (116). L'amplification de l'ADN est réalisée à 30°C grâce à des amorces aléatoires hexamériques et à une enzyme à haute fidélité, la polymérase $\phi 29$ issue d'un bactériophage. Cette enzyme présente une activité polymérase 5'-3', une activité de relecture 3'-5' et a la propriété de pouvoir déplacer le brin complémentaire de celui qu'elle réplique afin de poursuivre son activité indéfiniment. Elle produit ainsi des fragments de 7 à 10 kb. Elle peut être appliquée aux ADN et aux ARN après transcription inverse, et est particulièrement efficace sur les génomes circulaires (RCA, *Rolling-Circle Amplification*), comme nous pouvons le voir sur la Figure 22, et a permis l'identification de virus apparentés au TTV (117).

Toutes ces techniques d'amplification non ciblée permettent d'enrichir et d'amplifier l'ensemble des acides nucléiques présents, dont des séquences potentiellement nouvelles à partir d'échantillons cliniques, mais il est ensuite nécessaire de les caractériser. Cette étape est réalisée par le séquençage. L'identification de la séquence est alors réalisée en la confrontant aux bases de données existantes grâce à des outils bioinformatiques tels que le BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) ou les analyses phylogénétiques. De nombreux pathogènes ont ainsi été découverts mais cette technique d'identification présente des défauts. D'une part, les stratégies classiques de séquençage de type Sanger, reposant sur l'utilisation de didésoxyribonucléotides marqués, sont limitées en taille, les fragments excédant rarement 1kb. Ensuite il est généralement nécessaire de cloner les produits d'amplification, ce qui introduit un biais, étant donné que certaines séquences sont plus facilement intégrées que d'autres. Enfin, l'identification par homologie signifie que de nombreuses séquences demeurent non identifiées, par manque de similitude avec les séquences existantes (111).

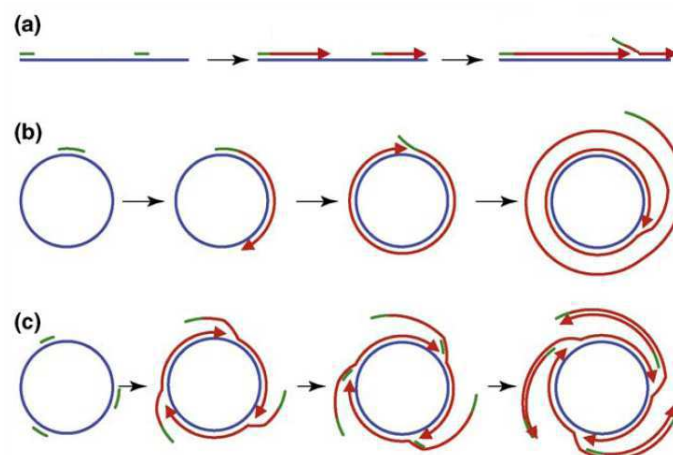


Figure 22 : Amplification du génome entier grâce à la polymérase $\phi 29$ à partir d'un génome linéaire (a) ou circulaire (b et c) et d'amorces spécifiques (b) ou hexamériques (a et c). Adapté de (118)

Le séquençage de nouvelle génération

Des progrès technologiques considérables ont eu lieu ces dernières années dans le séquençage des génomes et un ensemble de méthodes sont apparues à partir de 2005 pour réaliser du séquençage à très haut débit, désigné sous le terme de séquençage de nouvelle génération (NGS, *Next Generation Sequencing*) (119). Ce procédé se caractérise par l'utilisation d'approches massivement parallèles, permettant de séquencer des centaines de milliers de fragments simultanément, et permettent de s'affranchir des étapes de clonage et de constitution de banques génomiques. Il est désormais théoriquement possible de séquencer des molécules uniques d'ADN, et l'ensemble du génome d'un humain peut être obtenu en l'espace de quelques semaines.

Le marché des plateformes de NGS est couvert par 3 grands groupes que sont Roche, Illumina et Life Technologies, ayant respectivement proposé de manière successive, leur première plateforme à savoir le 454, le Genome Analyser et enfin le SOLiD. Depuis, le marché s'est étoffé proposant un panel de technologies aux principes et aux caractéristiques propres mais complémentaires (Figure 24). Chaque plateforme possède ses avantages et ses inconvénients, mais le fonctionnement global est commun. Le NGS se décompose en plusieurs étapes incontournables. Les acides nucléiques sont d'abord extraits, purifiés puis fragmentés par nébulisation, sonication ou digestion enzymatique. Les fragments obtenus sont soumis à une réparation afin de phosphoryler leurs extrémités.

On obtient ainsi une librairie de séquences, qui vont devoir être amplifiées. L'amplification est effectuée par une PCR à émulsion à l'aide d'adaptateurs ou par amplification de clusters (*bridge PCR*). On obtient alors des clones qui vont être placés dans la cellule d'analyse (*flow cell*) et séquencés. Les chimies utilisées sont le pyroséquençage, le séquençage par terminateurs d'élongation (*reversible dye-terminator*) ou le séquençage par ligature séquentielle de sondes oligonucléotidiques (Figure 23).

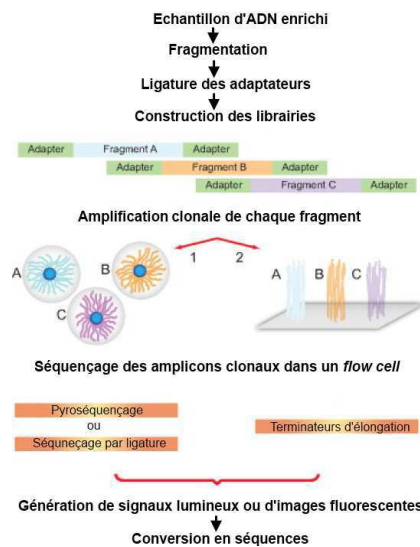


Figure 23 : Principe des techniques de séquençage de nouvelle génération. Adapté de (120)

Séquenceurs 2 ^{ème} génération											
Société	Roche			Illumina				Life Technologies			
Plateforme											
Technologie	Titanium	FLX Titanium					Chip 314 Chip 316 Chip 318				
Acides nucléiques (matrice)											
Ligation adaptateurs											
Méthode d'amplification	PCR en émulsion			« Bridge PCR »				PCR en émulsion			
Méthode de séquençage	Synthèse (Pyroséquençage)			Synthèse				Ligation			
Durée de séquençage/run	10h	10h 20h	26h	8jrs	8jrs	14jrs	2h	12jrs	8jrs	8jrs	
Capacité (Mb) séquençage/run	50	500 900	1500	100000	200000	95000	>10 >100 >1000	70000	80000	150000	
Taille moyenne des reads	400	400 700	150+150	100+100	100+100	150+150	100 >100 >100	50+35	75+35	75+35	
Coût (\$) /run	1100	6200	750	10000	20000	11500	500 750 950	8150	6100	10500	
Coût machine + annexes ((K\$))	110+25	500+30	125	560	690	250	50+20	480+55	350+55	600+55	
Exactitude de séquençage (%)	99	99	99,9	99,9	99,9	99,9	99	99,95	99,95	99,99	
Re-séquençage											
Séquençage de novo											
RNA-seq											
CHIP-seq											
Amplicon sequencing											
Détection mutation											
	Bactérie, Virus		Levure		Plante, Mammifère, Humain						

Figure 24 : Caractéristiques techniques des appareils de séquençage de nouvelle génération. D'après (121)

Les technologies NGS sont actuellement utilisées en diagnostic dans différents buts : le séquençage de génomes entiers par des approches de métagénomique (séquençage de novo), l'étude de la diversité des génomes inter- ou intra-organisme (quasi-espèces), la détection de mutations de résistance aux antibiotiques ou aux antiviraux ou des approches plus globales d'étude du microbiome ou du virome humain et environnemental (122).

De récentes études (123–125) ont ainsi entrepris d’effectuer un séquençage massif de prélèvements provenant de patients souffrant d’infections respiratoires, révélant la présence d’une multitude de pathogènes et démontrant les avantages indéniables de ces techniques en terme d’étiologie. L’apport grandissant des technologies NGS au diagnostic a, de plus, été démontré en cas d’éclosions de maladies infectieuses (126). Toutefois, l’ensemble de ces études met également en avant le problème principal que causent ces nouvelles technologies, à savoir quelle interprétation faire de la quantité de données générées. D’une part, le coût encore élevé de ces techniques fait que peu d’échantillons de contrôle sont disponibles, les erreurs d’assemblage des séquences restent très fréquentes et de fort taux de contamination sont souvent observés. D’autre part se pose la question de la signification biologique de ces observations. En disposant d’une profondeur de séquençage d’une molécule d’ADN, de nombreuses traces d’ADN de pathogènes sont détectées mais ne sont pas nécessairement représentatives d’une infection en cours, passée ou future (127).

Conclusion

Le tableau clinique de la pneumonie présente des symptômes communs avec les autres infections aigües des voies respiratoires basses, et diffère très peu entre les différents pathogènes impliqués. Ainsi, il peut être difficile pour un clinicien de déterminer l’étiologie d’une pneumonie afin d’adapter le traitement de son patient. De nombreuses études sont ainsi en cours afin : i) d’améliorer nos connaissances sur la pathogénicité des agents bactériens et viraux, ii) de connaître la distribution géographique et la saisonnalité de ces pathogènes, et iii) de prévenir, ou tout du moins, de surveiller l’émergence de nouveaux pathogènes respiratoires. Ces études reposent sur l’utilisation d’outils de diagnostic toujours plus performants, et l’apport de la biologie moléculaire et ses récentes avancées dans ce domaine a été indéniable. Le pourcentage d’échantillons non-diagnostiqués dans les cas de pneumonies a ainsi pu être significativement réduit : proche des 60% avec les techniques de culture classiques, il est désormais compris entre 14 et 35% selon les études (128).

Toutefois, la principale limite de ces techniques extrêmement sensibles, de biologie moléculaire et de séquençage à haut débit, réside dans le fait qu’elles permettent de découvrir le génome de nouveaux agents infectieux mais ne témoignent en aucun cas de leur pathogénicité. Il est alors du travail du scientifique de faire les preuves de l’implication de ces nouveaux agents dans une pathologie. Cette problématique est au cœur des débats, depuis de nombreuses années, concernant l’implication potentielle du TTV et des autres membres de sa famille virale, les *Anelloviridae*, dans une pathologie. Avant de nous intéresser à notre tour à cette question, le prochain chapitre de cette thèse sera consacré à la description de cette famille virale surprenante.

LES ANELLOVIRIDAE

3.1	LA FAMILLE DES ANELLOVIRIDAE	88
	3.1.1- <i>Le virion</i>	88
	3.1.2- <i>Positionnement taxonomique</i>	89
	3.1.3- <i>Phylogénie</i>	90
3.2	CARACTERISTIQUES DES ANELLOVIRIDAE	91
	3.2.1- <i>Organisation génomique</i>	91
	3.2.2- <i>Transcription</i>	93
	3.2.3- <i>Les protéines virales</i>	93
	a- <i>L'ORF1</i> - 94	
	b- <i>L'ORF2</i> - 94	
	c- <i>Les ORF additionnelles</i> - 95	
	d- <i>Localisation cellulaire</i> - 95	
	3.2.4- <i>Réplication des Anelloviridae</i>	95
	a- <i>Les sites de réplication</i> - 96	
	b- <i>Mécanisme de réplication</i> - 96	
	3.2.5- <i>Variabilité génétique</i>	97
	a- <i>Mutations</i> - 97	
	b- <i>Recombinaisons/réarrangements</i> - 97	
	c- <i>Région conservée</i> - 98	
3.3	ÉPIDEMIOLOGIE DES ANELLOVIRIDAE	98
	3.3.1- <i>Les méthodes de détection</i>	98
	3.3.2- <i>Prévalences</i>	99
	3.3.3- <i>Modes de transmission</i>	100
	3.3.4- <i>Compartiments biologiques et environnementaux</i>	100
3.4	L'IMPLICATION DES ANELLOVIRIDAE DANS LA SANTE DE L'HOTE	101
	3.4.1- <i>Immunologie des infections</i>	101
	a- <i>TTV et immunité innée</i> - 101	
	b- <i>TTV et immunité adaptative</i> - 102	
	3.4.2- <i>Pathologies potentiellement associées aux Anelloviridae</i>	103
	a- <i>Pathologies hépatiques</i> - 103	
	b- <i>Infections respiratoires aiguës</i> - 103	
	c- <i>Cancers</i> - 103	
	d- <i>Désordres auto-immuns</i> - 104	
	e- <i>Autres pathologies</i> - 104	

La famille des *Anelloviridae* (du latin *anellus* signifiant petit anneau) a été officiellement créée par le comité international de taxonomie des virus (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*) en 2009, en réponse à l'isolation d'un nombre croissant d'espèces virales humaines et animales, présentant des caractéristiques moléculaires spécifiques (129).

La première démonstration de l'existence de ces virus a eu lieu en 1997 par une équipe de chercheurs japonais qui, en examinant par PCR soustractive les échantillons sanguins de patients atteints d'hépatite non A-G post-transfusionnelle, a découvert un nouveau virus, avec un génome à ADN circulaire simple brin de très petite taille. Ces auteurs ont nommé ce nouvel agent le virus TT (TTV), d'après les initiales du premier patient chez lequel il a été identifié, et l'ont proposé comme cause possible d'infections hépatiques (109). Cette découverte a rapidement été suivie par l'identification, à la fois chez l'homme et différentes espèces animales, de plusieurs virus proches du TTV, mais avec une taille encore plus petite et génétiquement très divergents (130). A l'heure actuelle, la famille des *Anelloviridae* regroupe environ une quarantaine d'espèces, aux propriétés peu communes pour une famille virale, et dont les mécanismes biologiques demeurent peu connus, comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants.

3.1- La famille des *Anelloviridae*

3.1.1- Le virion

Les *Anelloviridae* ont été définis comme des virus non enveloppés, d'un diamètre de 30-32 nm (Figure 25). Leur densité dans le sérum a été estimée entre 1,28 et 1,32 g/cm³ en chlorure de césium. La capsid virale, probablement icosaédrique, protège un génome circulaire monopartite, à ADN simple brin, de polarité négative. La taille du génome varie entre 2,1 et 3,9 kb.

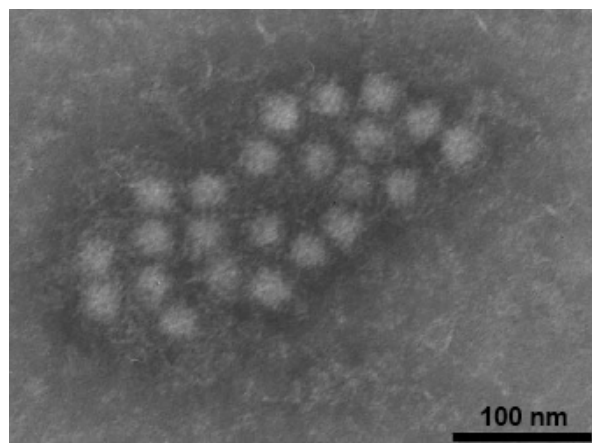


Figure 25 : Microscopie électronique de particules de TTV agrégées dans un échantillon sanguin. Tiré de (131)

Ces propriétés ont été démontrées grâce à différents tests : i) ces virus sont résistants à la DNase I, ce qui témoigne de la présence d'une capsidie protégeant le génome ; ii) ils sont sensibles à la nucléase "mung bean" mais résistants à la RNase A et aux enzymes de restriction, ce qui informe sur la nature simple brin de leur génome ; iii) des études d'hybridation utilisant des sondes nucléotidiques sens ou anti-sens ont prouvé la polarité négative de leur génome ; iv) leur densité reste inchangé après un traitement par un détergent, ce qui atteste de l'absence d'enveloppe (132, 133).

3.1.2-Positionnement taxonomique

Le TTV a été le premier virus possédant un génome à ADN circulaire simple brin à être identifié chez l'homme. D'autres hôtes étaient déjà connus pour être porteurs de ce type de virus, aussi bien chez les procaryotes (*Microviridae* et *Inoviridae*) que dans le règne animal (*Circoviridae*) ou végétal (*Geminiviridae* et *Nanoviridae*), si bien que le TTV a d'abord été considéré comme un circovirus infectant les humains. Les deux principaux virus de cette famille virale sont le virus de l'anémie infectieuse du poulet (CAV, *Chicken Anemia Virus*) et le circovirus porcine (PCV, *Porcine CircoVirus*), tous deux responsables de pathologies sévères chez leurs hôtes respectifs (Figure 26). L'étude de ces virus ayant débutée bien avant celle des *Anelloviridae*, les connaissances acquises sur ces virus ont largement contribué à l'étude des anellovirus (AV) (134).

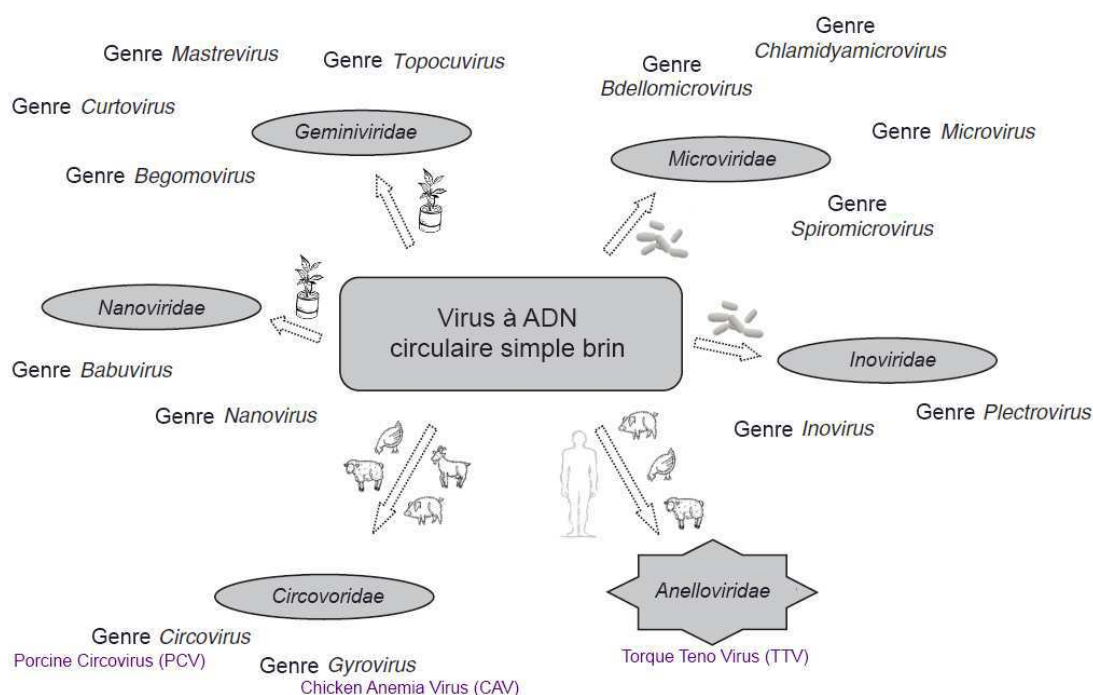


Figure 26 : Classification des virus à ADN simple brin et leurs principaux hôtes (plante, animal, homme, bactérie). Adapté de (134)

3.1.3-Phylogénie

Après la découverte du TTV, des études de sa prévalence ont été promptement mises en place. En 1999, au cours d'une étude menée chez des donneurs de sang, l'analyse de produits d'amplification a révélé la présence de fragments de taille inférieure à celle attendue pour le TTV, et a conduit à l'identification de plusieurs génomes circulaires d'environ 2900nt, désignés initialement TTV-like mini virus, puis officiellement nommés Torque Teno Mini Virus (TTMV) (135). En 2005, de nouvelles séquences de 2200 et 2600nt, fortement divergentes et provisoirement nommées "small anellovirus" ont été identifiées par la technique SISPA, chez des patients présentant une sérologie positive pour le HIV. Des études complémentaires ont montré qu'il s'agissait, en réalité, de formes tronquées de génomes d'environ 3,2 kb, dénommés, par la suite, Torque Teno Midi Virus (TTMDV) (136, 137). Simultanément à ces études chez l'homme, de nouvelles séquences ont été isolées chez de nombreuses espèces animales (primates non humains, rongeurs, animaux domestiques ou de ferme, mammifères marins) (138, 139).

Toutes ces séquences sont caractérisées par leur extrême diversité génétique les unes par rapport aux autres. Cette diversité, considérablement élevée, comparée aux autres groupes de virus à ADN simple brin, a compliqué leur classification jusqu'à la formation d'un genre *Anellovirus* puis de la famille virale des *Anelloviridae*. A l'heure actuelle, cette famille est composée de 11 genres, présentant une divergence nucléotidique dans l'ORF-1 d'au moins 56%. Les virus humains ont été inclus dans les genres *Alphatorquevirus* pour les TTV, *Betatorquevirus* pour les TTMV, et *Gammatorquevirus* pour les TTMDV. Les TTV identifiés chez différentes espèces animales appartiennent à 8 autres genres, indiqués par des lettres grecques Delta-, Epsilon-, Eta-, Iota-, Kappa-, Lambda-, Theta- et Zetatorquevirus (Figure 27). Parmi les virus animaux, les Torque Teno Sus Virus (TTSuV), infectant les porcs, ont été les plus largement étudiés, notamment comme modèles potentiels des infections humaines (140). Cette classification évolue régulièrement en raison de la découverte de nouvelles séquences. La création de nouveaux genres, ainsi que le rapprochement du CAV, qui présente des caractéristiques moléculaires proches des AV, comme nous le verrons ultérieurement dans ce chapitre, sont ainsi actuellement pris en considération par l'ICTV (141).

Au moment d'écrire ces lignes, plus de 200 séquences complètes ont été déposées dans les bases de données et les trois genres d'AV humains TTV, TTMV et TTMDV étaient composés de 29, 12, et 15 espèces virales, respectivement. Dans cette classification, chaque isolat est considéré comme appartenant à une espèce différente lorsque sa divergence nucléotidique dans l'ORF1, avec sa plus proche voisine, est supérieure à 20%. Cela dénote que, même au sein d'une même espèce, la diversité génétique est inhabituellement élevée. A titre de comparaison, une divergence

nucléotidique de 10% ou moins dans le gène *late-1* est acceptée entre deux isolats de papillomavirus d'un même génotype (142).

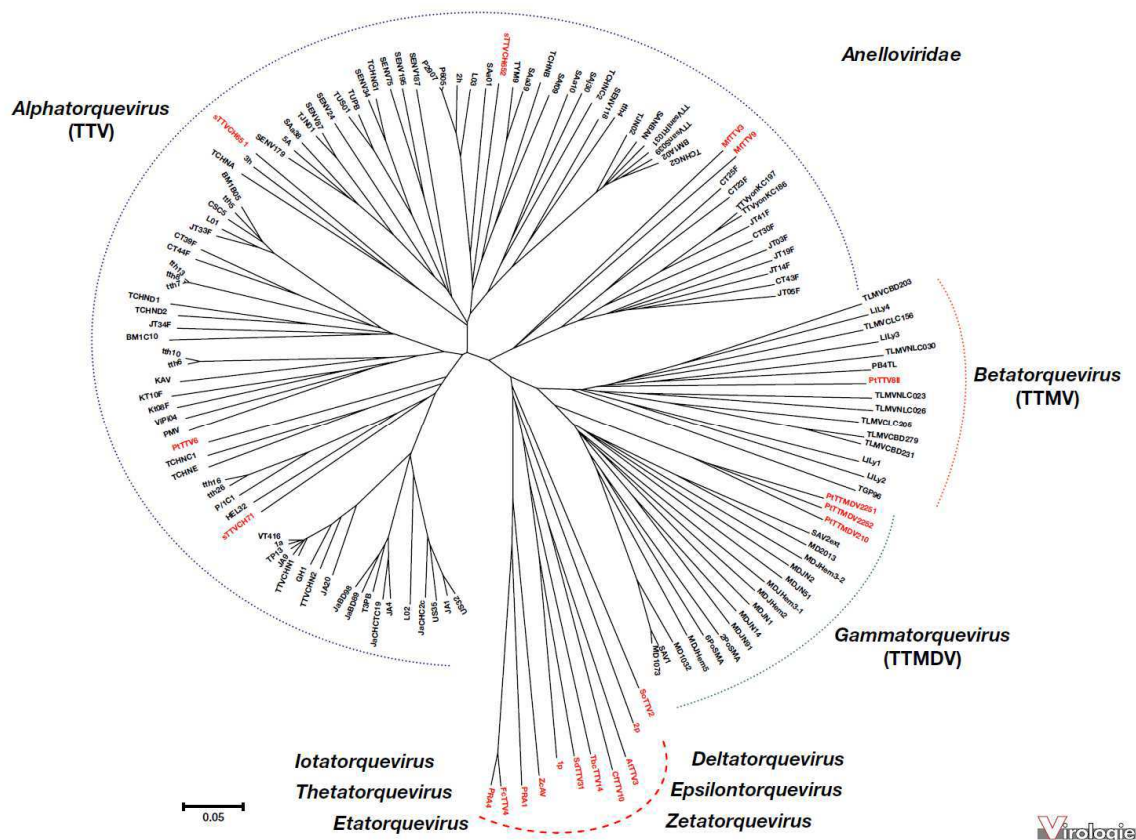


Figure 27 : Arbre phylogénétique de la famille des *Anelloviridae*, d'après le rapport de l'ICTV de 2009. (Méthode *neighbour-joining*/p-distance, en nucléotides, sur l'ORF1 complète). Les isolats animaux sont représentés en rouge sur l'arbre. D'après (143)

3.2- Caractéristiques des *Anelloviridae*

Les propriétés biologiques des AV sont encore mal définies. Ceci est dû, du moins en partie, à l'absence d'un système cellulaire éprouvé permettant la persistance du cycle viral, ce qui limite fortement les possibilités d'investigations, aussi bien sur les mécanismes précis de transcription, de traduction ou de réplication de ces virus, mais aussi sur les effets qu'ils peuvent avoir sur les cellules et les organes infectées.

3.2.1- Organisation génomique

La taille du génome des AV humains varie entre 3,5 et 3,9 kb pour les TTV, entre 3,1 et 3,2 kb pour les TTMDV, et entre 2,7 et 2,9 kb pour les TTMV. Malgré cette différence, l'organisation génomique est globalement conservée au sein de la famille avec un codage unidirectionnel.

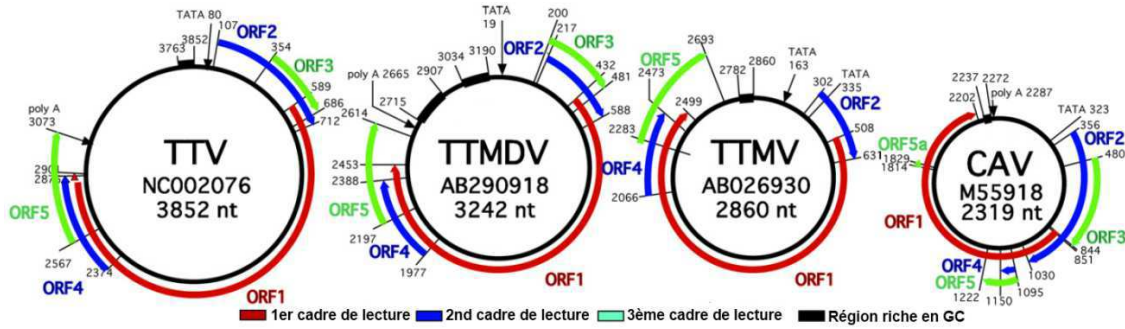


Figure 28 : Organisation génomique des *Anelloviridae* et du CAV. Adapté de (144)

La région codante contient au moins deux cadres ouverts de lecture (ORF, *Open Reading Frame*), les ORF-1 et -2, et des petites ORF partiellement ou totalement chevauchantes. L'ORF1 de certains isolats contient un domaine central avec des régions hypervariables (HVR, *HyperVariable Region*). La région intergénique (UTR, *UnTranslated Region*) représente environ un tiers de la séquence virale et contient généralement une région d'une centaine de nucléotides, riche en GC, susceptible de former des structures secondaires de type « épingle à cheveux ». Cette organisation génomique est également partagée avec le circovirus aviaire, le CAV (Figure 28) (145).

Plusieurs motifs moléculaires sont communément retrouvés dans les séquences d'AV : la boîte TATA et un signal poly-A situés en amont et en aval de la région codante, une région riche en résidus arginine en N-ter de l'ORF1, ainsi que des motifs de type FxTL et YxxK, décrits comme étant liés à la protéine de réplication Rep des circovirus. Au niveau de l'ORF2, un motif protéique WX₇HX₃CX₁CX₅H est similaire au CAV (Figure 29) (146).

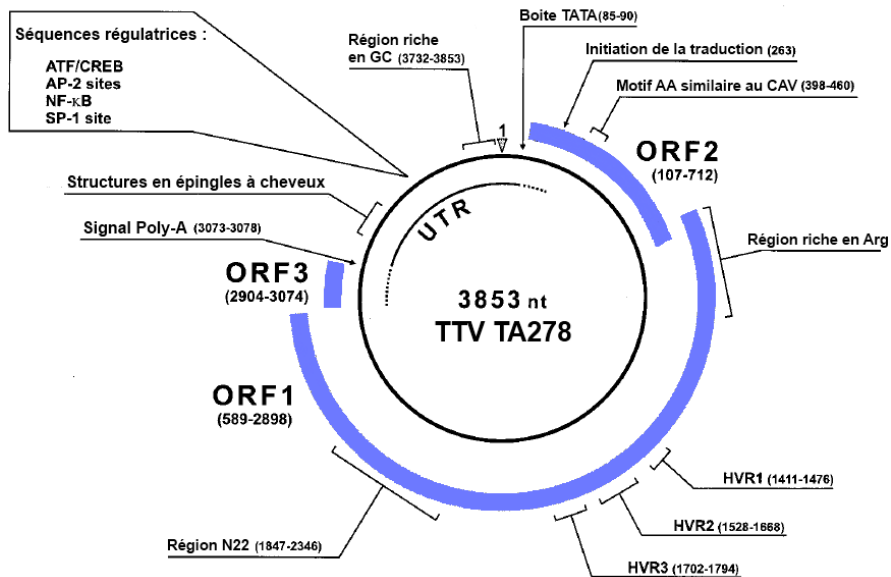


Figure 29 : Motifs moléculaires communs au sein des AV. Adapté de (146)

3.2.2-Transcription

Les connaissances sur l'expression génique des AV ont été obtenues par des approches de transfection et d'analyse d'échantillons biologiques. Ainsi, trois types d'ARN messagers (ARNm) d'environ 2 800-3 000 nt, 1 200 et 1 000 nt ont été mis en évidence. Ces 3 ARNm proviennent d'un promoteur unique localisé dans la région -154/-76 par rapport au site d'initiation de la transcription, et sont polyadénylés en position 2978. Les trois transcrits sont épissés au niveau d'un court intron (~ 100 nt) localisé approximativement 70 nt après le site d'initiation de la transcription, et les deux formes les plus courtes (1,2 et 1,0 kb) résultent d'un épissage alternatif situé environ 400 nt après le premier intron (147, 148). Des transcrits additionnels ont également été mis en évidence pour d'autres génotypes de TTV, consécutifs à la présence d'autres sites d'épissage et de réarrangements intragénomiques (149).

En complément, il semble que la région UTR joue un rôle important dans la régulation de la transcription. Deux études reposant sur l'utilisation de plasmides luciférase ont, en effet, rapporté la présence de séquences promotrices et amplificatrices de la transcription dans cette région (150, 151). De plus, *in silico*, l'UTR présente un grand nombre de sites de liaison pour des facteurs de transcription (ATF/CREB, AP-2, SP-1, USF, E2F, NF- κ B, Figure 30).

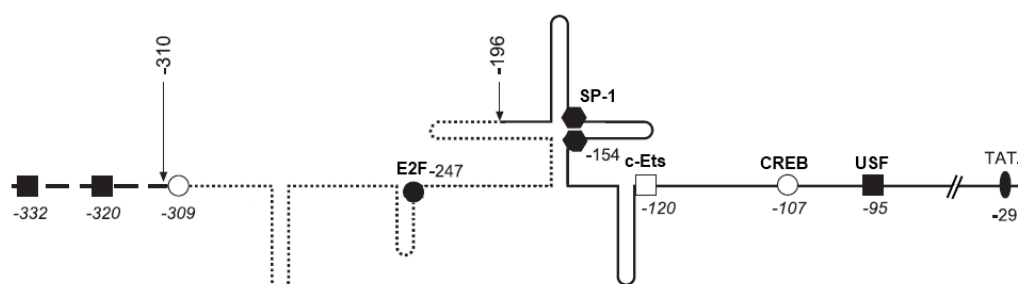


Figure 30 : La région 5'-UTR contient des éléments de régulation de la transcription, ainsi des sites de liaison pour les facteurs de transcription. Adapté de (151)

3.2.3-Les protéines virales

Plus récemment, la transfection d'un génome complet de TTV dans la lignée cellulaire 293 a démontré qu'au moins six protéines différentes étaient synthétisées lors de la réplication du TTV, résultant à la fois d'un épissage alternatif mais également d'une initiation alternative de la traduction (152). Le long transcrit de 2,8 kb exprime ainsi les protéines ORF1 (736 aa) et ORF2 (117aa), à partir de 2 codons AUG. De la même manière, le transcrit de 1,2 kb génère les protéines ORF2/2 et ORF1/1 et le transcrit de 1,0 kb, les protéines ORF2/3 et ORF1/2 (Figure 31). De plus, les stratégies de transcription et de traduction semblent être modulées selon les isolats considérés, et probablement selon le type de cellules infectées (153).

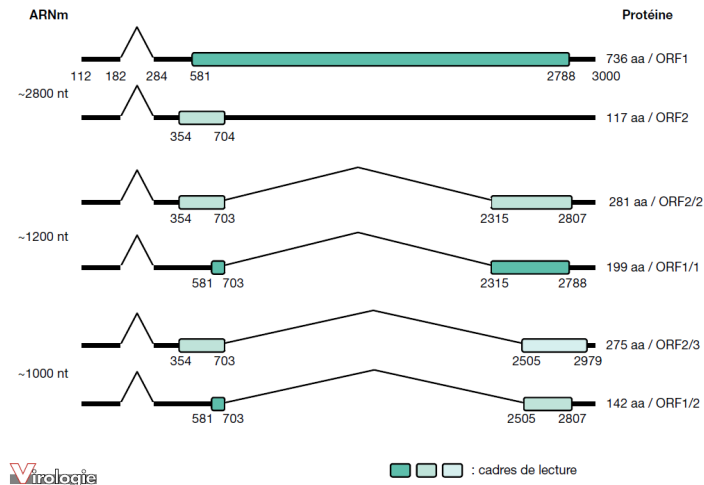


Figure 31 : Transcription et traduction chez les AV (TTV-HEL32). Tiré de (143)

Les informations relatives aux fonctions des différentes protéines exprimées lors de l'infection virale sont fragmentaires et ont souvent été déduites directement à partir des séquences oligonucléotidiques et protéiques ou grâce à des similitudes avec les autres virus à ADN circulaire simple brin.

a- L'ORF1

L'ORF1 des *Anelloviridae* code probablement pour une ou plusieurs protéines assurant des fonctions structurales et/ou fonctionnelles. Au niveau structurel, l'extrémité N-terminale est systématiquement riche en résidus arginine, lesquels présenteraient une activité de liaison à l'ADN et un rôle dans l'encapsidation du génome, comme c'est le cas pour le virus de l'hépatite C (154). Au niveau fonctionnel, il a d'une part été suggéré que la présence de codons stop dans l'ORF1, aboutissant à la traduction d'une protéine tronquée, pourrait former des particules virales défectives (155). D'autre part, la variabilité nucléotidique et protéique de l'ORF1, particulièrement au niveau des HVR, est supposée pouvoir permettre au virus d'échapper aux réponses immunes de l'hôte. Enfin, la présence de motifs Rep similaires à ceux des circovirus laisse supposer d'un rôle pour cette protéine dans la réplication virale (156).

b- L'ORF2

La protéine codée par l'ORF2 d'un génotype de TTV a été étudiée après sa transfection et a montré sa capacité à bloquer la cascade de signalisation du NF- κ B, en interagissant avec les sous-unités catalytiques IKK α et IKK β de la protéine inhibitrice I κ B α . Cette interaction inhibe la dégradation d'I κ B α , et ainsi l'activation du NF- κ B, bloque l'entrée des sous-unités p50 et p65 dans le noyau cellulaire et empêche ainsi la surexpression de différents médiateurs inflammatoires (IL-6, IL-8, cyclo-oxygénase-2). Ainsi, il est supposé que la protéine issue de l'ORF2 pourrait être impliquée dans les phénomènes d'échappement du TTV aux réponses immunitaires innées et adaptatives (157). Il apparaît, de plus, que cette protéine pourrait posséder une activité phosphatase,

en raison de motifs communs avec la protéine VP2 du CAV. Les phosphatases sont connues pour avoir des fonctions importantes dans la régulation de l'expression génique, certaines voies de transduction du signal, et dans la réponse humorale. Une possible implication de la protéine issue de l'ORF2 dans les mécanismes de persistance virale est ainsi supposée. Pour aller plus loin, des variations dans la séquence de cette ORF pourraient conduire à la perte de cette activité et moduler la pathogénicité du virus (158).

c- Les ORF additionnelles

Le nombre et la taille des ORF additionnelles varient beaucoup entre les différentes espèces des *Anelloviridae*. Leur fonction en est donc difficilement interprétable. Une étude sur l'ORF3 de l'isolat TTV-TA278, codant pour une protéine dénommée TAIP (*TTV-derived Apoptosis-Inducing Protein*), a montré des similarités de séquences avec l'apoptine du CAV. Cette protéine induit une apoptose indépendante de p53 dans les cellules infectées par le virus aviaire. TAIP n'a montré des propriétés pro-apoptotiques que dans quelques lignées cellulaires. Cependant, ces résultats laissent à supposer que les ORF additionnelles des AV pourraient participer, par leur présence et leurs fonctions, à la pathogénicité de ces virus (159).

d- Localisation cellulaire

Les protéines issues des ORF-1 et -2 du TTV-génotype 6 ont d'abord été localisées dans le cytoplasme de cellules transfectées (148). Au contraire, la protéine codée par l'ORF1 du TTV-génotype 1 a été localisée dans le noyau, et en particulier dans le nucléole, tandis que celle de l'ORF3 a été observée dans le noyau, mais pas dans le nucléole. Dans la même étude, la protéine ORF2 était trouvée dans le cytoplasme (160). Plus récemment, les protéines codées à partir de l'ORF1 et de l'ORF3 des TTSuV ont été localisées dans le nucléole des cellules rénales porcines, et celle codée par l'ORF2 dans le cytoplasme et le noyau, en excluant le nucléole (161). Une étude récente *in silico* a confirmé l'adressage de la protéine issue de l'ORF1 vers le noyau (162). Les écarts observés entre ces études suggèrent que la diversité génomique, entre les isolats d'AV, pourrait être associée à différentes stratégies d'expression et de localisation des protéines virales, avec des conséquences non décrites sur la pathogénèse des AV.

3.2.4-Réplication des *Anelloviridae*

Le génome des *Anelloviridae* est constitué d'ADN circulaire simple brin de polarité négative. Cependant, il a rapidement été mis en évidence que des formes double brin ou de polarité positive étaient présentes dans différents tissus et constituaient des intermédiaires réplicatifs du virus. De l'ADN double brin a ainsi été détecté dans les poumons, les PBMC, la moelle osseuse, le foie, les ganglions lymphatiques, la glande thyroïdienne, la rate le pancréas et le rein, issus de patients atteints de différentes

pathologies. De plus, les hépatocytes, les cellules de moelle osseuse et les PBMC, ont été signalés comme contenant de l'ADN à brin positif du TTV (153).

a- Les sites de réplication

A l'heure actuelle, les auteurs s'accordent à penser : i) que la grande majorité, sinon la totalité, des AV présents dans le plasma des personnes infectées est produite dans le compartiment hématopoïétique par un/des type(s) de cellules non identifiées ; et ii) qu'une fois infectées, les cellules immunitaires propagent le virus dans les tissus qu'elles envahissent (142). Des données quantitatives suggèrent, en effet, que les patients atteints de leucémie, fortement myéloprimés à la suite d'irradiations et de chimiothérapies, présentent un important déclin de leur virémie, laquelle augmente fortement après une transplantation de moelle osseuse (163, 164). Les AV se répliqueraient ainsi de manière très active avec plus de 10^{10} virions générés par jour (165). L'épithélium respiratoire est également considéré comme un site d'infection privilégié et de réplication continue du virus, suite à une étude démontrant l'existence de prélèvements nasopharyngés TTV+/plasma- chez un même individu (166).

Il ne peut être exclu, cependant, que le TTV se réplique sur d'autres sites. Compte tenu de la grande diversité probable des protéines de capsid virale, il est également plausible que les différents membres des *Anelloviridae* se répliquent dans des tissus et des compartiments corporels différents.

b- Mécanisme de réplication

A partir d'analogies avec d'autres virus à ADN simple brin, il semblerait que les AV aient besoin de cellules en cours de division pour se répliquer efficacement. Cette hypothèse semble confortée par plusieurs études. L'une d'elle a démontré que la production de TTV après l'infection de cellules mononuclées sanguines n'avait lieu que lorsque celles-ci étaient activées (PBMC) (167). Une autre a montré que le TTV serait capable de détourner la machinerie cellulaire de la cellule hôte afin de se répliquer. Une inhibition de la réplication du TTV HEL32 était ainsi observée, lorsque l'action de l'ADN polymérase cellulaire était bloquée par l'aphidicoline (168). Bien que ce mécanisme n'ait jamais été mis en évidence pour les AV, il est supposé qu'ils se répliqueraient au moyen d'un "cercle roulant" (*rolling circle*, voir Figure 32), comme déjà démontré chez l'animal pour d'autres virus à ADN circulaire simple brin (circovirus porcins PCV1 et 2, CAV) et confirmé par l'identification des formes d'AV double brin (169). L'initiation de la réplication par l'ADN polymérase nécessite la présence de structures en « épingles à cheveux », formant un site "Nick" reconnu et clivé par le complexe Rep. La région UTR, qui comporte plusieurs de ces structures tertiaires, participerait ainsi à la régulation de la réplication virale (150). Un motif partiellement conservé `_AGT_TTACA` a ainsi récemment été proposé comme origine de réplication (170).

En raison de l'absence dans les virions d'une enveloppe dérivée de la membrane cellulaire, il est également raisonnable de supposer que les AV tuent les cellules dans lesquelles ils se répliquent de manière à être libérés dans le plasma où on les retrouve abondamment. Une exocytose dépourvue de mort cellulaire serait sans précédent pour des virus avec les caractéristiques structurales de TTV, mais compatible avec l'absence de maladies précises associées à l'infection (voir paragraphe 3.4-).

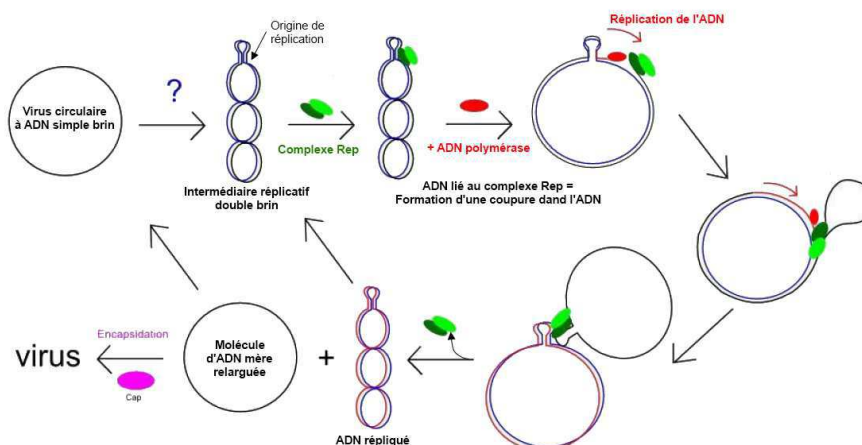


Figure 32 : Mécanisme de répllication de type "cercle roulant". Adapté de (171)

Pour en finir sur la répllication virale, une étude récente semble indiquer que le virus Epstein-Barr pourrait avoir un effet *helper* sur la répllication du TTV, suggérant une interaction synchrone des deux virus (172).

3.2.5- Variabilité génétique

Comme nous l'avons abordé en étudiant leur phylogénie, les AV présentent une extrême variabilité, aussi bien au niveau des séquences nucléotidiques que protéiques. Les raisons et les mécanismes qui conduisent à cette divergence restent méconnus.

a- Mutations

La première possibilité serait que les AV sont capables de muter très fréquemment. Ce phénomène n'est pas courant chez les virus à ADN, étant donné que l'ADN polymérase a une activité de relecture, contrairement à la transcriptase inverse utilisée par les virus à ARN. Néanmoins, il a été montré que les parvovirus à ADN sb, évoluaient avec un taux de mutations comparable à celui des virus à ARN, en raison de la nature de son génome. Il est ainsi possible que des mécanismes similaires entrent en jeu pour les AV ; ces mutations fréquentes leur permettant d'échapper à leur reconnaissance par le système immunitaire (173).

b- Recombinaisons/réarrangements

La possibilité de recombinaisons homologues entre formes TTV a été avancée tôt dans l'étude des *Anelloviridae* (174). Plus récemment, l'occurrence de réarrangements a

été suggérée, avec la caractérisation de formes subgénomiques de séquences TTV, isolées à partir de plasma humain ou issues de transfections. Cette diversité inter-espèces s'accompagne également de réarrangements intragénomiques et de formes subgénomiques (μ TTV) comme démontré *in vitro* (149, 170).

c- Région conservée

Malgré le faible degré d'homologie existant entre les différentes formes déjà décrites, une courte portion de séquence d'environ 130 nt, relativement bien conservée, est remarquable dans toutes les séquences identifiées chez l'homme et l'animal. Cette zone, localisée en amont de l'ORF1, présente deux courtes séquences de 15 nt remarquablement conservées (CGAATGGCTGAGTTT et AGGGGCAATTCGGGC), ainsi qu'un motif de type Sp1 (GGGCGGG) (143).

3.3- Épidémiologie des *Anelloviridae*

3.3.1- Les méthodes de détection

La détection des AV est presque exclusivement basée sur des méthodes moléculaires, car il n'existe pas de systèmes de culture virale, ni de tests sérologiques fiables qui pourraient permettre la détection d'antigènes ou d'anticorps antiviraux. Cela se comprend, étant donné la diversité antigénique potentielle des AV, les produits déduits des ORF-1 et -2 du TTV sont très hétérogènes dans les différentes espèces et même entre les différents isolats d'une même espèce.

Le dessin des amorces de PCR a connu une évolution importante depuis l'introduction des premiers tests de détection, qui utilisaient des amorces ciblant le fragment N22 situé dans l'ORF1 du premier prototype de TTV isolé. Actuellement, plusieurs PCR sont utilisées en fonction des laboratoires, et présentent des tailles d'amplicons et des sensibilités différentes. On distingue ainsi les PCR " universelles", qui amplifient la plupart, sinon tous les AV humains, et les PCR « genre-spécifiques » (175). Cependant, à l'heure actuelle, aucune PCR classique ou en temps réel n'a été formellement reconnue comme la technique de référence pour la détection des AV. Il semble cependant acquis que la fiabilité des tests repose sur le ciblage de la région conservée présente dans la région intergénique (Figure 33).

Alors que cette méthode avait montré peu de débouchés ces dernières années, une étude de séroprévalence a récemment été réalisée à l'aide d'un essai immunoenzymatique, dirigé contre les protéines issues de l'ORF2 de 5 souches de TTV. Cet essai semble présenter une bonne couverture antigénique (176).

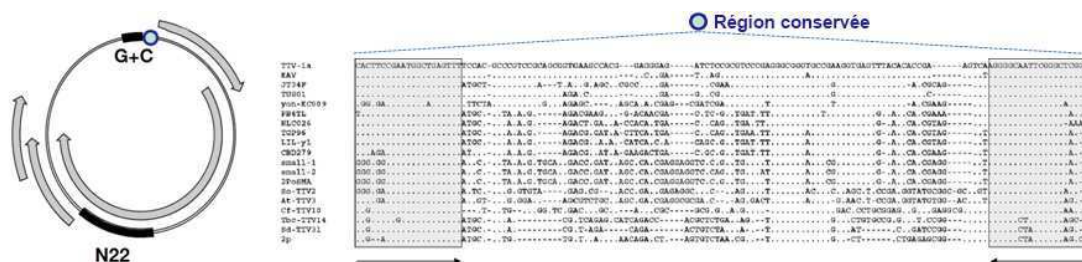


Figure 33 : Zone conservée entre isolats AV humains et animaux. Les séquences représentatives identifiées chez l'homme (TTV : TTV-1a, KAV, JT34F, TUS01, yon-KC009 ; TTMV : PB4TL, NLC026, TGP96, LIL-y1, CBD279 ; TTMDV : small-1, small-2, 2PoSMA) et l'animal (So-TTV2, At-TTV3, Cf-TTV10, Tbc-TTV14, Sd-TTV31, 2p) sont représentées. Les positions des amorces de détection « universelle » sont indiquées. Adapté de (177)

3.3.2-Prévalences

Les AV ont la particularité d'avoir une prévalence extrêmement élevée dans la population générale à travers le monde. Les enquêtes épidémiologiques employant une large gamme de techniques de PCR ont montré qu'à un moment donné, les deux tiers ou plus des populations mondiales étudiées sont infectées par le TTV, et que le TTMV et le TTMDV pourraient être encore plus omniprésents. De plus, on observe très fréquemment la présence simultanée chez un même individu, de plusieurs isolats d'un même genre ou de genre différents (178–181). Bien que la prévalence globale du TTMDV doive encore être déterminée avec précision à l'aide de techniques de PCR de sensibilité suffisante, de récentes enquêtes sur des échantillons de plasma provenant de donneurs sains européens et japonais indiquent que la prévalence du TTMDV dans la population générale peut être aussi élevée que ceux du TTV ou du TTMV, à savoir environ 95% de la population infectée (182).

Une autre caractéristique du TTV, qui semble être partagée par les autres AV, est son extraordinaire capacité à établir des infections chroniques. En effet, suite à l'inoculation de sang contaminé ou de produits dérivés du sang, comme après une infection des muqueuses, le TTV devient détectable dans le sang périphérique dans la, ou les quelques semaines suivant son entrée dans le corps, et résulte en une longue virémie plasmatique (183). Des cas d'infections aiguës ont également été signalées, mais il n'est pas certain que ces observations reflètent véritablement une éradication virale complète, ou juste du fait que la charge virale descend sous le seuil inférieur de sensibilité des méthodes de détection utilisées (146). Il est également clairement établi que les charges virales dans le plasma peuvent varier considérablement, de 10^2 à 10^9 copies d'ADN par ml, en fonction des personnes infectées et du nombre d'AV différents présents (184, 185).

Les enquêtes épidémiologiques menées à ce jour dans les différentes régions du monde ont la limitation d'avoir utilisé des PCR de sensibilité variable, de sorte que les résultats ne peuvent pas être comparés facilement. Cependant, elles semblent indiquer que certains TTV (génogroupes 1 et 3) sont très fréquents, tandis que d'autres (en particulier le génogroupe 2) sont moins fréquents. Les résultats suggèrent également l'existence de différences considérables dans la répartition géographique de certains TTV. Cependant, il

est actuellement difficile de déterminer dans quelle mesure ces différences sont biaisées par l'amplification préférentielle de TTV sélectionnés par les techniques utilisées. La relevance d'un changement d'AV en fonction de l'âge des sujets infectés et / ou du mode de transmission reste également à déterminer (180, 186).

3.3.3-Modes de transmission

Les infections à AV sont acquises très tôt dans la vie sans distinction de sexe, des conditions socio-économiques, ou de la localisation géographique. Même s'ils peuvent évidemment être transmis par le sang (voie parentérale), les voies les plus courantes de transmission comprennent la voie oro-fécale et la voie verticale mère-enfant. Une transmission par voie aérienne est également probable (166). Cette route est un puissant moyen de diffusion pour un virus, mais son impact réel sur la circulation des AV dans la population n'a pas encore été étudié. En outre, la détection fréquente des AV dans la salive, les sécrétions génitales, les larmes, la peau et les follicules pileux semble impliquer également l'existence d'autres modes de diffusion (142).

A ce jour, la contamination de l'homme par un variant animal n'a pu être prouvée, et l'analyse phylogénétique des séquences d'*Anelloviridae* identifiées chez les différentes espèces animales ne plaide pas en faveur d'infections inter-espèces (187).

3.3.4-Compartiments biologiques et environnementaux

Initialement identifié dans des échantillons de plasma et de sérum, l'ADN viral a également été mis en évidence dans quasiment tous les échantillons biologiques de l'organisme : les PBMC, la moelle osseuse, les tissus des différents organes vitaux, le liquide céphalo-rachidien, la salive, la bile, l'urine, les fèces, les sécrétions nasales, les larmes, le fluide vitreux, la pulpe dentaire ou le sperme (188, 189). L'identification des *Anelloviridae* dans le lait maternel, le sang de nouveau-nés et le sang de cordon a aussi été rapportée, bien que des données contradictoires existent selon les études. Les PBMC regroupent un grand nombre de types cellulaires et les AV ont été décrits dans beaucoup d'entre eux : les monocytes, les LB, les LT, les NK, ... Ils seraient absents des plaquettes et des érythrocytes (190, 191). Les *Anelloviridae* ont, par ailleurs, aussi bien été trouvés dans des tissus sains que dans différents types de cancers (192). Enfin, il a été démontré qu'un simple individu pouvait héberger plusieurs souches virales, parfois très divergentes, dans différentes localisations tissulaires et dans ses principaux organes (193).

Les AV présentent une résistance élevée aux agents physico-chimiques, ce qui expliquerait leur présence probablement généralisée dans l'environnement. L'ADN des AV a été trouvé partout où il a été étudié, y compris dans l'air, l'eau des rivières, les eaux usées et la pollution des eaux superficielles (194, 195).

3.4- L'implication des *Anelloviridae* dans la santé de l'hôte

L'impact des *Anelloviridae* sur la santé des hôtes les hébergeant est un sujet soumis à controverse depuis leur mise en évidence. Les découvertes des formes TTMV et TTMDV n'ont fait qu'accroître le nombre d'hypothèses concernant leur implication dans la santé de l'hôte. En témoigne le nombre d'articles publiés dans les années 2000 et dont la majorité avait pour objet une association potentielle à telle ou telle pathologie (Figure 34). Une chose semble cependant assurée : bien que ces pathogènes n'aient été identifiés que récemment, ils semblent être présents chez l'homme depuis des centaines d'années (196), et représentent un remarquable exemple de co-évolution virus-hôte.

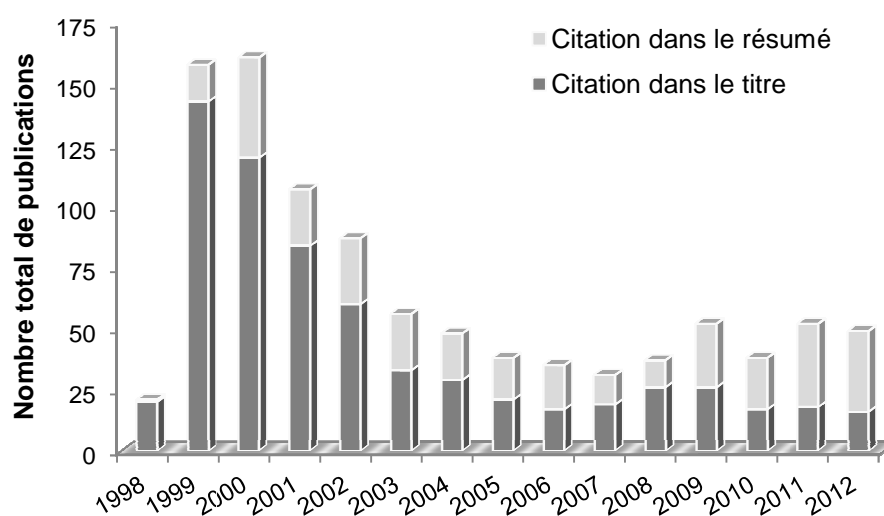


Figure 34 : Nombre d'articles publiés sur les *Anelloviridae* par année. Le nombre total de publications se référant aux *Anelloviridae* a été obtenu avec Pubmed et les mots clé suivants : "TT virus", anellovirus, *anelloviridae*, torque teno virus, "human circovirus" et TTV, et répartis selon la présence de ces mots clé dans le titre ou dans le résumé.

3.4.1- Immunologie des infections

Les propriétés immunologiques des *Anelloviridae* sont toujours méconnues et les rares études qui s'y consacrent sont exclusivement relatives aux TTV.

a- TTV et immunité innée

De nombreuses observations cliniques ont suggéré que les AV pourraient contribuer à la morbidité humaine en agissant comme des cofacteurs, ou comme déclencheur dans des maladies d'origine multifactorielle, qui ont en commun une large composante inflammatoire, comme l'asthme ou des formes d'arthrite (197–199). Il est alors apparu que les AV étaient probablement capables d'affaiblir les mécanismes de défense de l'hôte contre les autres agents pathogènes, et/ou d'altérer les moyens par lesquels l'organisme réagit aux micro-organismes, en maintenant par exemple une inflammation constante.

Comme nous l'avons vu précédemment, une étude a montré que la protéine codée par l'ORF2 aurait la capacité de bloquer la cascade NF- κ B, laquelle permet l'expression d'une centaine de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des molécules d'adhésion, mais également des récepteurs de l'immunité. Le TTV aurait ainsi la capacité d'impacter significativement la réponse inflammatoire (157).

Une autre étude a montré la capacité du TTV à stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires en activant le TLR-9. Le TLR-9 reconnaît spécifiquement l'ADN non méthylé, et plus particulièrement les motifs CpG. La nature de la réponse immune induite (stimulation ou inhibition de la voie du TLR-9) dépend du type de nucléotides flanquants les motifs CpG. Le génome des AV, riche en motifs CpG serait ainsi capable d'interagir avec le TLR-9. Cette propriété a été démontrée avec l'isolat ViPiSAL, qui, transfecté dans des cellules de rate, induisait la production d'IFN γ , d'IL-6, et d'IL-12 (200).

Il a également été suggéré que le TTV pouvait modifier l'efficacité de l'escalator muco-ciliaire, en infectant les cellules ciliées qui le produisent. Pifferi et ses collaborateurs ont en effet montré que de fortes charges virales étaient détectées dans des prélèvements d'épithélium respiratoire chez des enfants avec une bronchopneumonie récurrente. Ces charges virales présentaient une corrélation positive avec une perte de l'intégrité anatomique et fonctionnelle des cellules ciliées (201).

De fortes charges virales ont été associées à concentration importante, dans le sang, de la protéine cationique de l'éosinophile (ECP), indicatrice d'une activité inflammatoire intense au niveau du tractus respiratoire (202). La même corrélation positive aurait été établie entre charge virale et quantité de NO expiré chez des enfants asthmatiques. L'ECP et le NO sont impliqués dans plusieurs maladies respiratoires et jouent des rôles clé dans l'inflammation du tractus respiratoire. Ces deux études semblent indiquer qu'une réplication active du TTV pourrait induire un statut inflammatoire, amplifiant la réponse immune en cas d'infection par un autre pathogène (203).

b- TTV et immunité adaptative

La présence d'anticorps dirigés contre le TTV a été démontrée grâce à différentes méthodes. Dans un premier temps, par des tests d'immuno-précipitation, Tsuda *et al.* ont montré la présence d'IgG spécifiques du TTV dans le sérum de patients virémiques ou non (204). Dans un second temps, la présence d'IgM était démontrée, ainsi que la présence de complexes immuns TTV-IgM dans le sérum (205). Il a, par ailleurs, été prouvé que les anticorps dirigés contre un génotype ne protégeaient pas de l'infection par d'autres isolats, et les données de prévalence entre des enfants séroconvertis et sérorévertis ont montré que les AV circulaient dans les populations quels que soient les anticorps antiviraux (152, 176).

Des études ont mis en évidence que les charges virales étaient plus élevées chez des patients immunodéprimés, particulièrement quand la numération de CD4+ était faible,

suggérant que la charge virale en AV pouvait être un reflet du statut immunitaire de l'hôte. Néanmoins, la virémie ne corrèle pas directement avec le nombre de CD4+ (206). Récemment, il a été observé qu'une altération des LB était reliée à une augmentation de la charge virale du TTV, suggérant de nouveau son potentiel comme marqueur du statut immunitaire (207).

3.4.2- Pathologies potentiellement associées aux *Anelloviridae*

a- Pathologies hépatiques

Les circonstances, dans lesquelles le TTV a été dévoilé ont abouti, dans un premier temps, à une étude quasi-exclusive sur le rôle possible de ce virus en tant que cause d'infections hépatiques non A-G (208). Des données continuent d'ailleurs d'apparaître dans la littérature, compatibles avec la possibilité que des anomalies transitoires et légères des taux d'enzymes hépatiques soient, dans certains cas, associés aux AV ou le résultat d'une coinfection TTV/virus de l'hépatite B (HBV) ou TTV/virus de l'hépatite C (HCV) (209–212). Une publication a sous-entendu que les génomes de TTV pourraient être sensibles à la réaction immune dirigée contre HBV, via une interaction avec la protéine APOBEC3 (213). Cependant, le TTV a globalement été exclu des causes classiques de maladies du foie (214).

b- Infections respiratoires aiguës

L'implication du TTV dans les infections respiratoires aiguës a été étayée par différents travaux. Ainsi de fortes charges virales dans des prélèvements respiratoires ont été associées à : i) une sévérité accrue de la pathologie respiratoire (166, 198, 215, 216), et ii) une diminution de la fonction ventilatoire (197). En outre, des données indiquent que le TTV pourrait se répliquer activement dans les voies respiratoires des enfants et, éventuellement, être une cause de maladies respiratoires aiguës et/ou un facteur aggravant (166, 216).

Par ailleurs, il est de plus en plus décrit que les AV porcins pourraient agir comme co-facteurs à d'autres virus dans la pathogenèse de syndromes respiratoires sévères (217, 218).

c- Cancers

L'ADN du TTV a été détecté dans plusieurs types de lymphomes (219) : les cancers hépatiques (220), colorectaux (221), du larynx (222), du pancréas (223), du col de l'utérus (224), le lymphome de Hodgkin (173), ou le syndrome de Kaposi (225). A l'heure actuelle, les données suggèrent que les infections à AV agiraient comme des carcinogènes indirects en modulant la réponse immune des LT (219). De plus, il semblerait que certains génotypes seraient plus susceptibles de déclencher une pathologie que d'autres (226).

d- Désordres auto-immuns

Les AV ont été associés à différents désordres auto-immuns, parmi lesquels la sclérose en plaque, le lupus érythémateux systémique (227, 228), certaines maladies rhumatismales (199), ou la maladie de Kawasaki (229).

Sclérose en plaque (SEP)

Une première étude a été incapable de détecter la présence d'ADN de TTV dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients atteints de SEP, bien que le sérum ait été testé positif pour le virus, indiquant que le système nerveux central (SNC) ne représente pas un site commun de réplication et de persistance du TTV, et que le virus ne pénètre pas facilement la barrière hémato-encéphalique (166). Néanmoins, il a été suggéré que des infections répétées avec des virus communs, tels que le TTV, pourrait favoriser l'expansion de cellules T présentant des domaines protéiques conservés. Cette réactivité croisée (mimétisme moléculaire) entre les agents pathogènes et les auto-antigènes pourrait finalement aboutir à l'ouverture d'une maladie auto-immune chez des individus génétiquement susceptibles (230). Les co-infections virales (TTV/HBV ou TTV/HHV-6) pourraient également contribuer au déclenchement de la maladie (231). Une récente étude a montré *in vitro* qu'EBV pouvait stimuler la réplication du TTV et qu'ensemble, ces deux virus pourraient jouer un rôle dans la progression de la pathologie (172).

e- Autres pathologies

Une contribution possible du TTV à la déficience immunitaire des patients atteints du SIDA ou d'autres maladies immunosuppressives a également été suggérée (232, 233). Une étude de cas a montré que des changements de souches d'AV pouvaient se produire en cas de transplantation d'organe (234). En outre, le fait que les AV circulent souvent dans le sang sous forme de complexes immuns a conduit à enquêter sur une possible implication du TTV et du TTMV dans les pathologies rénales (235). Des états fébriles ont également été rapportés en lien avec des infections à AV (236, 237).

Après cette liste non exhaustive de pathologies potentielles liées aux AV, il est bon de rappeler que de nombreuses autres études démontrent l'absence de liens entre ces virus et des pathologies humaines (214). Des auteurs ont ainsi proposé que les *Anelloviridae* puissent appartenir d'une « flore virale » (238). Si cela paraît assez improbable, des approches récentes de NGS semblent également témoigner que le virome d'une personne « saine » serait principalement composé de virus comme les *Anelloviridae* (239).

Conclusion

Les AV présentent des propriétés originales et propres à cette famille virale : i) une extrême diversité génétique menant à l'existence de nombreuses espèces et variants, ii) une prévalence exceptionnellement élevée dans les populations avec des infections chroniques tout au long de la vie, iii) une présence dans de nombreux tissus différents, iv) des co-infections fréquentes par deux ou plusieurs variants, et v) une large gamme de charges virales apparaissant même chez des individus sains.

Ces propriétés font que l'implication de ces virus dans une pathologie est un sujet toujours controversé. Certains ont ainsi suggéré que les AV devraient être considérés comme une composante de la flore humaine normale, dépourvus de pouvoir pathogène. Cependant, la virologie est riche en exemples de virus qui, après la découverte, ont dû attendre de nombreuses années avant d'être définitivement liés à leurs maladies respectives, y compris les échovirus, les réovirus (qui tous deux portent encore le terme d'orphelin), les adénovirus, le parvovirus B19, le virus Epstein-Barr, les virus de l'herpès 6 et 7, etc. C'est ainsi que les *Anelloviridae* viennent s'ajouter à la liste des virus actuellement orphelins, mais pour combien de temps ?

LES QUESTIONS ABORDEES EXPERIMENTALEMENT DANS CE MANUSCRIT

Ce projet de thèse a été construit suite à l'identification de nouveaux génomes de TTMV dans les épanchements pleuraux d'enfants hospitalisés en raison d'une pleuro-pneumopathie, et pour lesquels aucun agent étiologique n'avait été identifié. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, l'implication de ces virus dans la santé de l'hôte nécessite d'être mieux définie, et il y a un véritable besoin d'approfondir les recherches sur leur rôle potentiel dans les pathologies respiratoires. Ainsi, au travers de ces travaux, nous avons entrepris de répondre aux questions suivantes :

- Quelle homologie ces nouveaux génomes présentent-ils avec les TTMV déjà décrits ?
- La pathogénicité de ces virus peut-elle être associée à certaines signatures moléculaires ou caractéristiques génétiques propres à certains variants ?
- Quelle est la prévalence du TTMV dans une cohorte de patients atteints de pneumopathies ? Y a-t-il un lien entre la présence de ce virus et la gravité de la pathologie ?
- Les cellules de l'appareil respiratoire sont-elles permissives à l'infection par ce virus et permettant-elles effectivement sa réplication *in vitro* ?
- Si oui, le virus entraîne-t-il une réaction de défense de la part de ces cellules ?
- Ce virus est-il reconnu par des cellules de l'immunité innée ? Observe-t-on la mise en place d'une réponse inflammatoire ?

Différentes stratégies expérimentales ont été mises en place afin d'entreprendre de répondre à ces questions. Nous verrons ainsi, dans un premier temps, comment le protocole de découverte de nouveaux pathogènes mis en place dans notre laboratoire a permis d'isoler plusieurs nouveaux génomes de TTMV associés à des cas de pleuro-pneumopathies dépourvues d'agent étiologique identifié. Dans un second temps, nous nous intéresserons au potentiel infectieux de ces nouveaux génomes, à travers leur caractérisation génomique *in silico*, et l'étude de leur réplication *in vitro* dans différents types cellulaires (Chapitre 4). Nous verrons alors quelles conséquences peuvent être engendrées suite à l'infection de cellules épithéliales alvéolaires par ces virus (Chapitre 5). Enfin, nous nous attacherons à décrire l'interaction potentielle de ces virus avec les cellules de l'immunité innée et plus précisément avec les APC (Chapitre 6). Ces résultats seront alors suivis d'une discussion sur les différentes informations apportées par ce travail et les questions qu'il soulève.

Partie B

Résultats

Discussion

B

Chapitre 4

DE NOUVELLES ESPECES DE TTMV ISOLEES DANS LES EPANCHEMENTS PLEURAUX D'ENFANTS ATTEINTS DE PNEUMONIE SEVERE

4.1	CONTEXTE ET OBJECTIF	113
4.2	METHODES	113
	4.2.1- <i>Patients et échantillons</i>	113
	4.2.2- <i>Détection moléculaire des pathogènes respiratoires</i>	114
	4.2.3- <i>Isolement des nouveaux génomes de TTMV par RT-PCR aléatoire et caractérisation génomique</i>	114
	4.2.4- <i>Culture cellulaire, transfections et infections des lignées A549 et HEK293T</i>	115
	4.2.5- <i>Quantification des TTMV-LY et évaluation du taux de réplication</i>	116
4.3	RESULTATS	119
	4.3.1- <i>Identification et caractérisation de nouveaux génomes de TTMV</i>	119
	a- <i>Caractérisation génomique</i>	119
	b- <i>Phylogénie</i>	121
	c- <i>Prévalence</i>	121
	4.3.2- <i>Réplication in vitro</i>	121
	a- <i>Détection des génomes de TTMV-LY répliqués</i>	123
	b- <i>Infection des cellules épithéliales alvéolaires avec les particules virales</i>	123
4.4	DISCUSSION	124
4.5	PUBLICATION SOUS PRESSE	128

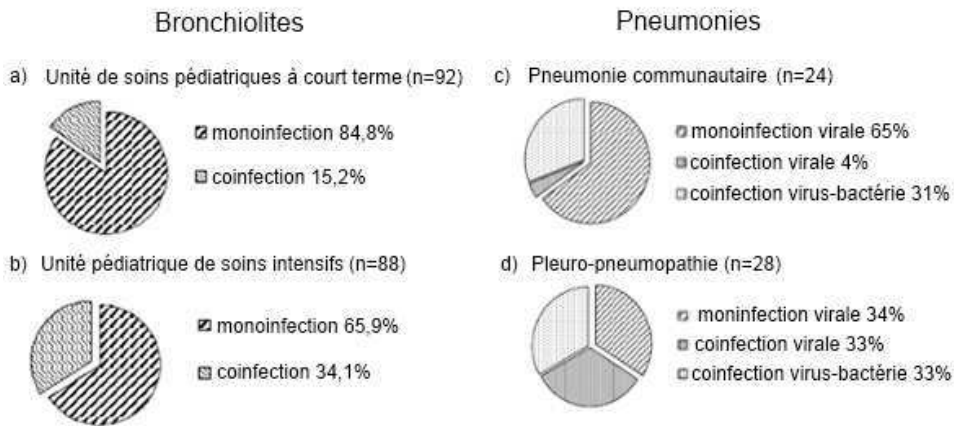


Figure 35 : Impact des coinfections dans la sévérité de la pneumonie. L'étiologie des bronchiolites (a et b) et des pneumonies (c et d) a été déterminée par biologie moléculaire sur des prélèvements naso-pharyngés (240-242).

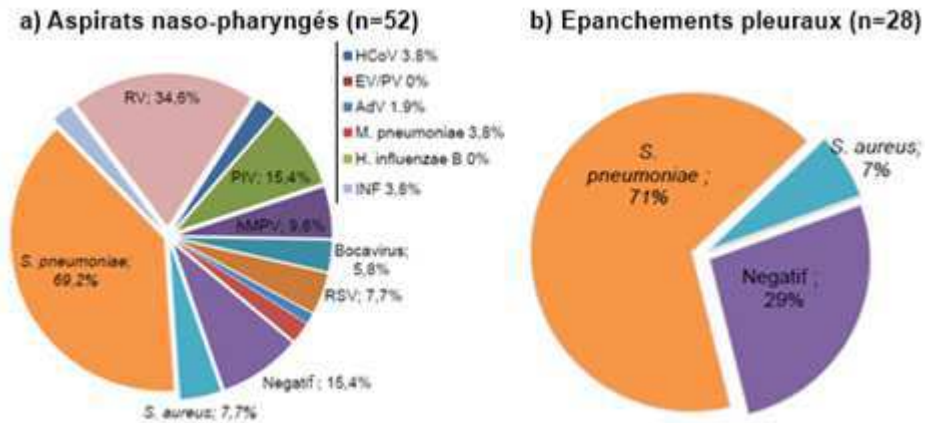


Figure 36 : Etiologie des pneumonies (CAP+PPE) en fonction du type de prélèvement respiratoire testé : a) prélèvements naso-pharyngés (PNP) dans les cas de CAP et de PPE, ou b) épanchements pleuraux (EP), seulement dans les cas de PPE. Les prélèvements négatifs dans les PNP et les EP proviennent de patients différents, sauf pour un d'entre eux (240).

4.1- Contexte et objectif

La pneumonie (CAP, *Community-Acquired Pneumonia*) est la principale cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans dans le monde. Il existe peu de données fiables sur les agents responsables des CAP chez l'enfant, en raison de la difficulté d'établir un diagnostic étiologique précis. On considère actuellement que la majorité des CAP résulte d'infections bactériennes plutôt que virales, et *S. pneumoniae* est perçu comme étant l'agent pathogène le plus fréquent chez les enfants (243).

Plusieurs études ont rapporté une incidence croissante, dans plusieurs pays, de cas de pleuro-pneumopathies, ou pleurésies purulentes (PPE, *ParaPneumonic Empyema*), pour une raison qui reste inconnue (244–246). La PPE est une forme de pneumonie sévère, caractérisée par la formation d'un épanchement purulent entre les 2 feuillets de la plèvre. Cette pathologie est associée à une morbidité élevée, et nécessite souvent une hospitalisation prolongée et des procédures thérapeutiques invasives. En effet, un épanchement pleural conduit souvent à une insuffisance respiratoire, due à la compression du parenchyme pulmonaire sous-jacent. Un drainage s'avère alors incontournable afin de ponctionner le liquide de l'épanchement pleural (247).

Ces constatations ont conduit notre laboratoire à mettre en place différentes études, en collaboration avec le service de réanimation pédiatrique de l'hôpital Femme-Mère-Enfant (Bron, France), afin de définir les différents agents étiologiques impliqués dans les cas d'IRA plus ou moins sévères (bronchiolites, CAP, PPE). Les résultats de ces études ont permis de confirmer l'importance de *S. pneumoniae* dans ces pathologies, mais ont également permis de mettre en évidence l'implication majeure des virus respiratoires et l'impact d'infections multiples dans la sévérité des IRA (Figure 35) (240–242).

En accord avec la littérature, aucun agent étiologique n'a pu être identifié pour 15,4% des PNP et 29% des EP testés, malgré l'utilisation de tests de détection très sensibles (Figure 36). Ces échantillons ont alors été analysés à nouveau, mais avec un protocole d'amplification non ciblée, afin de tester la présence potentielle de nouveaux pathogènes, à l'origine de ces infections respiratoires cliniquement bien définies.

4.2- Méthodes

4.2.1- Patients et échantillons

Une étude prospective a été menée sur 52 enfants, hospitalisés entre le 04/04/2007 et le 30/03/2009, dans le service d'urgence pédiatrique, ou dans l'unité pédiatrique de soins intensifs de l'Hôpital Femme-Mère-Enfant de Lyon (France). Cette cohorte était

composée de 30 garçons et 22 filles, âgés de 3 mois à 14 ans, souffrant de formes plus ou moins sévères de pneumonies (25 cas de CAP et 28 cas de PPE). Cette étude a été approuvée par un comité d'éthique (numéro CE 06-139), et un formulaire de consentement a été signé par chaque parent ou tuteur d'enfants participant à l'étude. Cinquante-deux PNP ont été recueillis à l'aide d'aspirateurs de mucus nasal jetables, dans les 48h suivant l'admission. Vingt-cinq EP ont été ponctionnés chez les enfants atteints d'une PPE, suite à la mise en place d'un drain thoracique. Tous les échantillons ont été conservés à -70°C jusqu'à l'identification de l'agent étiologique.

4.2.2-Détection moléculaire des pathogènes respiratoires

La présence des 24 principaux pathogènes respiratoires a été testée dans les 52 NA et les 25 PE. Les acides nucléiques totaux ont été extraits avec l'automate NucliSENS® easyMAG (bioMérieux, France, nommé easyMAG ci-dessous), et élués dans 50µl de tampon d'éluion selon les recommandations du fabricant. L'amplification a été réalisée à l'aide du kit FTD Respiratory Pathogens 21+ (Fast Track Diagnostics, Luxembourg), en association avec le kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Ambion, Etats-Unis). Ce test consiste en 6 réactions de RT-PCR multiplexes et permet la détection simultanée des pathogènes suivants : INF A, INF A (H1N1), INF B, HCoV-NL63, -229E, -OC43 et -HKU1, PIV-1, -2, -3 et 4, HRV, RSV A et B, hMPV A et B, AdV, entérovirus, HPeV, HBoV, *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus* et *C. pneumoniae*. Dix microlitres d'acides nucléiques totaux ont été ajoutés à chaque tube réactionnel. L'amplification et la détection en temps réel ont été effectuées dans le thermocycleur CFX96 (Bio-Rad, Etats-Unis).

4.2.3-Isolement des nouveaux génomes de TTMV par RT-PCR aléatoire et caractérisation génomique

Les échantillons négatifs ont été soumis à un protocole de découverte de nouveaux pathogènes mis en place au laboratoire et adapté de Allander *et al* (115). Afin de limiter les contaminations par l'ADN génomique, un pré-traitement des échantillons est réalisé. Deux cent microlitres d'échantillon sont prélevés et centrifugés dans le but d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est filtré à 0,22 µm (Millex GV, Millipore, Etats-Unis), ce qui permet d'éliminer la majorité des bactéries de la flore respiratoire et de réaliser une première purification des particules virales potentiellement présentes dans l'échantillon. Une ultracentrifugation à 729600 x g est alors réalisée pendant 90 min, afin de concentrer ces particules virales. Le culot qui en résulte est dissous dans 200 µl d'eau ultra-pure. Soixante-dix unités de DNase I (1U/µl, Promega, USA) sont alors ajoutées et les échantillons sont incubés pendant 2 h à 37°C. Les acides nucléiques sont extraits par easyMAG et élués dans 50 µl de tampon d'éluion. ADN et ARN sont ensuite amplifiés

par RT-PCR aléatoire. La transcription inverse est réalisée à 42°C pendant 60 min avec l'amorce FR26RV-N et 10 µM de l'enzyme ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, Etats-Unis). Puis le fragment de Klenow, avec une activité polymérase 3'-5' exo- (New England Biolabs, Etats-Unis), est ajouté et le mélange réactionnel incubé à 37°C pendant 1h. Cinq microlitres de chaque mélange réactionnel sont utilisés pour la PCR. L'amplification est réalisée dans 50 µl, avec le kit Expand High Fidelity PCR System (Invitrogen, Allemagne), et avec 40 pmol d'amorce FR20RV. Après 5 min à 95°C, 40 cycles d'amplification (95° C pendant 30 s, 62°C pendant 1 min, et 68°C pendant 2 min) sont effectués. Les amplicons sont purifiés avec le kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Etats-Unis), clonés dans le vecteur pCR-2.1 (Figure 37) et propagés dans des bactéries *E. coli* TOP-10 électro-compétentes, selon les instructions du fabricant (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Allemagne). Quatre-vingt-seize clones par échantillon sont alors séquencés par un prestataire (GATC Biotech, Suisse).

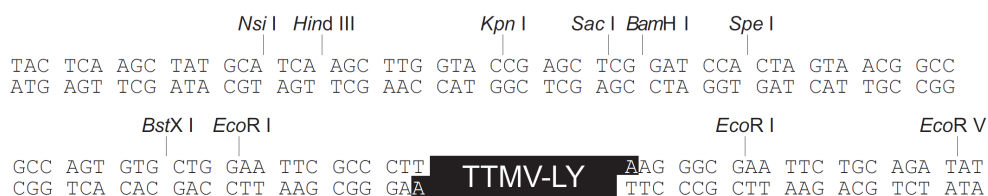


Figure 37 : Clonage des TTMV-LY dans le vecteur pCR-2.1

Les trois échantillons contenant des fragments de séquences assimilés au TTMV, ont été testés pour la présence du génome complet du TTMV par PCR inverse avec les amorces TTMV-LY-9F et TTMV-LY-8R (Tableau 1). Les amplicons ont été clonés et les 2 brins ont été séquencés (GATC Biotech, Suisse), à l'aide d'amorces internes spécifiques de chaque génome. Les alignements multiples de séquences ont été générés à l'aide du logiciel MEGA5 selon l'algorithme ClustalW, et les arbres phylogénétiques ont été construits par la méthode du plus proche voisin. Les structures secondaires prédictives ont été modélisées avec RNA Structure 4.5.

Les 3 génomes entiers obtenus ont été déposés dans la base de données Genbank sous les numéros d'accès suivants: JX134044, JX134045 et JX134046.

4.2.4- Culture cellulaire, transfections et infections de lignées épithéliales alvéolaires ou embryonnaires rénales

Deux lignées cellulaires ont été utilisées pour étudier la réplication des TTMV-LY : la lignée dérivée de cellules rénales embryonnaires humaines 293T (HEK293T), et la lignée A549 dérivée de cellules épithéliales alvéolaires. Les cellules HEK293T ont été maintenues dans du DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine et des antibiotiques. Les cellules A549 ont été maintenues dans du milieu F12K contenant 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine et des antibiotiques. Les cellules sont entretenues deux fois par semaine. L'ADN cloné des TTMV-LY a été linéarisé par

digestion enzymatique avec *EcoRV* et *BamHI* (Roche Diagnostics, France) (Figure 37). Les ADN viraux et le vecteur plasmidique ont été co-transfectés dans des cellules ($1\mu\text{g}$ pour 10^5 cellules en plaques de 12 puits) à l'aide de l'agent de transfection JetPEI (Polyplus-transfection, France) selon les recommandations du fournisseur. Deux types de contrôles ont été réalisés : la transfection des cellules avec le vecteur seul ou l'exposition des cellules aux génomes viraux mais sans l'agent de transfection. Les cellules transfectées ont été incubées une nuit à 37°C , 5% de CO_2 . Après 18h, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS avant l'ajout de milieu frais. Les cellules ont été passées à confluence si besoin et récoltées aux différents temps d'analyse. Les efficacités de transfection ont été optimisées avec un plasmide rapporteur (SWINGY, dérivé de pSIV-GAE (248)).

Pour les études d'infection, les cellules saines,ensemencées dans des plaques de 24 puits, ont été infectées avec les surnageants des cellules transfectées avec l'ADN des TTMV-LY et qui avaient été récoltés 3 jours post-transfection, puis incubées à 37°C , 5% de CO_2 pendant 2h, 7h ou 24h. Les cellules ont alors été lavées 3 fois avec du PBS et incubées avec du milieu frais pendant 6 heures. Dans les expériences de cinétique, 1.10^5 cellules A549 ont été mises en contact avec 2.10^6 équivalents génomes EG, dans 1ml de milieu de culture, durant 3h, 6h, 18h, 24 ou 48h. Les surnageants des cellules ont été récoltés, et les cellules lavées 3 fois au PBS et 2 fois avec du milieu de culture avant leur lyse. Toutes les expériences ont été réalisées au moins deux fois, en deux exemplaires.

TABLEAU 1		Amorces et sondes oligonucléotidiques utilisées dans cette étude.			
Amorces ^a	Séquence	Position des nucléotides	Cible	Position des sites GATC	Conditions d'amplification
PCR inverse					
TTMV-LY-9F	5'-GACCACAAACCGTCACTTAGTTCC-3'	42-65	<i>Betatorquevirus</i>	N/A	95°C : 1min; 40 cycles: 95°C : 30sec 54°C : 1min 72°C : 3min; 72°C : 10min
TTMV-LY-8R	5'-GCAATTTAAATTAGGTGTTTTCTTG-3'	40-15			
TTMV-LY-11F	5'-CTAGRTCAGTCTGGCGGAACGG-3'	288-309	<i>Betatorquevirus</i>	N/A	
TTMV-LY-10R	5'-CCCCTTGACTACGGTGGTTTCAC-3'	278-256			
PCR en temps réel					
TTMV-LY-F	5'-ATTCGAATGGCTGAGTTTATGC-3'	170-191	<i>Betatorquevirus</i>	210; 579; 2674	95°C : 3min; 35 cycles: 95°C : 10sec 54°C : 30sec 72°C : 34sec
TTMV-LY-R	5'-CCTTGACTACGGTGGTTTCAC-3'	276-256			
TTMV-LY-P	5'-CCAGACGGAGACCGGATCACTTCA-3' (FAM-BHQ1)	194-217			
TTMV-LY-2F	5'-CACGAATTAGCCAAGACTGGGCAC-3'	2398-2421 ^b	TTMV-LY2	512; 1382; 2456; 2732; 2746 ^b	
TTMV-LY-2R	5'-TGCAGGCATTGAGGGCTTGT-3'	2494-2473 ^b			
TTMV-LY-2P	5'-ACAGAGCCAGATCGACAGCAACTGCT-3' (FAM-BHQ1)	2445-2470 ^b			

La position des nucléotides et des sites GATC se réfèrent à l'isolat TGP96 (AB041962). N/A, Non Applicable; a- F, Sens (Forward) ; R, Anti-sens (Reverse) ; P, sonde (Probe); b- La position des nucléotides se réfère à la séquence du TTMV-LY2.

4.2.5-Quantification des TTMV-LY et évaluation du taux de répllication

Pour toutes les expériences, les surnageants ont été recueillis à chaque point de mesure, centrifugés, immédiatement traités à la DNase I pendant 2 heures à 37°C, et congelés à -80°C. L'ADN répliqué des TTMV-LY a été extrait des surnageants par easyMAG (protocole Generic 2.1) et élué dans 50µl pour les analyses après transfection, ou 25µl pour les expériences d'infection.

Pour les expériences de transfection, les cellules ont été récoltées dans 2 ml de tampon de lyse NucliSENS (bioMérieux, France). L'extraction des acides nucléiques a de nouveau été effectuée par easyMAG (protocole Specific B), dans 100 µl de tampon d'éluion. L'ADN cellulaire total a ensuite été digéré avec *DpnI* ou *NdeII*, qui vont cliver respectivement les sites GATC *dam*-méthylés de l'ADN introduit ou les sites GATC non-méthylés de l'ADN répliqué en cellules eucaryotes (Tableau 1). Afin d'assurer une digestion complète des ADN et de réduire le bruit de fond observé en qPCR, l'exonucléase III (ExoIII, Fermentas, Canada) a été ajoutée, comme décrit par Faurez *et al.* (249). Les génomes entiers des TTMV-LY ont été détectés par PCR inverse. Brièvement, le mélange réactionnel était composé de 5 µl d'acides nucléiques, 1 µM de chaque amorce TTMV-LY-11F et TTMV-LY-10R (Tableau 1), 2 mM de dNTP mix, et du mélange d'enzymes Expand High Fidelity (Invitrogen, Allemagne). La quantification des TTMV-LY a été réalisée par PCR en temps réel à l'aide de sondes TaqMan et d'amorces ciblant spécifiquement un site GATC. Les tests ont été optimisés (évaluation de la sensibilité, de la spécificité, et de l'efficacité) selon les bonnes pratiques de qPCR (250). L'étape d'amplification a été réalisée dans un volume de 25 µl, contenant 12,5 µl d'iQ Supermix (Biorad, Etats-Unis), 0,3 µM de chaque amorce et de sonde (Tableau 1) et 5 µl d'ADN. L'amplification et la détection ont été réalisées à l'aide du thermocycleur CFX96 (Biorad, Etats-Unis). L'ADN de cellules non transfectées a été inclus dans chaque réaction, comme contrôle négatif. Le taux de répllication a été défini comme le quotient de la quantité de TTMV répliqué (détecté après digestion par *DpnI*, qDE), par la quantité totale de TTMV (ADN répliqué qDE + ADN résiduel introduit par transfection détecté après digestion par *NdeII*, qNE) (Figure 38).

Pour les expériences d'infection, les cellules ont été récoltées et extraites dans 40µl de tampon d'éluion. La quantification a été réalisée après une seule digestion par *DpnI*, dans les mêmes conditions que précédemment.

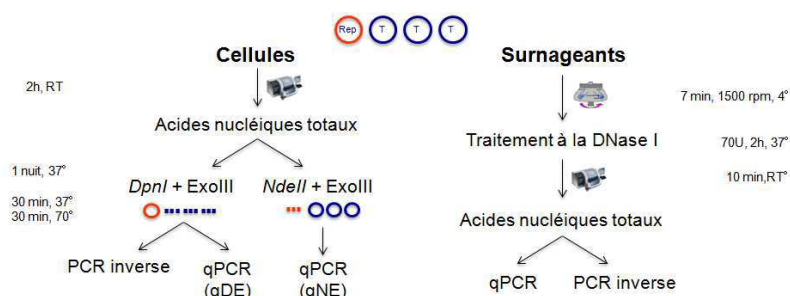


Figure 38 : Méthodes de détection des TTMV-LY dans les cellules et les surnageants après transfection. Le taux de répllication est défini comme égal à $\frac{qDE}{qDE+qNE}$.

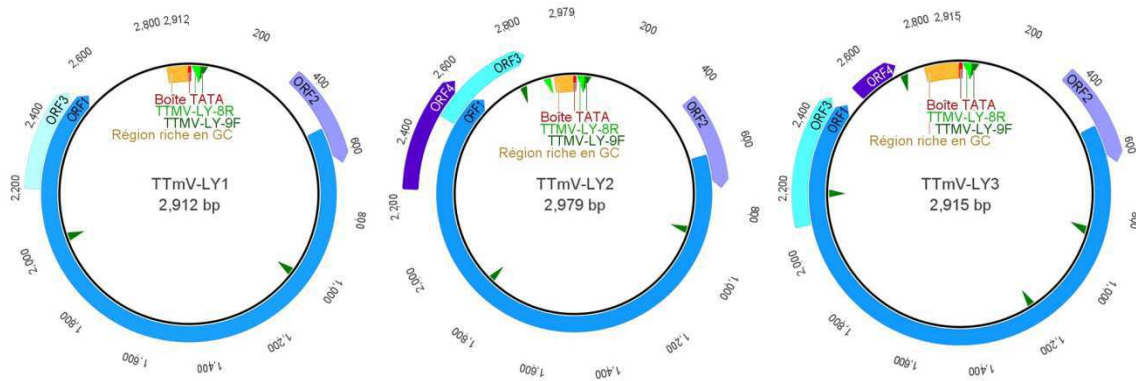


Figure 39 : Représentation schématique des génomes des TTMV-LY. Les flèches vertes indiquent la position des amorces internes utilisées pour le séquençage des génomes.

TABLEAU 2		Caractéristiques génétiques des nouveaux génomes de TTMV		
	TTMV-LY1	TTMV-LY2	TTMV-LY3	
Taille du génome	2912 b	2979 b	2915 b	
ORF1				
Position	522-2540 (2019 b)	612-2612 (2001 b)	516-2492 (1977 b)	
Longueur	673 aa	667 aa	659 aa	
ORF2				
Position	343-633 (291 b)	424-723 (300 b)	343-633 (291 b)	
Longueur	97 aa	100 aa	97 aa	
ORF3				
Position	2203-2505 (303 b)	2486-2812 (327 b)	2095-2481 (387 b)	
Longueur	101 aa	109 aa	129 aa	
ORF additionnelles				
Position		2551-2589 (339 b)	2549-2695 (147 b)	
Longueur		113 aa	49 aa	
Taille de la région non-codante				
5'-UTR	342 b	423 b	342 b	
3'-UTR	372 b	167 b	220 b	

b : bases ; aa : acides aminés

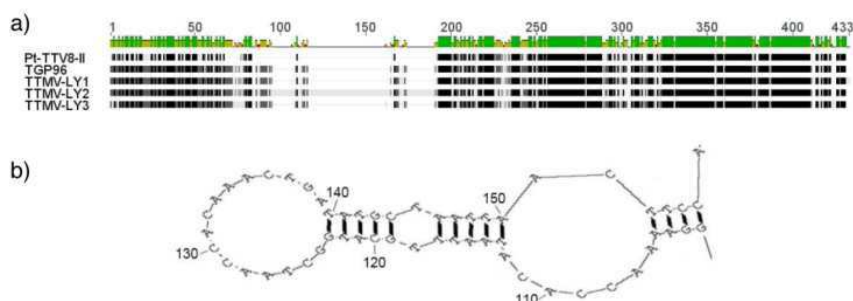


Figure 40 : Alignement multiple des régions 5'UTR de génomes de TTMV (TGP96, Pt-TTV8-II et TTMV-LY), révélant la présence d'une insertion dans le génome du TTMV-LY2 (a) capable de former des structures en épingle à cheveux.

4.3- Résultats

4.3.1- Identification et caractérisation de nouveaux génomes de TTMV

Le protocole d'amplification non ciblée utilisé dans notre laboratoire se compose de 4 étapes : i) le prétraitement des échantillons, au cours duquel les acides nucléiques viraux sont concentrés, purifiés puis extraits ; ii) l'amplification en elle-même effectuée par RT-PCR aléatoire ; iii) le clonage et le séquençage de type Sanger des amplicons obtenus ; et iv) l'analyse des séquences à l'aide d'un logiciel développé à façon par un de nos collaborateurs (S. Li), et qui permet de catégoriser les séquences comme "connue", "divergente", "nouvelle", ou "inconnue" par comparaison avec les séquences présentes dans la base de données Genbank.

Cinq EP négatifs ont été testés à l'aide de ce protocole et 96 clones ont été séquencés pour chaque échantillon, L'analyse des clones a révélé la présence de plusieurs fragments catégorisés comme étant des "nouveaux" TTMV pour 3 échantillons. Pour le premier échantillon, trois fragments de 263, 265, et 255 paires de bases (pb) ont été amplifiés aléatoirement, avec deux d'entre eux chevauchants. Pour le second échantillon, 2 fragments de 800 et 497 pb étaient définis comme apparentés au TTMV, contre un seul et pour le troisième échantillon de 255 pb. La présence de potentiels nouveaux génomes de TTMV dans plusieurs EP négatifs d'enfants hospitalisés pour une PPE, nous a conduits à rechercher la présence des génomes complets de ces virus et à les caractériser plus précisément.

a- Caractérisation génomique

L'amplification des 3 génomes complets de TTMV, nommés TTMV-LY, réalisée par PCR inverse, a révélé que ces génomes étaient composés de 2912 pb, 2979 pb et 2912 pb pour les TTMV-LY1, -LY2 et -LY3, respectivement. La présence de ces génomes a, par ailleurs, été confirmée dans les prélèvements naso-pharyngés (PNP) des patients correspondants. Ces 3 patients, deux garçons et une fille, hospitalisés les 02/04/2007, 14/02/2008 et 06/02/2009, étaient âgés de 48, 7 et 37 mois, respectivement, et présentaient les mêmes signes cliniques que les autres patients de la cohorte étudiée (troubles respiratoires, fièvre, difficultés respiratoires, infiltrats pulmonaires compatibles avec une pneumonie, radiographie thoracique à l'admission confirmée par ultrasons, taux de leucocytes > 20 g/L ou de neutrophiles > 10 g/L, et taux de CRP > 60 mg/L après 12 heures de fièvre).

Les isolats TTMV-LY possèdent tous au moins 3 ORF dont les caractéristiques principales sont présentées ci-contre (Figure 39 et Tableau 2). Brièvement, l'ORF1 est composée de 673aa, 667aa, et 659aa pour les TTMV-LY-1, -2, et -3, respectivement. La

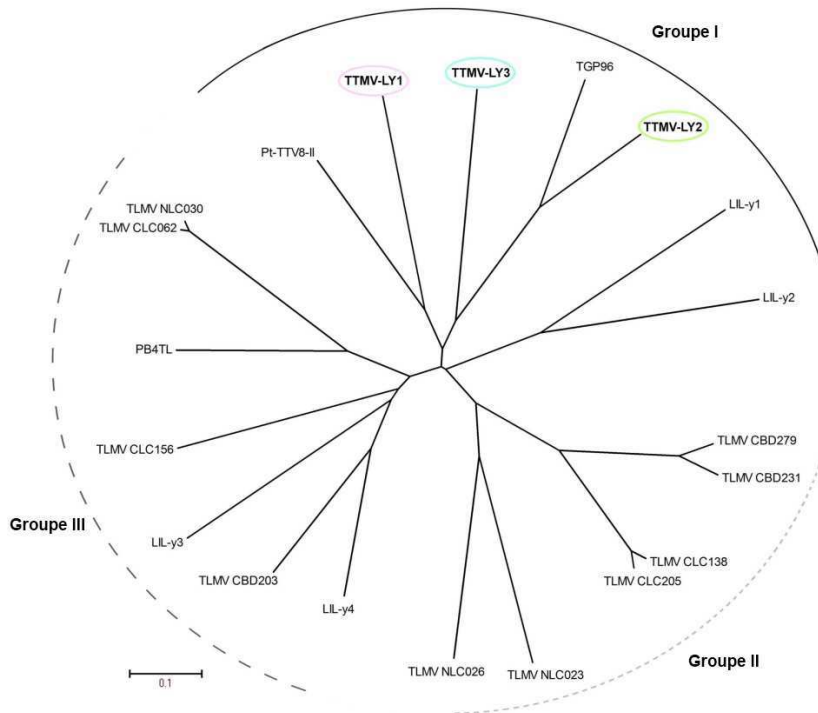


Figure 41 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences oligonucléotidiques de l'ORF1 des TTMV-LY1, -LY2, -LY3 et des *Betatorquevirus*.

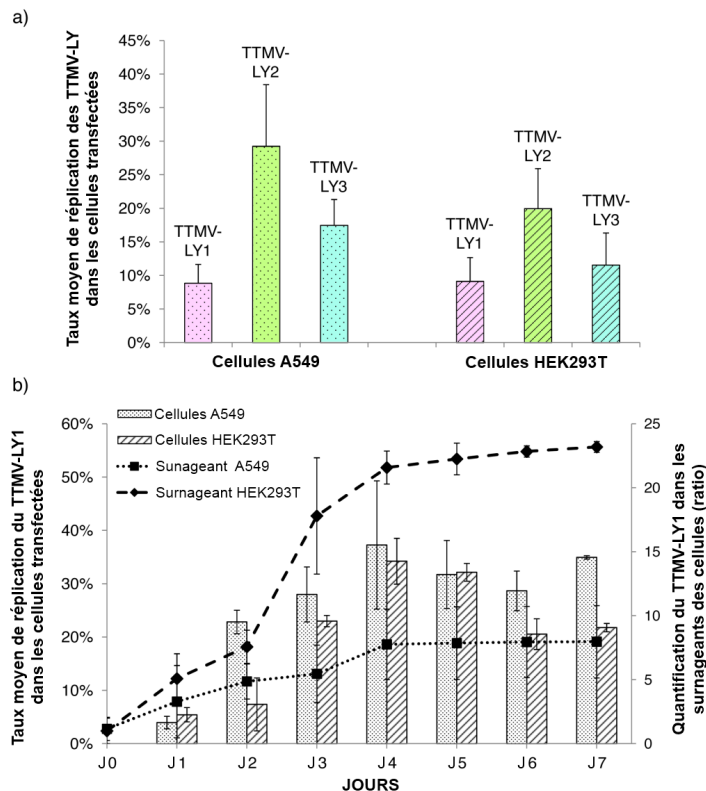


Figure 42 : Réplication des génomes TTMV-LY après transfection dans les cellules A549 et HEK293T. Les histogrammes représentent le taux moyen de réplication des TTMV-LY dans les cellules transfectées avec les génomes complets linéarisés. La réplication a été : a) mesurée dans les cellules 3 jours après transfection, ou b) suivie durant une semaine suivant la transfection. Pour le b), les courbes indiquent la quantification du TTMV-LY1 dans le surnageant de culture des cellules de J0 à J7, après un traitement à la DNaseI et l'extraction des acides nucléiques. Les résultats sont exprimés en ratio de la quantité mesurée de J1 à J7 sur celle mesurée à J0.

région 5'-UTR du TTMV-LY2 est plus longue que celle des deux autres virus (423 bases contre 342 bases). Elle contient en effet une insertion significative, capable de former des structures secondaires prédictives en "épingles à cheveux" (Figure 40).

a- Phylogénie

Des analyses phylogénétiques ont été réalisées afin de déterminer la similarité de ces nouvelles séquences avec celles existantes. L'arbre phylogénétique a été construit à partir d'alignements multiples dans l'ORF1 des différentes séquences de TTMV, selon les recommandations de l'ICTV (251) (Figure 41). Les 3 isolats TTMV-LY appartiennent tous au génogroupe I. Génétiquement, les plus proches séquences de TTMV sont les isolats TGP96 (64% d'identité nucléotidique au maximum) et Pt-TTV8-II (44% d'identité). La divergence nucléotidique est telle que les 3 nouveaux génomes de TTMV représentent au niveau phylogénétique de nouvelles espèces virales.

b- Prévalence

La prévalence des *Betatorquevirus* a été évaluée par qPCR dans 2 cohortes d'enfants souffrants d'IRA plus ou moins sévères. L'étude de la cohorte chinoise a été conduite en collaboration avec l'IPB-CAMS (*Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, Chine*), sur 216 enfants souffrant de bronchites aiguës ou de CAP. L'étude a été validée par un comité d'éthique local et les formulaires de consentement ont signés pour chaque enfant inclus.

Aucune différence significative n'a été observée entre la présence du TTMV dans les échantillons et la sévérité de la pathologie, l'âge ou le sexe des patients. De plus, le virus était détecté avec un autre pathogène dans 60 à 75% des cas (Tableau 3).

TABLEAU 3	Prévalence des <i>Betatorquevirus</i> dans les IRA			
	Prélèvements naso-pharyngés		Epanchement pleuraux	
	Cas positifs	Cas de co-détection	Cas positifs	Cas de co-détection
Cohorte française				
CAP (n=24)	10	6	N/A	N/A
PPE (PNP=28, EP=25)	8	6	9	6
Cohorte chinoise				
Bronchite (n=24)	6	N/A	N/A	N/A
CAP (n=186)	43	N/A	N/A	N/A

Dans les PNP, les cas de co-détection mettaient en jeu un ou plusieurs virus. Dans les EP, seule *S. pneumoniae* était trouvée dans les cas de co-détection.

4.3.2-Réplication *in vitro*

Dans le but d'étudier les propriétés biologiques de ces nouveaux génomes de TTMV, nous avons mesuré, durant une semaine après transfection des génomes linéarisés : i) la réplication des nouveaux isolats dans les lignées cellulaires pulmonaires A549 et rénales

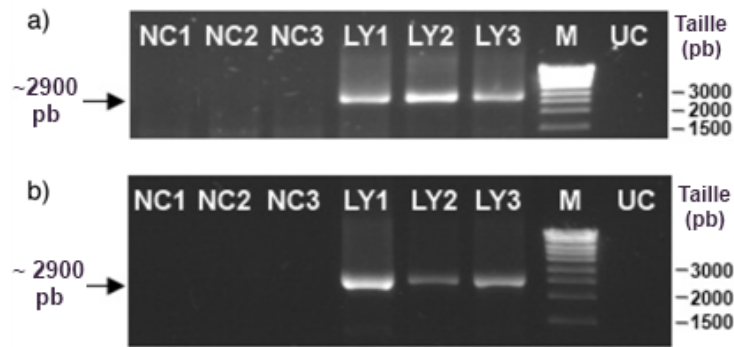


Figure 43 : Détection par PCR inverse des génomes recircularisés dans les cellules A549 (a) et leurs surnageants (b) 3 jours après transfection. LY1, LY2 et LY3 : cellules retransfectées avec les génomes des TTMV-LY1, -LY2 et -LY3 respectivement. NC, NC2 et NC3 : contrôles négatifs de chaque génome (mise en contact des génomes avec les cellules sans agent de transfection). UC : cellules non transfectées. M : Marqueur de poids moléculaire.

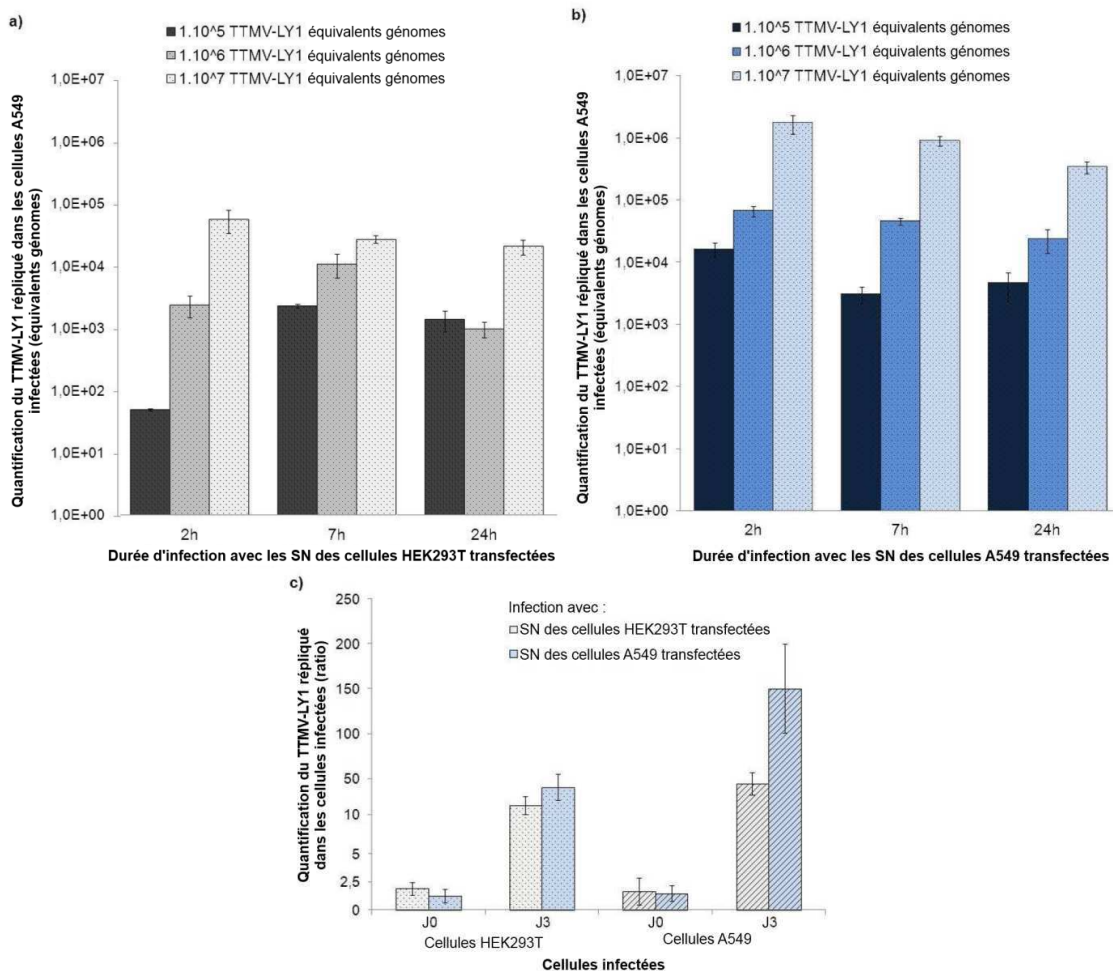


Figure 44 : Infection des cellules A549 et HEK293T avec les particules virales néo-synthétisées. Pour les a) et b), les cellules A549 ont été exposées durant 2h, 7h ou 24h aux surnageants (SN) des cellules A549 ou HEK293T à J3 post-transfection et contenant 1.10^5 , 1.10^6 ou 1.10^7 EG. Pour le c), la quantité de TTMV-LY1 a été mesurée à J0 et à J3 dans les cellules A549 et HEK293T après 2h d'infection (1.10^7 EG). Les résultats sont exprimés en ratio par rapport à la quantité de TTMV détectée dans les surnageants des cellules exposées aux génomes de TTMV-LY sans agent de transfection.

HEK293T, et ii) le relargage des particules virales. La quantification a été réalisée grâce une méthode de qPCR ciblant spécifiquement les génomes néo-synthétisés.

a- Détection des génomes de TTMV-LY répliqués

La réplication des génomes de TTMV-LY a été quantifiée dans les lignées HEK293T et A549. Dans un premier temps, nous avons pu voir qu'une réplication active des 3 génomes était observée dans les 2 lignées cellulaires, comme en témoigne l'augmentation de la quantité d'ADN viral répliqué au cours du temps. Il n'y a pas de différences significatives entre les taux moyens de réplication des 3 isolats dans les cellules A549 (25%) et HEK293T (10%) (Figure 42a). Les expériences de cinétique ont montré que la quantité de TTMV-LY répliqué augmente de J2 à J4, atteignant ~ 35% dans les 2 lignées. Le taux de réplication reste alors relativement constant jusqu'à J7, avec une légère baisse dans les cellules HEK293T. Le relargage des particules de TTMV-LY1 dans les surnageants montre un profil similaire au taux de réplication observé dans les cellules, avec un pic à J4 post-transfection où la quantité d'ADN répliqué augmente de 20 et 8 fois par rapport à J0 pour les surnageants des cellules HEK293T et A549, respectivement (Figure 42b). Les résultats ne sont présentés que pour le TTMV-LY1 mais les 2 autres virus présentaient un profil similaire.

En complément, nous nous sommes assurés que l'ADN répliqué correspondait bien au génome complet du virus, et non à de simples fragments partiels. Dans ce but, une amplification de la totalité du génome a été réalisée par PCR inverse dans les cellules A549 et leurs surnageants. Nous avons alors observé la présence d'un fragment de 2,9 kb, représentant les formes recircularisées des génomes de TTMV-LY (Figure 43). Ces résultats ont été confirmés par séquençage et la séquence obtenue correspondait à celle qui avait été transfectée (données non présentées). Ces résultats confirment que des génomes complets, circulaires, sont produits dans les cellules et relargués dans le surnageant des cellules, suggérant la formation de particules virales.

b- Infection des cellules épithéliales alvéolaires avec les particules virales

La capacité des génomes de TTMV à produire des particules virales infectieuses a été évaluée en infectant les cellules A549 avec les surnageants issus des cellules transfectées avec les génomes des TTMV-LY. Les cellules A549 ont ainsi été exposées durant 2h, 7h, ou 24h aux virus (1.10^5 , 1.10^6 ou 1.10^7 EG) relargués dans les surnageants des cellules A549 ou HEK293T 3 jours après leurs transfections. Nous avons alors constaté que la condition qui donnait les meilleures productions virales pour l'infection des cellules A549 était après 2h, ou 7h d'incubation avec les surnageants des cellules A549 et HEK293T transfectées, respectivement (Figure 44 : a et b). Nous avons également relevé que l'entrée des particules virales était d'autant plus significative que la concentration d'exposition était forte (1.10^7 EG). De plus, la quantité de TTMV-LY dans les cellules A549 semble systématiquement plus élevée lorsqu'elles sont exposées aux surnageants de

cellules A549 transfectées, comparée aux surnageants de cellules HEK293T, avec $1,7 \cdot 10^6$ EG contre $5,6 \cdot 10^4$ EG après 2h d'infection avec $1 \cdot 10^7$ EG. Cela suggérerait que les particules virales produites dans les cellules pulmonaires sont plus infectieuses. Ce résultat a été confirmé par la quantification du TTMV-LY1 répliqué après infection des deux lignées cellulaires (Figure 44c). Les cellules A549 infectées montraient de nouveau une augmentation du titre viral 3 jours après infection, de 48 et 167 fois pour les infections avec les surnageants de cellules HEK293T et A549, respectivement. Cette observation était d'ailleurs observée pour les 3 TTMV-LY (données non présentées). Aucun effet cytopathique n'a été mis en évidence, quelles que soient les conditions d'infection.

Afin de préciser la cinétique d'infection par les TTMV-LY, les cellules A549 et leurs surnageants ont été analysés après 3h, 6h, 18h, 24h, et 48h d'infection. Les résultats montrent que la quantité de TTMV augmente dans les cellules, pour les 3 variants de TTMV-LY, de 3 à 6 heures après infection, mais dans une moindre mesure pour le TTMV-LY1 avec une hausse de 2 EG/cellule contre 8 et 10 EG/cellule pour les TTMV-LY3 et -LY2, respectivement. La quantité diminue drastiquement entre 6h et 18h, puis elle est quasiment constante jusqu'à 48h (Figure 45a). Dans les surnageants, la quantité de TTMV-LY augmente régulièrement de 3h à 48h pour le TTMV-LY3. Les quantités de TTMV-LY1 et -LY2 croissent doucement de 3h à 18h après-infection, puis une hausse est observée à 24h, avant que la quantité se stabilise aux alentours de $4 \cdot 10^6$ EG/ml pour le TTMV-LY1 et de $2,8 \cdot 10^6$ EG/ml pour le TTMV-LY2 (Figure 45b).

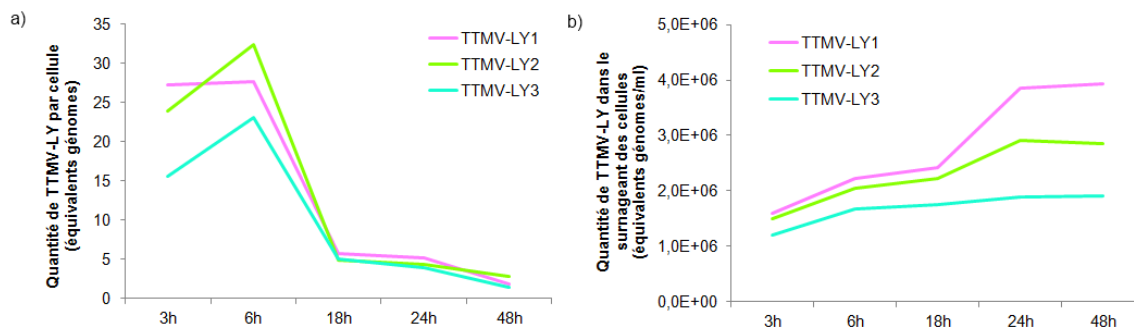


Figure 45 : Cinétique de l'infection par les TTMV-LY, dans les cellules A549 (a) et leurs surnageants (b). Les expériences ont été réalisées deux fois en triplicats. Les écart-types, très élevés, ne sont pas représentés car ils masquent la lecture.

4.4- Discussion

La pneumonie est la première cause de mortalité chez l'enfant dans le monde. Elle peut être provoquée par un certain nombre d'agents pathogènes connus mais 15 à 35% des pneumonies de l'enfant restent encore non renseignées d'un point de vue étiologique (128). Durant la dernière décennie, l'utilisation de protocoles de découverte de nouveaux pathogènes, émergents ou ré-émergents a conduit à l'identification de nouveaux virus

respiratoires permettant d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients. Le but de ce projet de thèse est d'examiner l'implication potentielle de nouvelles souches de TTMV (TTMV-LY), isolées à partir d'épanchements pleuraux, dans la pathogenèse de la pneumonie sévère chez l'enfant. Les principales conclusions de cette première partie du projet montrent que : i) les AV, et plus particulièrement les TTMV-LY, peuvent profondément coloniser les poumons, ii) les cellules épithéliales alvéolaires sont permissives aux TTMV-LY, et iii) les TTMV-LY se répliquent activement dans ces cellules.

La PPE correspond à une inflammation de la plèvre, et résulte généralement d'une infection par des pathogènes bactériens (252). Les bactéries sont fréquemment décrites dans les liquides pleuraux, comme nous l'avons également démontré dans cette étude où *S. pneumoniae* était trouvée dans 70% des EP, mais la présence d'une origine virale reste mal documentée (92, 253). Cette étude est la première à révéler la présence d'AV dans ce type de prélèvement biologique. Comme nous l'avons vu en introduction, les *Anelloviridae* se caractérisent par leur extrême diversité génétique, une forte prévalence dans les populations, et une large distribution dans les fluides corporels. Cette ubiquité, combinée à l'absence de systèmes appropriés de culture *in vitro*, a compliqué la mise en place de protocoles d'études, destinés à mieux comprendre les mécanismes biologiques et l'impact des *Anelloviridae* sur la santé de l'hôte. Ainsi, les études publiées jusqu'à présent, n'ont pas permis une démonstration sans équivoque que les AV pourraient être impliqués dans la pathogenèse ou la gravité d'une pathologie (142, 143, 172). Dans cette étude, nous avons constaté la présence de génomes complets de TTMV-LY identiques dans les PNP et les EP d'enfants hospitalisés pour une pneumonie sévère. Notre étude de prévalence des *Betatorquevirus* n'a pas permis de mettre en évidence une corrélation entre la présence de ces virus et la gravité de la maladie, l'âge ou le sexe des patients. Cependant, la présence de génomes complets de TTMV, associés à une réplication virale active, pourrait suggérer un rôle dans la pathogenèse de la pneumonie. Cette 1^{ère} partie des résultats rapporte l'isolement des 3 nouveaux génomes complets des TTMV-LY chez des enfants atteints de pneumonie sévère, ainsi que l'étude de leurs caractéristiques génétiques et biologiques.

Afin d'examiner la capacité de ces nouveaux virus à se répliquer, les génomes complets des trois TTMV-LY ont été amplifiés par clonage, linéarisés puis transfectés dans les lignées cellulaires HEK293T et A549. Bien que l'on ne dispose pas d'un système de culture *in vitro* efficace pour propager les AV, cette stratégie a déjà fait ses preuves pour répliquer et étudier les propriétés de plusieurs isolats de TTV : HEL32, tth8, TTV-HD14b et c (149, 168, 170), et est également utilisée pour d'autres virus qui se cultivent difficilement comme les papillomavirus (254). Un grand nombre de lignées cellulaires ont été testées pour répliquer les AV, et les cellules HEK293T font partie des plus efficaces (168), c'est pourquoi nous les avons choisi comme modèle de référence. Les cellules

A549, provenant d'un adénocarcinome pulmonaire, représentent le modèle de lignée cellulaire le plus couramment utilisé pour étudier les cellules épithéliales alvéolaires de type II, en raison des similarités de leurs propriétés morphologiques et biochimiques (255, 256). Jusqu'à présent, la détection de l'ADN répliqué des AV était principalement réalisée par des techniques d'hybridation à l'aide de sondes (*Southern Blotting*), après une digestion de l'ADN transfecté. Afin d'obtenir des données quantifiables, nous avons choisi de réaliser la détection de l'ADN répliqué par qPCR. Cette technique est beaucoup plus rapide, plus sensible et permet d'estimer le titre viral. Cette sensibilité accrue conduit néanmoins à une diminution de la spécificité, c'est-à-dire qu'on observe un bruit de fond provenant de la détection d'ADN résiduel non clivé. Une mise au point des conditions de détection de la réplication virale a donc été nécessaire et nous a conduit à quantifier également spécifiquement l'ADN transfecté, ce qui nous a permis de normaliser les résultats de quantification, et à ajouter une étape de traitement à l'exonucléase III des acides nucléiques après leur clivage maximisant la spécificité de la détection. Nous avons alors pu décrire pour la première fois que le TTMV, comme le TTV, était effectivement capable de se répliquer dans des lignées cellulaires après transfection de son génome, conduisant à la production de virions infectieux. Dans cette étude, la mise en évidence de la production de particules virales après transfection repose uniquement sur la transmissibilité de l'ADN des TTMV-LY. Il aurait été intéressant de conduire d'autres expérimentations afin d'approfondir la caractérisation de ces nouveaux virus et la synthèse effective des virions, comme la mise en évidence de transcrits des gènes de protéines structurales, la mise en évidence d'ADN génomique simple brin, la présence d'ADN encapsidé, c'est-à-dire associé à une structure à haute densité dans une analyse en gradient de densité, ou des expériences de neutralisation de l'infection. Une précédente étude a démontré visuellement, par microscopie électronique, la formation de particules virales de TTV suite à la transfection de son génome dans des cellules (172), c'est pourquoi nous n'avons pas approfondi ces aspects plus précisément, mais focalisé notre travail sur les effets biologiques et immunologiques induits par ces particules virales.

La demi-vie des virions de TTV a été précédemment estimée à 4,3 heures (142). Dans cette étude, nous avons observé que la quantité de TTMV-LY augmentait dans les cellules A549 durant 6 heures après infection. Puis celle-ci diminue fortement à 18h, ce qui laisse supposer du relargage des virions, qui serait cohérent avec la hausse de la concentration des TTMV-LY dans les surnageants constatée à ce moment là. Plusieurs mécanismes sécrétoires ont été envisagés pour les AV. Dans cette étude, l'absence d'effets cytopathiques semble indiquer que le relargage des virions ne provoque pas la mort cellulaire de la cellule hôte utilisée dans le modèle proposé. Par ailleurs, nous avons observé que l'infection virale était plus efficace dans les cellules alvéolaires que dans des cellules rénales, ce qui pourrait suggérer un tropisme préférentiel des TTMV-LY pour les cellules pulmonaires et vient étayer l'hypothèse d'un rôle potentiel dans la pathogenèse

de la PPE.

Il a déjà été suggéré que la pathogénicité potentielle des AV pourrait être limitée à certaines espèces ou groupes d'espèces, comme c'est le cas pour les circovirus porcins ou les papillomavirus, (217, 257, 258). Dans notre étude, une grande diversité génétique dans les isolats de TTMV a été observée entre les différents patients testés, mais les mêmes génomes complets ont systématiquement été retrouvés dans les différents échantillons prélevés chez un même patient. De plus, les 3 génomes isolés appartiennent à la même branche phylogénétique (Groupe I) des *Betatorquevirus*, ce qui vient d'autant appuyer cette idée. Nous nous sommes donc questionnés sur la présence possible de motifs/signatures moléculaires, qui pourraient être associés à une pathogénicité accrue chez ces virus. Dans ce but, nous avons étudié la séquence de la région conservée 5'UTR pour les 3 génomes de TTMV-LY. L'origine de répllication (_AGT_TTACA), proposée par de Villiers *et al.*(170), n'a été identifiée dans nos génomes, mais une insertion de 200 bases formant une structure en « épingle à cheveux » a été mise en évidence pour le TTMV-LY2, laquelle est susceptible d'être impliquée dans la pathogénicité virale (150). Nous n'avons cependant pas pu confirmer cette hypothèse *in vitro* où le TTMV-LY2 présentait un taux de répllication légèrement plus élevé que les 2 autres TTMV-LY mais pas de manière significative. Néanmoins, les effets de ces modifications génétiques pourraient s'exprimer biologiquement d'une autre manière, notamment en réponse à l'interaction avec la cellule hôte, comme on l'observe pour de nombreux virus (259).

L'ensemble de ces résultats montrent que les TTMV-LY peuvent envahir les cellules alvéolaires et s'y répliquer activement, confirmant un tropisme privilégié des AV pour le tractus respiratoire, déjà suggéré par d'autres auteurs (166). La présence des génomes complets de TTMV-LY, et donc de potentiels virions infectieux, dans des EP témoigne d'un lien possible entre ces virus et la pneumonie. Néanmoins, les mécanismes physiopathologiques par lesquels les TTMV-LY pourraient induire la maladie demeurent inconnus, c'est pourquoi nous nous sommes ensuite attachés à étudier les réponses biologiques et immunologiques induites par l'infection par les TTMV-LY, comme nous le verrons dans les chapitres suivants.

4.5-Publication sous presse

Potential implication of new torque teno mini viruses in parapneumonic empyema in children

Johanna Galmès*, Yongjun Li[#], Alain Rajoharison*, Lili Ren[#], Sandra Dollet*, Nathalie Richard[¶],
Guy Vernet*, Etienne Javouhey[¶], Jianwei Wang[#], Jean-Noël Telles*, Gláucia Paranhos-Baccalà*

Affiliations:

*Laboratoire des Pathogènes Emergents, Fondation Mérieux, Lyon, France

[#]Christophe Mérieux Laboratory, Institute of Pathogen Biology-CAMS-Fondation Mérieux, Beijing,
People's Republic of China

[¶]Service de Réanimation Pédiatrique Médico-Chirurgicale, Hôpital Femme-Mère-Enfant, Lyon,
France

Corresponding author:

Gláucia Paranhos-Baccalà

Fondation Mérieux - Emerging Pathogens Laboratory

21 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon - France.

Phone: +33 4 37 28 24 13; Fax: +33 4 37 28 24 11; e-mail: glaucia.baccala@fondation-merieux.org

Abstract:

An unexplained increasing incidence of parapneumonic empyema (PPE) in pneumonia cases has been reported in recent years. The present study investigated the genetic and biological specifications of new isolates of Torque Teno Mini Virus (TTMV) detected in pleural effusion (PE) samples from children hospitalised for severe pneumonia with PPE.

A pathogen discovery protocol was applied in undiagnosed PE samples and led us to the identification of 3 new isolates of TTMV (TTMV-LY). Isolated TTMV-LY genomes were transfected into A549 and HEK293T cells and viral replication was assessed by qPCR and full-length genome amplification. A549 cells were further infected with released TTMV-LY virions and the induced-innate immune response was measured by multiplex immunoassays.

Genetic analyses of the 3 TTMV-LY genomes revealed a classic genomic organisation but a weak identity (<64%) with known sequences. We demonstrated here the *in vitro* replication of TTMV-LY in alveolar epithelial cells and the effective release of infectious viral particles. We also showed a selective production of inflammatory mediators in response to TTMV infection.

This study reports the description of replicative TTMV-LY isolated from parapneumonic effusions of children hospitalised with PPE, suggesting the potential role of the virus in the pathogenesis of pneumonia.

Chapitre 5

ETUDE DE LA REPONSE DES CELLULES EPITHELIALES ALVEOLAIRES A L'INFECTION PAR LES TTMV-LY

5.1	CONTEXTE ET OBJECTIF	130
5.2	METHODES	130
	5.2.1- Infection des cellules épithéliales alvéolaires par les TTMV-LY	130
	5.2.2- Quantification de la sécrétion de médiateurs inflammatoires	130
	5.2.3- Extraction des ARN totaux	131
	5.2.4- Etude du transcriptome des cellules A549	131
	5.2.5- Quantification de l'expression génique	131
5.3	RESULTATS	133
	5.3.1- Les TTMV-LY sont capables de moduler la réponse immunitaire innée des cellules épithéliales alvéolaires	133
	5.3.2- Les TTMV-LY sont capables de moduler l'expression de certains gènes dans les cellules épithéliales alvéolaires	135
	a- Analyse du transcriptome des cellules A549	135
	b- Fonctions des gènes dont l'expression est dérégulée	135
	c- Modulation de l'expression génique par les TTMV-LY	135
5.4	DISCUSSION	137
5.5	PUBLICATION EN PREPARATION	142

5.1- Contexte et objectif

Trois nouvelles espèces de TTMV, TTMV-LY1, -LY2, et -LY3, ont été isolées dans les épanchements pleuraux d'enfants hospitalisés à la suite d'une PPE. Ces virus étaient les seuls pathogènes qui ont pu être détectés pour ces prélèvements respiratoires, ce qui laisse à penser qu'ils pourraient potentiellement jouer un rôle dans la pathogenèse de la pneumonie. Cette pathologie consiste en une inflammation du parenchyme alvéolaire, ce qui sous-entend la mise en place d'une réaction du système immunitaire innée. Comme nous l'avons vu en introduction, cette réaction à un stimulus infectieux est orchestrée par la production d'une multitude de médiateurs solubles, qui vont être capables d'attirer les phagocytes sur le lieu de l'inflammation, ainsi que de moduler les voies de signalisation cellulaires. Ainsi, nous en sommes venus à nous questionner sur l'éventuelle capacité de ces nouveaux virus à induire une réponse immunitaire innée après l'infection de cellules épithéliales alvéolaires.

Deux approches ont été développées afin d'évaluer la réponse des cellules infectées par les TTMV-LY. Dans un premier temps, nous nous sommes attelés à quantifier la production d'une large gamme de cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation, véritable reflet de la mise en place d'une réaction immune. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression génique, à savoir si ces nouveaux virus avaient le potentiel d'induire la surexpression ou la sous-expression de certains gènes des cellules hôtes.

5.2- Méthodes

5.2.1- Infection des cellules épithéliales alvéolaires par les TTMV-LY

Les cellules A549 ont été maintenues dans du milieu F12K contenant 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine et des antibiotiques, et entretenues deux fois par semaine. La veille des infections, les cellules sontensemencées en plaques de 24 puits, à raison de 10^5 cellules/puits. L'infection a été réalisée avec 2.10^6 EG/ml de chaque TTMV-LY, ou avec le surnageant de cellules A549 non transfectées, puis les cellules ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ durant 3h, 6h, 18h, 24h ou 48h.

5.2.2- Quantification de la sécrétion de médiateurs inflammatoires

Les surnageants ont été récoltés après 24h d'infection et congelés en aliquots de 100µl. La quantification simultanée des médiateurs inflammatoires suivants a été réalisée à l'aide d'un kit Milliplex (Millipore, Etats-Unis), selon les recommandations du

fournisseur : EGF, éotaxine, G-CSF, GM-CSF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, IL-1ra, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , TNF- β , VEGF. La lecture a été réalisée sur le FlexMap3D (Luminex Corp, Etats-Unis). La production d'IFN β a été mesurée avec le kit IFN- β Human ELISA (Invitrogen, Allemagne), selon le protocole préconisé.

5.2.3-Extraction des ARN totaux

Avant ajout du tampon de lyse, les cellules A549 infectées ont été lavées 3 fois avec du PBS, puis 2 fois avec du milieu de culture, chauffés à 37°C. Les culots sont repris dans 350 μ l de tampon RLT contenant 1% de β -mercaptoéthanol. L'extraction des ARN totaux a ensuite été réalisée à l'aide du kit RNeasy Mini (Qiagen, France), dans un volume d'élution de 30 μ l, comprenant un traitement à la DNase I. Les ARN totaux extraits ont été quantifiés à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Scientific, France).

5.2.4-Etude du transcriptome des cellules épithéliales alvéolaires

La qualité des ARN totaux a été vérifiée grâce au Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, France). La synthèse des ADNc, suivie de l'amplification et du marquage à la biotine des ARNc, ont été réalisées à partir de 100 ng d'ARN totaux, à l'aide du kit GeneChip 3' IVT Express (Affymetrix, Etats-Unis). La qualité de la librairie d'ARNc a été vérifiée comme décrit ci-dessus. Dix microgramme d'ARNc ont été fragmentés puis hybridés sur la puce GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Etats-Unis), selon les instructions du fabricant. Les puces ont alors été lues à l'aide d'une station fluïdique (Affymetrix, Etats-Unis). La normalisation des données a été effectuée par le logiciel Expression Console (Affymetrix, Etats-Unis). Le seuil a été calculé en utilisant l'intensité du signal normalisée des contrôles négatifs. Les sondes présentant une intensité du signal en dessous de ce seuil ont été considérées comme absentes. La recherche des fonctions associées aux gènes dérégulés a été effectuée à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Etats-Unis).

5.2.5-Quantification de l'expression génique

La transcription inverse a été réalisée durant 1h à 42°C, à partir d'1 μ g d'ARN totaux et dans 20 μ l de mélange réactionnel, contenant 0,5 μ M d'amorce oligodT(20), 3 mM de MgCl₂, 20U d'inhibiteur de ribonucléases, 0,5 μ M de chaque dNTP et 1 μ l d'enzyme ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, France). Les ADNc obtenus ont été dilués au 1 : 15. L'amplification a été réalisée par qPCR sur un thermocycleur CFX96 (Biorad, France), à l'aide du kit SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Biorad, France), de 5 μ l d'ADNc, et de 0,3 μ M des amorces sens et anti-sens (Tableau 4). Le gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisé pour la normalisation

des résultats. Les amorces de la GAPDH utilisées proviennent du kit Human GAPDH Primer Mix (Search-LC, Allemagne). Des contrôles positifs et négatifs ont été réalisés lors de chaque quantification. Les amorces utilisées ont été dessinées à l'aide du logiciel Geneious utilisant l'algorithme Primer3 et leur efficacité a été optimisée selon les bonnes pratiques de qPCR (250). L'analyse de l'expression génique a été réalisée à l'aide du logiciel CFX Manager (Biorad, France) et représente la variation $\Delta\Delta Cq$, c'est-à-dire l'expression relative des gènes dans les échantillons infectés par rapport aux échantillons témoin. Les expériences ont été réalisées deux fois en triplicats.

TABLEAU 4	
Amorces utilisées pour l'étude de l'expression génique.	
Amorces	Séquence 5'-3'
PPM1L-F	ACG-TCT-AAA-TCC-TGC-TCT-GTG-GA
PPM1L-R	GTC-TGG-GAG-CCT-AAA-TCA-GAG-GAG-T
KRAS-F	ACA-CAA-CAG-GTG-ACT-TGG-TTT-TAG-G
KRAS-R	AGC-CTG-CTG-GTG-ACT-GGC-AT
RPL5-F	GCT-GCA-ATG-AAC-ATG-GGA-GTG-CC
RPL5-R	TCC-CAA-ACC-CCA-ACT-TCT-GTG-A
MAPK8-F	TGA-AGC-AGA-AGC-TCC-ACC-ACC-A
MAPK8-R	GGA-GAG-GGC-TGC-CCC-CGT-AT
PPP2R2B-F	AGT-CCA-ACA-TTC-CCA-GCT-CCC-CA
PPP2R2B-R	GGA-CCC-ACC-AGA-GAA-AAC-TGG-GC
MAP3K8-F	CAG-GCG-CAG-TTA-GCA-GGC-GA
MAP3K8-R	CAG-GAC-CCG-GGA-GGT-GGA-GG

Toutes les amplifications ont été réalisées dans les conditions suivantes : 3 min à 95°C puis 35 cycles de 10 sec à 95°C et 30 sec à 65°C. La courbe de fusion a été effectuée en augmentant la température de 0,5°C de 55°C à 95°C.

5.3- Résultats

5.3.1- Les TTMV-LY sont capables de moduler la réponse immunitaire innée des cellules épithéliales alvéolaires.

Dans cette étude, nous avons utilisé un essai immuno-enzymatique multiplexe, afin de mesurer simultanément la production de 29 médiateurs inflammatoires, dans le surnageant des cellules A549 infectées par les TTMV-LY1, -LY2, et -LY3. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5. Six heures après infection, les TTMV-LY induisent la production de plusieurs cytokines et facteurs de croissance dans les cellules infectées, en témoigne l'augmentation significative de la quantité de médiateurs solubles comparée aux cellules non-infectées. Nous avons pu observer que cette induction était variable selon l'isolat considéré. L'infection par le TTMV-LY1 provoque la production d'un grand nombre de cytokines, aussi bien pro-inflammatoires (IFN γ , RANTES, IL-2, IL-12), qu'anti-inflammatoires (IL-10, IL-13), ou chimiotactiques (MIP-1 β), mais également des facteurs de croissance (G-CSF, GM-CSF, IL-7). L'infection par les 2 autres TTMV-LY induit une réponse plus faible avec la sécrétion significative de RANTES, d'IL-12(p40), de MCP-1, de VEGF et d'IL-12 pour le TTMV-LY2, et d'IL-2, d'IL-12(p40) et de MCP-1 pour le TTMV-LY3. Seule l'IL-12 est relarguée dans le surnageant des cellules après infection par chacun des 3 TTMV-LY. Aucune production des IFN de type I n'a été mesurée après infection, quelque soit l'isolat testé.

TABEAU 5		Sécrétion de médiateurs inflammatoires dans le surnageants de cellules A549, 6 heures après infection			
	Médiateurs solubles	Témoin	TTMV-LY1	TTMV-LY2	TTMV-LY3
Cytokines pro-inflammatoires	IFN- γ	4,5 \pm 3,0	20,5 \pm 4,9	7,8 \pm 2,7	7,2 \pm 0,8
	IL-2	26,6 \pm 5,2	51,3 \pm 6,8	32,3 \pm 2,4	33,4 \pm 1,2[#]
	IL-12(p40)	16,6 \pm 4,2	36,3 \pm 4,9[#]	22,2 \pm 1,0[#]	22,3 \pm 1,1[#]
	IL-12(p70)	10,2 \pm 1,8	20,9 \pm 2,1[#]	10,1 \pm 0,8	10,6 \pm 0,6
Cytokines anti-inflammatoires	IL-10	54,8 \pm 4,9	95,7 \pm 5,4[#]	60,2 \pm 1,2	55,3 \pm 0,9
	IL-13	82,0 \pm 6,1	120,2 \pm 1,3[#]	94,6 \pm 1,2[#]	89,2 \pm 3,8
Cytokines Chimiotactiques	RANTES	28,1 \pm 0,1	67,7 \pm 12,4[#]	71,6 \pm 14,2[#]	33,1 \pm 2,4
	MIP-1 β	43,4 \pm 1,9	67,9 \pm 0,4[†]	43,5 \pm 2,7	44,2 \pm 2,6
	MCP-1	868 \pm 197	1271 \pm 48	2108 \pm 524	1610 \pm 550
Facteurs de croissance	G-CSF	55,5 \pm 3,6	176,2 \pm 38,1[#]	58,1 \pm 1,7	58,5 \pm 4,0
	GM-CSF	30,9 \pm 7,5	56,9 \pm 1,0[#]	44,1 \pm 2,7	40,0 \pm 5,9
	IL-7	37,8 \pm 6,5	77,8 \pm 7,1[#]	41,1 \pm 1,1	39,2 \pm 1,3
	VEGF	156,5 \pm 20,0	218,6 \pm 13,5	254,6 \pm 32,8[#]	220,9 \pm 42,3

Les résultats sont exprimés en moyenne pg/ml \pm écart-type. Les expériences ont été réalisées deux fois en duplicats.
[#] Statistiquement différent du témoin avec p<0.05 (test de Student).
[†] Statistiquement différent du témoin avec p<0.01 (test de Student).

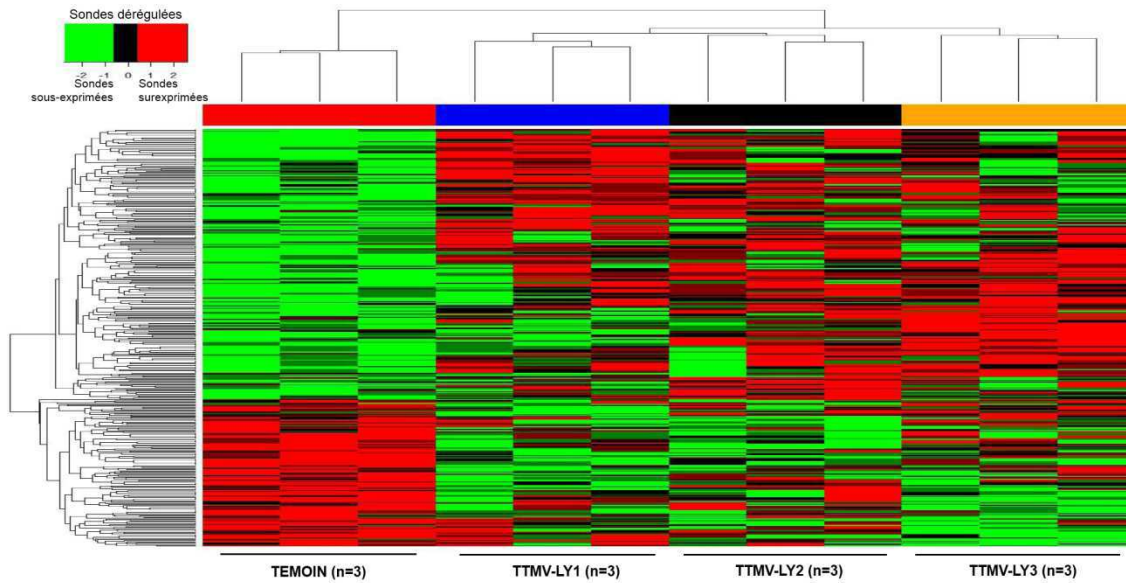


Figure 46 : Dérégulation de l'expression génique dans les différentes conditions testées : témoin, infection par le TTMV-LY1, -LY2 ou -LY3.

TABLEAU 6		Gènes dont l'expression est la plus dérégulée par les TTMV-LY, après 6h d'infection				
Comparaison	FC	Nom	N° Genbank	Description	Fonction	
Témoin vs TTMV-LY1	2,869	ZNF91	NM_003430	<i>zinc finger protein 91</i>	Inconnue	
	2,853	CREBRF	AA481560	<i>CREB3 regulatory factor</i>	Inconnue	
	2,395	WSB1	NM_015626	<i>WD repeat and SOCS box-containing 1</i>	Inconnue	
	- 2,481	CTNS	NM_004937	<i>cystinosis, nephropathic</i>	Métabolisme	
	- 2,280	PPM1L	AW274846	<i>protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1L</i>	Cycle cellulaire	
	- 2,045	ATP6V1H	AW468382	<i>ATPase, H+ transporting, lysosomal, V1 subunit H</i>	Signalisation	
Témoin vs TTMV-LY2	2,318	HSPB11	NM_016126	<i>heat shock protein family B (small), member 11</i>	Signalisation	
	2,067	ALAS2	AF130113	<i>aminolevulinate, delta-, synthase 2</i>	Métabolisme	
	1,992	TPP2	BC024905	<i>tripeptidyl peptidase II</i>	Inconnue	
	- 2,687	CDKL3	NM_016508	<i>cyclin-dependent kinase-like 3</i>	Inconnue	
	- 2,497	ETV4	BC007242	<i>ets variant 4</i>	Signalisation	
	- 2,469	DHX35	AF086439	<i>DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 35</i>	Inconnue	
Témoin vs TTMV-LY3	2,217	MORF4L2	NM_012286	<i>mortality factor 4 like 2</i>	Inconnue	
	2,156	FAM198B	NM_016613	<i>family with sequence similarity 198, member B</i>	Inconnue	
	2,072	PLAGL2	NM_002657	<i>pleiomorphic adenoma gene-like 2</i>	Inconnue	
	- 2,518	RGS5	AF159570	<i>regulator of G-protein signaling 5</i>	Inconnue	
	- 2,05	SMG1	AC003007	<i>PI-3-kinase-related kinase SMG-1 pseudogene</i>	Inconnue	
	- 2,023	MAPK8	AU152505	<i>mitogen-activated protein kinase 8</i>	Inflammation	
Témoin vs TTMV-LY	2,325	CREBRF	AA481560	<i>CREB3 regulatory factor</i>	Inconnue	
	2,212	PDLIM5	AI808578	<i>PDZ and LIM domain 5</i>	Inconnue	
	2,130	PPDPF	NM_024299	<i>pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor homolog</i>	Inconnue	
	- 2,216	ST8SIA1	BC039019	<i>ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1</i>	Métabolisme	
	- 2,077	CTNS	NM_004937	<i>cystinosis, nephropathic</i>	Métabolisme	
	- 2,073	PPM1L	AW274846	<i>protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1L</i>	Cycle cellulaire	

FC (Fold Change) : induction du niveau d'expression génique dans les cellules infectées par comparaison au témoin, quantifié par analyse du transcriptome, grâce à des puces à ADN. Les fonctions ont été obtenues par ontologie génique (Ingenuity).

5.3.2- Les TTMV-LY sont capables de moduler l'expression de certains gènes dans les cellules épithéliales alvéolaires

a- Analyse du transcriptome des cellules épithéliales alvéolaires

Les cellules ont été infectées avec les TTMV-LY1, -LY2, -LY3, ou mises en contact avec le surnageant de cellules non transfectées (condition témoin), et les ARN totaux ont été récoltés après 6h d'infection, afin d'obtenir des informations sur des changements précoces dans l'expression génique induite par les TTMV-LY dans les cellules épithéliales alvéolaires. Parmi les 47.000 transcrits analysés, les comparaisons d'expression génique entre les échantillons infectés et non infectés ont révélé que 120, 100 et 122 gènes étaient dérégulés par l'infection par les TTMV-LY1, -LY2 et -LY3, respectivement (test t <0,05, FC >1,5). Si les expressions géniques des 3 isolats de TTMV-LY sont groupées et confrontées à l'expression quantifiée dans les conditions témoin, 109 gènes sont alors dérégulés. Quelle que soit les comparaisons effectuées, nous avons pu observer un même ratio, avec 60% des gènes surexprimés et 40% sous-exprimés (Figure 46).

b- Fonctions des gènes dont l'expression est dérégulée

Parmi les gènes les plus fortement dérégulés, l'infection par les TTMV-LY induit une modulation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (PPM1L↓), dans l'inflammation (MAPK8↓), dans le métabolisme cellulaire (CTNS, ST8SIA1), ou les voies de signalisation, mais la plupart des gènes régulés n'ont pas été associés à une fonction connue (Tableau 6). Tous les gènes dérégulés ont alors été classés en fonction de leur ontologie génique et de leurs fonctions biologiques connues. Cette analyse a suggéré une potentielle implication des TTMV-LY dans la régulation du cycle cellulaire, avec 2 gènes surexprimés (RPL5↑, PPP2R2B↑), et dans la réaction inflammatoire (MAP3K8↑, KRAS↑).

c- Modulation de l'expression génique par les TTMV-LY

Afin de confirmer les résultats obtenus sur puce, la dérégulation potentielle de l'expression des gènes, impliqués dans le cycle cellulaire et l'inflammation, a été évaluée en cinétique, par RT-PCR quantitative. L'expression de ces gènes a ainsi été mesurée à 3h, 6h, 18h, 24h et 48h après infection (Figure 47). Premièrement, concernant l'inflammation, les données obtenues ne montrent pas de régulation dans l'expression du gène KRAS. Les données obtenues par qPCR pour le gène MAPK8 sont contradictoires avec celles obtenues par l'étude du transcriptome et sont donc pas interprétables. Une surexpression est observée pour le gène MAP3K8, dès 3h après infection pour le TTMV-LY3, après 18h pour le TTMV-LY2 et au bout de 48h pour le TTMV-LY1.

Deuxièmement, les résultats obtenus pour les 3 gènes impliqués dans la régulation du

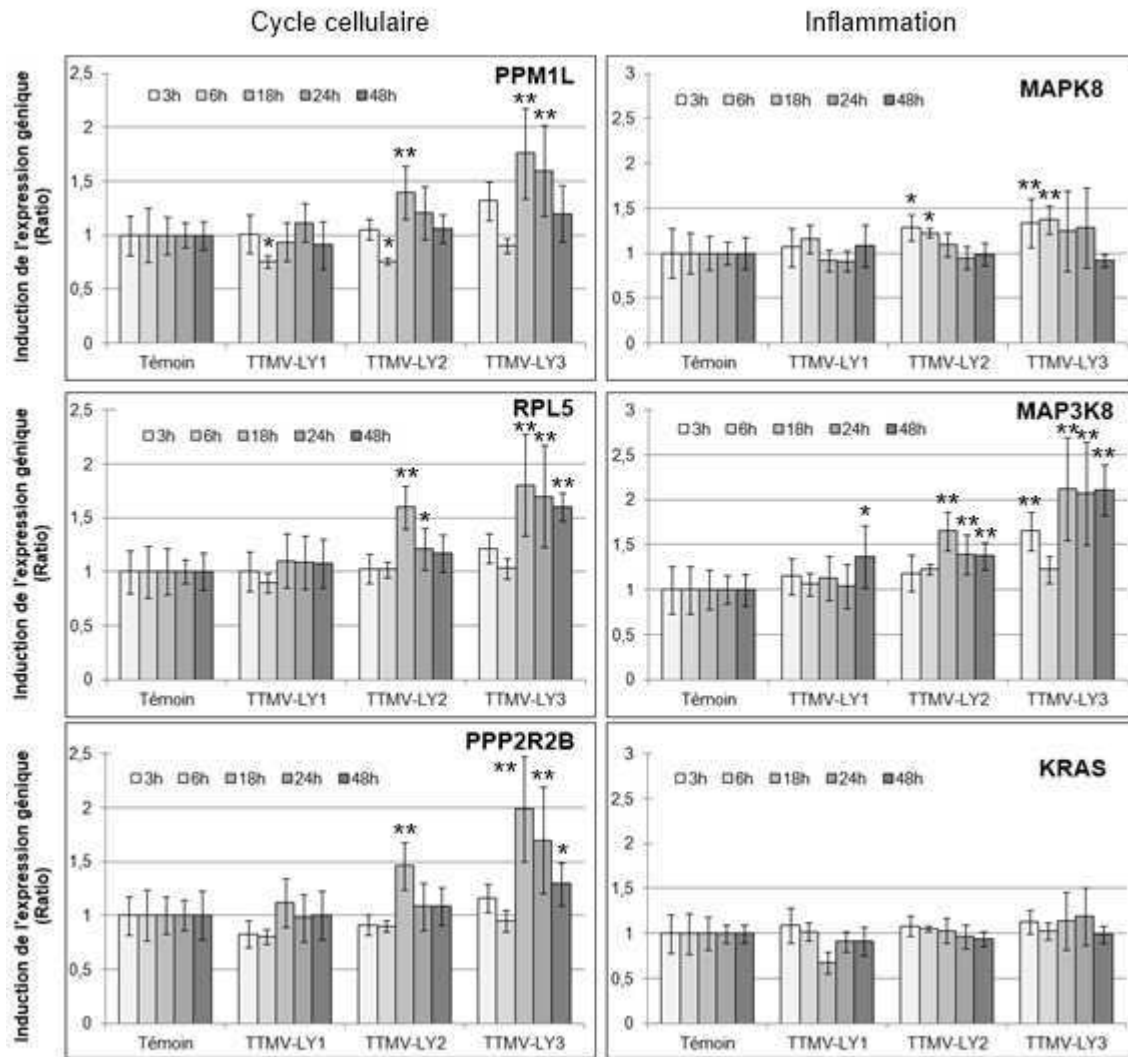


Figure 47 : Modulation de l'expression génique dans les cellules épithéliales alvéolaires, en réponse à l'infection par les TTMV-LY. Les infections ont été réalisées 2 fois en triplicats. * statistiquement différent du témoin avec $p < 0,05$; ** statistiquement différent avec $p < 0,01$ (test de Student).

cycle cellulaire montrent un profil globalement similaire entre les 3 virus avec une augmentation de l'expression génique de 2 et 1,5 fois pour les TTMV-LY3 et -LY2, respectivement, après 18h d'infection et qui se poursuit à 24 et 48h dans une moindre mesure. On notera également la sous-expression de PPM1L pour les TTMV-LY1 et -LY2 après 6h d'infection, comme observée lors de l'étude du transcriptome.

5.4- Discussion

Trois nouvelles espèces de TTMV, les TTMV-LY1, -LY2, et -LY3, ont été identifiées dans les épanchements pleuraux d'enfants hospitalisés à la suite d'une PPE. Leurs génomes complets ont été isolés puis répliqués *in vitro* afin de produire des virions infectieux. Nous avons ainsi montré que ces virus étaient capables d'infecter des cellules épithéliales alvéolaires et de s'y répliquer activement. Les cellules épithéliales font partie intégrante de l'immunité innée et représentent la première ligne de défense en cas d'infection par des agents pathogènes. Ces cellules sont en effet capables de produire différentes molécules antimicrobiennes, mais également des médiateurs solubles permettant de déclencher une inflammation sur le lieu de l'infection (260). La PPE résulte d'une réaction inflammatoire exacerbée au niveau du parenchyme pulmonaire. La présence des génomes complets de TTMV-LY dans des EP suggère que ces virus pourraient être impliqués dans la pathogenèse de la pathologie en participant au déclenchement de l'inflammation. La forte prévalence des *Anelloviridae* dans les populations et la virémie chronique qu'ils engendrent viennent à l'encontre de cette idée et laissent à penser que ces virus développent des mécanismes biologiques efficaces afin d'échapper à une reconnaissance par le système immunitaire. Néanmoins, il est possible que la pathogénicité des AV soit réduite à certains variants, ou résulte d'une interaction hôte-pathogène spécifique, comme c'est le cas pour d'autres familles virales. Dans cette étude, nous avons entrepris d'étudier la réponse des cellules épithéliales alvéolaires suite à l'infection par les TTMV-LY.

Afin d'évaluer la capacité des TTMV-LY à induire une réponse immunitaire innée, nous avons mesuré la production d'un large panel de médiateurs inflammatoires dans les surnageants de cellules A549 infectées. Les résultats obtenus montrent que l'infection par les TTMV-LY induit une réponse immunitaire innée complexe, modulée différemment en fonction de chaque isolat, par comparaison avec les réponses observées pour d'autres virus à l'origine d'une IRA comme le virus INF par exemple (261). Ainsi, l'infection par les TTMV-LY entraîne non seulement la production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IFN γ comme cela avait déjà été décrit pour le TTV (200), mais des niveaux significatifs des cytokines anti-inflammatoires IL-10 ou IL-13 ont aussi été mesurés. Cette ambiguïté confirme que les TTMV -LY pourrait modifier la balance immunitaire, comme il semble que ce soit le cas pour le TTV (262). Le fait que les différents isolats de

TTMV puissent avoir un impact différent sur la production de médiateurs solubles n'est pas surprenant, compte tenu de ce qui est observé avec d'autres infections virales (263, 264), et peut refléter qu'ils soient reconnus par des récepteurs différents et/ou d'agir sur différentes voies moléculaires. L'IL-12 semble jouer un rôle central dans la réponse à l'infection par les TTMV-LY. Cette cytokine, qui augmente la prolifération des LT et la cytotoxicité des LTc et des NK, est considérée comme un facteur clé dans la régulation de la défense de l'hôte contre de nombreux agents pathogènes intracellulaires (265).

L'induction des réponses cellulaires et inflammatoires est modulée par différentes cascades de signalisation, qui vont permettre une régulation fine de l'expression génique dans la cellule infectée, grâce à l'intervention de protéines modulatrices et de facteurs de transcription. Une étude, menée après transfection de l'isolat ViPiSAL du TTV, a ainsi montré que les effets pro-inflammatoires de ce virus résulteraient de l'activation de la voie du TLR-9 (200). Afin de mieux comprendre les effets que peuvent avoir les TTMV-LY sur les cellules pulmonaires, nous avons entrepris d'étudier le transcriptome des cellules A549 après infection. Les cinétiques d'infection ont montré que la réplication des TTMV-LY est maximale dans les cellules à 6h après infection (Cf Figure 45). A la vue des résultats obtenus en cinétique par qPCR, l'expression génique semble cependant plus fortement dérégulée après 18h d'infection, ce qui signifie que d'autres gènes auraient potentiellement pu être identifiés en réalisant notre étude du transcriptome à un temps plus tardif. Afin de mettre en évidence des effets propres aux différents TTMV-LY, ou communs à ces 3 virus, l'expression génique a été comparée, avec des puces à ADN, entre le témoin négatif et chaque virus, ou entre le témoin négatif et les 3 virus. L'analyse de l'expression génique montre ainsi que : i) un faible nombre de gènes sont dérégulés par l'infection par les TTMV-LY et ii) l'expression des gènes dérégulés demeure peu prononcée, comparés à ce que l'on peut observer avec d'autres virus. L'infection par le virus mortel Nipah, par exemple, induit une dérégulation de plus de 500 gènes et avec des variations proches de 20 FC en surexpression et de 50 FC en sous-expression, après 8 heures d'infection, et la mort cellulaire au bout de 24 heures (266). Ceci n'est cependant pas aberrant, étant donné que le virus Nipah induit des pathologies sévères (encéphalites, œdème pulmonaire, ...) et mortelles dans 75% des cas, quand les AV semblent développer des stratégies infectieuses beaucoup moins évidentes. Dans le cas de l'infection par les TTMV-LY, nous nous sommes concentrés sur la dérégulation potentielle de 6 gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (PPM1L, PPP2R2B, RPL5) ou l'inflammation (MAPK8, MAP3K8, KRAS). L'analyse de leur expression par qPCR a confirmé la surexpression du gène de l'inflammation MAP3K8 suite à l'infection par le TTMV-LY3 principalement. Ce gène code pour la protéine sérine/thréonine kinase MAP3K8 ou TPL2. Cette enzyme catalyse l'activation de MAP kinases, impliquées dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire, et induit la production de différentes molécules, parmi lesquelles le facteur de transcription NF- κ B (267). Le facteur NF- κ B joue un rôle central dans la régulation de divers processus

biologiques, y compris les réponses immunitaires, le développement, la croissance et la survie cellulaire. Une étude a précédemment démontré que la sous-unité p105 du NF- κ B pouvait former un complexe avec TPL2, réprimant alors son activité catalytique et les cascades de signalisation qui en découlent (268, 269). La surexpression de MAP3K8 pourrait ainsi aboutir à un blocage de certaines voies MAP kinases (Figure 48). L'implication possible du TTV, et plus précisément de la protéine issue de l'ORF2, dans la modulation des voies modulées par le NF- κ B avait d'ailleurs déjà fait l'objet de travaux (157). Notre étude vient donc en complément montrer que le TTMV serait également capable de réguler la réponse immunitaire en induisant l'expression de certains gènes comme MAP3K8. La Figure 48 synthétise l'hypothèse émise quand à la modulation des TTMV-LY dans les cellules épithéliales alvéolaires. La réponse inflammatoire induite par le TTMV-LY3 semble être inhibée par la surexpression de TPL2 et le blocage de NF- κ B, tandis qu'en réponse à l'infection par le TTMV-LY1, une réponse inflammatoire plus étendue se mettrait en place, en l'absence de rétro-régulation.

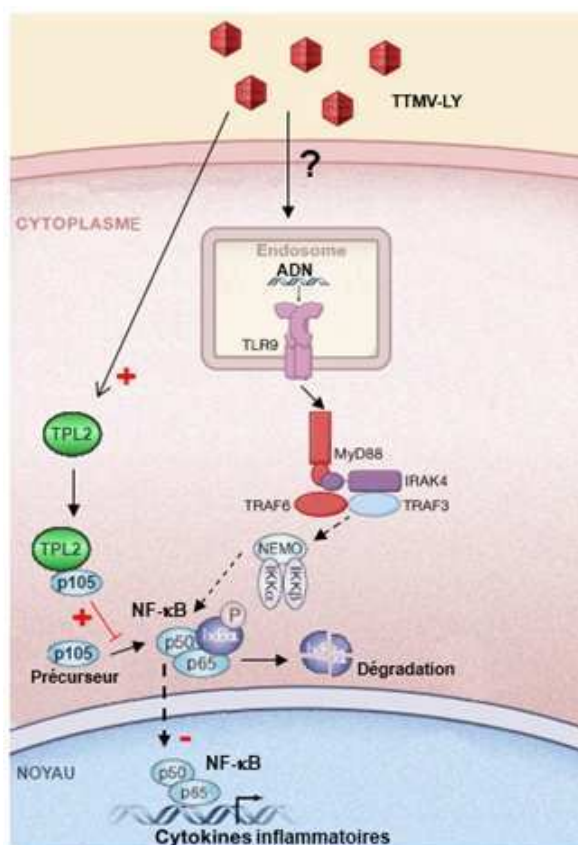


Figure 48 : Effets potentiels d'une surexpression de la protéine TPL2 par les TTMV-LY. La formation d'un complexe entre TPL2 et la sous-unité p105 du NF- κ B pourrait inhiber la cascade de signalisation du NF- κ B et réduire ainsi l'expression de cytokines inflammatoires.

Nous avons par ailleurs pu observer que les TTMV-LY2 et -LY3 induisaient l'expression des gènes PPM1L, PPP2R2B, et RPL5, impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Le gène PPM1L code pour la protéine phosphatase sérine-thréonine du même nom. Cette enzyme appartient à la famille des phosphatases PP2C, et agit comme un régulateur négatif dans la progression du cycle cellulaire, pouvant conduire à son arrêt ou

à l'apoptose des cellules (270, 271). Le gène PPP2R2B code pour la sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 2A (PP2A). PP2A est une enzyme oligomérique essentielle qui joue un rôle fondamental dans les processus cellulaires, comme le métabolisme et le cycle cellulaire. Les sous-unités régulatrices sont primordiales dans la définition des interactions de PP2A (272). Cette protéine est ainsi la cible de différentes protéines virales, qui en dérégulant son expression et en maintenant les cellules hôtes en division, vont détourner les mécanismes cellulaires au profit de la réplication virale (273). Le gène RPL5 code pour la protéine ribosomale L5, dont la surexpression induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, modulée par le facteur de transcription p53 (274). D'après les précédentes études, la réplication des AV nécessite l'utilisation de l'ADN polymérase de la cellule hôte (153). La surexpression de ces 3 gènes suggère que les TTMV-LY pourraient intervenir dans la régulation du cycle cellulaire, de manière à détourner la machinerie cellulaire à leur propre bénéfice, comme synthétisé dans la Figure 49.

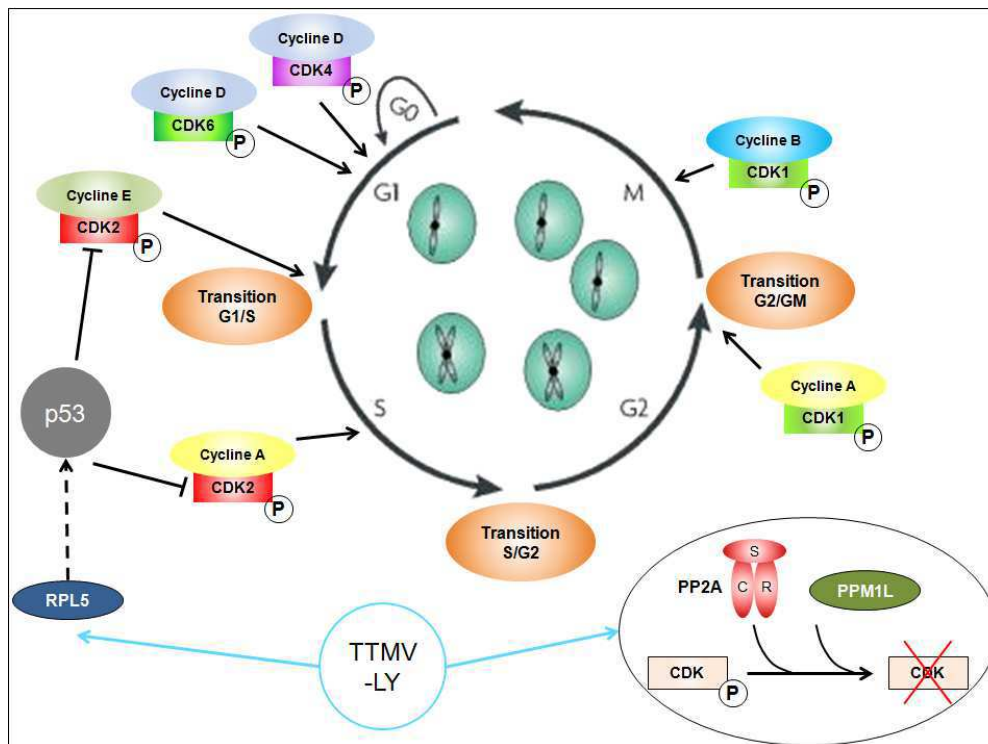


Figure 49 : Régulation du cycle cellulaire et implication possible des TTMV-LY. La progression du cycle cellulaire est régulée par un ensemble de protéines kinases cycline-dépendantes (CDK, *cyclin-dependent kinase*). Les phosphatases PPM1L et PP2A catalysent la déphosphorylation des CDK, ce qui les inactive et inhibe la progression du cycle cellulaire. La protéine RPL5 interagit avec le facteur de transcription p53, lequel pourrait ainsi inhiber la transition G1/S du cycle cellulaire.

L'ensemble de ces résultats montrent que les isolats de TTMV-LY sont capables de moduler les mécanismes biologiques et immunitaires des cellules qu'ils infectent, mais de manière différente. Ce constat serait en faveur de l'hypothèse d'une pathogénicité variable des différents variants d'AV et de la multitude de réponses différentes qu'ils engendrent. Il serait ainsi intéressant de comparer les effets, que nous avons observés pour les TTMV-LY, avec ceux induits par d'autres génomes d'AV. L'identification de

gènes ou de molécules exprimées fréquemment en réponse à l'infection permettrait alors de définir des voies de signalisation cellulaires spécifiques d'une l'infection aux AV.

5.5-Publication en préparation

Regulation of gene expression by torque teno mini viruses in type II pneumocytes.

Johanna Galmès*, Milen Milenkov*, Séverine Croze[#], Nicolas Nazaret[#], Jean-Noël Telles*, Catherine Legras-Lachue[#], Gláucia Paranhos-Baccalà*.

Affiliations:

*Laboratoire des Pathogènes Emergents, Fondation Mérieux, Lyon, France

[#]ProfileExpert, Lyon, France

Corresponding author:

Gláucia Paranhos-Baccalà

Fondation Mérieux - Emerging Pathogens Laboratory

21 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon - France.

Phone: +33 4 37 28 24 13; Fax: +33 4 37 28 24 11; e-mail: glaucia.baccala@fondation-merieux.org

Abstract:

Three new species of Torque Teno Mini Virus (TTMV), named TTMV-LY were recently isolated from parapneumonic effusions of children suffering from severe pneumonia and defined as new potential etiologic agents in this pathology. Infection of alveolar epithelial cells with TTMV-LY was shown to provoke innate immune imbalance, with a differential production of inflammatory mediators for each viral isolate.

To better understand virus-host interactions, we analyzed the transcriptome profile of TTMV-LY infection in alveolar epithelial cells, with the use of DNA chip. We further validated some of the obtained results by qPCR.

We found that TTMV-LY infection induces weak deregulations in gene expression. However, a few genes involved in different pathways, specifically in the inhibition of inflammation (MAP3K8) and in cell cycle regulation (PPM1L, PPP2R2B, and RPL5), were significantly over expressed during infection by TTMV-LY. Interestingly, the observed upregulation of these genes was restricted to TTMV-LY2 and -LY3, that could deflect cellular pathways in favour of their own benefit, as viral replication.

This study sheds new light on TTMV pathogenesis, indicating the role of gene expression modulation during the course of infection. Specific and targeted gene deregulation by different isolates of TTMV in cells supports the previously advanced hypothesis that some variants of *Anelloviridae* could be more pathogenic than others, leading to viremic healthy people or patients suffering from diseases.

Chapitre 6

ETUDE DE LA REPONSE DES APC A L'INFECTION PAR LES TTMV-LY

6.1	CONTEXTE ET OBJECTIF	144
6.2	METHODES	144
	6.2.1- <i>Préparation des DCi et des macrophages</i>	144
	a- <i>Purification des monocytes à partir de sang périphérique humain</i> -	144
	b- <i>Différenciation des monocytes en DCi et des macrophages</i> -	145
	6.2.2- <i>Infection des DCi et des macrophages</i>	145
	a- <i>Protocole d'infection</i> -	145
	b- <i>Analyse phénotypique des DC</i> -	145
	c- <i>Viabilité cellulaire</i> -	146
	6.2.3- <i>Quantification des médiateurs inflammatoires</i>	146
6.3	RESULTATS	146
	6.3.1- <i>Expression des molécules du CMH et de co-stimulation par les DC</i>	146
	6.3.2- <i>Production de médiateurs de l'inflammation par les DC et les macrophages</i>	147
6.4	DISCUSSION	149
6.5	PUBLICATION EN PREPARATION	153

6.1- Contexte et objectif

La défense des voies respiratoires est assurée en premier lieu par les cellules épithéliales qui les composent, mais elle fait autant intervenir d'autres cellules de l'immunité innée, et en particulier les APC. Les macrophages alvéolaires représentent ainsi plus de 90% des cellules intra-alvéolaires chez le sujet sain, et ils sont à l'origine des plusieurs réponses anti-infectieuses grâce à leurs capacités de phagocytose et de synthèse de signaux activateurs de l'immunité innée et adaptative. Les macrophages jouent également un rôle primordial dans la résolution de l'inflammation, en assurant l'élimination des PNN apoptotiques (15). Il est alors aisément compréhensible que les macrophages participent activement au processus inflammatoire à l'origine de la pneumonie. En complément, il a également été démontré que les DC étaient impliquées dans la pathogenèse des pneumonies sévères chez l'enfant, en induisant une production excessive de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF α , IL-6) (275).

Dans la continuité de notre étude sur le potentiel infectieux des nouveaux génomes de TTMV, et sur l'implication possible de ces virus dans la pathogenèse de la PPE, nous nous sommes intéressés au comportement des DC et des macrophages face aux TTMV-LY.

6.2- Méthodes

6.2.1- Préparation des DCi et des macrophages

a- Purification des monocytes à partir de sang périphérique humain

Les monocytes humains sont purifiés à partir d'une poche de sang total (400 à 450ml), prélevée chez un donneur de sang, dans un centre de l'Etablissement Français du Sang (Lyon). A réception, les composants sanguins sont séparés par gradient de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, France). Les anneaux cellulaires contenant les PBMC sont récupérés. Les PBMC sont alors lavées, reprises à une concentration de 25-30.10⁶ cellules/mL en milieu RPMI complet, constitué de RPMI 1640 sans glutamine (Gibco), de 5 ml d'HEPES 1M, de 5 ml de glutamine 100X, de 400 μ l de Gentamycine à 10 mg/ml et de 10 % de SVF décomplementé (Biowest), et déposées sur une solution de Percoll 45% (Percoll 45% ; PBS 1X 50% ; PBS 10X 5%), permettant la séparation des monocytes des lymphocytes. Le SVF a été testé au préalable et n'induit pas la maturation des DCi. Après centrifugation, les anneaux cellulaires contenant les monocytes sont récoltés, lavés et mis en saturation en milieu RPMI 3% de sérum humain. Afin d'éviter une possible contamination par d'autres cellules, une déplétion des LT (anticorps anti-CD3), des LB (anticorps anti-CD19 et anti-CD20), des NK (anticorps anti-CD56) et des

globules rouges (Ac anti- glycophorine A) est réalisée, à l'aide de billes magnétiques de Dynal (Life Technologies, France). Les différents anticorps (Beckman Coulter, Etats-Unis) sont ajoutés à la préparation cellulaire et incubés 30 min à 4°C. Les monocytes sont ensuite lavés en milieu RPMIc et les billes magnétiques sont ajoutées. Les billes, recouvertes d'anticorps dirigés contre le fragment Fc des anticorps, vont permettre d'immobiliser les cellules contaminantes. Afin de vérifier la pureté des monocytes, les cellules sont incubées avec les anticorps spécifiques de chaque type cellulaire, couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou à la phycoérythrine (PE) : monocytes : CD14-FITC, LT : CD3-PE, LB : CD20-FITC, NK : CD56-PE, globules rouges : glycophorine A-FITC. Un contrôle isotypique est également réalisé en utilisant des anticorps non-spécifiques IgG FITC/PE. Après le marquage, les cellules sont lavées puis analysées par cytométrie de flux (Accuri C6, BD Biosciences).

b- Différenciation des monocytes en DCi et des macrophages

La préparation de monocytes purs (< 5% de cellules contaminantes) est mise en culture avec différents facteurs de différenciation. Afin de produire des DCi, les monocytes sont mis en culture à 1.10^6 cellules/ml en présence de GM-CSF à 50 ng/ml et d'IL-4 à 62,5 ng/ml durant 5 jours à 37°C, 5% de CO₂ en plaque de 24 puits. Pour produire des macrophages, les monocytes sontensemencés de la même manière, mais en présence de M-CSF à 50 ng/ml.

6.2.2-Infection des DCi et des macrophages

a- Protocole d'infection

Les DCi et les macrophages ont été infectés durant 24h à 37°C, 50% CO₂, avec 1.10^6 EG/ml des TTMV-LY. Un témoin négatif et un témoin positif sont systématiquement ajoutés. Le témoin négatif correspond aux les cellules mises en présence de surnageant de cellules A549 ne contenant pas de virus. Le témoin positif correspond aux cellules exposées à 10 ng/ml de LPS. L'absence de TTMV dans les monocytes en différenciation a été vérifiée, après extraction des acides nucléiques, à l'aide de la qPCR ciblant les *Betatorquevirus* (Tableau 1, p116). Les surnageants sont récoltés, centrifugés, aliquotés et congelés à -70°C jusqu'à leur utilisation. Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS et l'analyse phénotypique est immédiatement réalisée. Les expériences ont été effectuées en triplicats sur des poches de sang provenant de donneurs différents.

b- Analyse phénotypique des DC

Les DC sont aliquotées et marquées par différents anticorps couplés au FITC ou à la PE, dirigés contre les molécules d'expression du CMH, ou de co-stimulation : CD80-FITC, CD86-PE, HLA-DR-FITC, CD83-PE, CD54-FITC, CD40-PE. Après des lavages

en tampon "Stain" (BD Pharmingen, France), les DC sont analysées par cytométrie en flux (MACSquant, Miltenyi Biotech, France), à l'aide du logiciel FlowJo (Etats-Unis).

c- Viabilité cellulaire

La viabilité des DC et des macrophages a été évaluée à chaque expérience, afin de s'assurer de la reproductibilité des conditions. Dans ce but, nous avons utilisé le kit FITC Annexin V Apoptosis Detection (BD Pharmingen, France), permettant de quantifier les cellules en nécrose, en apoptose ou en nécrose post-apoptotique

6.2.3-Quantification des médiateurs inflammatoires

La quantification simultanée des médiateurs inflammatoires suivants a été réalisée à l'aide du kit Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex (Biorad, France), selon les recommandations du fournisseur : IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, FGF, éotaxine, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , et VEGF. La lecture des billes magnétiques a été effectuée sur le FlexMap3D (Luminex Corp, Etats-Unis).

6.3- Résultats

L'activation des DC et des macrophages a été évaluée par 2 approches. D'abord, nous avons évalué l'expression du CMH et des molécules de co-stimulation à la surface des cellules dendritiques, et ensuite, nous avons mesuré la sécrétion des molécules inflammatoires dans les macrophages et les DC, en réponse à l'infection par les TTMV-LY.

6.3.1-Expression du CMH II et des molécules de co-stimulation par les DC

Les DC immatures (DCi) ont d'abord été mises en contact durant 24h avec 1.10^6 génomes équivalents des TTMV-LY1, LY2 et LY3 et leur phénotype a été observé par cytométrie de flux, après un immuno-marquage. Les résultats obtenus n'ont montré aucune expression des molécules du CMH-II (HLA-DR), ni des molécules de co-stimulation (CD86, CD80, CD83, CD54 et CD40) (Figure 50a). Dans un second temps, la même expérience a été réalisée, mais en ajoutant $1\mu\text{g}$ d'ADN viral db linéarisé afin de mimer une infection massive (Figure 50b). L'ajout de l'ADN viral db entraîne ainsi l'expression, seulement par les TTMV-LY1 et -LY2, du CD86 et du CD54, ainsi que du CD80 et du CD83 dans une moindre mesure. En complément, des tests de viabilité cellulaire ont été effectués et ne mettent pas en évidence une mortalité accrue des DCi lors de l'infection par les TTMV-LY.

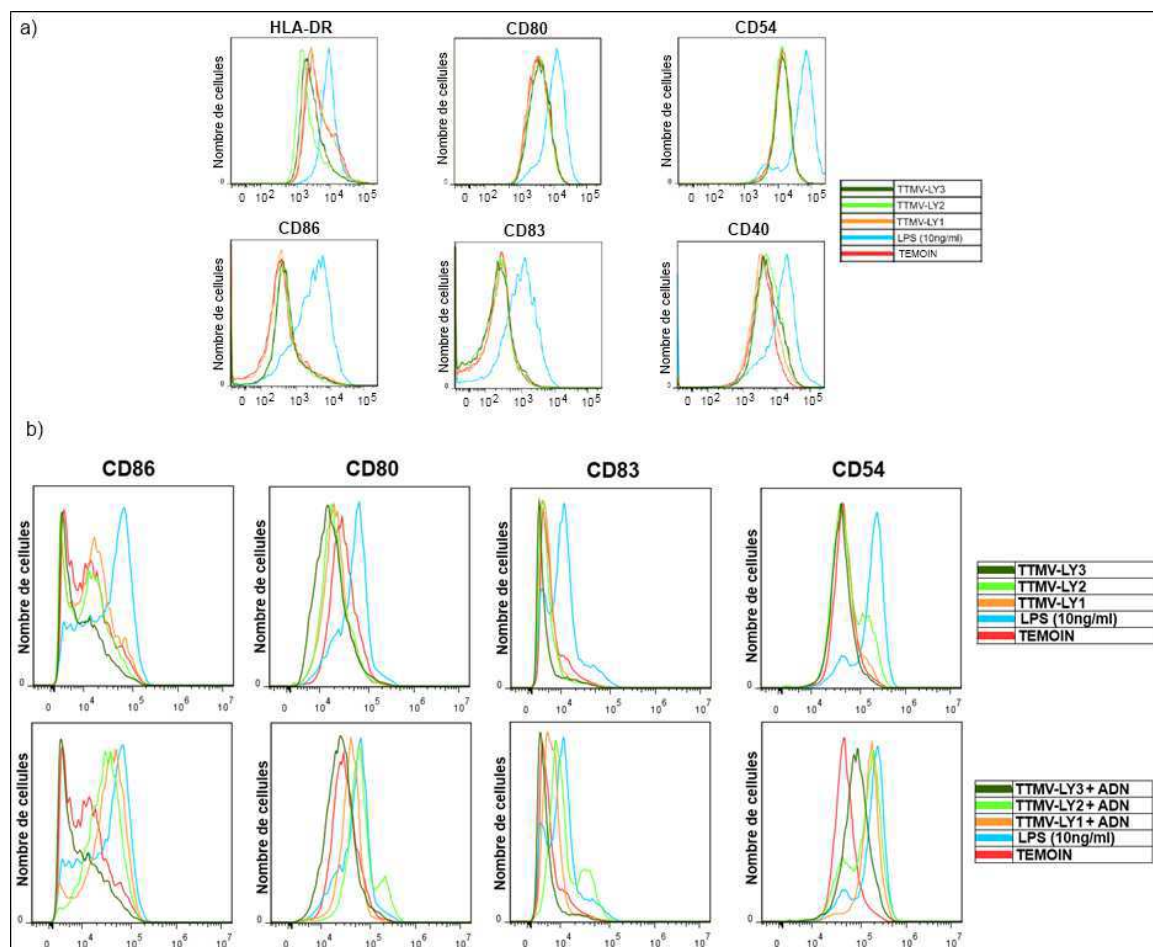


Figure 50 : Expression des molécules du CMH et de co-stimulation par les DC, en réponse aux TTMV-LY. a) mise en contact des DC avec les particules virales. b) mise en contact des DC avec les particules virales et $1\mu\text{g}$ d'ADN viral db.

6.3.2- Production de médiateurs de l'inflammation par les DC et les macrophages

Comme dans le cas des cellules épithéliales, nous avons utilisé un essai immuno-enzymatique multiplexe, afin de mesurer simultanément la production de 29 médiateurs inflammatoires. Les surnageants des macrophages et des DC, mis en contact 24h avec les particules virales, ont été récoltés puis analysés. Nous pouvons voir qu'en réponse aux 3 TTMV-LY, les DC produisent des cytokines pro-inflammatoires : IL-6 (60 pg/ml en moyenne) et IL-8 (300 pg/ml en moyenne) majoritairement. Le TTMV-LY1 induit également la sécrétion d'IL-17 (20 pg/ml) et le TTMV-LY2 de TNF α (20 pg/ml) (Figure 51a). Face aux 3 TTMV-LY, les macrophages induisent la sécrétion d'IL-5 (1pg/ml en moyenne) mais inhibent celle de la chimiokine MCP-1 d'environ 20%. On observe une faible production de G-CSF (6 pg/ml) en réponse au TTMV-LY1, et l'inhibition d'IL-10 et d'IL-1 β pour les TTMV-LY3, et -LY2, respectivement (Figure 51b). Les résultats obtenus pour l'ensemble des autres médiateurs testés ne montrent aucun effet (données non présentées). Comme précédemment, une expérience préliminaire d'infection massive

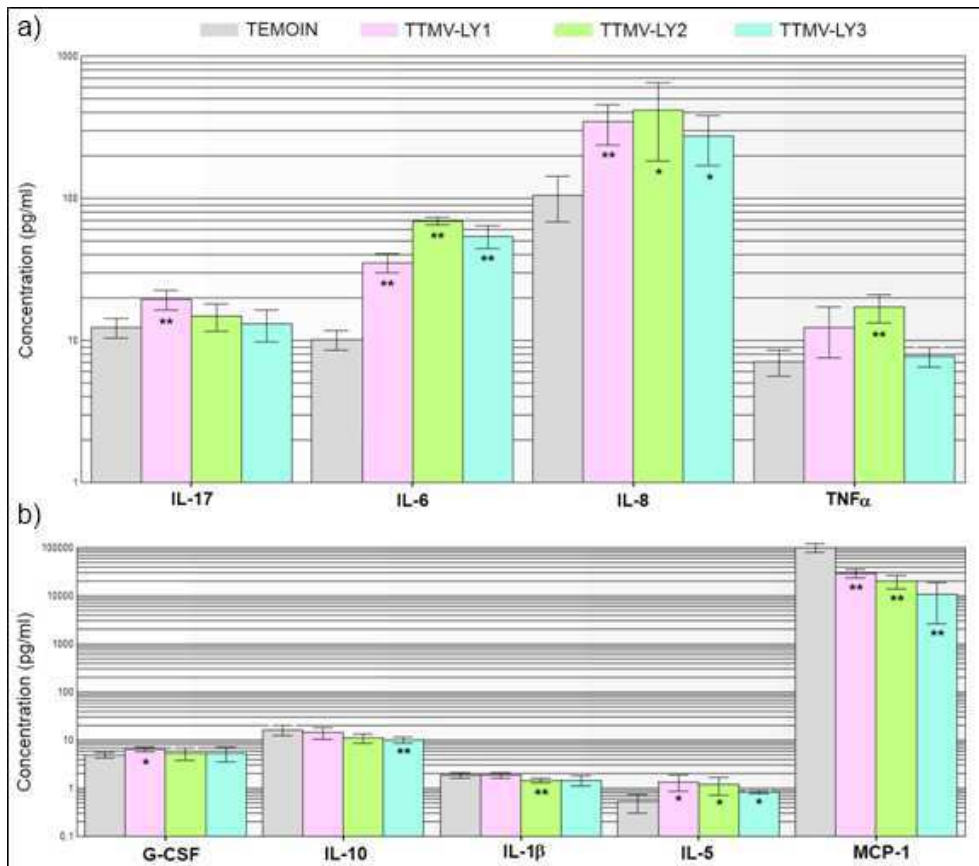


Figure 51 : Sécrétion de médiateurs inflammatoires par les DC (a) et les macrophages (b) * statistiquement différent du témoin avec $p < 0,05$; ** statistiquement différent avec $p < 0,01$ (test de Student).

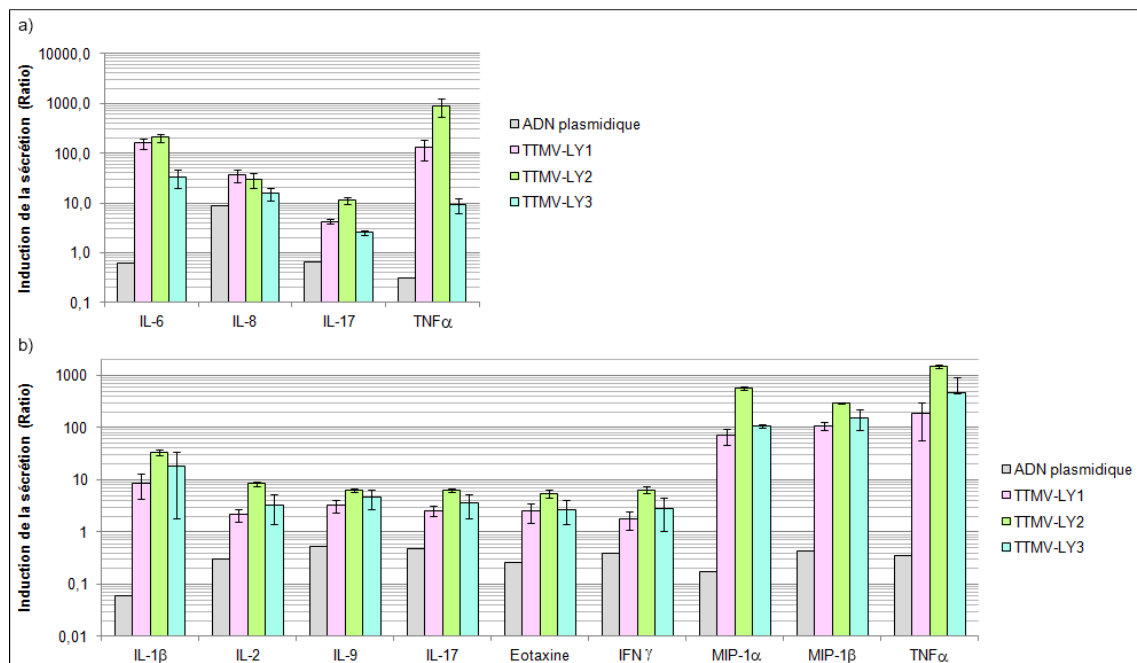


Figure 52 : Effet d'une infection massive par les TTMV-LY sur la sécrétion de médiateurs inflammatoires par les DC (a) et les macrophages (b). Expérience préliminaire réalisée en duplicats. Pour b), seules les cytokines avec un ratio supérieur à 2 ont été représentées.

a été menée, en ajoutant sur les cellules 1 μ g d'ADN viral db linéarisé ou 1 μ g d'ADN plasmidique linéarisé (condition témoin). Dans ces conditions, l'expression par les DC des mêmes cytokines pro-inflammatoires est fortement augmentée et spécifique des ADN viraux (Figure 52). Les sécrétions d'IL-6, d'IL-8, d'IL-17 et de TNF α augmentent en moyenne de 100, 30, 5 et 80 fois, respectivement. Les macrophages, qui semblaient peu activés dans les conditions d'infection simple, produisent, dans ce cas, un large panel de médiateurs inflammatoires. Les sécrétions les plus significatives, avec une induction de l'ordre de 100 fois, concernent MIP-1 α , MIP-1 β et le TNF α .

6.4- Discussion

La PPE résulte d'une inflammation exacerbée du parenchyme pulmonaire, caractérisée par la formation d'un exsudat riche en protéines entre les 2 feuillets de la plèvre (EP), suite à l'infiltration d'une grande variété de cellules immunes (PNN, PNE, macrophages, lymphocytes, ...). Le processus inflammatoire fait intervenir différentes cellules du système immunitaire, particulièrement les APC qui jouent un rôle majeur dans sa régulation, grâce à la production de médiateurs inflammatoires. Trois nouvelles espèces de TTMV ont été isolées dans des EP, suggérant une implication possible de ces virus dans la pathogenèse de la PPE. Après avoir étudié la réponse des cellules de l'épithélium alvéolaire à l'infection par les TTMV-LY, nous avons entrepris d'évaluer l'effet de ces virus sur des APC, les DC et les macrophages. Nous avons ainsi mis en évidence que les TTMV-LY seraient capables d'induire des réponses inflammatoires localisées, tout en limitant le déclenchement d'une réponse adaptative généralisée.

Les DC sont les chefs d'orchestre de l'immunité grâce à leur capacité de migration, leur permettant d'exercer une surveillance continue et accrue des antigènes présents dans tous les tissus de l'organisme, et de donner ainsi le signal d'alarme aux lymphocytes présents dans les organes lymphoïdes secondaires. Les DC sont présentes dans l'organisme sous deux états : immature et mature. Les DC immatures migrent de la moelle osseuse par le flux sanguin vers les tissus non lymphoïdes où elles résident et y jouent le rôle de sentinelles en capturant les antigènes. Dans ce cas, elles subissent un processus de maturation caractérisé par : i) un changement de morphologie dû à la réorganisation du cytosquelette et permettant une interaction accrue avec les LT, ii) une perte de la capacité à phagocyter, iii) un changement phénotypique, dû à l'augmentation de l'expression du CMH et des molécules de co-stimulation telles que le le CD86, les CD80 et 83, le CD54 ou le CD40, iv) la sécrétion de cytokines inflammatoires, et v) l'acquisition de capacités migratoires, suite à la modification de l'expression en surface de récepteurs aux chimiokines. Afin d'évaluer la capacité des DC à reconnaître les TTMV-LY comme pathogènes, nous avons ainsi examiné leur degré de maturité. Nous avons pu observer que la mise en présence des TTMV-LY avec les DC n'induisait pas de

modifications phénotypiques de celles-ci. Ceci laisse à supposer que les DC ne reconnaissent pas de motifs PAMP associés à ces pathogènes, susceptibles d'induire leur endocytose et le déclenchement de la réponse immunitaire, ou que les AV sont capables d'inhiber la maturation des DC et donc l'expression des molécules du CMH II et de co-stimulation des LT. Ces stratégies d'échappement au système immunitaire ont déjà été rapportées pour de nombreux virus, notamment ceux induisant des virémies chroniques. Les herpèsvirus, par exemple, sont ainsi capables d'inhiber l'expression des molécules du CMH-I ou du CMH-II (CMV), ainsi que la présentation des antigènes (HSV), empêchant ainsi le déclenchement des réponses immunes adaptatives (276). Néanmoins, lors de l'infection par les TTMV-LY, bien que le phénotype des DC reste inchangé, une production significative de cytokines, notamment d'IL-6 et d'IL-8, est observée. L'IL-6 est impliquée dans la phase aiguë de l'inflammation. Principalement produite par les macrophages et les LT, elle stimule la production de protéines de la phase aiguë comme la CRP au niveau du foie, et de PNN dans la moelle osseuse. Elle oriente la réponse immune vers un profil Th2 (277). L'IL-8 est la cytokine chimioattractante la plus puissante pour les PNN, elle possède ainsi de puissantes propriétés pro-inflammatoires. Le TTMV-LY2 induit également la production de TNF- α , dont les propriétés pro-inflammatoires agissent en synergie avec l'IL-8. De manière surprenante, une production d'IL-17 est observée pour le TTMV-LY1. Bien que plusieurs cellules de l'immunité innée aient été décrites pour sécréter cette cytokine pro-inflammatoire, les DC n'en font a priori pas partie (278). Lors de la purification des monocytes, 5% de cellules contaminantes sont tolérées, on peut donc supposer que l'IL-17 ait été produite par un autre type cellulaire. Ces différents résultats, obtenus après infection par les TTMV-LY et confirmés par une expérience préliminaire simulant une infection massive par ces virus, sont en faveur de l'induction d'une réponse pro-inflammatoire dont l'amplitude dépendrait de la quantité de virus présente (Figure 53).

De plus, les DC orienterait la réponse immune vers un profil Th2, ce qui serait en

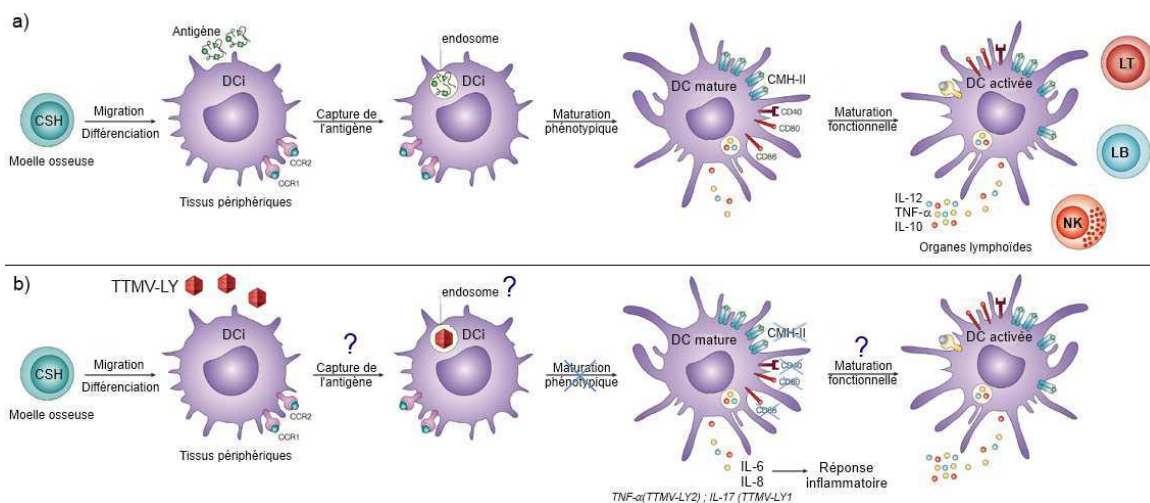


Figure 53 : Processus de maturation des DC en conditions physiologiques (a) ou suite à l'infection par les TTMV-LY (b). CSH : cellules souches hématopoïétiques. Adapté de (279).

accord avec les observations de Maggi *et al.*, qui ont rapporté que de fortes charges virales en TTV dans les sécrétions nasales d'enfants atteints d'IRA étaient corrélées avec le pourcentage des LB, mais inversement proportionnel à celui des LT (262).

Les macrophages, en tant que cellules phagocytaires résiduelles, jouent également un rôle majeur dans les défenses immunitaires contre les pathogènes. Après élimination de l'agent pathogène, ils sont responsables de l'élimination des polynucléaires neutrophiles apoptotiques, des cellules mortes et des débris cellulaires, favorisant ainsi la résolution des processus inflammatoires et le retour à l'homéostasie. De plus, les macrophages sécrètent des quantités importantes de cytokines (environ 10 à 100 fois plus que les PNN), et sont ainsi très impliqués dans l'amplification des réponses immunitaires. Nous nous sommes donc intéressés à la réponse inflammatoire des macrophages, mis en présence des TTMV-LY. Une production faible mais significative d'IL-5 a été observée pour les 3 virus. Cette cytokine régule la croissance et la différenciation des PNE. Les PNE possèdent de puissantes propriétés antimicrobiennes, si bien qu'un afflux trop important de PNE sur un site d'infection induit fréquemment des dommages tissulaires (280). La production d'IL-5 pourrait être à l'origine d'un recrutement accru des PNE, suggéré par des auteurs en raison d'une forte corrélation entre la concentration en ECP dans le sang chez des enfants souffrant d'IRA et la charge virale en TTV. Néanmoins, ces mêmes auteurs n'avaient pas observé d'augmentation de la concentration en IL-5 circulante chez ces mêmes patients (202). En complément, la chimiokine MCP-1 est fortement induite par l'infection par les TTMV-LY. MCP-1 amplifie la réponse inflammatoire en recrutant activement les monocytes, les LT mémoires et les cellules dendritiques sur le lieu de l'inflammation, *via* un gradient de concentration. La sécrétion de ces 2 médiateurs par les macrophages vient confirmer la réponse pro-inflammatoire observée au niveau des DC. L'infection TTMV-LY1 et TTMV-LY2 induit de plus, une production de G-CSF et d'IL-1 β , tous deux s'accordant également cette théorie. L'infection par le TTMV-LY3 induit une sécrétion plus faible de cytokines pro-inflammatoires et celle de la cytokine anti-inflammatoire IL-13, ce qui supposerait une induction plus faible du processus inflammatoire. La simulation d'une infection massive par les TTMV-LY, via l'ajout d'ADN viral db induit une amplification de la réponse inflammatoire des macrophages avec un large panel de cytokines exprimées, majoritairement pro-inflammatoires et des concentrations plus élevées, amenant à penser que l'amplitude de la réponse immune est dépendante de la quantité de virus présente. L'équipe de Maggi avait d'ailleurs, à ce propos, déjà rapporté que de fortes charges virales dans des sécrétions nasales étaient associées à des formes sévères d'IRA (166).

L'ADN du TTMV-LY2 semble être plus immunogène que les 2 autres génomes, à la vue des quantités de cytokines induites dans les DC et les macrophages. Rocchi *et al.*, qui ont décrit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par des cellules épithéliales de foie murin, ont suggéré que la composition en motifs CpG stimulateurs et inhibiteurs, définie

comme l'index CpG, pourrait moduler l'immunogénicité des génomes d'AV (200). Le génome du TTMV-LY2, présentant une insertion significative en 5'-UTR, pourrait ainsi présenter un index CpG plus immunogène, mais des investigations plus poussées seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

En conclusion, cette étude décrit pour la première fois la mise en place d'une réaction immune pro-inflammatoire par les APC, en réponse à l'infection par des AV. L'absence de maturation des DC à 24h pourrait signifier que les TTMV-LY sont capables d'inhiber l'expression des molécules du CMH-II et de co-stimulation, afin de retarder le déclenchement de la réaction immune adaptative. Le profil de cytokines produites serait alors en faveur d'une réponse humorale. Il semble de plus que les différents isolats de TTMV-LY soient capables d'induire une réponse inflammatoire spécifique, qui pourrait contribuer à la compréhension des phénomènes d'évasion au système immunitaire dont font preuve les AV.

6.5-Publication en préparation

Inflammatory profiles of torque teno mini virus-infected antigen-presenting cells.

Johanna Galmès*, Jonathan Hoffmann*, Sandra Dollet*, Jean-Noël Telles*, Gláucia Paranhos-Baccalà*.

Affiliations:

*Laboratoire des Pathogènes Emergents, Fondation Mérieux, Lyon, France

Corresponding author:

Gláucia Paranhos-Baccalà

Fondation Mérieux - Emerging Pathogens Laboratory

21 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon - France.

Phone: +33 4 37 28 24 13; Fax: +33 4 37 28 24 11; e-mail: glaucia.baccala@fondation-merieux.org

Abstract:

Active infection with *Anelloviridae* has been associated with an increased severity of diseases in which inflammation plays a particularly important pathogenetic role. We recently isolated 3 new species of Torque Teno Mini Virus (TTMV) in parapneumonic effusions (PE) of children suffering from severe pneumonia, an infectious inflammation of the lung parenchyma. These viruses, named TTMV-LY were the only pathogens found in these PE, but their implication in the pathogenesis of the disease remains unclear. In this study, we investigated the inflammatory profiles of antigen-presenting cells, in response to the TTMV-LY infection.

The production of 27 inflammatory mediators was measured by multiplex immunoassay, 24h after infection of monocyte-derived dendritic cells (moDC) and macrophages by the 3 TTMV-LY.

We first shown that TTMV-LY viruses globally induce similar pro-inflammatory responses by APC, characterized by the production of IL-6 and IL-8 in moDC, and of MCP-1 and IL-5 in macrophages. Phenotypic maturation of DC was however not observed. Moreover, the 3 TTMV-LY isolates induced different cytokines expression patterns, suggesting the existence of viral mechanisms to evade or delay immune adaptive responses.

These findings demonstrate for the first time that some anelloviruses have the potential to stimulate inflammatory responses from APC.

Partie C

Conclusions

C

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

7.1	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	158
	<i>7.1.1- Les TTMV-LY, des nouveaux Betatorquevirus</i>	<i>158</i>
	<i>7.1.2- Les TTMV-LY, des virus à l'origine d'infections respiratoires ?</i>	<i>159</i>
	<i>7.1.3- Les TTMV-LY et la régulation du cycle cellulaire</i>	<i>160</i>
	<i>7.1.4- Les TTMV-LY et l'inflammation</i>	<i>161</i>
7.2	CONCLUSIONS	164

7.1-Discussion générale et perspectives

L'essor des techniques de biologie moléculaire et de la virologie classique a permis lors de ces dernières décennies de découvrir de nombreux virus, et notamment des virus associés à l'appareil respiratoire. Ces virus sont à l'origine d'insuffisances respiratoires sévères chez les enfants et les adultes immunodéprimés, et représentent un important problème de santé publique. Les IRA, et plus particulièrement la pneumonie, sont ainsi la 1^{ère} cause de mortalité de l'enfant de moins de 5 ans dans le monde (2). La lutte contre ces maladies, qui a été placée parmi les objectifs du millénaire pour le développement, nécessite de connaître précisément leurs agents étiologiques afin d'adapter au mieux la prise en charge des patients (43). Cependant, malgré l'identification d'un nombre croissant de pathogènes impliqués dans les cas de pneumonies, un pourcentage important d'entre elles demeure sans étiologie ou sont mal diagnostiquées. Les raisons sont diverses : le pathogène peut être connu mais non inclus dans le test de détection utilisé ; il peut également s'agir de nouveaux variants de pathogènes connus ; ou encore de pathogènes impliqués dans d'autres pathologies ou totalement inconnus. Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre de l'identification et de la caractérisation de nouveaux agents infectieux, chez des patients atteints de pathologies respiratoires sévères, qui pourraient devenir une menace pour la santé publique.

7.1.1-Les TTMV-LY, des nouveaux *Betatorquevirus*

En 2009, l'utilisation d'un protocole de découverte de nouveaux pathogènes sur des échantillons respiratoires, provenant d'enfants atteints de pneumonie sévères et pour lesquels aucun agent étiologique n'avait pu être identifié, nous a conduits à la découverte de nouveaux génomes appartenant à la famille des *Anelloviridae* dans 3 EP. Un protocole de RT-PCR aléatoire a été utilisé dans cette étude. Par cette méthode, une étape de clonage des fragments est indispensable afin d'identifier les potentielles nouvelles séquences présentes dans l'échantillon. Plusieurs clones de TTMV ont été mis en évidence dans ces EP, suggérant une présence significative de ces virus dans les échantillons respiratoires. Cela a été confirmé par l'amplification du génome complet de ces virus dans les échantillons. Leur analyse phylogénétique nous a alors permis de les identifier comme de nouvelles espèces du genre *Betatorquevirus*, nommées TTMV-LY. Les AV sont caractérisés par une haute diversité génétique, si bien que l'isolement de nouvelles espèces est fréquemment décrite. Néanmoins, cette étude démontre pour la 1^{ère} fois la présence d'AV dans des EP, témoignant d'une invasion et d'une colonisation profonde des voies respiratoires. L'implication des AV dans la santé de l'hôte est un sujet soumis à controverse, en raison principalement de leur extrême ubiquité. Ces virus induisent en effet des virémies chroniques, et sont retrouvés dans de multiples

compartiments biologiques, aussi bien chez des personnes saines que chez des patients atteints de différentes pathologies. Bien que l'implication potentielle des AV dans la sclérose en plaques ou certaines affections des voies aériennes ait été étayée par plusieurs travaux, la question de la pathogénicité des AV s'est posée à différentes reprises durant la dernière décennie (281). Dans le cadre de ce travail, nous avons fondé notre hypothèse sur le fait qu'à l'instar d'autres virus ubiquitaires, comme les papillomavirus, le caractère potentiellement pathogène des AV pourrait être restreint à quelques variants ou groupes viraux (257). En effet, les 3 espèces de TTMV-LY semblent appartenir à un même groupe phylogénétique majeur. Nous avons donc entrepris d'étudier plus précisément la caractérisation de ces nouveaux génomes de TTMV-LY, et leur implication dans la pathogénèse de la pneumonie.

7.1.2- Les TTMV-LY, des virus à l'origine d'infections respiratoires ?

Plusieurs travaux, basés sur des études cliniques, ont suggéré que le tractus respiratoire pourrait être une cible d'infection privilégiée des AV chez le jeune enfant et un lieu de réplication continue de ceux-ci (166). Afin d'évaluer les capacités infectieuses des TTMV-LY, leur réplication a été mesurée *in vitro* après transfection des génomes complets dans 2 types de lignées cellulaires : une lignée de référence, connue pour supporter la réplication virale, et une lignée de cellules épithéliales alvéolaires. Cette étude a montré que les TTMV-LY étaient effectivement capables de se répliquer et de produire des particules infectieuses, mais également qu'ils présentaient un tropisme privilégié pour les cellules épithéliales alvéolaires. Nous avons, de plus, retrouvé les mêmes séquences de TTMV dans les PNP et les EP, témoignant de l'invasion profonde des voies respiratoires par les TTMV-LY. Notre étude vient ainsi appuyer *in vitro* l'hypothèse que l'épithélium respiratoire représente un lieu de réplication active des AV. Il est probable qu'en complément des cellules épithéliales alvéolaires de type II évaluées dans cette étude, d'autres types cellulaires appartenant à l'épithélium respiratoire soient également des cellules cibles de ces virus. Nous avons ainsi envisagé d'évaluer la réplication des TTMV-LY dans la lignée cellulaire 16HBE14o-, dérivées de cellules épithéliales bronchiques, dans le but d'évaluer comment ces virus se propagent dans les voies respiratoires jusqu'aux alvéoles, comme modélisées par les cellules A549 (7). Les études cliniques ont par ailleurs suggéré que les cellules ciliées seraient de bonnes candidates à l'infection par les AV, étant donné que de fortes charges virales ont été mesurées en lien avec un dysfonctionnement de la motilité ciliaire (201).

L'implication causale de nouveaux virus dans la pathogénèse d'une maladie est complexe à définir, et requiert généralement la démonstration de différents effets sur l'organisme. Les postulats de Koch en 1890 stipulaient que les micro-organismes devaient être régulièrement isolés chez les malades, qu'ils devaient pouvoir être cultivés *in vitro*, ou encore que l'inoculation de la culture microbienne devait induire chez

l'animal susceptible la survenue de la maladie typique. Ces postulats ont été régulièrement contredits depuis leur parution, en réponse à l'identification de nouveaux pathogènes et à la description croissante de maladies multifactorielles, et à l'heure actuelle il ne semble plus exister de règles consensuelles permettant de définir le lien causal entre un micro-organisme et une maladie (127). Ces dernières années, l'association de nouveaux virus, tels que le hMPV, le HBoV, ou le HRV-C avec des pathologies respiratoires a majoritairement reposé sur la mise en place d'études épidémiologiques, et ont ainsi démontré l'impact de ces virus dans la survenue de la maladie, bien que des études *in vitro* n'y soient parfois pas parvenues comme pour le HBoV par exemple. La mise en place progressive de techniques moléculaires quantitatives pourrait permettre de mettre en évidence une forte prévalence de ces virus et des charges virales élevées chez des cohortes de patients atteints d'IRA, comparées à des cohortes contrôle. En revanche, on ne saurait déduire la pathogénicité d'un virus à sa seule présence dans un échantillon.

Il est en effet désormais reconnu que de nombreux virus infectent l'homme sans induire une réponse néfaste, comme c'est le cas par exemple pour des virus comme les AAV (*Adeno-Associated Virus*) qui ont besoin d'autres virus dits *helper* pour se répliquer (282). Nous avons donc poursuivi notre étude des TTMV-LY, en nous penchant sur leurs propriétés biologiques et leur capacité à induire des réponses cellulaires et immunitaires dans les cellules qu'ils infectent, grâce à l'utilisation des virions néo-synthétisés lors de la réplication virale. Les sous-chapitres suivants reprennent et synthétisent les hypothèses émises précédemment dans les chapitres 5 et 6, où elles y ont été plus amplement discutées.

7.1.3-Les TTMV-LY et la régulation du cycle cellulaire

Grâce à l'étude du transcriptome de cellules épithéliales alvéolaires infectées par les TTMV-LY, nous avons pu mettre en évidence que plusieurs gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire étaient surexprimés, majoritairement après 18h d'infection. La synthèse des effets dus à la surexpression des gènes PPM1L, PPP2R2B et RPL5 semble indiquer que les TTMV-LY, et plus significativement le TTMV-LY3, seraient capables de ralentir, voire de stopper la transition G1/S du cycle cellulaire, afin de maintenir une activité répllicative, et de détourner la machinerie cellulaire pour son propre bénéfice. Cela signifierait que le virus pourrait se répliquer indéfiniment dans ces cellules, ce qui supporterait l'hypothèse que le tractus respiratoire puisse produire une réplication continue des AV. Nous n'avons pas observé ce phénomène *in vitro*, où la quantité d'ADN virale dans les cellules diminuait fortement entre 6h et 18h après infection pour se maintenir ensuite jusqu'à 48h (Figure 45). Néanmoins, cette quantité constante pourrait s'expliquer par le fait que la réplication virale compense un relargage des virus dans le milieu extracellulaire, mais de plus amples investigations seraient nécessaires afin de préciser ce phénomène. Des tests de prolifération cellulaire, après inactivation totale de

l'expression de ces gènes par des ARN interférents et en l'absence de virus, permettrait également de confirmer si ces gènes représentent effectivement des cibles stratégiques pour la régulation du cycle cellulaire. Si le TTMV-LY3 semble induire une dérégulation de l'expression génique plus forte que les 2 autres TTMV-LY, nous n'avons pas pu observer de différences dans les manifestations cliniques (température, durée d'hospitalisation, d'oxygénation, taux de CRP) observées chez les 3 patients atteints par ces virus. Néanmoins, ces mesures ont été réalisées à un stade avancé et sévère de la maladie, tandis que les phénomènes constatés *in vitro* ont été évalués de manière précoce suite à l'infection. On ne peut donc pas exclure que cette dérégulation génique, observée au niveau cellulaire, puisse être directement impliquée dans la pathogenèse de la PPE.

7.1.4- Les TTMV-LY et l'inflammation

Nous avons démontré que les TTMV-LY sont capables d'infecter les cellules épithéliales alvéolaires et de s'y répliquer. Ces cellules font partie des premiers effecteurs de l'immunité innée et exercent un rôle défensif grâce à la sécrétion de peptides antimicrobiens et de médiateurs inflammatoires. La quantification d'un large panel de ces médiateurs en réponse à l'infection a révélé que les TTMV-LY induisaient une production différentielle des cytokines et chimiokines selon l'isolat considéré, mais que tous 3 conduisaient à la sécrétion d'IL-12. Cette dernière a été démontrée comme jouant un rôle clé dans la régulation et l'induction de l'inflammation du tissu pulmonaire (283). De plus, nous avons pu observer que certains gènes (MAPK8, MAP3K8), codant pour des enzymes impliquées dans la transduction du signal inflammatoire, étaient plus ou moins surexprimés en réponse à l'infection. Ces résultats témoignent que les TTMV-LY interagiraient avec les cellules épithéliales alvéolaires, en modulant la réponse inflammatoire. Pour approfondir ces résultats, nous avons étudié l'impact de ces virus sur les DC et les macrophages. Nous avons alors constaté que les TTMV-LY induisaient la production de médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages, permettant le recrutement sur le lieu de l'infection des monocytes, des PNN mais également des PNE. L'absence d'activation des DC semble suggérer que les TTMV-LY pourraient retarder la mise en place d'une réponse immune adaptative, et le profil des cytokines sécrétées orienterait celle-ci vers une réponse humorale (Figure 54).

Les DC sont des cellules migratoires et leur activation diminue cette capacité. Les TTMV-LY, en inhibant leur maturation, pourraient ainsi les utiliser comme vecteur pour être disséminés dans l'organisme. Cette hypothèse a déjà été formulée par différents auteurs, en raison des fortes charges virales observées dans une multitude d'organes et de la capacité des AV à se répliquer dans les PBMC activées, issues de donneurs virémiques ou non (167). Dans ce sens, il serait intéressant de mieux caractériser l'interaction entre les différentes cellules de l'immunité innée et de créer un modèle plus complet de la barrière alvéolo-capillaire. Plusieurs modèles de co-culture ont été décrits pour étudier les

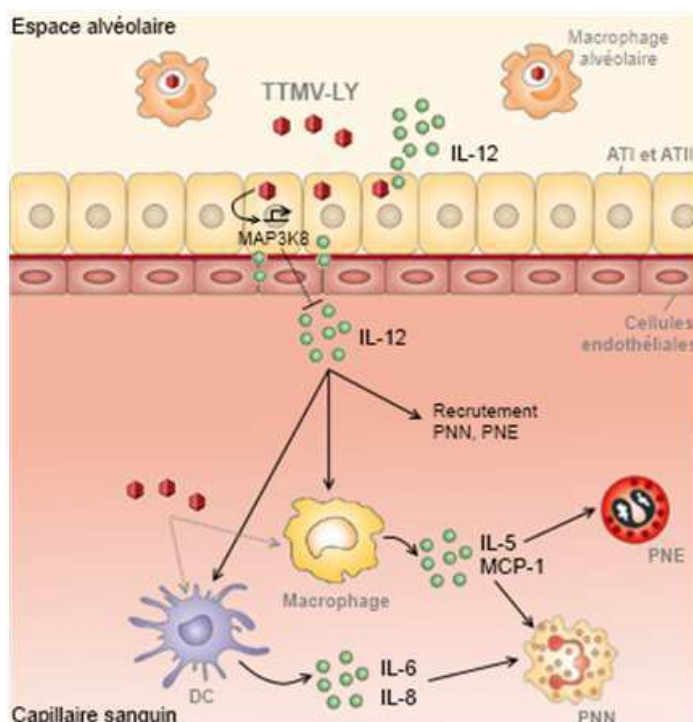


Figure 54 : Implication des TTMV-LY dans le processus inflammatoire. Les TTMV-LY induisent la production d'IL-12 par les cellules épithéliales alvéolaires de type II (ATII), laquelle participe à la régulation de l'inflammation, modulée par les APC et les médiateurs inflammatoires sécrétés par ceux-ci en réponse à l'infection.

relations entre les cellules épithéliales et les APC (284, 285). L'utilisation de tels modèles nous permettrait d'évaluer si les médiateurs inflammatoires produits par les cellules épithéliales alvéolaires, en réponse à l'infection, sont effectivement capables d'induire le recrutement des APC et de décortiquer plus profondément les mécanismes immunologiques des TTMV-LY.

Nous avons par ailleurs pu observer une régulation différentielle de la réponse induite par les différents isolats de TTMV-LY. L'infection par les TTMV-LY1 et -LY2 semble provoquer une réaction inflammatoire plus importante que le TTMV-LY3. En effet, ce dernier n'induit la production que de quelques médiateurs inflammatoires, et semble capable de réguler l'expression génique de manière plus importante et plus précoce, en inhibant la cascade NF- κ B, très impliquée dans le déclenchement et l'amplification du processus inflammatoire (Figure 55). De manière intéressante, le pourcentage de PNN chez les 2 enfants atteints des TTMV-LY1 et -LY2 était sensiblement plus élevé que celui de l'enfant infecté par le TTMV-LY3 (90 et 88% contre 63% de PNN), ce qui viendrait appuyer cette idée. Les facteurs propres à l'hôte sont également importants à prendre en compte. En effet, la mise en place des processus inflammatoires est intimement liée au statut immunitaire et à l'état de santé global de l'hôte infecté.

Bien qu'appartenant au même groupe phylogénétique majeur que les TTMV-LY1 et -LY2, le TTMV-LY3 est génétiquement plus éloigné des 2 autres isolats (< 55% d'identité nucléotidique, Figure 41), ce qui pourrait témoigner d'une importance de la

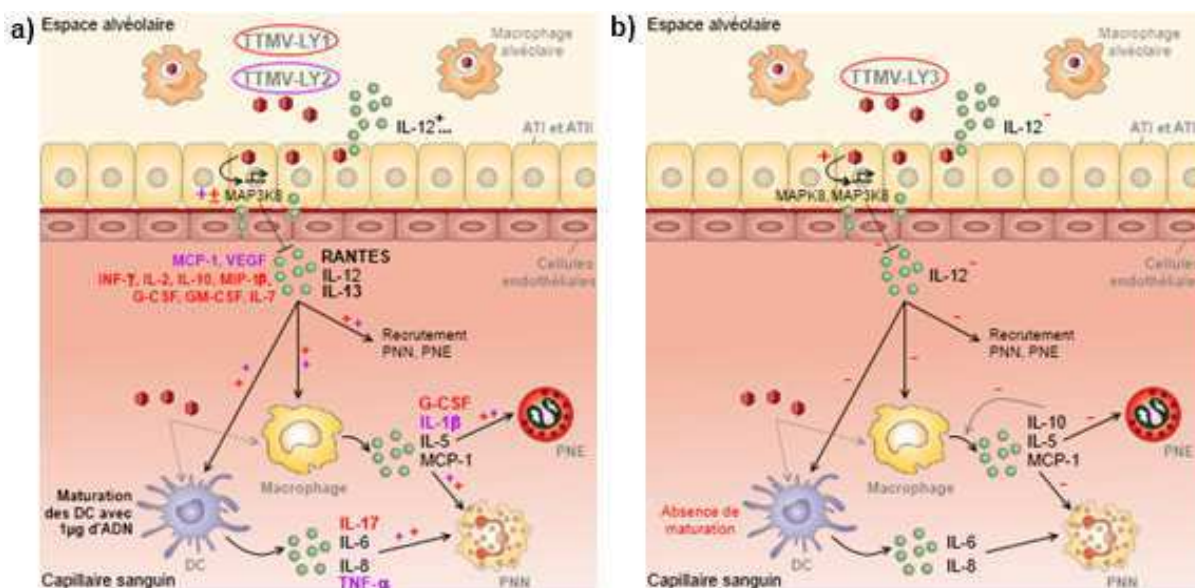


Figure 55 : Régulation différentielle de la réponse inflammatoire par les isolats TTMV-LY1 (a), -LY2 (a), et -LY3 (b).

séquence nucléotidique dans la pathogénicité possible des différents isolats d'AV. Cela pourrait également constituer une stratégie d'échappement de ces virus au système immunitaire. Pour aller plus loin dans cette idée, des études *in vitro* seraient nécessaires, basées sur un plus grand nombre d'isolats d'AV, appartenant aux différents groupes phylogénétiques. Nous pourrions alors comparer les profils de réponse cytokinique, ce qui pourrait permettre d'identifier des cibles potentielles, spécifiques d'une infection aux AV, et de mettre au point des tests de détection reflétant de l'activité biologique des AV. En effet, à l'heure actuelle, les tests de détection des AV reposent quasi-exclusivement sur la présence d'une courte portion du génome et témoignent ainsi seulement de la présence de fragments d'AV. Au cours de notre étude, des génomes complets d'AV n'ont pas pu être amplifiés pour certains échantillons, bien qu'ils se soient révélés positifs avec le test de détection des *Betatorquevirus*. On peut supposer que la grande diversité génétique des AV soit à l'origine de cette absence d'amplification, mais il est également possible qu'elle reflète le fait que des fragments de génomes persistent après un épisode infectieux. Les études épidémiologiques réalisées seraient ainsi biaisées, mettant en avant le besoin d'identifier des marqueurs de l'infection, afin de mieux appréhender l'impact de ces virus sur la santé de l'hôte.

7.2- Conclusions

La pneumonie est la principale cause de mortalité chez l'enfant de moins de 5 ans, à travers le monde. Bien qu'un grand nombre de bactéries et de virus aient été associés à cette pathologie, de nouveaux pathogènes sont régulièrement identifiés comme des agents étiologiques à l'origine de pneumonies. L'objectif de ce projet de thèse est de décrire l'implication possible de nouveaux virus, les TTMV-LY, dans la pathogenèse de la PPE. Au cours de ce manuscrit, nous avons ainsi démontré que :

- les TTMV-LY sont tous capables d'infecter et de se répliquer dans les cellules épithéliales alvéolaires et potentiellement dans d'autres types cellulaires de l'épithélium respiratoire, témoignant d'une infection en profondeur du tractus respiratoire.
- l'infection par les TTMV-LY induit une réponse cellulaire et inflammatoire des cellules épithéliales alvéolaires, qui permettrait le maintien d'une réplication virale continue, grâce notamment à une modulation de la régulation du cycle cellulaire et des cascades de signalisation du processus inflammatoire.
- les TTMV-LY induisent la sécrétion de médiateurs inflammatoires par les APC, à l'origine d'un possible recrutement des cellules phagocytaires sur le lieu de l'infection, qui en l'absence d'une régulation fine pourrait conduire à des lésions tissulaires et à l'infiltration de ces cellules et du virus entre les feuillets de la plèvre causant ainsi un épanchement.
- l'infection par les TTMV-LY semble provoquer la mise en place d'une réaction immunitaire innée mais retarder ou inhiber la mise en place d'une réponse immune adaptative dirigée contre ces virus.
- les TTMV-LY1 et -LY2 seraient à l'origine d'une réaction inflammatoire plus aiguë que le TTMV-LY3, indiquant ainsi que les caractéristiques génétiques des différents isolats pourraient être un facteur de pathogénicité des AV.

Les différents résultats de cette étude témoignent de liens complexes entre les AV et les processus inflammatoires, avec de possibles répercussions sur d'autres pathologies. Des études plus approfondies s'avèrent néanmoins encore nécessaires pour développer les mécanismes biologiques mis en jeu lors des infections aux AV et établir un lien causal entre ces virus et la pathogenèse de la pneumonie. Nous prévoyons ainsi plusieurs nouvelles approches pour approfondir les résultats obtenus jusqu'alors. Une étude de grande ampleur sur l'étiologie de la pneumonie de l'enfant a été lancée, fin 2010, par la Fondation Mérieux, en collaboration avec 11 sites du réseau de laboratoires GABRIEL, situés dans des pays en voie de développement à travers le monde (Haïti, Paraguay, Brésil, Madagascar, Mali, Inde, Liban, Chine, Mongolie, Cambodge). Nous pourrions

ainsi avoir accès à plus d'un millier de prélèvements respiratoires (PNP, EP, sang total) d'enfants hospitalisés pour une pneumonie ou de cas contrôle. Il sera alors possible d'étudier la prévalence de génomes complets d'AV, éventuellement de les isoler et des caractériser grâce au modèle de répllication mis en place au laboratoire. Nous pourrions également nous pencher sur la répartition géographique des AV, et potentiellement identifier des zones de circulation préférentielles de ces virus. L'accès à de nouveaux isolats nous permettrait par ailleurs de confirmer ou de réfuter la spécificité d'une réponse immune aux AV et d'identifier de potentiels variants infectieux.

Afin d'ouvrir d'autres perspectives sur le rôle joué par ces virus, il serait intéressant d'étudier la réponse humorale dirigée contre les particules virales des TTMV-LY. Il est à noter que les TTMV-LY ont été retrouvés dans 2 compartiments biologiques, PNP et EP, chez les 3 patients où ces virus ont été isolés. Néanmoins, il serait pertinent d'étendre les investigations à d'autres compartiments, comme par exemple le sang.

De plus, pour aller plus loin dans cette association, le recours à des modèles animaux serait une voie d'étude intéressante, étant donné que cette famille virale a un impact reconnu en pathologie vétérinaire, et que les critères permettant d'établir un lien de causalité entre un virus et une pathologie, comme par exemple ceux décrits par Rivers, impliquent de reproduire les effets d'un potentiel pathogène dans plusieurs espèces hôtes (286).

Pour conclure, si l'implication des AV dans la pathogenèse des pneumonies était irréfutablement avérée, l'identification de cibles virales, et des cibles de l'hôte induites spécifiquement par les TTMV-LY, serait un atout pour la mise en place de stratégies thérapeutiques et la mise au point de tests diagnostic. Le développement d'un vaccin pourrait également être envisagé même si la forte diversité génétique des AV serait probablement un facteur limitant, comme c'est le cas pour d'autres virus comme le HIV par exemple.

BIBLIOGRAPHIE

1. T. Jartti, L. Jartti, O. Ruuskanen, M. Söderlund-Venermo, New respiratory viral infections, *Curr Opin Pulm Med* **18**, 271–278 (2012).
2. OMS | La pneumonie de l'enfant: un fléau oublié (available at http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9280640489/fr/index.html).
3. Qu'est-ce que la pneumonie ? - ameli-santé (available at <http://www.ameli-sante.fr/pneumonie/definition-pneumonie.html>).
4. Medisite - L'appareil respiratoire (available at <http://planetbonsplans.com/medisite/Les-voies-aeriennes.html>).
5. G. Huchon, *Pneumologie pour le praticien* (Masson, 2001).
6. Histologie broncho-pulmonaire (available at <http://www.respir.com/doc/abonne/base/Histologie.asp>).
7. C. Ehrhardt, B. Forbes, K.-J. Kim, in *Drug Absorption Studies*, C. Ehrhardt, K.-J. Kim, Eds. (Springer US, Boston, MA, 2008), vol. VII, pp. 235–257.
8. M. C. Williams, Alveolar type I cells: molecular phenotype and development, *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 669–695 (2003).
9. H. Fehrenbach, Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited, *Respiratory Research* **2**, 33 (2001).
10. L. Sherwood, *Physiologie humaine: A Human Perspective* (De Boeck Supérieur, 2006).
11. M. Vareille, E. Kieninger, M. R. Edwards, N. Regamey, The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses, *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 210–229 (2011).
12. C. Coraux, R. Hajj, P. Lesimple, E. Puchelle, Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire, *M/S : médecine sciences* **21**, 1063–1069 (2005).
13. T. J. Nevalainen, G. G. Graham, K. F. Scott, Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review, *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 1–9 (2008).
14. N. A. Eisele, D. M. Anderson, Host Defense and the Airway Epithelium: Frontline Responses That Protect against Bacterial Invasion and Pneumonia, *Journal of Pathogens* **2011**, 1–16 (2011).
15. S. B. Gordon, R. C. Read, Macrophage Defences Against Respiratory Tract Infections The Immunology of Childhood Respiratory Infections, *Br Med Bull* **61**, 45–61 (2002).
16. G. A. Rossi *et al.*, Human ciliated bronchial epithelial cells: expression of the HLA-DR antigens and of the HLA-DR alpha gene, modulation of the HLA-DR antigens by gamma-interferon and antigen-presenting function in the mixed leukocyte reaction, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**, 431–439 (1990).
17. A.-K. Abbas, A.-H. Lichtman, *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique* (Elsevier, 2008).
18. R. Medzhitov, Toll-like receptors and innate immunity, *Nature Reviews Immunology* **1**, 135–145 (2001).
19. F. Martinon, J. Tschopp, NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens, *Trends Immunol.* **26**, 447–454 (2005).
20. Y.-M. Loo, M. Gale Jr, Immune signaling by RIG-I-like receptors, *Immunity* **34**, 680–692 (2011).
21. C. Basset, J. Holton, R. O'Mahony, I. Roitt, Innate immunity and pathogen-host interaction, *Vaccine* **21 Suppl 2**, S12–23 (2003).
22. R. Bals, P. S. Hiemstra, Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens, *Eur. Respir. J.* **23**, 327–333 (2004).
23. W. K. Born, C. L. Reardon, R. L. O'Brien, The function of gammadelta T cells in innate immunity, *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 31–38 (2006).
24. V. Brinkmann *et al.*, Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria, *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
25. A. Aderem, D. M. Underhill, Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593–623 (1999).
26. P. Blanco, A. K. Palucka, V. Pascual, J. Banchereau, Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases, *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 41–52 (2008).
27. E. Vivier *et al.*, Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells, *Science* **331**, 44–49 (2011).
28. E. Vivier, N. Anfossi, Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future, *Nature Reviews Immunology* **4**, 190–198 (2004).
29. F. Martin, J. F. Kearney, B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets, *Current Opinion in Immunology* **13**, 195–201 (2001).

30. H. Rus, C. Cudrici, F. Niculescu, The role of the complement system in innate immunity, *Immunol. Res.* **33**, 103–112 (2005).
31. C. T. Weaver, L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli, K. M. Murphy, Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties, *Immunity* **24**, 677–688 (2006).
32. J. J. O’Shea, Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet?, *Immunity* **7**, 1–11 (1997).
33. J. J. O’Shea, W. E. Paul, Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells, *Science* **327**, 1098–1102 (2010).
34. K. Schwartz, Inflammation & maladies inflammatoires, clés de compréhension (2011) (available at <http://www.inserm.fr/associations-de-malades/actualites/inflammation-maladies-inflammatoires-cles-de-comprehension>).
35. B. Min, W. E. Paul, Basophils and type 2 immunity, *Curr. Opin. Hematol.* **15**, 59–63 (2008).
36. S. P. Hogan *et al.*, Eosinophils: biological properties and role in health and disease, *Clin. Exp. Allergy* **38**, 709–750 (2008).
37. S. J. Galli, M. Grimaldeston, M. Tsai, Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of innate and acquired immunity, *Nat Rev Immunol* **8**, 478–486 (2008).
38. P. J. Barnes, Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Nature Reviews Immunology* **8**, 183–192 (2008).
39. D. J. McKeon *et al.*, Prolonged survival of neutrophils from patients with $\Delta F508$ CFTR mutations, *Thorax* **63**, 660–661 (2008).
40. A. Papi *et al.*, Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 1114–1121 (2006).
41. I. Rudan, C. Boschi-Pinto, Z. Biloglav, K. Mulholland, H. Campbell, Epidemiology and etiology of childhood pneumonia, *Bull World Health Organ* **86**, 408–416 (2008).
42. B. Greenwood, A global action plan for the prevention and control of pneumonia, *Bulletin of the World Health Organization* **86**, 322–322A (2008).
43. United Nations Millennium Development Goals (available at <http://www.un.org/millenniumgoals/bkgd.shtml>).
44. A. T. Pavia, Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis, *Clin Infect Dis* **52 Suppl 4**, S284–289 (2011).
45. F. Blasi, Atypical pathogens and respiratory tract infections, *Eur Respir J* **24**, 171–182 (2004).
46. T. Marrie *et al.*, The Role of Atypical Pathogens in Community-Acquired Pneumonia, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* **33**, 244–256 (2012).
47. C. Hyams *et al.*, Streptococcus pneumoniae Resistance to Complement-Mediated Immunity Is Dependent on the Capsular Serotype, *Infect Immun* **78**, 716–725 (2010).
48. A. Martner, C. Dahlgren, J. C. Paton, A. E. Wold, Pneumolysin Released during Streptococcus pneumoniae Autolysis Is a Potent Activator of Intracellular Oxygen Radical Production in Neutrophils, *Infect. Immun.* **76**, 4079–4087 (2008).
49. A. Kadioglu, J. N. Weiser, J. C. Paton, P. W. Andrew, The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease, *Nature Reviews Microbiology* **6**, 288–301 (2008).
50. W. P. Hausdorff, R. Dagan, Serotypes and pathogens in paediatric pneumonia, *Vaccine* **26, Supplement 2**, B19–B23 (2008).
51. J. W. Johnston, M. A. Apicella, in *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Moselio Schaechter, Ed. (Academic Press, Oxford, 2009), pp. 153–162.
52. A. L. Erwin, A. L. Smith, Nontypeable Haemophilus influenzae: understanding virulence and commensal behavior, *Trends Microbiol.* **15**, 355–362 (2007).
53. E. S. Lysenko, A. J. Ratner, A. L. Nelson, J. N. Weiser, The Role of Innate Immune Responses in the Outcome of Interspecies Competition for Colonization of Mucosal Surfaces, *PLoS Pathog* **1** (2005), doi:10.1371/journal.ppat.0010001.
54. S. D. Haessler, R. B. Brown, Pneumonia Caused by Staphylococcus aureus, *Current Respiratory Medicine Reviews* **5**,

- 62–67 (2009).
55. D. Gendrel, Mycoplasma pneumoniae et infections respiratoires aiguës, *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **47**, 442–445 (2007).
56. I. Puljiz, I. Kuzman, O. Dakovic-Rode, N. Schönwald, B. Mise, Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae pneumonia: comparison of clinical, epidemiological characteristics and laboratory profiles, *Epidemiol Infect* **134**, 548–555 (2006).
57. M. Woodhead, Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns, *Eur Respir J Suppl* **36**, 20s–27s (2002).
58. A. M. Kesson, Respiratory virus infections, *Paediatric Respiratory Reviews* **8**, 240–248 (2007).
59. M. Korppi, M. Don, F. Valent, M. Canciani, The value of clinical features in differentiating between viral, pneumococcal and atypical bacterial pneumonia in children, *Acta Paediatr.* **97**, 943–947 (2008).
60. W. J. Barson, Clinical features and diagnosis of community-acquired pneumonia in children (2012) (available at <http://www.uptodate.com/contents/clinical-features-and-diagnosis-of-community-acquired-pneumonia-in-children>).
61. W. F. Carman, J. B. Mahony, The pathogens, *J. Clin. Virol.* **40 Suppl 1**, S5–S10 (2007).
62. O. Ruuskanen, E. Lahti, L. C. Jennings, D. R. Murdoch, Viral pneumonia, *Lancet* **377**, 1264–1275 (2011).
63. W. M. Sullender, Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity, *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 1–15 (2000).
64. W. P. Glezen, A. L. Frank, L. H. Taber, J. A. Kasel, Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children, *J. Infect. Dis.* **150**, 851–857 (1984).
65. W. Kunze, D. Beier, K. Groeger, Adenovirus Respiratory Infections In Children. Do They Mimic Bacterial Infections?, (2010) (available at http://www.webmedcentral.com/article_view/1098).
66. J. P. Lynch 3rd, M. Fishbein, M. Echavarría, Adenovirus, *Semin Respir Crit Care Med* **32**, 494–511 (2011).
67. W.-M. Lee *et al.*, A Diverse Group of Previously Unrecognized Human Rhinoviruses Are Common Causes of Respiratory Illnesses in Infants, *PLoS ONE* **2**, e966 (2007).
68. S. B. Greenberg, Respiratory consequences of rhinovirus infection, *Arch. Intern. Med.* **163**, 278–284 (2003).
69. M. Debiaggi, F. Canducci, E. R. Ceresola, M. Clementi, The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children, *Virology Journal* **9**, 247 (2012).
70. M. G. Sy, J. L. Robinson, Community-acquired Moraxella catarrhalis pneumonia in previously healthy children, *Pediatr. Pulmonol.* **45**, 674–678 (2010).
71. G. Cortés, D. Álvarez, C. Saus, S. Albertí, Role of Lung Epithelial Cells in Defense against Klebsiella pneumoniae Pneumonia, *Infect Immun* **70**, 1075–1080 (2002).
72. K. A. Beynon *et al.*, Bordetella pertussis in Adult Pneumonia Patients, *Emerg Infect Dis* **11**, 639–641 (2005).
73. J. S. Kahn, Epidemiology of Human Metapneumovirus, *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 546–557 (2006).
74. J. V. Williams *et al.*, Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children, *N. Engl. J. Med.* **350**, 443–450 (2004).
75. C. Manoha, S. Espinosa, S.-L. Aho, F. Huet, P. Pothier, Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children, *J. Clin. Virol.* **38**, 221–226 (2007).
76. A. Manning *et al.*, Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses, *J. Infect. Dis.* **194**, 1283–1290 (2006).
77. O. Schildgen *et al.*, Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections?, *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 291–304, table of contents (2008).
78. P. Berche, *Faut-il encore avoir peur de la grippe ? : Histoire des pandémies* (Odile Jacob, 2012).
79. J. Kuypers *et al.*, Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes, *Pediatrics* **119**, e70–76 (2007).
80. WHO | Background and summary of novel coronavirus infection (2012) (available at http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/update_20121130/en/index.html).
81. Y. Abed, G. Boivin, Molecular Characterization of Viruses from Clinical Respiratory Samples Producing Unidentified Cytopathic Effects in Cell Culture, *Viruses* **1**, 84–90 (2009).
82. Z. Xiang *et al.*, Coxsackievirus A21, Enterovirus 68, and Acute Respiratory Tract Infection, China, *Emerg Infect Dis* **18**, 821–824 (2012).

83. A. Piralla *et al.*, Clinical severity and molecular typing of human rhinovirus C strains during a fall outbreak affecting hospitalized patients, *J. Clin. Virol.* **45**, 311–317 (2009).
84. V. Foulongne *et al.*, KI and WU Polyomaviruses in Children, France, *Emerging Infectious Diseases* **14**, 523–525 (2008).
85. M. Babakir-Mina, M. Ciccozzi, C. F. Perno, M. Ciotti, The novel KI, WU, MC polyomaviruses: possible human pathogens?, *New Microbiol.* **34**, 1–8 (2011).
86. R. Gonzales, D. C. Malone, J. H. Maselli, M. A. Sande, Excessive antibiotic use for acute respiratory infections in the United States, *Clin. Infect. Dis.* **33**, 757–762 (2001).
87. J. S. Tregoning, J. Schwarze, Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology, *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 74–98 (2010).
88. W. A. Knaus, E. A. Draper, D. P. Wagner, J. E. Zimmerman, APACHE II: a severity of disease classification system, *Crit. Care Med.* **13**, 818–829 (1985).
89. W. S. Lim *et al.*, Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study, *Thorax* **58**, 377–382 (2003).
90. R. Seligman *et al.*, Biomarkers in community-acquired pneumonia: A state-of-the-art review, *Clinics (Sao Paulo)* **67**, 1321–1325 (2012).
91. J. Hedlund, L. O. Hansson, Procalcitonin and C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia: correlation with etiology and prognosis, *Infection* **28**, 68–73 (2000).
92. M. Falguera *et al.*, Predictive factors, microbiology and outcome of patients with parapneumonic effusion, *Eur. Respir. J.* **38**, 1173–1179 (2011).
93. A. Girdhar, A. Shujaat, A. Bajwa, Management of infectious processes of the pleural space: a review, *Pulm Med* **2012**, 816502 (2012).
94. NHLBI, NIH, How Is Pneumonia Treated? (2012) (available at <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/pnu/treatment.html>).
95. D. S. Leland, C. C. Ginocchio, Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology, *Clin Microbiol Rev* **20**, 49–78 (2007).
96. M. Ogilvie, Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories, *Rev. Med. Virol.* **11**, 351–354 (2001).
97. P. Roingeard, Viral detection by electron microscopy: past, present and future, *Biol. Cell* **100**, 491–501 (2008).
98. W. K. Aldous *et al.*, A comparison of Binax NOW to viral culture and direct fluorescent assay testing for respiratory syncytial virus, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **49**, 265–268 (2004).
99. M. L. Landry, S. Cohen, D. Ferguson, Comparison of Binax NOW and Directigen for rapid detection of influenza A and B, *J. Clin. Virol.* **31**, 113–115 (2004).
100. S. F. Dowell, R. L. Garman, G. Liu, O. S. Levine, Y.-H. Yang, Evaluation of Binax NOW, an Assay for the Detection of Pneumococcal Antigen in Urine Samples, Performed among Pediatric Patients, *Clin Infect Dis.* **32**, 824–825 (2001).
101. J. B. Mahony, Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods, *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 716–747 (2008).
102. J. D. Fox, Nucleic acid amplification tests for detection of respiratory viruses, *J. Clin. Virol.* **40 Suppl 1**, S15–23 (2007).
103. M. Ieven, Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections, *J. Clin. Virol.* **40**, 259–276 (2007).
104. T. Hyypiä, Detection of adenovirus in nasopharyngeal specimens by radioactive and nonradioactive DNA probes., *J Clin Microbiol* **21**, 730–733 (1985).
105. K. Pabbaraju, K. L. Tokaryk, S. Wong, J. D. Fox, Comparison of the Luminex xTAG Respiratory Viral Panel with In-House Nucleic Acid Amplification Tests for Diagnosis of Respiratory Virus Infections, *J Clin Microbiol* **46**, 3056–3062 (2008).
106. B. Lin *et al.*, Broad-spectrum respiratory tract pathogen identification using resequencing DNA microarrays, *Genome Res.* **16**, 527–535 (2006).
107. S. R. Dominguez *et al.*, Multiplex MassTag-PCR for respiratory pathogens in pediatric nasopharyngeal washes

- negative by conventional diagnostic testing shows a high prevalence of viruses belonging to a newly recognized rhinovirus clade, *J. Clin. Virol.* **43**, 219–222 (2008).
108. D. R. Murdoch *et al.*, Laboratory Methods for Determining Pneumonia Etiology in Children, *Clinical Infectious Diseases* **54**, S146–S152 (2012).
109. T. Nishizawa *et al.*, A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 92–97 (1997).
110. A. S. Muerhoff, T. P. Leary, S. M. Desai, I. K. Mushahwar, Amplification and subtraction methods and their application to the discovery of novel human viruses, *J. Med. Virol.* **53**, 96–103 (1997).
111. H. E. Ambrose, J. P. Clewley, Virus discovery by sequence-independent genome amplification, *Rev. Med. Virol.* **16**, 365–383 (2006).
112. L. G. Birkenmeyer *et al.*, Selectively primed adaptive driver RDA (SPAD-RDA): an improved method for subtractive hybridization, *J. Med. Virol.* **71**, 150–159 (2003).
113. P. Biagini, X. de Lamballerie, P. de Micco, Effective detection of highly divergent viral genomes in infected cell lines using a new subtraction strategy (primer extension enrichment reaction-PEER), *J. Virol. Methods* **139**, 106–110 (2007).
114. L. van der Hoek *et al.*, Identification of a new human coronavirus, *Nat. Med.* **10**, 368–373 (2004).
115. T. Allander *et al.*, Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 12891–12896 (2005).
116. N. Berthet *et al.*, Phi29 polymerase based random amplification of viral RNA as an alternative to random RT-PCR, *BMC Molecular Biology* **9**, 77 (2008).
117. P. Biagini *et al.*, Circular genomes related to anelloviruses identified in human and animal samples by using a combined rolling-circle amplification/sequence-independent single primer amplification approach, *J Gen Virol* **88**, 2696–2701 (2007).
118. R. Johne, H. Müller, A. Rector, M. van Ranst, H. Stevens, Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase, *Trends in Microbiology* **17**, 205–211 (2009).
119. M. L. Metzker, Sequencing technologies — the next generation, *Nature Reviews Genetics* **11**, 31–46 (2010).
120. K. V. Voelkerding, S. Dames, J. D. Durtschi, Next Generation Sequencing for Clinical Diagnostics-Principles and Application to Targeted Resequencing for Hypertrophic Cardiomyopathy, *J Mol Diagn* **12**, 539–551 (2010).
121. R. Blervaque, Biorigami - Site francophone de biotechnologies (2011) (available at <http://www.biorigami.com/>).
122. L. Barzon, E. Lavezzo, V. Militello, S. Toppo, G. Palù, Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology, *Int J Mol Sci* **12**, 7861–7884 (2011).
123. J. Yang *et al.*, Unbiased Parallel Detection of Viral Pathogens in Clinical Samples by Use of a Metagenomic Approach, *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3463–3469 (2011).
124. F. Lysholm *et al.*, Characterization of the viral microbiome in patients with severe lower respiratory tract infections, using metagenomic sequencing, *PLoS ONE* **7**, e30875 (2012).
125. S. Bousbia *et al.*, Repertoire of Intensive Care Unit Pneumonia Microbiota, *PLoS ONE* **7**, e32486 (2012).
126. C. U. Köser *et al.*, Rapid Whole-Genome Sequencing for Investigation of a Neonatal MRSA Outbreak, *New England Journal of Medicine* **366**, 2267–2275 (2012).
127. W. I. Lipkin, Pathogen Discovery, *PLoS Pathog* **4**, e1000002 (2008).
128. A. Thomson, M. Harris, Community-acquired pneumonia in children: what's new?, *Thorax* **66**, 927–928 (2011).
129. P. Biagini *et al.*, *Anelloviridae - Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* A. M. King, E. Lefkowitz, M. J. Adams, E. B. Carstens, Eds. (Elsevier, ed. 1, 2011).
130. H. Okamoto, History of discoveries and pathogenicity of TT viruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **331**, 1–20 (2009).
131. Y. Itoh *et al.*, Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 718–724 (2000).
132. H. Okamoto *et al.*, Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology, *Hepatology research* **10**, 1–16 (1998).
133. I. K. Mushahwar *et al.*, Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family

- infecting humans, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3177–3182 (1999).
134. P. Biagini, Classification of TTV and related viruses (anelloviruses), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **331**, 21–33 (2009).
135. K. Takahashi, Y. Iwasa, M. Hijikata, S. Mishiro, Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus, *Arch. Virol.* **145**, 979–993 (2000).
136. M. Ninomiya *et al.*, Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb, *J. Gen. Virol.* **88**, 1939–1944 (2007).
137. M. S. Jones *et al.*, New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome, *J. Virol.* **79**, 8230–8236 (2005).
138. H. Okamoto, TT viruses in animals, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **331**, 35–52 (2009).
139. T. F. F. Ng, W. K. Suedmeyer, E. Wheeler, F. Gulland, M. Breitbart, Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions, *J. Gen. Virol.* **90**, 1256–1261 (2009).
140. T. Kekarainen, J. Segalés, Torque teno virus infection in the pig and its potential role as a model of human infection, *Vet. J.* **180**, 163–168 (2009).
141. ICTV, Anelloviridae - Taxonomy Proposals - Under consideration and open for discussion (available at http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy_proposals_vertibrate1/m/vert02/4308/download.aspx).
142. F. Maggi, M. Bendinelli, Human anelloviruses and the central nervous system, *Rev. Med. Virol.* **20**, 392–407 (2010).
143. P. Biagini, P. de Micco, La famille des Anelloviridae : virus TTV et genres apparentés, *Virologie* **14**, 3–16 (2010).
144. I. Davidson, L. M. Shulman, Unraveling the puzzle of human anellovirus infections by comparison with avian infections with the chicken anemia virus, *Virus Research* **137**, 1–15 (2008).
145. S. Hino, A. A. Prasetyo, Relationship of Torque teno virus to chicken anemia virus, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **331**, 117–130 (2009).
146. M. Bendinelli *et al.*, Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans, *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 98–113 (2001).
147. T. Kamahora, S. Hino, H. Miyata, Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells, *J. Virol.* **74**, 9980–9986 (2000).
148. J. Qiu *et al.*, Human circovirus TT virus genotype 6 expresses six proteins following transfection of a full-length clone, *J. Virol.* **79**, 6505–6510 (2005).
149. L. Leppik *et al.*, In Vivo and In Vitro Intragenomic Rearrangement of TT Viruses, *J Virol* **81**, 9346–9356 (2007).
150. T. Suzuki *et al.*, Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome, *J. Virol.* **78**, 10820–10824 (2004).
151. K. Kamada, T. Kamahora, P. Kabat, S. Hino, Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region, *Virology* **321**, 341–348 (2004).
152. L. Kakkola *et al.*, Expression of all six human Torque teno virus (TTV) proteins in bacteria and in insect cells, and analysis of their IgG responses, *Virology* **382**, 182–189 (2008).
153. L. Kakkola, K. Hedman, J. Qiu, D. Pintel, M. Söderlund-Venermo, Replication of and protein synthesis by TT viruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **331**, 53–64 (2009).
154. H. Okamoto *et al.*, The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome, *Jpn. J. Exp. Med.* **60**, 167–177 (1990).
155. T. Pollicino *et al.*, TT virus has a ubiquitous diffusion in human body tissues: analyses of paired serum and tissue samples, *J. Viral Hepat.* **10**, 95–102 (2003).
156. J. C. Erker, T. P. Leary, S. M. Desai, M. L. Chalmers, I. K. Mushahwar, Analyses of TT virus full-length genomic sequences, *J. Gen. Virol.* **80** (Pt 7), 1743–1750 (1999).
157. H. Zheng *et al.*, Torque Teno Virus (SANBAN Isolate) ORF2 Protein Suppresses NF- κ B Pathways via Interaction with I κ B Kinases, *J Virol* **81**, 11917–11924 (2007).
158. M. A. Peters, D. C. Jackson, B. S. Crabb, G. F. Browning, Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase, *J. Biol. Chem.* **277**, 39566–39573 (2002).
159. S. Asabe, T. Nishizawa, H. Iwanari, H. Okamoto, Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TT virus genome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 298–304 (2001).
160. B. Mueller, A. Maerz, K. Doberstein, T. Finsterbusch, A. Mankertz, Gene expression of the human Torque Teno Virus

- isolate P/1C1, *Virology* **381**, 36–45 (2008).
161. L. Martínez-Guinó, M. Ballester, J. Segalés, T. Kekarainen, Expression profile and subcellular localization of Torque teno sus virus proteins, *J. Gen. Virol.* **92**, 2446–2457 (2011).
162. C. Jinling *et al.*, Bioinformatics analysis on ORF1 protein of Torque teno virus (SANBAN isolate), *Asian Pac J Trop Med* **4**, 850–856 (2011).
163. F. Maggi *et al.*, Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia, *J. Virol.* **84**, 6891–6893 (2010).
164. Y. Kanda *et al.*, TT Virus in Bone Marrow Transplant Recipients, *Blood* **93**, 2485–2490 (1999).
165. F. Maggi *et al.*, Dynamics of Persistent TT Virus Infection, as Determined in Patients Treated with Alpha Interferon for Concomitant Hepatitis C Virus Infection, *J Virol* **75**, 11999–12004 (2001).
166. F. Maggi *et al.*, TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity, *J Virol* **77**, 2418–2425 (2003).
167. L. F. Mariscal *et al.*, TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells, *Virology* **301**, 121–129 (2002).
168. L. Kakkola *et al.*, Construction and biological activity of a full-length molecular clone of human Torque teno virus (TTV) genotype 6, *FEBS J.* **274**, 4719–4730 (2007).
169. B. Grasland *et al.*, Circovirus et pathologies associées chez les animaux, *Virologie* **9**, 431–442 (2005).
170. E.-M. de Villiers, S. S. Borkosky, R. Kimmel, K. Gunst, J.-W. Fei, The diversity of torque teno viruses: in vitro replication leads to the formation of additional replication-competent subviral molecules, *J. Virol.* **85**, 7284–7295 (2011).
171. F. Faurez, D. Dory, B. Grasland, A. Jestin, Replication of porcine circoviruses, *Virol. J.* **6**, 60 (2009).
172. S. S. Borkosky, C. Whitley, A. Kopp-Schneider, H. zur Hausen, E.-M. de Villiers, Epstein-Barr virus stimulates torque teno virus replication: a possible relationship to multiple sclerosis, *PLoS ONE* **7**, e32160 (2012).
173. I. Jelcic, A. Hotz-Wagenblatt, A. Hunziker, H. Zur Hausen, E.-M. de Villiers, Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region, *J. Virol.* **78**, 7498–7507 (2004).
174. E. M. de Villiers, R. Kimmel, L. Leppik, K. Gunst, Intragenomic rearrangement in TT viruses: a possible role in the pathogenesis of disease, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **331**, 91–107 (2009).
175. M. Ninomiya, M. Takahashi, T. Nishizawa, T. Shimosegawa, H. Okamoto, Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy, *J. Clin. Microbiol.* **46**, 507–514 (2008).
176. T. Chen, E. Väisänen, P. S. Mattila, K. Hedman, M. Söderlund-Venermo, Antigenic diversity and seroprevalences of Torque teno viruses in children and adults by ORF2-based immunoassays, *J. Gen. Virol.* **94**, 409–417 (2013).
177. P. Biagini, P. de Micco, Anelloviruses (TTV and variants): state of the art 10years after their discovery, *Transfus Clin Biol* **15**, 406–415 (2008).
178. J. K. Ball *et al.*, TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types, *J. Gen. Virol.* **80** (Pt 7), 1759–1768 (1999).
179. P. Biagini *et al.*, Determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT virus isolates, *J. Gen. Virol.* **80** (Pt 2), 419–424 (1999).
180. P. Biagini *et al.*, Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in French blood donors, *J. Med. Virol.* **78**, 298–304 (2006).
181. P. Biagini, P. de Micco, X. de Lamballerie, Identification of a third member of the Anellovirus genus (“small anellovirus”) in French blood donors, *Arch Virol* **151**, 405–408 (2006).
182. P. Biagini *et al.*, High prevalence of TT virus infection in French blood donors revealed by the use of three PCR systems, *Transfusion* **40**, 590–595 (2000).
183. J. J. Lefrère *et al.*, Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients, *Blood* **95**, 347–351 (2000).
184. F. Maggi *et al.*, Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried, *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4807–4810 (2005).

185. M. Pistello *et al.*, TT virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathology, *J. Med. Virol.* **63**, 189–195 (2001).
186. S. Devalle, C. Niel, Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients, *J. Med. Virol.* **72**, 166–173 (2004).
187. S. Hino, H. Miyata, Torque teno virus (TTV): current status, *Rev. Med. Virol.* **17**, 45–57 (2007).
188. S. L. Smits *et al.*, High prevalence of anelloviruses in vitreous fluid of children with seasonal hyperacute panuveitis, *J. Infect. Dis.* **205**, 1877–1884 (2012).
189. H. Matsubara *et al.*, Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects, *Intervirology* **43**, 16–19 (2000).
190. M. Takahashi *et al.*, TT virus is distributed in various leukocyte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 242–248 (2002).
191. F. Maggi *et al.*, TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells, *J. Med. Virol.* **64**, 190–194 (2001).
192. E.-M. de Villiers, R. Schmidt, H. Delius, H. zur Hausen, Heterogeneity of TT virus related sequences isolated from human tumour biopsy specimens, *J. Mol. Med.* **80**, 44–50 (2002).
193. H. Okamoto *et al.*, Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans, *Virology* **288**, 358–368 (2001).
194. A. D. Vecchia *et al.*, First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil, *Braz J Biol* **72**, 323–329 (2012).
195. K. Chikasue *et al.*, Detection of Torque teno virus DNA in exhaled breath by polymerase chain reaction, *Acta Med. Okayama* **66**, 387–397 (2012).
196. S. Bédarida, O. Dutour, A. P. Buzhilova, P. de Micco, P. Biagini, Identification of viral DNA (Anelloviridae) in a 200-year-old dental pulp sample (Napoleon's Great Army, Kaliningrad, 1812), *Infect. Genet. Evol.* **11**, 358–362 (2011).
197. M. Pifferi *et al.*, Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma, *J. Infect. Dis.* **192**, 1141–1148 (2005).
198. M. Pifferi *et al.*, High torquetenovirus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, 804–808 (2006).
199. F. Maggi *et al.*, Torquetenovirus in patients with arthritis, *Rheumatology (Oxford)* **46**, 885–886 (2007).
200. J. Rocchi *et al.*, Torquetenovirus DNA drives proinflammatory cytokines production and secretion by immune cells via toll-like receptor 9, *Virology* **394**, 235–242 (2009).
201. M. Pifferi *et al.*, Torquetenovirus infection and ciliary dysmotility in children with recurrent pneumonia, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **27**, 413–418 (2008).
202. F. Maggi *et al.*, Correlation between Torque tenovirus infection and serum levels of eosinophil cationic protein in children hospitalized for acute respiratory diseases, *J. Infect. Dis.* **190**, 971–974 (2004).
203. F. Maggi, M. Bendinelli, Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **331**, 65–90 (2009).
204. F. Tsuda *et al.*, Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan, *J. Virol. Methods* **77**, 199–206 (1999).
205. Tsuda *et al.*, IgM-class antibodies to TT virus (TTV) in patients with acute TTV infection, *Hepatol. Res.* **19**, 1–11 (2001).
206. C. D. Madsen *et al.*, TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients, *HIV Clin Trials* **3**, 287–295 (2002).
207. M. Fogli *et al.*, Emergence of Exhausted B Cells in Asymptomatic HIV-1-Infected Patients Naïve for HAART is Related to Reduced Immune Surveillance, *Clinical and Developmental Immunology* **2012**, 1–10 (2012).
208. R. Tuveri *et al.*, Impact of TT virus infection in acute and chronic, viral- and non viral-related liver diseases, *J. Hepatol.* **33**, 121–127 (2000).
209. M. Ishimura *et al.*, Hepatitis-associated aplastic anemia during a primary infection of genotype 1a torque teno virus, *Eur. J. Pediatr.* **169**, 899–902 (2010).
210. T. Hussain, S. Manzoor, Y. Waheed, H. Tariq, K. Hanif, Phylogenetic analysis of torque teno virus genome from

- Pakistani isolate and incidence of co-infection among HBV/HCV infected patients, *Viol. J.* **9**, 320 (2012).
211. M. García-Álvarez *et al.*, Association of torque teno virus (TTV) and torque teno mini virus (TTMV) with liver disease among patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (2012), doi:10.1007/s10096-012-1744-1.
212. P. Kristian *et al.*, Impact of TTV and SENV infection in chronic hepatitis B or C on liver histology and therapy outcome, *Bratisl Lek Listy* **111**, 629–634 (2010).
213. M. Tsuge *et al.*, G to A hypermutation of TT virus, *Virus Res.* **149**, 211–216 (2010).
214. M. Irshad, K. Mandal, S. Singh, S. K. Agarwal, Torque teno virus infection in hemodialysis patients in North India, *Int Urol Nephrol* **42**, 1077–1083 (2010).
215. J.-Y. Chung *et al.*, Small Anellovirus Infections in Korean Children, *Emerg Infect Dis* **13**, 791–793 (2007).
216. P. Biagini, R. N. Charrel, P. de Micco, X. de Lamballerie, Association of TT Virus Primary Infection with Rhinitis in a Newborn, *Clin Infect Dis.* **36**, 128–129 (2003).
217. T. Kekarainen, J. Segalés, Torque Teno Sus Virus in Pigs: an Emerging Pathogen?, *Transbound Emerg Dis* (2012), doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01289.x.
218. L. Rammohan *et al.*, Increased prevalence of torque teno viruses in porcine respiratory disease complex affected pigs, *Vet. Microbiol.* **157**, 61–68 (2012).
219. H. zur Hausen, E. M. de Villiers, TT viruses: oncogenic or tumor-suppressive properties?, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **331**, 109–116 (2009).
220. P. Pineau *et al.*, Effect of TT virus infection on hepatocellular carcinoma development: results of a Euro-Asian survey, *J. Infect. Dis.* **181**, 1138–1142 (2000).
221. E.-M. de Villiers *et al.*, TTV infection in colorectal cancer tissues and normal mucosa, *International Journal of Cancer* **121**, 2109–2112 (2007).
222. G. Szládek *et al.*, High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma, *J. Clin. Pathol.* **58**, 402–405 (2005).
223. K. Tomasiewicz, R. Modrzewska, A. Lyczak, G. Krawczuk, TT virus infection and pancreatic cancer: relationship or accidental coexistence, *World J. Gastroenterol.* **11**, 2847–2849 (2005).
224. S. Calcaterra *et al.*, Cervicovaginal shedding of TT virus in HIV-infected women, *J. Hum. Virol.* **4**, 343–345 (2001).
225. C. Girard *et al.*, High Prevalence of Torque Teno (TT) Virus in Classical Kaposi's Sarcoma, *Acta Dermato-Venereologica* **87**, 14–17 (2007).
226. E. Fehér *et al.*, Comparison of diversity of torque teno virus 1 in different mucosal tissues and disorders, *Acta Microbiol Immunol Hung* **58**, 319–337 (2011).
227. P. Gergely Jr *et al.*, Increased prevalence of transfusion-transmitted virus and cross-reactivity with immunodominant epitopes of the HRES-1/p28 endogenous retroviral autoantigen in patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Immunol.* **116**, 124–134 (2005).
228. M. R. da Costa, I. P. da Costa, S. Devalle, A. R. C. M. de Castro, S. Z. Freitas, Prevalence and genetic diversity of torque teno virus in patients with systemic lupus erythematosus in a reference service in Mato Grosso do Sul, *Rev Bras Reumatol* **52**, 49–54 (2012).
229. H. Katano *et al.*, Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease, *Int J Clin Exp Pathol* **5**, 814–823 (2012).
230. M. Sospedra *et al.*, Recognition of Conserved Amino Acid Motifs of Common Viruses and Its Role in Autoimmunity, *PLoS Pathog* **1**, e41 (2005).
231. J. E. Libbey, R. S. Fujinami, Potential triggers of MS, *Results Probl Cell Differ* **51**, 21–42 (2010).
232. S. Devalle, F. Rua, M. G. Morgado, C. Niel, Variations in the frequencies of torque teno virus subpopulations during HAART treatment in HIV-1-coinfecting patients, *Arch. Virol.* **154**, 1285–1291 (2009).
233. J. K. Christensen *et al.*, Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus, *J. Infect. Dis.* **181**, 1796–1799 (2000).
234. P. Biagini *et al.*, Evolution of Anelloviridae strains distribution in serial blood and biopsy samples from a renal transplant patient, *J. Med. Virol.* **84**, 96–98 (2012).
235. G. Szládek *et al.*, Persisting TT virus (TTV) genogroup 1 variants in renal transplant recipients, *Arch. Virol.* **148**, 841–

- 851 (2003).
236. E. McElvania TeKippe *et al.*, Increased Prevalence of Anellovirus in Pediatric Patients with Fever, *PLoS ONE* **7**, e50937 (2012).
237. N. L. Yozwiak *et al.*, Virus Identification in Unknown Tropical Febrile Illness Cases Using Deep Sequencing, *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1485 (2012).
238. P. Simmonds *et al.*, TT virus--part of the normal human flora?, *J. Infect. Dis.* **180**, 1748–1750 (1999).
239. S.-K. Li *et al.*, Detection and identification of plasma bacterial and viral elements in HIV/AIDS patients in comparison to healthy adults, *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 1126–1133 (2012).
240. J.-N. Telles *et al.*, Viral and bacterial pathogens identification in children hospitalised for severe pneumonia and parapneumonic empyema, *Pneumonia* **1**, 11–19 (2012).
241. N. Richard *et al.*, The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **27**, 213–217 (2008).
242. G. Paranhos-Baccalà *et al.*, Mixed Respiratory Virus Infections, *Journal of Clinical Virology* **43**, 407–410 (2008).
243. D. Gendrel, Community-acquired pneumonia in children: etiology and treatment, *Arch Pediatr* **9**, 278–288 (2002).
244. A. Desrumaux *et al.*, [Epidemiology and clinical characteristics of childhood parapneumonic empyemas], *Arch Pediatr* **14**, 1298–1303 (2007).
245. K. D. Schultz *et al.*, The changing face of pleural empyemas in children: epidemiology and management, *Pediatrics* **113**, 1735–1740 (2004).
246. R. Gupta, S. Crowley, Increasing paediatric empyema admissions, *Thorax* **61**, 179–180 (2006).
247. E. Paraskakis, E. Vergadi, A. Chatzimichael, D. Bouros, Current evidence for the management of paediatric parapneumonic effusions, *Curr Med Res Opin* **28**, 1179–1192 (2012).
248. P.-E. Mangeot *et al.*, High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors, *Mol. Ther.* **5**, 283–290 (2002).
249. F. Faurez, D. Dory, A. Henry, S. Bougeard, A. Jestin, Replication efficiency of rolling-circle replicon-based plasmids derived from porcine circovirus 2 in eukaryotic cells, *J. Virol. Methods* **165**, 27–35 (2010).
250. S. A. Bustin *et al.*, The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, *Clin Chem* **55**, 611–622 (2009).
251. ICTV, Current virus taxonomy. International Committee on Taxonomy of Viruses (available at <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>).
252. R. W. Light, Parapneumonic Effusions and Empyema, *Proc Am Thorac Soc* **3**, 75–80 (2006).
253. S. F. T. Thijssen, R. Luderer, J. M. H. Van Gorp, S. J. G. Oudejans, A. W. J. Bossink, A Possible Role for Epstein-Barr Virus in the Pathogenesis of Pleural Effusion, *Eur Respir J* **26**, 662–666 (2005).
254. C. Meyers, T. J. Mayer, M. A. Ozbun, Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA, *J. Virol.* **71**, 7381–7386 (1997).
255. K. A. Foster, C. G. Oster, M. M. Mayer, M. L. Avery, K. L. Audus, Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism, *Exp. Cell Res.* **243**, 359–366 (1998).
256. C. Ehrhardt, M. Laue, K.-J. Kim, in *Drug Absorption Studies*, Biotechnology: Pharmaceutical Aspects. C. Ehrhardt, K.-J. Kim, Eds. (Springer US, 2008), pp. 258–282.
257. H.-U. Bernard, I. E. Calleja-Macias, S. T. Dunn, Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications, *Int. J. Cancer* **118**, 1071–1076 (2006).
258. D. Todd, M. S. McNulty, B. M. Adair, G. M. Allan, Animal circoviruses, *Adv. Virus Res.* **57**, 1–70 (2001).
259. Virus-Host Interactions, *Cell* **146**, 183 (2011).
260. R. J. Mason, Biology of alveolar type II cells, *Respirology* **11 Suppl**, S12–15 (2006).
261. S. Wu, J. P. Metcalf, W. Wu, Innate immune response to influenza virus, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**, 235–240 (2011).
262. F. Maggi *et al.*, TT virus loads and lymphocyte subpopulations in children with acute respiratory diseases, *J. Virol.* **77**, 9081–9083 (2003).
263. W. C. Russell, Adenoviruses: Update on Structure and Function, *J Gen Virol* **90**, 1–20 (2009).
264. L. N. Sørensen *et al.*, TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain, *J. Immunol.* **181**, 8604–8612 (2008).

265. S. Ruan *et al.*, Interleukin-12 and Host Defense against Murine Pneumocystis Pneumonia, *Infect Immun* **76**, 2130–2137 (2008).
266. C. Mathieu *et al.*, Lethal Nipah Virus Infection Induces Rapid Overexpression of CXCL10, *PLoS One* **7** (2012), doi:10.1371/journal.pone.0032157.
267. T. Bouwmeester *et al.*, A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway, *Nat. Cell Biol.* **6**, 97–105 (2004).
268. S. Beinke, M. J. Robinson, M. Hugunin, S. C. Ley, Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105, *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9658–9667 (2004).
269. M. Vougioukalaki, D. C. Kanellis, K. Gkouskou, A. G. Eliopoulos, Tpl2 kinase signal transduction in inflammation and cancer, *Cancer Letters* **304**, 80–89 (2011).
270. T. Lammers, S. Lavi, Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**, 437–461 (2007).
271. S. Tamura *et al.*, PP2C family members play key roles in regulation of cell survival and apoptosis, *Cancer Sci.* **97**, 563–567 (2006).
272. A. M. Silverstein *et al.*, in *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*, Ralph A. Bradshaw, Edward A. Dennis, Eds. (Academic Press, San Diego, 2010), pp. 1353–1365.
273. J. Guernon *et al.*, PP2A targeting by viral proteins: A widespread biological strategy from DNA/RNA tumor viruses to HIV-1, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1812**, 1498–1507 (2011).
274. M.-S. Dai, H. Lu, Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5, *J. Biol. Chem.* **279**, 44475–44482 (2004).
275. M. Zhang, L. Wang, C. Chen, Y. Yang, L. Zhang, [Role of dendritic cells in the pathogenesis of severe pneumonia in children], *Zhonghua Er Ke Za Zhi* **43**, 410–413 (2005).
276. H. M. Friedman, Immune evasion by herpes simplex virus type 1, strategies for virus survival., *Trans Am Clin Climatol Assoc* **114**, 103–112 (2003).
277. I. L. Dodge, M. W. Carr, M. Cernadas, M. B. Brenner, IL-6 Production by Pulmonary Dendritic Cells Impedes Th1 Immune Responses, *J Immunol* **170**, 4457–4464 (2003).
278. D. J. Cua, C. M. Tato, Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 479–489 (2010).
279. H. Hackstein, A. W. Thomson, Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs, *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 24–34 (2004).
280. M. E. Rothenberg, S. P. Hogan, The Eosinophil, *Annual Review of Immunology* **24**, 147–174 (2006).
281. E.-M. de Villiers, H. zur Hausen, Eds., *TT Viruses: The Still Elusive Human Pathogens* (Springer Berlin Heidelberg, ed. 2009, 2009).
282. G. L. Rogers *et al.*, Innate Immune Responses to AAV Vectors, *Front Microbiol* **2**, 194 (2011).
283. M. J. Walter, N. Kajiwara, P. Karanja, M. Castro, M. J. Holtzman, Interleukin 12 p40 production by barrier epithelial cells during airway inflammation, *J. Exp. Med.* **193**, 339–351 (2001).
284. A. D. Lehmann *et al.*, An in vitro triple cell co-culture model with primary cells mimicking the human alveolar epithelial barrier, *Eur J Pharm Biopharm* **77**, 398–406 (2011).
285. B. Rothen-Rutishauser, F. Blank, C. Mühlfeld, P. Gehr, In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 1075–1089 (2008).
286. T. M. Rivers, Viruses and Koch's Postulates, *J. Bacteriol.* **33**, 1–12 (1937).

Ma belle aventure de la thèse s'achève sur ces mots.

Ne reste que l'avenir à inventer et à écrire.

Résumé

La pneumonie est la première cause de mortalité chez l'enfant dans le monde. Elle peut être provoquée par un certain nombre d'agents pathogènes connus mais 15 à 35% des pneumonies de l'enfant restent encore non renseignées d'un point de vue étiologique. L'utilisation d'un test moléculaire de découverte de nouveaux pathogènes nous a permis de découvrir de nouvelles espèces de Torque Teno Mini Virus (TTMV, *Anelloviridae*), nommées TTMV-LY, dans trois épanchements pleuraux provenant d'enfants hospitalisés avec une pleuro-pneumopathie, dont l'étiologie demeurait inconnue. Les TTMV sont des virus ubiquitaires dont l'implication dans une pathologie reste à déterminer. Les voies respiratoires ayant précédemment été décrites pour être un site d'infection des anellovirus, nous avons entrepris de caractériser ces nouveaux virus, ainsi que d'étudier leur potentiel rôle dans la pathogénèse.

Les génomes complets de TTMV-LY ont été isolés, caractérisés puis répliqués *in vitro*. La réponse des cellules épithéliales alvéolaires, ainsi que des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), impliquées dans l'inflammation, a été étudiée après infection par les virions néo-synthétisés.

Ces travaux ont démontré que : i) les TTMV-LY peuvent coloniser les poumons en profondeur, ii) les cellules pulmonaires sont permissives aux TTMV-LY et permettent une réplication virale efficace, iii) l'infection virale module les réponses cellulaires et immunitaires des cellules pulmonaires en induisant des dérégulations de l'expression génique et la production de médiateurs inflammatoires, iv) les TTMV-LY seraient capables d'interagir avec les CPA et de réguler ainsi différenciellement le processus inflammatoire.

L'ensemble de ces résultats ont permis de mettre en évidence une implication potentielle des TTMV-LY dans la pathogénèse des pneumopathies, et souligné la complexité des mécanismes biologiques mis en jeu lors de l'infection par les virus de cette famille.

Abstract

Pneumonia is the leading cause of death in children worldwide. It can be caused by a number of known pathogens, but 15-35% of childhood pneumonia are still not associated with an etiologic agent. A pathogen discovery assay allowed us to identify new species of Torque Teno Mini Virus (TTMV, *Anelloviridae*), named TTMV-LY, in three undiagnosed pleural effusions from children hospitalized with parapneumonic empyema. TTMV are ubiquitous orphan viruses, and their involvement in pathogenesis remains unknown. The respiratory tract was previously described to be a site of anellovirus detection. We investigated the role of these new species in the pathogenesis of severe pneumonia.

Full-length TTMV-LY genomes were isolated and *in vitro* replicated. The response of alveolar epithelial cells, and antigen presenting cells (APC), both involved in the inflammation process, was studied after infection with neo-synthesized virions.

This study showed for the first time that: i) TTMV-LY can deeply colonize lungs, ii) alveolar epithelial cells are permissive to the TTMV-LY and allow an efficient replication, iii) viral infection modulates cellular and innate immune responses of alveolar epithelial cells, by inducing gene expression deregulations and inflammatory mediators production, iv) TTMV-LY are able to interact with APC and thereby regulate differentially their inflammatory process.

All these results allowed to highlight a potential involvement of TTMV-LY in the pathogenesis of severe pneumonia and brought out the complexity of the biological mechanisms taking place during infection by viruses of this family.

Mots-clé : Pneumonie, épanchement pleural, TTMV, phylogénie, réplication virale, réponse immunitaire innée, médiateurs inflammatoires solubles, dérégulation de l'expression génique.

Keywords : Pneumonia, parapneumonic effusion, TTMV, phylogeny, viral replication, innate immune response, soluble inflammatory mediators, gene expression deregulation.