



HAL
open science

Immunomodulation induite par la pré-sensibilisation per os à Norovirus dans un modèle murin de pneumonie aiguë à *Pseudomonas aeruginosa*

Marion Thépaut

► **To cite this version:**

Marion Thépaut. Immunomodulation induite par la pré-sensibilisation per os à Norovirus dans un modèle murin de pneumonie aiguë à *Pseudomonas aeruginosa*. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S033 . tel-01285182

HAL Id: tel-01285182

<https://theses.hal.science/tel-01285182>

Submitted on 8 Mar 2016

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.

UNIVERSITÉ LILLE 2 – DU DROIT ET DE LA SANTÉ

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ DE LILLE

THÈSE D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Maladies infectieuses

Présentée et soutenue par Marion THÉPAUT

**Immunomodulation induite par la pré-sensibilisation *per os*
à *Norovirus* dans un modèle murin de pneumonie aiguë à
*Pseudomonas aeruginosa***

Thèse dirigée par Monsieur le Professeur Benoit GUERY

Soutenue publiquement le 25 septembre 2015

Jury :

Docteur Florence ADER	Rapporteur
Professeur David BOUTOILLE	Rapporteur
Professeur Didier HOBBER	Président du jury
Docteur Rozenn LE BERRE	Examineur
Docteur Thomas HUBERT	Examineur
Professeur Benoit GUERY	Directeur de Thèse

Á Teddy,
Á mes Parents, Á Audrey

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier les Professeurs David Boutoille, Didier Hober et les Docteurs Florence Ader, Rozenn Le Berre et Thomas Hubert d'avoir accepté de prendre part à l'évaluation de mon travail de thèse.

Mes remerciements s'adressent ensuite à mon directeur de thèse et directeur de l'équipe d'accueil EA 7366 recherche translationnelle hôte-pathogène *Pseudomonas aeruginosa*, le Professeur Benoit Guery. Merci de m'avoir recueillie au sein de votre laboratoire lorsque les temps furent incertains. Je remercie à nouveau le professeur Benoit Guery pour sa disponibilité ainsi que son aide et soutien apportés tout au long de ce travail et durant la rédaction de ce mémoire.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Rodrigue Dessein pour m'avoir initialement accompagnée et soutenue lors de la réalisation de mon Master 2. Merci pour sa gentillesse et ses encouragements qui m'ont accompagnée durant ces années supplémentaires.

Je remercie l'ensemble des encadrants de l'EA 7366, les Professeurs Karine Faure et Eric Kipnis, et le Docteur Rodrigue Dessein. Merci de m'avoir écoutée, soutenue et conseillée. Je remercie ma collègue de galère le Docteur Perrine Bortolotti pour son aide. Je termine les remerciements de l'équipe EA 7366 par son pilier Teddy Grandjean autoproclamé « roi du labo ». Merci pour ton soutien immuable et ton aide précieuse.

J'adresse également mes remerciements au Professeur Didier Hober directeur du laboratoire de virologie EA 3610, rencontré dans le cadre de mon Master 2. Merci d'avoir continué à m'accompagner au-delà du Master ainsi que pour votre expertise et collaboration chaleureuse et décisive au cours de ces années.

J'en profite pour remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de Virologie EA 3610 et en particulier Madame Delphine Lobert et le Docteur Pierre Emmanuel Lobert pour leur aide précieuse, leur rigueur et les nombreux conseils qu'ils ont pu m'apporter. Je remercie à nouveau le Professeur Didier Hober pour avoir fourni la souche de norovirus murin S99 ainsi que les cellules Raw 264.7, indispensables à la réalisation de ce travail.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'animalerie de l'institut Pasteur de Lille et plus particulièrement Thierry Chassat et Antony Mourray pour leur gentillesse disponibilité et conseils

Je souhaite remercier également Teddy, Sylvain, Ludivine et Aurélie pour tous les bons moments passés ensemble et sans lesquels la vie à Lille aurait été plus monotone.

Merci à mes parents et à ma sœur Audrey, d'avoir toujours cru en moi. Teddy, merci de m'accompagner dans le travail et dans la vie. Merci à Marilyne et Michel pour m'avoir accueillie si chaleureusement dans votre famille.

Résumé

Le norovirus murin (MNV) est un agent pathogène de la souris récemment découvert, il représente le contaminant le plus courant dans les animaleries de recherche. Néanmoins, les effets de l'infection du MNV sur la recherche biomédicale ne sont pas encore clairs. L'hypothèse que l'infection par le MNV pourrait modifier la réponse immunitaire chez les souris atteintes d'une infection pulmonaire aiguë a été testée au cours de cette étude.

Cette étude a testé directement l'effet de la souche S99 du norovirus murin sur un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë. Les résultats démontrent sans équivoque que la souche S99 du norovirus murin module la réponse induite à une infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*.

In vitro, la souche S99 est capable de diminuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire par les BMDMs en réponse à une infection à la souche CHA de *P. aeruginosa*. Les modèles *in vivo* ont mis en évidence que le MNV augmente la survie des souris ayant une infection pulmonaire aiguë à CHA. L'amélioration, par le MNV, du pronostic vital de ces souris est consécutive à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoire et de chimiokines, ainsi que du recrutement de cellules immunitaires, en particulier des neutrophiles. Par conséquent, la lésion pulmonaire provoquée par l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* et la réponse pro-inflammatoire excessive sont réduites.

Ainsi, ces résultats suggèrent que l'infection au MNV peut profondément modifier les paramètres étudiés dans les modèles classiques d'infections et mener à de fausses conclusions dans ces modèles expérimentaux. Compte tenu de la prévalence du norovirus murin dans la recherche animale, il est maintenant nécessaire de considérer ce paramètre.

Abréviations

AANE : Acide Aminé Non Essentiel

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ANOVA : One Way Analysis Of Variance

ARN : Acide Ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

ATG16L1 : Autophagy-related gene 16-like 1

BCP : Bromo-Cresol Purple agar

BET : Bromure d'éthidium

BMDM : Bone marrow derived macrophage

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

Ct : Cycle seuil

CXCL : Chimiokine à motif CXC

DAMP : Damage-associated molecular patterns (Motifs moléculaires associés aux dommages)

DC : Cellules dendritiques

DICT50 : Dose infectieuse cytopathogène 50%

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DO: Densité optique

DTT : Dithiothréitol

ECACC : European Collection of Cell Cultures

ECP : Effet cytopathique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FELASA : the Federation of Laboratory Animal Science Associations

HI FBS: Heat inactivated fetal bovine serum

HRP : Horseradish peroxidase

HuNoV: Human Norovirus

ICTV : Comité International de Taxonomie des Virus

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IN : Intra-nasale

IP : Intra-péritonéal

IRF : Interferon- regulatory factor 3

LB : Lysogeny broth

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

LPS : Lipopolysaccharide

M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor

MLN : Mesenteric Lymph Nodes

MNV : Norovirus murin

MOI : Multiplicity of infection

MyD88 : Myeloid Differentiation 88

ND : Non détecté

NLR : Nod like receptor

NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B

NoV : Norovirus

NS : Non significatif

ORF : Open reading frame (Cadre de lecture ouvert)

PAMP : Pathogen-associated molecular patterns (Motifs moléculaires associés aux pathogènes)

PBS : Phosphate-buffered saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PNN : Polynucléaires neutrophiles

PRR : Pattern recognition Receptors (Récepteur de reconnaissance des motifs)

Q-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

QS : Quorum sensing

QSP : Quantité suffisante pour

Rag-2 : Recombination activating gene 2

RIP : Receptor-interacting protein

RT : Rétro-transcription

SRSV : Small Round Structured Viruses

SST : Système de sécrétion de type

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

TBE : Tris Borate EDTA

TCR : T cell receptor

TCID50 : 50% tissue culture infectious dose

TGI : Tractus gastro-intestinal

TLR : Toll like receptor

T_m : Melting temperature

TNF : Tumor Necrosis Factor

UFC : Unité formant colonie

UFP : Unité formant plaque

UV : Ultraviolet

VF1 : Virulence factor 1

VPg : Viral Protein linked to genome

WT : Wild type

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Visualisation par microscopie électronique d'un agrégat de Norwalk virus.....	19
<u>Figure 2</u> : Classification du <i>Norovirus</i> dans la famille des <i>Caliciviridae</i>	20
<u>Figure 3</u> : Représentation schématique de la structure du génome des norovirus humain et murin.	21
<u>Figure 4</u> : Représentation schématique du cycle de multiplication du <i>Norovirus</i>	25
<u>Figure 5</u> : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
<u>Figure 6</u> : Les principaux facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
<u>Figure 7</u> : Le Quorum sensing de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
<u>Figure 8</u> : Protocole d'infection des BMDMs.....	76
<u>Figure 9</u> : Chronologie du protocole d'infection.....	81
<u>Figure 10</u> : Protocole du modèle de survie.....	82
<u>Figure 11</u> : Protocole du modèle d'infection aiguë.....	82
<u>Figure 12</u> : Le norovirus murin S99 induit une inhibition de la production d'IL-6 et du TNF- α par les BMDMs en réponse à <i>P. aeruginosa</i>	91
<u>Figure 13</u> : Recherche de MNV par PCR.....	93
<u>Figure 14</u> : Survie à 96 heures.....	95
<u>Figure 15</u> : Evaluation physiologique et de la perméabilité alvéolo-capillaire.....	98
<u>Figure 16</u> : Paramètres microbiologiques	99
<u>Figure 17</u> : La réponse inflammatoire analysée par ELISA.....	100
<u>Figure 18</u> : La réponse pro-inflammatoire analysée par RT-QPCR	101
<u>Figure 19</u> : La production de Chimioquinas.	102
<u>Figure 20</u> : Déroulement de la réponse immunitaire à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , suivant la pré-infection ou non au norovirus murin.....	108

Listes de tableaux

<u>Tableau 1</u> : Nomenclature et fonctions des protéines du HuNV et du MNV	22
<u>Tableau 2</u> : Amorces pour l'amplification du MNV.....	78
<u>Tableau 3</u> : Critères d'évaluation du score clinique.....	83
<u>Tableau 4</u> : Oligonucléotides utilisées lors de cette étude	88

Table des Matière

Remerciements	4
Résumé	6
Abréviations.....	7
Liste des figures	11
Liste des tableaux.....	12
Partie 1 : Introduction	18
Chapitre 1 : Le <i>Norovirus</i>	18
1- Historique.....	18
2- Classification et génogroupes	19
3- Caractéristiques et structures virales	21
3-1. Morphologie et organisation génomique	21
3-2. Propriétés physiques	23
4- Cycles de multiplication	23
4-1. Attachement et mécanismes d'entrée du <i>Norovirus</i>	24
4-2. Décapsidation virale.....	24
4-3. Traduction des protéines virales	24
4-4. Réplication génomique	27
4-5. Assemblage et sortie du virus	27
5- Le norovirus murin.....	28
5-1. Généralités	28
5-2. Le tropisme du norovirus murin	29
5-3. Mécanismes immunitaires contrôlant l'infection au norovirus murin	29
5-4. Epidémiologie	30
5-4. Influence du MNV dans un modèle animale	30

Chapitre 2 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
1- Caractéristiques	32
2- Habitat	33
3- Les principaux facteurs de virulence	34
3-1. Facteurs de virulence de la surface cellulaire bactérienne	35
3-2. Facteurs de virulence secrétés	38
3-3. Le système de sécrétion de type III (SSTT) et ses toxines	41
3-4. Le Quorum sensing	43
4- En pathologie	45
 Chapitre 3 : Immunité innée dans une infection pulmonaire à <i>P. aeruginosa</i>	47
1- Mécanismes de défenses mécaniques	47
2- La reconnaissance de <i>P. aeruginosa</i> dans les voies respiratoires: le rôle des pattern recognition receptors	48
3- Les cellules épithéliales: détection et signalisation	49
4- <i>P. aeruginosa</i> reconnu par l'inflammasome	50
5- Cellules immunitaires innées: rôles dans la reconnaissance et la clairance de <i>P. aeruginosa</i>	51
5-1. Granulocytes neutrophiles	51
5-2. Macrophages alvéolaires	55
5-3 Les cellules dendritiques	56
5-4 Les lymphocytes	57
6-Signaux modulant la réponse immunitaire innée à <i>P. aeruginosa</i> ..	58
6-1. TNF- α	58
6-2. IL-6	59
6-3. IL-1 et IL-8	60
6-4. IL-17 et IL-23	61
6-5. IL-10	61
6-6. Les chimiokines	62

Chapitre 4 : La réponse immune détermine le pronostic de l'hôte.....	63
1- La théorie: « The damage-response framework of microbial pathogenesis »	63
2- Une réponse immunitaire excessive est néfaste pour l'hôte.....	64
Chapitre 5 : Objectifs de ce travail	66
Partie 2 : Matériels et Méthodes	68
Chapitre 1 : Lignées cellulaire, souches bactérienne et virale	68
1- Lignées cellulaire	68
1-1. Les cellules Raw 264.7	68
1-2. Les cellules L929	68
2- Norovirus murin	70
2-1. La souche MNV S99.....	70
2-2. Production virale.....	70
2-3. Concentration de la suspension virale.....	71
2-4. Titrage du virus par effet cytopathique	71
3- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
3-1. La souche CHA.....	72
3-2. Condition de culture des bactéries	72
Chapitre 2 : Etude de la réponse de l'hôte <i>in vitro</i>.....	74
1- Récupération et culture des macrophages dérivés de la moelle osseuse	74
1-1. Obtention des cellules de la moelle osseuse	74
1-2. Culture et différenciation des cellules de la moelle osseuse	74
2- Infection des BMDMs.....	75
3- Dosage des cytokines dans les surnageants de BMDMs	75

Chapitre 3 : Détection du MNV	77
1- Extraction des ARN viraux de fèces.....	77
2- Rétro-transcription.....	77
3- La polymérisation en chaîne	78
4- Electrophorèse de l'ADN	78
Chapitre 4 : Modèle murin d'infection pulmonaire	80
1- Animaux.....	80
2- Instillation par gavage de l'inoculum viral	80
3- Instillations intra-nasales et inocula bactériens.....	80
4- Modèle de survie à 96 heures	81
5- Modèle d'agression pulmonaire aiguë	82
6- Score clinique	82
7- Mise à mort des souris	83
Chapitre 5 : Analyse de la réponse de l'hôte	84
1- Exsanguination	84
2- Lavage broncho alvéolaire	84
3- Formule des liquides de lavage broncho alvéolaire.....	84
4- Quantification de la charge bactérienne pulmonaire.....	85
5- Dissémination splénique.....	85
6- Evaluation de la lésion pulmonaire	85
7- Dosage des cytokines dans le surnageant de LBA par ELISA	86
8- Mesures de l'expression des transcrits par PCR quantitative	86
8-1. Extraction des ARN des tissus pulmonaires	86
8-2. Dosages des acides nucléiques.....	86
8-3. PCR quantitative	87
8-4. Analyse par la méthode des comparatives CT	89
Chapitre 6 : Analyses statistiques.....	90

Partie 3 : Résultats	91
Chapitre 1 : Le MNV induit une inhibition de l'IL-6 et du TNF-α par les BMDMs en réponse à <i>P. aeruginosa</i>	91
Chapitre 2 : Confirmation du statut sanitaire.....	93
Chapitre 3 : L'infection au norovirus murin augmente la survie des souris dans un modèle de pneumonie aiguë à <i>P. aeruginosa</i>	95
Chapitre 4 : Le norovirus murin entraîne une variation des paramètres de réponse de l'hôte à l'infection pulmonaire à <i>P. aeruginosa</i>	97
1- L'infection au norovirus murin diminue les lésions pulmonaires à <i>P. aeruginosa</i> ainsi que le recrutement cellulaire et la dissémination bactérienne.....	97
2- L'infection au norovirus murin module la réponse pro-inflammatoire induite par <i>P. aeruginosa</i>	99
3- L'infection au norovirus murin module la production de chimiokines en réponse à une infection pulmonaire à <i>P. aeruginosa</i>	102
Partie 4 : Discussion	103
Partie 5 : Conclusions et Perspectives	110
Partie 6 : Publications.....	114
1- Articles Scientifiques	114
2- Communication oral.....	114
4- Communication affichée	114
Partie 7 : Travaux réalisés en collaboration au cours de la thèse .	115
Partie 8 : Bibliographie	116

Partie 1 : Introduction

Chapitre 1 : Le Norovirus

1- Historique

L'étude des *Norovirus* (NoV) a commencé en 1968 dans une école primaire de Norwalk en Ohio aux Etats-Unis [1]. Une épidémie de gastroentérite mêlant diarrhée et vomissement se déclara chez 50 % des élèves et des professeurs et 32,3 % des familles en contact. Néanmoins, l'agent étiologique de cette affection qualifiée de « winter vomiting disease » ou « hyperemesis hiemis » n'a pu être isolé [2]. En 1972, des particules virales ont été visualisées par microscopie électronique dans des échantillons de fèces provenant de volontaires infectés *per os* par des filtrats de matières fécales provenant d'enfants infectés lors de l'épidémie de 1968 [3, 4]. L'agent étiologique responsable est alors dénommé Agent de Norwalk en référence à la ville de sa découverte.

La découverte du virus de Norwalk comme pathogène entérique a favorisé le développement de ce domaine de recherche ainsi que la découverte de nombreux autres virus entériques nommés SRSV pour Small Round Structured Viruses de par leur aspect général en microscopie électronique [5–7].

Depuis les années 1990, l'essor des techniques de biologies moléculaires et notamment du séquençage du génome complet du virus de Norwalk a permis d'enrichir les connaissances sur ces virus [8, 9].

Par conséquent, des souches de *Norovirus* ont pu être identifiées comme responsable d'infection symptomatique ou asymptomatique dans différentes espèces animales dont les bovins [10, 11], les cochons [12, 13], les moutons [14], les lions [15] et chien [16]. Récemment, des souches de NoV ont été isolés chez des souris de laboratoire aussi bien immunodéficientes qu'immunocompétentes, il s'agit du norovirus murin ou MNV [17, 18].

Aujourd'hui le norovirus humain est reconnu comme le principal agent responsable des gastroentérites aiguës d'origine non bactériennes à travers le monde [19, 20]. Les épidémies sont fréquentes dans les endroits où les gens sont en contact étroit tels les écoles [21, 22], les centres hospitaliers [23, 24], les garderies [25], les paquebots de croisière [26–28] et les restaurants [29, 30]. Malgré l'impact sanitaire et économique qu'il suscite, il n'existe

actuellement aucun système de culture cellulaire du norovirus humain ce qui retarde les avancés de la recherche.

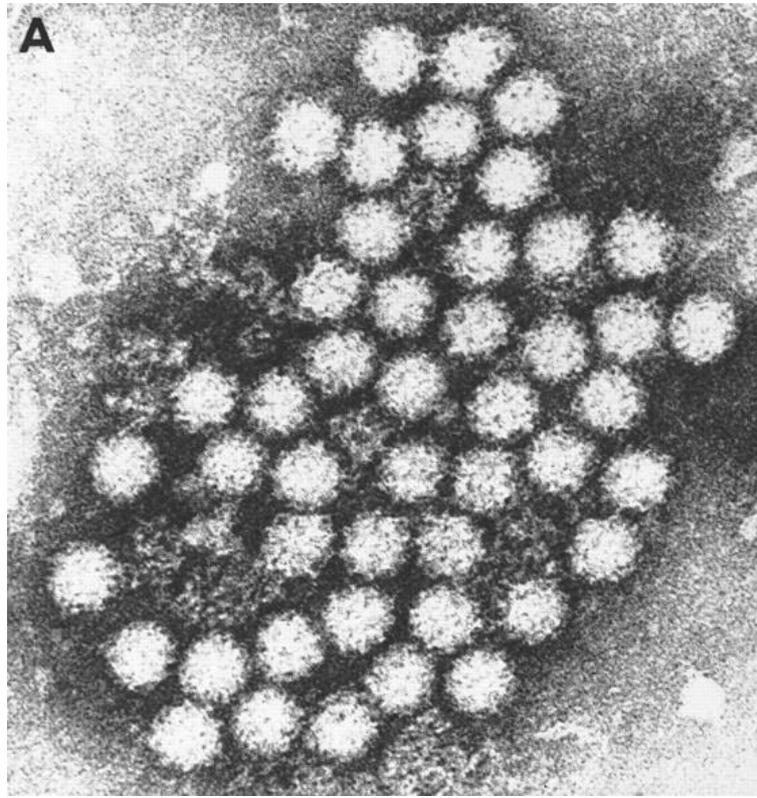


Figure 1: Visualisation par microscopie électronique d'un agrégat de Norwalk virus. [4]

2- Classification et génogroupes

Lors des premières études épidémiologiques, les souches de *Norovirus* étaient classées selon leur apparence décrite en microscopie électronique et nommées selon la localisation où elles ont sévis (virus de Norwalk, Southampton, Desert Shield, Snow Mountain, Mexico, Toronto et Hawaii). Avec le développement des techniques moléculaires permettant de définir des similarités et des variations entre les séquences des ARNs, une nouvelle nomenclature a été adoptée par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) en 1998.

Ainsi, les *Norovirus* ont été classés dans la famille des *Caliciviridae* du nom dérivé du latin *calyx*, signifiant coupe ou gobelet et se référant aux dépressions en forme de coupes visibles en microscopie électronique. Cette famille est divisée en 5 genres: les *Lagovirus*, les *Vesivirus*, les *Sapovirus*, les *Norovirus*, anciennement Norwalk-like virus et les *Nebovirus* [31, 32] (Figure 2). Les *Norovirus* et *Sapoviruses* ont été décrits comme agents pathogènes de maladies entériques chez les humains et un large éventail d'autres mammifères [33]. Les

Lagovirus provoquent une maladie hémorragique mortelle chez les lièvres et lapins, les *Vesivirus* causent diverses maladies chez des hôtes variés (félins, porcine, reptiles, amphibiens, poissons...). En 2002, un virus enteropathogène bovin, le *Nebovirus*, a été classé comme le cinquième du genre de la famille des *Caliciviridae* [34]. Deux autres genres ont été proposées plus tard, le *Recovirus* représentant un nouveau *Calicivirus* détecté dans les échantillons de selles de singes rhésus [35, 36] et le *Valovirus* représentant un nouveau groupe de *Calicivirus* porcine [37]. D'autres *Calicivirus* ont également été présentés mais non classés, comme le *Calicivirus* de poulet récemment décrit [38, 39].

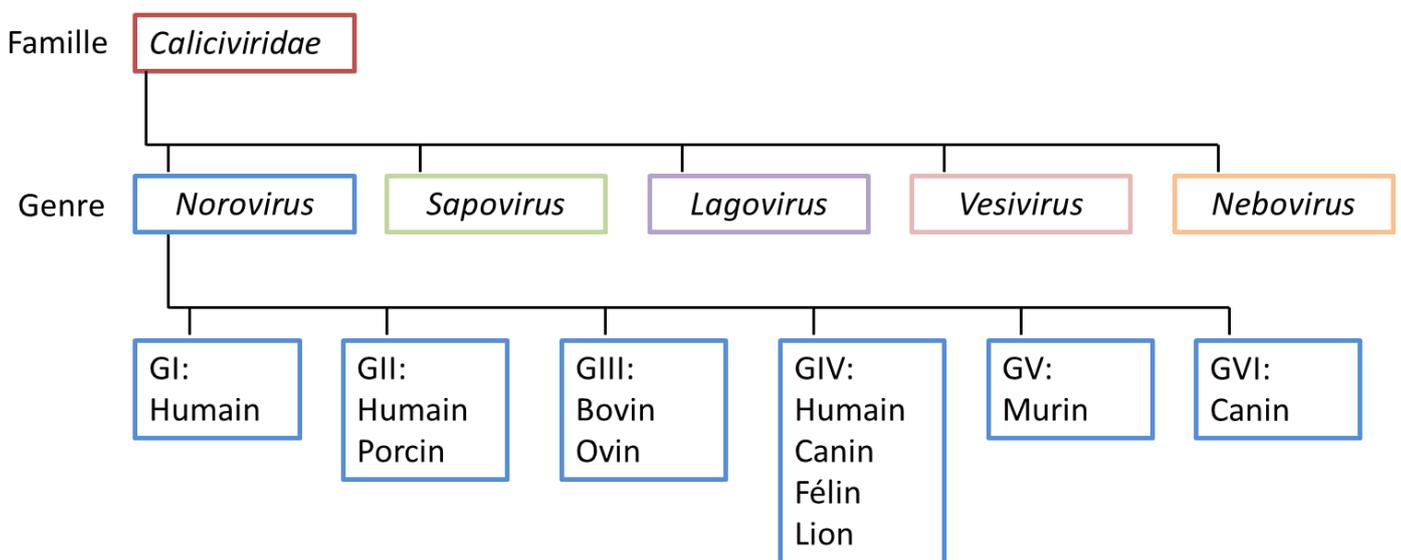


Figure 2 : Classification du *Norovirus* dans la famille des *Caliciviridae*. Seuls les cinq genres reconnus actuellement sont présentés, G pour génogroupes. (d'après [40])

Le séquençage complet de la protéine de capsid, VP1, a permis de subdiviser le genre *Norovirus* en au moins cinq génogroupes (GI-V) (Figure 2). Les génogroupes GI, GII et GIV infectent les humains et provoquent une gastro-entérite aiguë [31, 41, 42], mais des *Norovirus* ont également été isolés chez de nombreuses autres espèces, y compris les porcs (GII) [43], les bovins et les ovins (GIII) [10, 14, 44], les félins et les canins (GIV) [15]. Enfin, les *Norovirus* du génogroupe V sont d'origine murine et constituent un sérotype unique [17, 18]. Plus récemment, un nouveau *Norovirus* a été identifié chez des chiens domestiques souffrant de diarrhée et a été proposé pour représenter un nouveau génogroupe GVI [45].

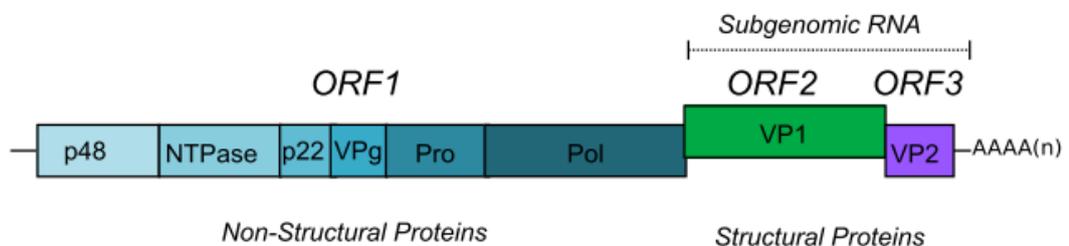
3- Caractéristiques et structures virales

3-1. Morphologie et organisation génomique

Le *Norovirus* est un virus non enveloppé et à capsidre icosaédrique de 27 à 40 nm. Son génome est constitué d'un ARN monocaténaire à polarité positive de 7300 à 7500 nucléotides. L'ARN génomique est attaché de façon covalente à la protéine VPg (Viral Protein linked to genome) qui fournit une coiffe à la partie 5' et possède en 3' une queue poly(A). Les UTRs (three prime untranslated region) des génomes du norovirus sont généralement courts. Ces structures sont importantes pour la réplication virale, la traduction et la pathogenèse du virus.

Le génome du *Norovirus* est organisé en 3 cadres de lecture ouverts (ORF) très conservés (ORF1, ORF2 et ORF3) à l'exception du MNV qui possède un quatrième ORF (Figure 3). Ce quatrième ORF est propre au cluster MNV GV et n'a encore été identifié chez aucun autre *Norovirus*. Les seuls membres de la famille des *Caliciviridae* possédant un quatrième ORF équivalent sont les sapovirus humain [46, 47].

Human Norovirus



Murine Norovirus

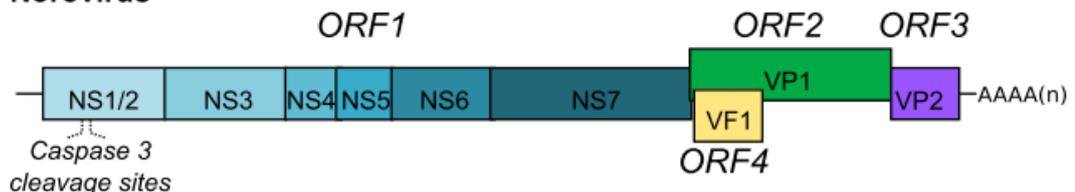


Figure 3 : Représentation schématique de la structure du génome des norovirus humain et murin (D'après [40])

La nomenclature des protéines du *Norovirus* n'a pas encore été unifiée dans la littérature et est résumée dans le tableau 1

Tableau 1 : Nomenclature et fonctions des protéines du HuNV et du MNV.

MNV	HuNV	Fonctions
NS1/2	P48 (N_term)	Formation du complexe de réplication, contribue à la persistance du MNV
NS3	NTPase (2C-like)	RNase hélicase/NTPase
NS4	P22 (3A-like)	Formation du complexe de réplication
NS5	VPg	Protéine liée au génome impliquée dans la traduction et la réplication
NS6	Pro (3C-like)	Protéase
NS7	Pol/3Dpol	RdRp (RNA-dependent RNA polymerase)
VP1	VP1	Protéine majeure de la capside
VP2	VP2	Protéine mineure de la capside
VF1	Pas d'équivalent	Facteur de virulence

Pour tous les norovirus, l'ORF1 code pour une polyprotéine d'environ 195 kDa qui est clivée par la protéase virale « 3C like » (NS6) pour libérer au moins six protéines non structurales (NS) matures, y compris NS6 [48] (Figure 3). Les autres protéines non structurales libérées comprennent l'ARN polymérase ARN dépendante (Pol; NS7), la VPg (NS5), une putative NTPase / ARN hélicase (NS3) et NS1/2 (p48) et NS4 (p22), dont certaines sont impliquées dans la formation du complexe de réplication [49, 50].

L'ORF2 d'environ 1,8 kb code pour la protéine majeure de la capside virale, la VP1 (viral protein 1) de 57 kDa constituée de 550 acides aminés.

L'ORF3, d'approximativement 0.6kb, est situé à l'extrémité 3' et code pour la protéine mineure de la capsid virale nommée VP2.

L'ORF4 du norovirus murin est traduite à partir d'un cadre de lecture alternative au sein de l'ORF2 et code pour un facteur de virulence 1 (VF1). Le produit de ce cadre de lecture alternatif engendre une régulation de la réponse immunitaire innée ainsi que l'apoptose cellulaire [46].

L'ARN subgénomique est identique aux dernières 2400pb du génome et est fixé de manière covalente à la protéine VPg en 5' et à une queue poly (A) à l'extrémité 3'

3-2. Propriétés physiques

Très résistant, les *Norovirus* sont extrêmement stables dans l'environnement [51]. Ce virus est capable de résister à la congélation ainsi qu'à la chaleur et aux variations de température, aux rayons UV, aux différentes conditions de pH acides ou basiques [52]. De plus les *Norovirus* sont résistants aux radiations dont les rayons gamma. Par conséquent, les doses utilisées dans l'industrie agroalimentaire, afin de contrôler le développement bactérien, pourraient être insuffisantes pour détruire le virus. Une étude a mis en évidence que le norovirus murin est sensible à l'eau de javel (0,26 %) et à la povidone iodée alors qu'il peut être résistant à d'autres solutions aseptiques ou désinfectants [53].

La grande stabilité du *Norovirus* dans l'environnement contribue à un taux élevé de transmission car il est souvent difficile d'éliminer le virus totalement. Ainsi les quelques virions restant sont suffisants pour infecter un nouvel individu.

4- Cycles de multiplication

Actuellement, le norovirus humain reste incultivable *in vitro*, ce qui entrave la caractérisation du cycle de multiplication du virus. Avant la découverte du MNV en 2003, de nombreux autres membres de la famille des *Caliciviridae* ont été largement utilisés comme modèles pour étudier la biologie du *Norovirus*. A l'heure actuelle, le norovirus murin, le seul *Norovirus* capable de se répliquer de manière efficace en culture cellulaire, joue un rôle important dans l'élucidation des mécanismes clés de la biologie des *Norovirus*. Le cycle de

multiplication virale peut être divisé en différentes étapes schématiquement représentées dans la figure 4.

4-1. Attachement et mécanismes d'entrée du *Norovirus*.

La première étape de l'infection est l'attachement spécifique du virus à la surface cellulaire. Les NoVs humains reconnaissent à la surface des cellules épithéliales digestives des structures glycaniques appartenant à la famille des antigènes tissulaires de groupe sanguin (HBGAs) [54–57]. Le site de reconnaissance de ces glycanes sur la capsid du virus est situé dans la région P2 de la protéine VP1 [58]. Le norovirus murin, d'une manière dépendante de la souche, se lie aux cellules hôtes par l'intermédiaire de résidus d'acide sialique, présents sur des glycolipides et des glycoprotéines [59, 60]. Le mécanisme par lequel le MNV s'internalise dans les cellules n'a pas encore été élucidé entièrement, mais il est dépendant de la dynamine II, du cholestérol ainsi que du pH [61, 62].

4-2. Décapsidation virale

Pour les virus non enveloppés, la capsid véhicule le génome viral à partir d'un hôte infecté vers un hôte naïf. La capsid protéique protège, transporte et libère le génome dans le cytoplasme (décapsidation). Les mécanismes de décapsidation du MNV restent encore non élucidés et peuvent être activés par différents déclencheurs environnementaux. Le virus peut exiger pour sa décapsidation une acidification des endosomes, un clivage de la protéase, ou une interaction directe avec un récepteur. Il a été mis en évidence que les protéines NS1/2 du MNV peuvent être clivées par des protéases de l'hôte, mais le rôle du clivage de la protéase sur la capsid de MNV n'a pas été étudié directement [47]. Actuellement, le récepteur d'entrée pour le MNV est inconnu, ce qui complique considérablement l'élucidation des interactions récepteur / virus.

4-3. Traduction des protéines virales

L'ARN génomique est libéré dans le cytoplasme suite à la décapsidation et interagit avec la machinerie cellulaire de la cellule hôte tel un ARN messager. Une fois livré sur le site de réplication, les génomes viraux doivent surmonter des obstacles considérables avant que la première descendance infectieuse ne puisse émerger de la cellule hôte infectée.

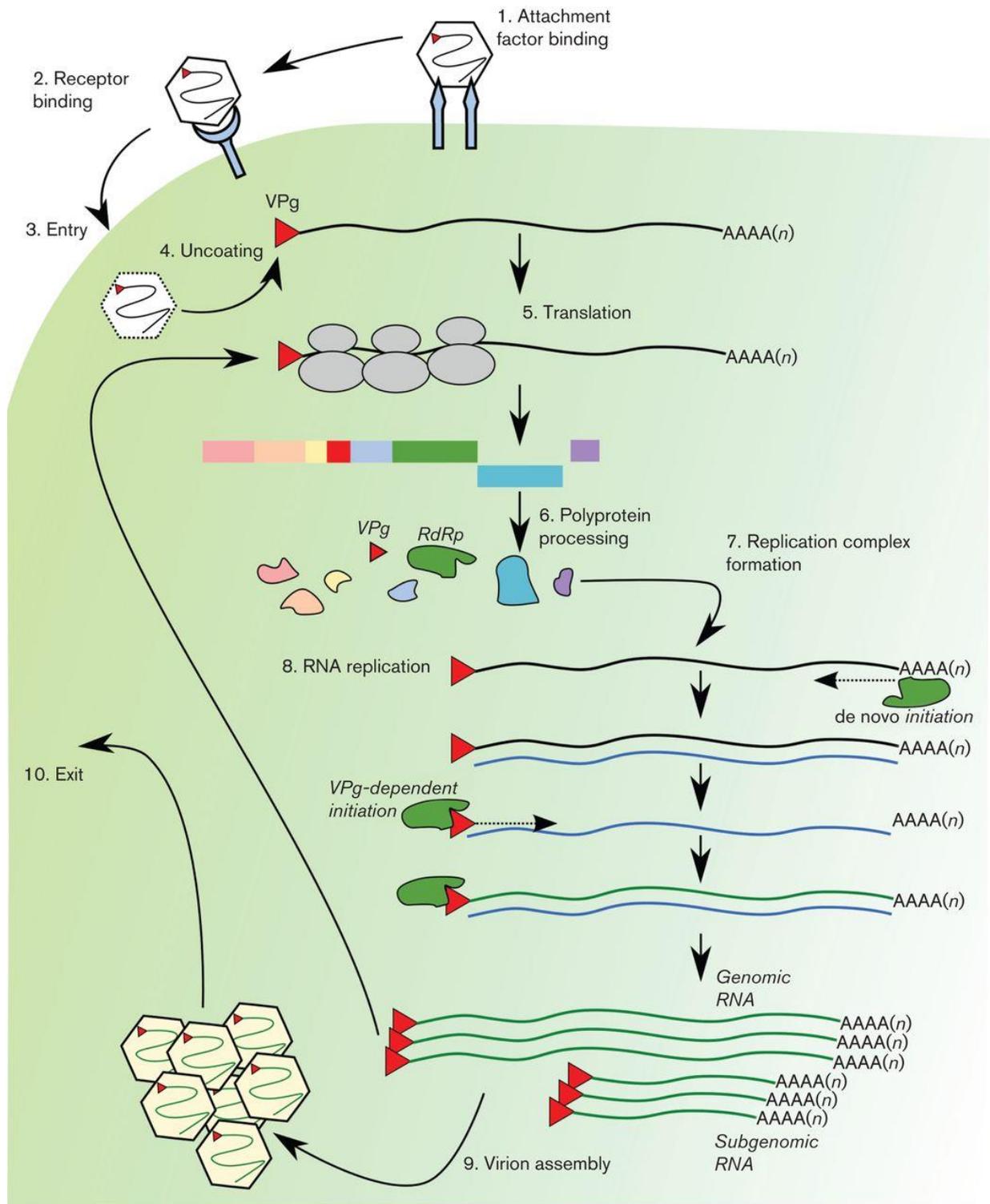


Figure 4 : Représentation schématique du cycle de multiplication du *Norovirus*. (D'après [63]).(1) les *Norovirus* se fixent à la surface cellulaire mais doivent se lier à un récepteur protéique non identifié (2) pour entrer (3). La décapsidation (4) est réalisée par des voies encore non définies. (5) Le génome viral est traduit par des interactions avec la VPg (triangle rouge) à la terminaison 5' du génome et avec la machinerie de traduction cellulaire. (6) La polyprotéine de l'ORF1 est co- et post-traductionnellement clivée par la protéase virale NS6. (7) La Formation du complexe de réplication permet (8) la réplication du génome (9). L'assemblage des virions a lieu avant leur sortie (10).

En général, les génomes de virus ARN de polarité positive exigent la traduction des protéines avant que la réplication virale ne soit initiée. Pour certains génomes de virus à ARN positif, le recrutement de la machinerie de traduction de l'hôte est effectué sans l'aide de protéines virales, ils utilisent plutôt une structure tridimensionnelle de leur génome, appelée site interne d'entrée du ribosome (IRES) [64]. Cependant, les *Calicivirus*, y compris le MNV [17] et le HuNoVs [65] possèdent une petite protéine virale VPg, liée de manière covalente à l'extrémité 5' du génome permettant la médiation de la traduction de l'ARN viral et le recrutement des facteurs d'initiation de la traduction de la cellule hôte. La structure de la protéine VPg du MNV a été décrite comme un noyau hélicoïdal compact, bordé par des régions flexibles en N- et C-terminales [66]. Ce degré élevé de flexibilité est probablement dû aux nombreux rôles que joue VPg dans le cycle de vie du *Norovirus* [67]. Les protéines VPg du HuNV et du MNV interagissent avec les composants du complexe de facteurs d'initiation de la traduction eIF4, en particulier eIF4E [68, 69], la protéine cap-binding et eIF3 [65], qui sont recrutées pour le complexe et à leur tour contribuent à recruter le complexe ribosomal 43S. Pour les *Norovirus*, VPg peut être la seule exigence dans le recrutement du complexe 43S de pré-initiation. La liaison de la protéine virale VPg à l'extrémité 5' du génome viral positionne correctement la machinerie de traduction et l'initiation de la traduction. En effet, la région 5' non traduite des *Norovirus* est très courte, environ 10 paires de bases, et est probablement trop petite pour contenir un IRES. Ces structures secondaires présentent aux extrémités 5' et 3' des ARN viraux jouent également un rôle dans leur traduction et favorisent des interactions avec certaines protéines de la cellule hôte qui circularisent les ARN viraux [70, 71]. Sous cette forme, les ARN établissent des liaisons avec certaines protéines comme la polypyrimidine tract-binding protein (PTB) et la poly(A)- binding protein (PABP), capables de stimuler ou d'inhiber leur traduction et leur réplication [71–73].

Le premier ORF à être traduit est l'ORF1. La polyprotéine résultant de la traduction est rapidement clivée à des sites spécifiques afin de libérer des protéines non structurales impliquées dans la réplication du virus, directement ou bien indirectement par la formation du complexe de réplication [74]. La traduction des ORFs 2, 3 et 4 codant respectivement les protéines VP1, VP2 et le facteur de virulence VF1, est principalement effectuée à partir des ARN subgénomiques. Du fait d'une présence plus importante de ces ARN par rapport aux ARN génomiques, il semblerait qu'une stratégie soit mise en place afin de réguler la synthèse des protéines virales et notamment VP1 pour qu'elle soit présente en un nombre suffisamment élevé permettant la formation de capsides entières. En effet, chaque capside icosaédrique est

formée de 180 copies de VP1 disposées en 90 dimères [75]. La traduction de l'ORF3 est réalisée par un mécanisme de terminaison-réinitiation puisque les ARN subgénomiques sont polycistroniques [76]. Après avoir entièrement traduit l'ORF2, les ribosomes restent parfois liés à l'ARN et commencent la traduction de l'ORF3 car le codon STOP de l'ORF2 chevauche le codon d'initiation de l'ORF3. Le codon d'initiation pour la traduction de l'ORF4 est positionné 13 bases en aval du début de l'ORF2 et peut être initiée par un mécanisme de décalage du cadre de lecture appelé « leaky scanning » [46].

4-4. Réplication génomique

Le complexe de réplication permet la réplication de l'ARN. Ce complexe est formé de dérivés membranaires auxquels se fixent les protéines virales non structurales dont la polymérase et structurales, VP1 et VP2, ainsi que des molécules d'ARN double-brin synthétisées à partir de l'ARN génomique [63]. Le complexe de réplication du MNV est juxtaposé avec le centre de l'organisation des microtubules dans la région péri-nucléaire, ainsi, le MNV pourrait utiliser le réseau cytosquelettique de la cellule pour organiser sa réplication [77]. Les membranes de l'hôte qui composent la plateforme du complexe de réplication du MNV sont des dérivées du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et des endosomes de la cellule hôte [49]. Ces réarrangements membranaire sont probablement conduits par les protéines NS1/2 et NS4 [50].

Chez tous les virus à ARN à polarité positive, la réplication du génome est réalisée par l'intermédiaire de la synthèse d'un brin complémentaire de polarité négative *via* la polymérase virale. Ce brin complémentaire sert alors de matrice et initie la synthèse des ARNs génomiques et subgénomiques de polarité positive [63].

4-5. Assemblage et sortie du virus

Les processus à l'origine de l'assemblage viral, l'encapsidation et la sortie des *Norovirus* sont méconnus et il n'existe pas d'étude directe sur l'assemblage et la libération des virions pour compléter le cycle de vie du virus.

La capacité des protéines VP1 à s'auto-assembler en virus-like particles (VPL) suggère qu'elles peuvent être suffisantes pour entraîner l'assemblage de la capsid au cours de la réplication virale, bien que l'implication des protéines cellulaires ne puisse être exclue [78].

Alors que la protéine VP2 ne semble pas nécessaire pour l'assemblage de VLP, elle pourrait favoriser la stabilité de la protéine VP1 qui est essentielle pour la production de virions [78, 79]. La protéine VP2 pourrait être impliquée dans l'encapsidation *via* une interaction avec l'ARN viral [79, 80].

Une stratégie de sortie adoptée par les *Calicivirus* implique l'induction de l'apoptose [81]. Il est possible que le *Norovirus* emploie une stratégie similaire. En effet le phénomène d'apoptose serait conséquent à la régulation négative de la survivine, une protéine de la cellule hôte inhibitrice de l'apoptose, de plus, une accumulation de cellules épithéliales apoptotiques a été observée dans des biopsies intestinales de patients infectés [81–83]. L'inhibition de l'apoptose induit une production de MNV réduite, mettant en évidence l'importance de l'apoptose dans le cycle de multiplication du *Norovirus* [82].

5- Le norovirus murin

5-1. Généralités

Le premier norovirus murin, MNV-1, a été isolé en 2003 à partir du cerveau d'une souris immunodéprimée déficiente pour des gènes de l'immunité innée (*RAG2/STAT1^{-/-}*) [17]. L'infection par le MNV a entraîné une létalité des souris associée à divers symptômes tels que des encéphalites, des inflammations de la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux, des méningites, hépatites et pneumonies.

Actuellement, le norovirus murin est considéré comme le meilleur modèle pour étudier les norovirus humains. En effet, ce virus murin partage les caractéristiques structurales et génomiques des souches humaines. Il se transmet également par voie oro-fécale, se réplique dans l'intestin et est excrété dans les fèces [84]. Le MNV possède également une propriété essentielle pour résister à l'acidité présente dans l'estomac car il tolère une large gamme de pH [85]. En revanche, il existe quelques différences entre les souches murines et humaines : par exemple, les molécules d'attachement reconnues sur la cellule hôte par le norovirus murin (résidus d'acide sialique) diffèrent des norovirus humains (HBGAs). De plus, la souche humaine induit l'apparition de symptômes chez l'Homme alors qu'une infection au norovirus murin reste asymptomatique.

Comme pour le norovirus humain, de nombreuses souches de MNV ont été isolées et la diversité biologique parmi ces souches a été rapportée. Les souches MNV-1, CW1, CW3 et

WU11, peuvent être éliminées rapidement chez les animaux de type sauvage, tandis que les souches CR1, CR3, CR6, CR7 et S99 sont persistantes et retrouvées jusqu'à 35 jours post-infection dans les fèces [86, 87].

5-2. Le tropisme du norovirus murin

Les données accumulées au cours des dernières années démontrent que les *Norovirus* ciblent les cellules immunitaires intestinales. En effet, le norovirus murin est capable d'infecter les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B aussi bien *in vitro* que *in vivo* [88, 89]. Les bactéries entériques augmentent l'infectiosité du virus comme en témoignent les titres de virus réduits chez les souris traitées avec un cocktail d'antibiotiques éradiquant le microbiote intestinal. Ainsi, les norovirus murins se développant au contact du microbiote ont pu évoluer pour exploiter les bactéries entériques afin d'améliorer leur infectiosité [90, 91]. Il existe des preuves de propagation extra-intestinale du MNV. Le tropisme cellulaire du norovirus murins étant connu pour les macrophages et les cellules dendritiques migrants [85], il est possible que les norovirus murins diffusent dans l'organisme de façon associée aux cellules. Cette hypothèse est étayée par une étude récente dans laquelle l'appauvrissement en cellules dendritiques des souris empêche la diffusion des norovirus murin dans les ganglions lymphatiques mésentériques [92].

5-3. Mécanismes immunitaires contrôlant l'infection au norovirus murin.

Les infections au norovirus murin sont généralement résolues quelques jours après l'exposition, ainsi les réponses immunitaires innées jouent un rôle crucial dans le contrôle des infections primaires. En effet, des souris dépourvues d'interféron de type I fonctionnel sont très sensibles à une infection au MNV [17, 88]. De plus, les interférons de type I empêchent la dissémination du MNV dans les tissus périphériques. Les médiateurs impliqués dans l'induction d'interféron en réponse à une infection au MNV ont été étudiés. Ces études ont mis en évidence que le MDA5 peut détecter l'ARN du norovirus murin [93], les facteurs de régulation de l'interféron IRF-3 et IRF-7 contribuent au contrôle de la réplication de norovirus murin [94] et ISG15 possède une activité antivirale contre les norovirus murins [95]. Aussi, un traitement exogène des cellules avec l'interféron de type I ou II peut également bloquer la réplication du norovirus murin [96]. L'IFN- α et l'IFN- β empêchent la propagation systémique

du norovirus murin mais seul l'IFN- λ permet de contrôler une infection intestinale persistante [97].

De plus, l'IL-10 préviendrait de l'inflammation de la muqueuse et de la perturbation de la barrière intestinale au cours des infections aux norovirus murins [98]. La réponse inflammatoire à l'infection par le norovirus murin dépendrait du microbiote intestinal, étant donné que ce phénomène n'a pas été observé chez des souris axéniques déficientes pour l'IL-10 [98]. Ces observations suggèrent que les bactéries entériques interagissent avec la réponse à l'infection aux norovirus murins.

Enfin, il est évident que les réponses immunitaires adaptatives, y compris les cellules B, les anticorps, les cellules T CD4 + et CD8 + contribuent tous aux contrôles des infections aux norovirus murins [99–102].

5-4. Épidémiologie

Aujourd'hui, le norovirus murin est le virus le plus répandu dans les animaleries de recherche [103]. En Amérique du nord, 22.1% des 12 639 échantillons de sérum de souris contenaient des anticorps anti-MNV-1 [104], et des enquêtes sérologiques en Europe ont mis en évidence des taux de contamination comparables [105]. Des taux de prévalence similaires ont été observés au Japon et en Corée du Sud après une analyse sérologique ou par RT-PCR sur des échantillons murins [106–108]. Cependant, l'impact de l'infection au MNV sur les résultats des travaux de recherche biomédicale n'a pas été clarifié.

5-5. Influence du MNV dans un modèle animal

Des études ont montré que les norovirus murin n'ont aucun effet sur certains modèles animaux spécifiques. Hensley et al ont mis en évidence qu'une infection par la souche CR6 du norovirus murin n'induit aucun effet significatif sur l'immunité adaptative au virus de la vaccine ou au virus grippal [109]. De même, une infection transitoire au MNV-1 ou persistante au MNV-4 ne modifie pas l'inflammation intestinale induite par *Salmonella typhimurium* chez les souris [110]. Dans un autre modèle de maladie inflammatoire de l'intestin induite par *Helicobacter* chez des souris IL-10^{-/-}, l'infection au norovirus murin 4 n'a pas entraîné de modification de la pathologie [111].

Cependant, plusieurs autres études ont suggéré les conséquences potentielles d'infections aux norovirus murins. Le MNV n'a pas modifié le gain de poids, la prise alimentaire et le métabolisme du glucose dans un modèle d'obésité et d'insulino-résistance induit par le régime alimentaire, mais a provoqué des changements subtils dans le tissu lymphoïde [112]. L'effet du norovirus murin 4, dans un modèle murin Ldlr KO d'athérosclérose s'est avéré être dépendant du moment de l'infection [113, 114]. Lencioni et al ont constaté que l'infection au MNV peut accélérer la progression de l'inflammation intestinale induite par les bactéries chez les souris Mdr1a^{-/-} mais pas chez les souris Smad3^{-/-} [115]. Le norovirus murin 1 a également été signalé comme favorisant l'inflammation et la mortalité chez les souris surinfectées avec *Escherichia coli* [116]. La souche MNV-4 a permis d'inhiber la réponse cellulaire T CD8 au cytomegalovirus murin (MCMV) aussi bien chez les souris BALB/c que C57BL/6. Cependant, la souche MNV-1 n'a pas affecté les titres viraux du MCMV chez ces souris [117]. Les souris ATG16L1 (Autophagy-related gene 16-like 1) déficientes infectées par la souche CR6 présentaient plusieurs caractéristiques de la maladie de Crohn humaine après administration de sulfate dextran sodium, par opposition à des souris infectées par la souche CW3 [118]. Récemment, Kernbauer et al ont mis en évidence un effet protecteur des souches CR6 et Ski du norovirus murin. En effet, l'administration de ces souches a amélioré la survie de souris traitées à un cocktail d'antibiotiques soumises à un protocole de colite chimique. De plus, ces auteurs ont montré que l'infection virale par le MNV pouvait fournir une protection contre les lésions intestinales induite par *Citrobacter rodentium* [119].

Par conséquent, l'analyse de l'ensemble de ces études met en évidence l'importance de différentes variables. En effet, les phénotypes observés sont dépendants de la souche de MNV, du fond génétique murin, et du timing de l'infection étudiés.

Chapitre 2 : *Pseudomonas aeruginosa*

1- Caractéristiques microbiologique

Pseudomonas aeruginosa a été décrit pour la première fois en 1872 par Schroeter et al [120]. Initialement appelée *Bacterium aeruginosum*, cette bactérie est capable de produire un pigment bleu hydrosoluble dans le pus et sur des pommes de terres bouillies. L'isolement bactérien sera fait 10 ans plus tard, à partir d'une plaie infectée de soldat dont les bandages étaient bleu/vert. L'isolement de cette bactérie est attribué à Carle Gessard, qui la nomme *Bacillus pyocyaneus*. Ce nom sera conservé jusqu'aux années 60 [121]. En 1894, Walter Migula lui donna le nom de «*Pseudomonas aeruginosa*», qui est encore en usage aujourd'hui. D'un point de vue étymologique, le mot est composé du grec pseudo pour « simili », et de monas pour « unité » désignant ici les « germes ». *Aeruginosa* signifie “vert-de-gris” en latin, et se réfère à la teinte du cuivre oxydé d'un pigment de la bactérie.

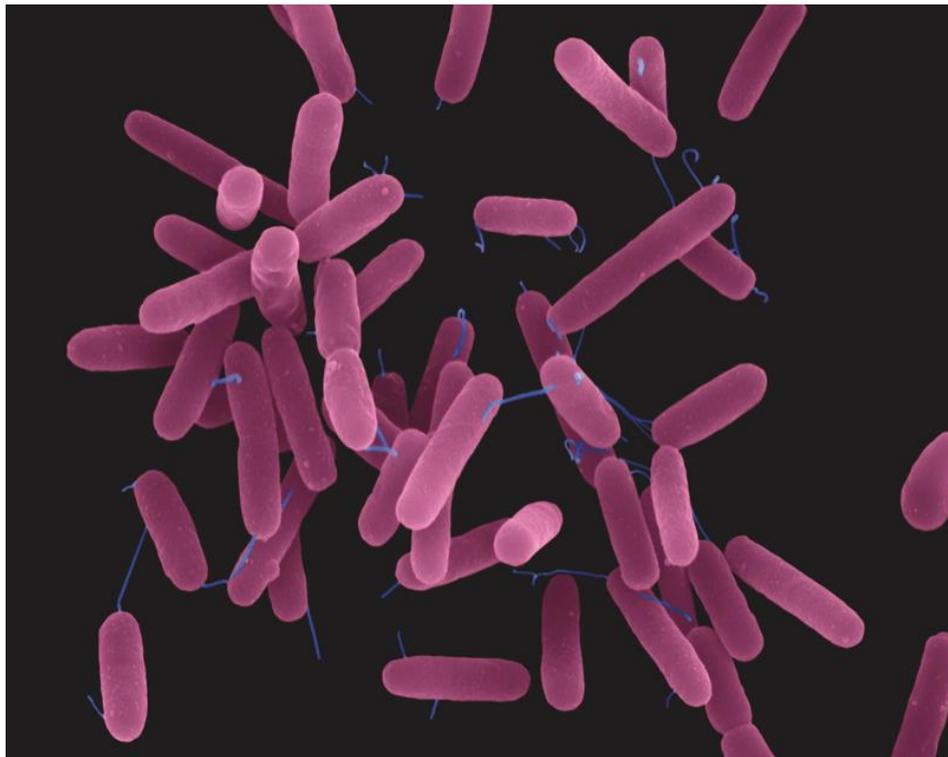


Figure 5 : *Pseudomonas aeruginosa* © Dennis Kunkel/Microscopy, Inc.

P. aeruginosa est une bactérie appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae*. Le genre *Pseudomonas* regroupe 7 espèces : *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. syringae*.

P. aeruginosa est un bacille Gram négatif de 1 à 3 µm de long et de 0,5 à 0,8 µm de diamètre, mobile grâce à un flagelle polaire à ciliature monotriche qui lui permet de se déplacer en milieu liquide. *P. aeruginosa* est une bactérie aérobie possédant un métabolisme oxydatif, utilisant l'oxygène comme accepteur terminal d'électron. Elle peut également survivre en anaérobie, en utilisant le nitrate comme accepteur terminal d'électron [122]. Ce bacille est mésophile mais est capable de se développer à des températures variant de 4 à 42°C, avec une croissance optimale à 37°C. *P. aeruginosa* est également résistant aux variations de pH. Bactérie non exigeante, *P. aeruginosa* peut se développer sur un grand nombre de milieux générant des colonies grises avec une teinte verdâtre, lisses, et produisant une odeur caractéristique de seringa.

En 2000, le génome de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé [123]. Il possède l'un des plus grands génomes bactériens, composé de 6,3 mégabases codant 5570 cadres de lecture. Le séquençage a permis de mettre en évidence de nombreux gènes impliqués dans des systèmes de régulation de la virulence et dans des fonctions métaboliques. Ces systèmes de régulation confèrent une grande adaptabilité à cette bactérie. En effet, *Pseudomonas aeruginosa* est ubiquitaire et capable de coloniser de nombreuses niches écologiques. De plus cette bactérie possède deux modes de vie distincts. *P. aeruginosa* est mobile grâce au flagelle et aux pili lors d'un mode de vie planctonique, mais perd sa mobilité, adhère à une surface ou s'agrège avec d'autres bactéries pour former un biofilm en mode de vie communautaire.

2- Habitat

Pseudomonas aeruginosa, bactérie ubiquitaire de l'environnement, colonise un habitat très vaste. Aquophile, il est fréquemment isolé des eaux d'origines très diverses (mer, rivière, réseaux domestiques...) [124]. *P. aeruginosa* est un saprophyte de l'environnement retrouvé également dans le sol, sur les surfaces inorganiques et les végétaux. Dans la nature, cette bactérie est plus fréquemment rencontrée sous forme de biofilms que sous forme planctonique. Chez les animaux, ce pathogène opportuniste peut être une bactérie commensale de la peau ainsi que du tractus gastro-intestinale [125].

3- Les principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

La pathogénie de *P. aeruginosa* est attribuée à la production d'un vaste arsenal de facteurs de virulence. Ces facteurs de virulence exprimés à différents niveaux au cours de l'infection, permettent à *P. aeruginosa* de survivre aussi bien dans l'environnement que chez différents hôtes. La plupart de ces facteurs de virulence sont sous la dépendance du Quorum sensing (QS) et sont exprimés de manière coordonnée. Ils sont impliqués dans les différentes étapes du processus d'infection et permettent ainsi à *P. aeruginosa* de coloniser son hôte.

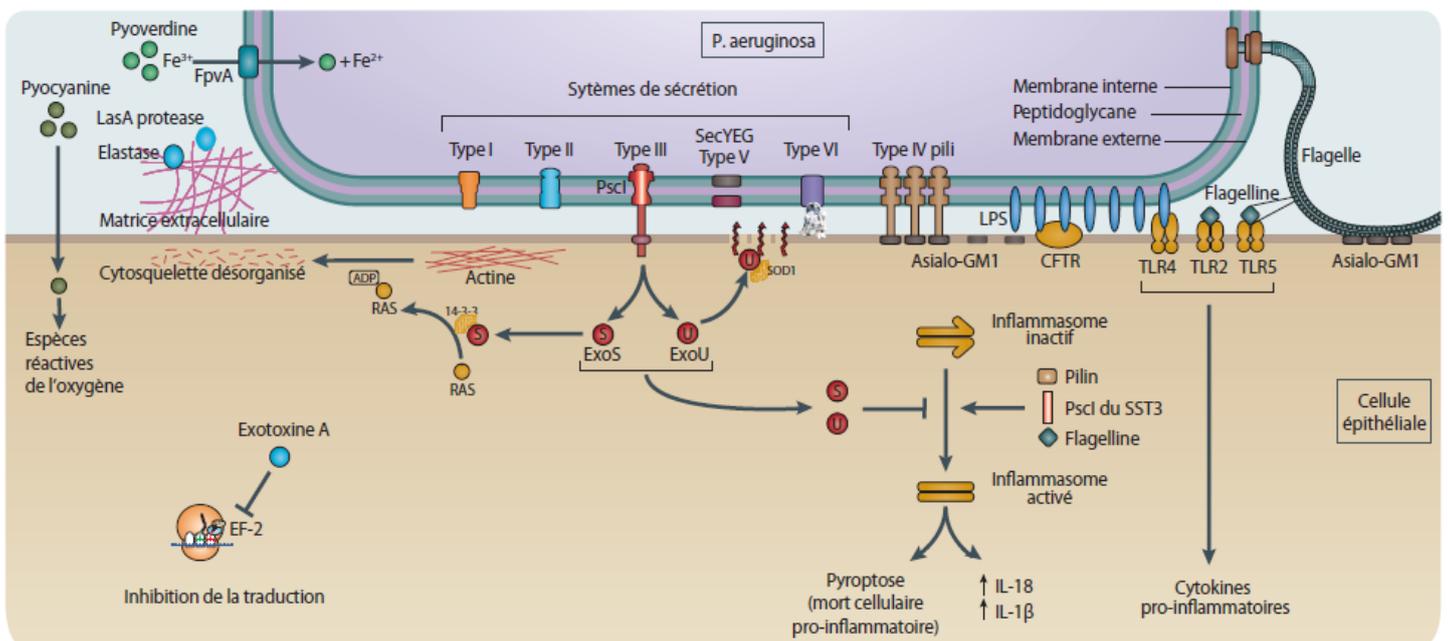


Figure 6 : Les principaux facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*. La pathogénicité de *P. aeruginosa* est médiée par différents facteurs de virulence. Ces facteurs de virulence sont impliqués dans les différentes étapes du processus d'infection et permettent à *P. aeruginosa* de coloniser son hôte. De plus, certains de ces facteurs de virulence sont capables d'activer ou de déjouer le système immunitaire de l'hôte

Lors d'infections aiguës, l'invasion, la dissémination et les lésions tissulaires sont prédominantes. Cependant, dans les infections chroniques, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose, *P. aeruginosa* peut aussi s'adapter, en perdant ses particularités les plus immunogènes comme les fimbriae et le flagelle. Ainsi en s'isolant des défenses de l'hôte et en adhérant à l'épithélium respiratoire en formant des biofilms, il se cache du système immunitaire pour éviter son élimination. Dans les infections chroniques, une inflammation persistante est maintenue par la sécrétion des facteurs de virulence extracellulaires.

De nombreux facteurs de virulence ont été décrits chez *P. aeruginosa*. Bien qu'intimement intriqués, deux groupes sont souvent individualisés :

- Les facteurs de virulence de la surface cellulaire bactérienne interviennent particulièrement lors de l'attachement et la colonisation (pili de type IV, LPS, flagelle...)

- Les facteurs de virulence sécrétés hors de la bactérie provoquent des lésions cellulaires ou tissulaires (exotoxine A, élastase, pyocyanine, rhamnolipide...).

3-1. Facteurs de virulence de la surface cellulaire bactérienne

a. Le flagelle

Le flagelle est une structure protéique complexe formant un appendice polaire filamenteux à la surface de *P. aeruginosa*. Le flagelle assure la mobilité de la bactérie dans les milieux liquides (swimming) et semi-liquides (swarming) et participe à l'adhésion bactérienne.

Les flagelles ont un rôle critique dans la pathogénèse en se liant avec une composante commune de la membrane, asialo GM1, permettant ainsi l'attachement et l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales. Ces appendices agissent également en tant que premières attaches pour faciliter le contact des bactéries aux cellules épithéliales en se liant au glycolipide asialo-GM1 situé à la surface de la cellule épithéliale. Ils participent également à la virulence et provoquent une réaction inflammatoire dépendante de la voie NF-kB *via* des interactions avec les Toll Like receptor (TLR) TLR5 et TLR2 menant à la production d'IL-8, IL-6 et de mucine [126, 127]. Cependant, les flagelles sont également très immunogènes, rendant leur présence un handicap pour *P. aeruginosa* une fois la colonisation établie. *P. aeruginosa* est capable de s'adapter à cette situation en sélectionnant des mutants dépourvus de flagelles pour contourner la réponse de l'hôte surtout au cours des infections chroniques [128]. Enfin, il joue aussi un rôle important dans les stades précoces du développement du biofilm bactérien *in vitro* [129].

b. Les pili de type IV

P. aeruginosa possède des pili, des appendices filamenteux, de plusieurs micromètres de long se situant à la surface de la paroi de nombreuses bactéries. Les pili sont d'apparence

plus courte et plus fine que le flagelle, et hérissent la surface de la cellule bactérienne. Le pilus individuel est constitué d'un polymère d'une protéine appelée piline, dont la constitution est différente selon les espèces bactériennes. *P. aeruginosa* possède des pili de type IV constitués d'une hélice à 5 sous unités. Les pili sont également impliqués dans la mobilité et l'adhésion bactérienne.

Le pilus de type IV est la principale adhésine de *P. aeruginosa* et est responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales [130]. Les pili de type IV sont impliqués dans les mobilités de type "twitching" [131] et de type "swarming"[127]. De plus, ces structures interagissent *in vitro* avec la région glycosylée des glycosphingolipides asialo GM1 et asialo GM2, située à la surface des cellules épithéliales pulmonaires [132]. Son expression est soumise au contrôle d'un système de régulation de la transcription à deux composants pilS et pilR [133].

c. Facteur d'attachement de type fimbriae (ou Cup)

Un facteur d'attachement a été plus récemment mis en évidence chez *P. aeruginosa*. Il s'agit de pili de type fimbriae qui sont assemblés par la voie "chaperone/usher/pathway" (Cup) [132]. Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes Cup appelés CupA, CupB et CupC ont été identifiés [132]. Chez *P. aeruginosa*, ces facteurs d'attachement sont essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques et dans la formation du biofilm [132].

d. Le lipopolysaccharide (LPS)

Le lipopolysaccharide LPS est un composant majeur de la membrane externe des bactéries Gram-négatives. Par conséquent, il contribue grandement à l'intégrité structurale de la bactérie, et protège la membrane à certaines attaques de type chimique. Le LPS permet une augmentation de la charge négative de la membrane cellulaire et contribue à stabiliser la structure globale de la membrane. Il est également impliqué dans la stimulation de la réponse inflammatoire et dans les interactions avec les tissus hôtes. La molécule de LPS peut être divisée en trois parties :

- le lipide A ou endotoxine, peut être responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant entraîner un choc septique et conduire à la mort de l'hôte

infecté [134]. Le lipide A est une région hydrophobe permettant l'ancrage de la structure dans la membrane externe.

- le cœur oligosaccharidique
- l'antigène O, une région polysaccharidique variable.

P. aeruginosa est capable de synthétiser deux formes de LPS A et B qui diffèrent par la composition de la région polysaccharidique de l'antigène O [135]. Selon que l'antigène O est présent ou absent sur le cœur oligosaccharidique, le phénotype est respectivement appelé lisse ou rugueux. Le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent qu'un phénotype rugueux [136]. De plus, le sérum humain est capable de lyser les souches dites rugueuses de *P. aeruginosa* alors que les souches dites lisses sont résistantes au sérum [137]. La variabilité des chaînes polysaccharidiques des antigènes O est à la base du sérotypage de *P. aeruginosa*.

e. L'alginat

L'alginat est un exopolysaccharide mucoïde chargé négativement et qui est constitué de polymères d'acides L-gulonique (G) et D-mannuronique (M) liés entre eux par des liaisons β -1,4. Cette molécule subit quelques modifications durant son transfert périplasmique telles qu'une acétylation et une épimérisation [138]. Le polymère s'organise de trois façons possibles : soit en une succession de blocs d'homopolymères, (MMM) ou (GGG), ou bien en bloc d'hétéropolymères (MGMG). L'alginat, comme le LPS, fonctionne comme une adhésine, permettant l'ancrage de *P. aeruginosa* à l'épithélium respiratoire. La transcription du gène *algD* est contrôlée par un système de régulation à deux composants, constitué de la protéine « sensor », AlgQ et de la protéine régulatrice AlgR1 [139]. La synthèse de l'alginat répond à certains facteurs environnementaux rencontrés notamment chez les patients atteints de mucoviscidose. Ces patients présentent une réponse inflammatoire chronique conduisant à une augmentation de la synthèse d'alginat menant à la conversion de *P. aeruginosa* en un phénotype mucoïde [140]. Au cours des infections à *P. aeruginosa*, ce phénotype mucoïde est communément trouvé au niveau des voies respiratoires des malades de mucoviscidose. Lorsque l'alginat est surexprimé, il protège *P. aeruginosa* de la phagocytose, des antibiotiques et atténue même la réponse de l'hôte [141, 142]. Bien que l'alginat ait été largement étudié et impliqué dans l'architecture du biofilm de *P. aeruginosa* dans la

mucoviscidose, il a été récemment montré qu'il n'est pas crucial pour le développement du biofilm [143].

f. Les lectines solubles

Deux lectines solubles ont été identifiées chez *P. aeruginosa*. La première, PA-IL (ou LecA), d'une taille de 12,7 kDa, montre une spécificité pour le galactose, et la deuxième, PA-IIL (ou LecB) d'une taille de 11,7 kDa, montre une très forte affinité pour le fucose [144, 145]. LecA se lie aux résidus α -galactosyl présents sur les glycosphingolipides dans les membranes des cellules épithéliales du poumon [146, 147], alors que LecB se lie à plusieurs épitopes fucosylés ou mannosylés mais présente une plus grande affinité pour le Lewis A [148, 149]. Ces deux protéines sont principalement présentes dans le cytoplasme de la bactérie mais ont également été trouvées sur la membrane externe même si aucun mécanisme de sécrétion n'a été identifié [150, 151]. Au niveau de la pathogénèse, les lectines sont susceptibles d'être impliquées dans l'adhésion des bactéries aux cellules [152]. LecA est impliquée dans l'internalisation de *P. aeruginosa* dans des cellules hôtes. Cytotoxique, LecA est capable d'endommager l'épithélium de l'appareil respiratoire et du tractus-gastro-intestinale [153, 154]. LecB n'est pas directement cytotoxique mais peut affecter *in vitro* la fréquence des battements ciliaires des cellules épithéliales des voies respiratoires [155]. Récemment, des molécules capables d'adhérer aux lectines, appelées glycocluster, ont été administrées dans un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë à *Pseudomonas aeruginosa*, et ont fourni une protection presque complète [156]. Par conséquent, ces deux lectines possèdent des caractéristiques spécifiques qui leur permettent d'être décrites comme des facteurs de virulence.

3-2. Facteurs de virulence sécrétés

a. La pyocyanine

La pyocyanine est un pigment bleu métabolisé par *P. aeruginosa* et responsable de la couleur bleue du pus en cas d'infection. La pyocyanine a été impliquée dans de nombreux mécanismes pathogènes telles que l'augmentation de l'IL-8 [157, 158], elle réprime la réponse immunitaire de l'hôte [159] et induit l'apoptose des neutrophiles [159]. Dans des modèles murin d'infection pulmonaire aiguë et chronique, la pyocyanine s'est avérée être essentielle

pour la virulence de *P. aeruginosa*. En effet, l'instillation de pyocyanine provoque un afflux de neutrophiles dans les poumons [160]. Plusieurs études ont mis en évidence les propriétés oxydoréductrices de la pyocyanine. Ce pigment est capable d'oxyder le glutathion et d'inactiver la catalase dans les cellules épithéliales respiratoires et les cellules endothéliales [161, 162]. La pyocyanine participe ainsi au stress oxydatif qui peut être responsable d'une lésion parenchymateuse pulmonaire [161, 162]. Enfin, il a été démontré que la pyocyanine inactive l'ATPase vacuolaire et le transport mitochondrial pouvant altérer les canaux chlorures au cours de la mucoviscidose [163].

b. La pyoverdine

La pyoverdine est un sidérophore, un récepteur soluble capable de chélater le fer de l'environnement nécessaire au métabolisme de *P. aeruginosa*. La pyoverdine joue également un rôle dans la virulence de *P. aeruginosa* [164, 165] en régulant la sécrétion d'autres facteurs de virulence, tel que l'exotoxine A, une exoprotéase PrpL et sa propre sécrétion [166].

c. La protéase alcaline

La protéase alcaline est une protéase dégradant la fibrine et sécrétée au moyen d'un système de sécrétion de type I de *P. aeruginosa* [167]. Ce facteur de virulence est impliqué dans les infections cornéennes comme pour la plupart des protéases de *P. aeruginosa* [167]. De plus, la protéase alcaline est fortement impliquée dans la pathogenèse des pneumopathies aiguës [168]. En effet, il a été montré l'existence d'une formation intra-alvéolaire massive et précoce de fibrine lors d'une lésion pulmonaire aiguë et que l'inhibition de cette formation initiale de fibrine *via* la protéase alcaline de *P. aeruginosa* est nocive dans un modèle murin [169].

d. La protéase IV

D'autres protéases sont sécrétées par *P. aeruginosa* comme la protéase IV. Cette protéase a un rôle pathogène connu dans les kératites [170] et il a été établi que la protéase IV est également impliquée dans la pathogenèse des infections respiratoires en dégradant des protéines du surfactant A, D et B [171].

e. L'élastase

L'activité élastolytique de *P. aeruginosa* est médiée par l'action combinée de deux enzymes protéolytiques, LasA et LasB codées respectivement par les gènes *lasA* et *lasB* [172–175]. LasR est un activateur transcriptionnel de *lasA* et de *lasB* [176] et RhlR est également un activateur transcriptionnel de *lasB*. L'élastase LasA agit en synergie avec LasB augmentant ainsi le pouvoir de dégradation. LasA coupe l'élastine, et la rend ainsi plus accessible à l'action d'autres protéases comme LasB [174]. L'élastase LasB ou pseudolysine est une métalloprotéase à zinc qui a une activité protéolytique très importante. L'élastase a un rôle dans la pathogenèse des infections respiratoires à *P. aeruginosa* par la dégradation de l'épithélium respiratoire et la destruction des jonctions serrées, ce qui augmente la perméabilité épithéliale et facilite le recrutement des neutrophiles [177–179]. L'élastase a également été décrite comme étant pro-inflammatoire et augmente les niveaux d'IL-8 chez le rat [180]. L'élastase de *P. aeruginosa* peut également diminuer la réponse immunitaire de l'hôte en clivant des protéines A et D du surfactant du tractus respiratoire [181], les IgA et les IgG [182], des composants du complément (C1q et C3) [183, 184], l'interféron gamma et le TNF- α [185].

f. Les phospholipases C

Les phospholipases ou hémolytique phospholipase C sont des enzymes thermolabiles d'environ 80 kDa contenant des ions zinc nécessaires à son activité enzymatique [186]. La phospholipase C est sécrétée dans l'espace extracellulaire *via* le système de sécrétion de type II de *P. aeruginosa*. Il existe quatre types de phospholipase C chez *P. aeruginosa*, trois d'entre elles ont un rôle dans le métabolisme lipidique de la bactérie [187]. La phospholipase C a pour principal substrat des phospholipides, un constituant majeur du surfactant pulmonaire, et est impliquée dans l'inflammation [188] et la pathogénèse des pneumonies en dégradant les phospholipides de la membrane des cellules de l'hôte [189].

g. L'exotoxine A

L'exotoxine A (ExoA) est le composé protéique le plus toxique produit par *P. aeruginosa* avec une dose létale 50% (DL50) de 0,2 mg chez la souris [190]. L'exotoxine A sous la forme d'une pro-toxine inactive de 71 kDa est sécrétée dans l'espace extracellulaire

via un système de sécrétion de type II. Comme la toxine diphtérique, l'exotoxine A est composée de deux domaines : le domaine A (26 kDa) qui possède une activité mono-ADP-ribosyltransférase qui inhibe la synthèse protéique des cellules hôtes en agissant sur le facteur EF-2 des cellules eucaryotes [191, 192] et le domaine B (45 kDa) qui interagit spécifiquement avec le récepteur présent à la surface de la cellule hôte permettant ainsi la translocation dans la cellule cible [193, 194]. ExoA a un rôle majeur dans la virulence de *P. aeruginosa*, un mutant déficient ExoA étant 20 fois moins virulent que la souche sauvage chez la souris [195].

h. Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires amphiphiles. Ils ont un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire [187, 196] et contribuent à l'invasion du tissu pulmonaire par *P. aeruginosa* [197]. Il a été décrit que les rhamnolipides perturbent le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire humain [198]. De plus, les rhamnolipides inhibent la phagocytose [199]. Enfin, les rhamnolipides sont impliqués dans la mobilité de type "swarming" [200] et la formation de biofilms [201].

3-3. Le système de sécrétion de type III et ses toxines

Le système de sécrétion de Type III est un complexe multi-protéique dont la synthèse et la régulation sont contrôlées par 36 gènes répartis sur 5 opérons [202]. La structure du système de sécrétion de type III (SSTT) de *P. aeruginosa* s'apparente à une « aiguille » ayant une base transmembranaire surmontée d'un filament extra-membranaire. Cette structure permet de former un pore dans la membrane de la cellule eucaryote et d'y injecter directement des protéines effectrices de la bactérie dans le cytoplasme de la cellule eucaryote [202]. Le complexe à lui seul pourrait être toxique pour les cellules en activant l'inflammasome [203].

Quatre toxines sont aujourd'hui décrites pour être sécrétées *via* le système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*. Les toxines ExoU, ExoS, ExoT et ExoY sont exprimées de façon variable selon les souches.

a. L'exoenzyme S

L'exoenzyme S (ExoS) est une cytotoxine bifonctionnelle de 49 kDa principalement transloquée dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible mais également sécrétée dans le milieu extracellulaire [204]. ExoS possède deux domaines aux activités distinctes, en C-terminale une ADP-ribosyltransférase [205] et en N-terminale une GTPase-activating protéine (GAP) [206]. Les activités GAP et principalement ADP-ribosyltransférase d'ExoS vont entraîner une perturbation de l'organisation normale du cytosquelette de la cellule cible [207]. De plus, l'expression du domaine ADP-ribosyltransférase inhibe l'internalisation de *P. aeruginosa* par les cellules épithéliales et les macrophages [207].

b. L'exoenzyme T

L'exoenzyme T (ExoT) est une protéine bifonctionnelle de 53 kDa. Comme ExoS, ExoT possède des domaines d'activité ADP-ribosyltransférase et GAP. ExoT a des effets similaires mais plus réduits qu'ExoS sur le cytosquelette eucaryote [208]. Bien que considérée comme une cytotoxine mineure [207], il a été montré que l'exoenzyme T inhibe à la fois l'internalisation de *P. aeruginosa* et la cicatrisation des plaies [209, 210]. Étonnamment, ExoT est décrit pour diminuer la cytotoxicité induite par ExoU [211].

c. L'exoenzyme U

L'exoenzyme U (ExoU) est une puissante phospholipase de 74 kDa comprenant un domaine de liaison à la protéine chaperonne, et un domaine patatin-like codant pour une phospholipase A2. L'activité phospholipase A2 possède une large spécificité de substrats incluant des phospholipides et des lysophospholipides entraînant une mort nécrotique des cellules eucaryotes [212]. L'ExoU possède une activité phospholipase et lysophospholipase dégradant la membrane cellulaire une fois transloquée dans le cytosol [213]. *In vitro*, la cytotoxicité d'ExoU s'exerce à la fois sur les cellules phagocytaires professionnelles comme sur les cellules épithéliales ou endothéliales [214]. L'ExoU dégrade l'un des principaux composants du surfactant pulmonaire, le dipalmitoyl phosphatidylcholine, contribuant ainsi à la translocation pulmonaire, des souches bactériennes exprimant l'ExoU [215]. *In vivo*, l'expression d'ExoU accroît la virulence de *P. aeruginosa* des modèles d'infections respiratoires aiguës chez la souris [207, 214–216].

d. L'exoenzyme Y

L'exoenzyme Y (ExoY) est une adénylate cyclase de 48 kDa [217]. L'injection intracytoplasmique d'ExoY dans la cellule cible conduit à une augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc, induisant la rétractation et l'arrondissement de la cellule cible [218, 219]. Cette activité engendre la formation de lésions intercellulaires et aboutit à une destruction des cellules endothéliales pulmonaires [220].

3-4. Le Quorum sensing

Le Quorum sensing est un système de communication entre les bactéries leur permettant de coordonner leur comportement vis-à-vis d'un environnement spécifique. Cette communication repose sur de petites molécules, les acyl homosérine lactones (AHL), qui diffusent librement à travers les membranes bactériennes. Quand une certaine densité bactérienne ou «quorum» est atteinte, ces molécules atteignent une concentration seuil permettant l'induction ou la répression coordonnée de l'expression de nombreux gènes de survie, de facteurs de virulence et de la formation de biofilm. Parmi les gènes régulés se trouvent très souvent ceux nécessaires à la synthèse des molécules diffusibles, d'où leur nom de composés auto-inducteurs.

Actuellement, trois systèmes de QS de *P. aeruginosa* sont connus. Le premier système de QS découvert est le système *las*, nommé ainsi car il régule en particulier l'expression de l'élastase LasB. Une enzyme codée par *LasI* intervient dans la synthèse d'une AHL, le N-(3-oxododécanyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL) [221]. Lorsque la concentration de 3-oxo-C12 atteint un seuil critique, une molécule de 3-oxo-C12-HSL se lie à deux protéines *LasR*, codée par le gène *lasR* [222]. De façon synchrone au sein de la population, le complexe ainsi formé agit comme activateur transcriptionnel de nombreux gènes (*lasA*, *lasB*...).

Le deuxième système de QS découvert chez *P. aeruginosa*, est nommé *rhl* car il régule en particulier la production de rhamnolipides. La production de N-butanoyl-L-homosérine lactone (C4-HSL) se fait sous la dépendance d'une enzyme codée par *RhlI*. Lorsque la concentration de C4-HSL atteint un niveau critique, deux protéines *RhlR*, codée par le gène *rhlR*, se lie à cette molécule formant un complexe activateur de la transcription de plusieurs gènes (*lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlI*...).

Le troisième système de QS a été découvert en 1999 [223]. Connue sous le nom de PQS (Pseudomonas quinolone signal), ce système de QS est basé sur la production de 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone. Cependant, les 4-quinolone sont connus depuis les années 1940 et étudiés en raison de leurs effets antibactériens [224, 225].

Le PQS est synthétisé à partir de l'anthranilate et d'un acide α -céto-gras par les produits des gènes de la biosynthèse PQS *pqsABCD* [226, 227]. Ceux-ci synthétisent la molécule précurseur, le 2-heptyl-4 (1H) -quinolone (HHQ), qui est finalement converti en PQS par PqsH. Lorsqu'un certain seuil de concentration de PQS dans le milieu extracellulaire est atteint, cette molécule se lie à son récepteur apparenté, PqsR. Le complexe résultant active l'expression des opérons *pqsABCDE* et *phnAB* augmentant la production de PQS et de pyocyanine [228–230]. L'augmentation de la production de PQS résultant de la liaison du complexe PQS-PqsR à la région du promoteur *pqsA* constitue un mécanisme d'auto-induction similaire à celui observé dans le système de Quorum sensing de type AHL [231]. La synthèse et l'activité biologique du PQS seraient indépendantes de la densité bactérienne [232] mais sous la dépendance des systèmes Las et Rhl [223]. En effet, la transcription des gènes nécessaires à la synthèse du PQS est régulée positivement par LasR et négativement par le système Rhl [233].

Ces trois systèmes de communication sont inter-régulés. Ainsi, le système Las est capable d'activer le système Rhl et le PQS. Le PQS active également le système Rhl de façon dépendante et indépendante du système Las. Enfin, le système Rhl inhibe le PQS [234]. Le QS régule l'expression de plus d'une centaine de gènes codant pour de nombreux facteurs de virulence.

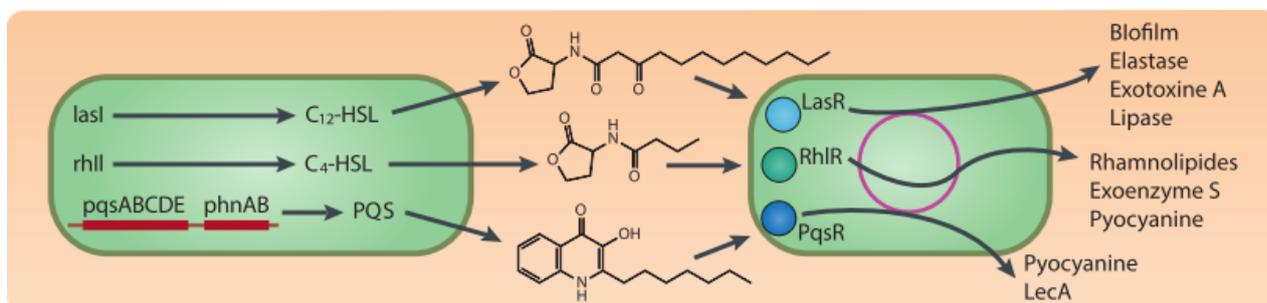


Figure 7 : Le Quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa*. Trois systèmes de quorum sensing chez *P. aeruginosa* régulent l'architecture d'un biofilm et un grand nombre de déterminants de la virulence. La régulation croisée des trois systèmes fournit un niveau supplémentaire de complexité.

La capacité de *P. aeruginosa* à coordonner la régulation à la hausse des gènes de virulence à l'ensemble de sa population constitue un avantage. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence, chez différents modèles animaux, une diminution de la pathogénicité des souches QS déficiente par rapport à des souches sauvages [235–237]. De plus, plusieurs études ont montré que l'autoinducteur N- (3-oxododécanoyl) -L-homosérine-lactone est un immunomodulateur et peut réprimer la réponse de l'hôte [238, 239].

4- En pathologie

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie opportuniste capable d'infecter un très large éventail d'hôtes (plantes [240, 241], amibes [242], insectes [191] et mammifères [243]). Malgré une grande adaptabilité et de nombreux facteurs de virulence, *Pseudomonas aeruginosa* établit rarement une infection sans un défaut sous-jacent de la barrière mécanique ou de l'immunité de l'hôte.

Les grands brûlés présentent une perte importante de l'intégrité de la barrière épithéliale et l'environnement hospitalier abrite des souches de *P. aeruginosa* multi-résistante pouvant être source d'infection [244] et est ainsi associé à une importante morbi-mortalité [245].

L'immunodépression est un facteur favorisant l'infection à *P. aeruginosa*. Les individus neutropéniques, en chimiothérapie [246, 247], atteints du SIDA [248] sont plus sensibles à une infection à ce pathogène opportuniste.

Pseudomonas aeruginosa peut coloniser une grande variété de tissus. Les infections oculaires à *P. aeruginosa* impliquent aussi la cornée (kératite) [249], pouvant aboutir à l'endophtalmie [250]. Les traumatismes permettant le passage des bactéries sont associés aux lentilles de contact [251]. *P. aeruginosa* peut engendrer couramment des otites [252], infections urinaires [253] ainsi que plus rarement des méningites [254], endocardites [254] et ostéomyélites [255].

P. aeruginosa est souvent isolé des voies respiratoires de patients intubés-ventilés en réanimation et des patients qui souffrent de maladies chroniques respiratoires comme la mucoviscidose ou de la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). L'infection à *P. aeruginosa* est une des principales causes de décès chez ces patients en entraînant un déclin accéléré de la fonction pulmonaire [256].

Du fait de sa grande adaptation, *P. aeruginosa* est fréquemment retrouvé en milieu hospitalier (colonisation des robinets et des surfaces, résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques). Par conséquent, après *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* est le 3ème pathogène responsable de maladies nosocomiales (en France, en 2012, 8,4% des infections nosocomiales). Elle représente par exemple 18,1% des infections pulmonaires, 6,9% des infections urinaires et 44,1% des infections de la peau et des tissus mous en milieu hospitalier (Rapport de l'Institut National de Veille Sanitaire 2012).

Cliniquement, les infections à *P. aeruginosa* sont souvent classées comme étant « aiguë » ou « chronique » bien que la distinction ne soit pas toujours claire. Selon les facteurs de virulence exprimés par *P. aeruginosa* et l'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte, l'infection peut transiter entre aiguës et chroniques [257, 258].

P. aeruginosa est capable de provoquer des infections aiguës, celles-ci sont généralement associées au mode de vie de *P. aeruginosa* dit « planctonique » en opposition au mode de vie en biofilm. La bactérie est virulente via une forte augmentation de l'expression des facteurs de virulence (flagelle, protéase, exotoxine A...). Le système de sécrétion de type III est largement impliqué et permet une importante sécrétion d'endotoxine. Les produits bactériens (protéases, toxines...) sont à l'origine de dommages tissulaires et induisent une forte réponse inflammatoire.

Les infections chroniques peuvent être définies comme des infections persistantes, la bactérie est fréquemment non invasive et non cytotoxique, les facteurs de virulence étant faiblement exprimés. Ainsi, la bactérie perd ses facteurs les plus immunogènes tels que les pili et le flagelle afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte. La bactérie sous forme de biofilm est également protégée des mécanismes de défense de l'hôte [259]. L'élimination du pathogène devient alors difficile.

Chapitre 3 : Immunité innée dans une infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*

Le tractus respiratoire est en permanence exposé à des particules et micro-organismes présents dans l'air inhalé. Les infections respiratoires sont peu fréquentes chez l'individu sain témoignant de mécanismes de défenses efficaces. Cependant, ceux-ci peuvent être mis en défaut ou inadaptés prodiguant un avantage au pathogène et l'émergence d'une infection. La réponse immunitaire de l'hôte face à une infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* est complexe, néanmoins, trois mécanismes principaux sont impliqués dans la réponse immunitaire de l'hôte à l'infection respiratoire à *P. aeruginosa*.

- Les mécanismes de défense mécanique permettent de piéger les pathogènes dans le mucus et de les rejeter *via* "l'escalator ou ascenseur muco-ciliaire".

- Les mécanismes de défense de l'épithélium ont un rôle important dans la mise en place de la réponse immunitaire cellulaire *via* la sécrétion de cytokines et de chimiokines

- Les mécanismes de défenses cellulaires comprennent la réponse immunitaire innée (macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques) et la réponse immunitaire adaptative *via* les lymphocytes

Lors de l'infection, les différents acteurs de l'immunité interagissent ensemble par la sécrétion de cytokines et de chimiokines afin d'adapter la meilleure réponse dans le but d'éliminer les pathogènes.

1- Mécanismes de défenses mécaniques

Les plus grosses particules inhalées, de plus de 50 microns, sont interceptées au niveau des voies aériennes supérieures, stoppées par des barrières anatomiques telles que l'épiglotte et sont éliminées *via* la toux et l'éternuement. Néanmoins les bactéries et virus d'un diamètre inférieur à 10µm vont passer à travers le filtre naso-pharyngé et se retrouver au niveau des muqueuses respiratoires. La surface de la muqueuse est une barrière physique imperméable aux pathogènes. Elle est composée de cellules étroitement juxtaposées et polarisées qui forment une barrière naturelle contre les pathogènes. Les cellules épithéliales sont constituées d'une région apicale à l'interface avec le milieu extracellulaire et d'une région basolatérale.

Les jonctions serrées définissent la frontière entre partie apicale et basolatérale et assurent l'étanchéité et le maintien d'un gradient de liquide et d'électrolytes de la barrière cellulaire.

Les cellules épithéliales sécrètent du mucus, un matériel polysaccharidique, qui permet de tapisser les voies aériennes sur lesquelles vont adhérer les particules inhalées (microorganismes, polluant, tabac ...). Ces particules sont ensuite transportées activement *via* "l'escalator muco-ciliaire" par le battement des 200 cils situés dans la région apicale des cellules épithéliales ciliées, vers le carrefour oro-pharyngé où elles sont dégluties. De manière significative, la perturbation dans ce processus tels que les syndromes de cils immobiles peut conduire à une infection bactérienne chronique des voies respiratoires inférieures [260].

Les particules de moins de 5 µm de diamètre peuvent atteindre les alvéoles. À ce niveau, les macrophages et de nombreuses molécules à activité antimicrobienne ont un rôle important dans l'exclusion des microorganismes. Le liquide de surface des voies aériennes a une action dans la clairance bactérienne grâce aux molécules à action antibiotique qu'il contient. Des études révèlent un rôle important des facteurs de l'activation du complément C3a et C5a dans le contrôle de *P. aeruginosa* dans un modèle murin de pneumonie [261, 262]. L'opsonisation des bactéries facilite sa reconnaissance par le système immunitaire et conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire. Le mucus contient également des défensines, des peptides cationiques courts, qui ont une activité antimicrobienne *via* la perméabilisation des membranes [263].

2- La reconnaissance de *P. aeruginosa* dans les voies respiratoires: le rôle des pattern recognition receptors

L'immunité innée est la première ligne de défense une fois que les barrières mécaniques, membrane épithéliale ou endothéliale, ont été enfreintes. Le système immunitaire inné peut être décrit comme un mécanisme effecteur qui empêche l'infection sans exposition préalable immunologique au pathogène.

Plusieurs structures microbiennes conservées, appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), ont été impliquées dans l'activation de la réponse immunitaire innée de hôte à *P. aeruginosa*. Les PAMPs sont détectées par des récepteurs de l'immunité innée appelés « pattern recognition receptors » (PRRs) qui comprennent les Toll-like receptor (TLR) située à la surface cellulaire et endosomale, et les Nods-like receptors (NLR),

récepteurs cytosoliques. MyD88 est une molécule adaptatrice pour presque tous les TLR, ainsi MyD88 possède un rôle important dans le contrôle de l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* [264, 265].

De nombreuses études ont été réalisées sur le rôle essentiel des TLR dans la réponse anti-infectieuse pulmonaire. Le TLR2 reconnaît le peptidoglycane, un des constituants principaux des membranes bactériennes, et son rôle est important dans les infections bactériennes extracellulaires [266]. Les TLR4 et les TLR5 reconnaissent respectivement le LPS et la flagelline et peuvent initier la réponse immunitaire contre une infection à *P. aeruginosa* [266–269]. D'autres TLR exprimés par l'épithélium pulmonaire et les macrophages alvéolaires, tels que le TLR9, mais ne semblent pas intervenir dans la reconnaissance de *P. aeruginosa* dans le poumon.

Les Nods like receptors ont plus récemment été découverts. NOD-1, abréviation de nucleotides domaine d'oligomérisation, est un PRR cytosolique qui se lie à l'acide diaminopimélique gamma glutamyle des bactéries Gram-négatives, et est important pour l'élimination de bactéries telle que *P. aeruginosa* [270]. NOD2 est impliqué dans le processus de détection intracellulaire du muramyl-dipeptide (MDP), un dérivé du peptidoglycane de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif [271–273], il contribue à la défense contre certaines bactéries [274]. Enfin, le NLRC4 humain a pour ligand la protéine de l'aiguille PscF tandis que le NLRC4 murin est capable de détecter la flagelline, PscF et PscI et semble être impliqué dans la reconnaissance de pathogène intracellulaire [275–277].

3-Les cellules épithéliales: détection et signalisation

Les cellules épithéliales des voies aériennes répondent à *P. aeruginosa* d'une manière dépendante de MyD88 en produisant des chimiokines et des cytokines tels que KC et IL-6. La reconnaissance du LPS et de la flagelline respectivement par le TLR4 et le TLR5 peut être suffisante pour déclencher la réponse immunitaire [278]. Les cellules épithéliales sont également impliquées, *in vivo*, dans la réponse immunitaire innée à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*.

Sadikot et al ont démontré que la manipulation de l'activité de la voie NF- κ B dans les cellules épithéliales est suffisante pour modifier la réponse immunitaire innée à *P.*

aeruginosa. En effet, l'inhibition de l'activité de NF- κ B chez les souris a montré une clairance bactérienne altérée et une diminution du recrutement de neutrophile [279].

MyD88 est l'adaptateur de la plupart des TLR et de l'IL-1R / IL-18R, conduisant à l'activation de la voie NF- κ B. Les souris dépourvues de MyD88 sont très susceptibles à l'infection à *P. aeruginosa*, mettant en évidence un recrutement inadéquat des défenses innées du poumon [280]. Une autre étude a démontré que l'expression de MyD88 uniquement dans les cellules épithéliales des voies aériennes est suffisante pour contrôler l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* [264]

Les cellules épithéliales participent à la réponse immunitaire innée par la production de signaux recrutant et modulant l'activité des leucocytes, mais également en sécrétant des produits ayant des activités antimicrobiennes. Les cellules épithéliales alvéolaires produisent des protéines du surfactant, membres de la famille des collectines qui jouent un rôle dans la défense innée de l'hôte contre les agents pathogènes bactériens et viraux. En effet, des souris déficientes en protéine du surfactant présentent une clairance de *P. aeruginosa* réduite [281, 282]

4- *P. aeruginosa* reconnu par l'inflammasome

L'inflammasome est un complexe intracellulaire macromoléculaire permettant la détection de PAMPs et de DAMPs (Damage associated molecular pattern molecules) [283]. L'inflammasome joue un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire *via* l'activation de la caspase-1 [284]. Bien que de nombreux NLR soient capables de cliver la pro-caspase-1 en sa forme active la caspase-1, lors d'une infection à *P. aeruginosa* l'activation de la caspase-1 nécessite l'intervention du NLRC4. Une fois la caspase-1 activée, elle permet la maturation par clivage de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-8 en IL-1 β et IL-8 mature et biologiquement actives. *In vivo*, l'activation de la caspase-1 et le signal dépendant de l'IL-1 récepteur sont nécessaires pour le recrutement rapide de neutrophiles sur le site de l'infection [264]. Enfin, la caspase-1 induit la pyroptose, une mort cellulaire inflammatoire à membrane rompue [285].

5- Les cellules de l'immunité innée: rôles dans la reconnaissance et la clairance de *P. aeruginosa*

5.1 Granulocytes neutrophiles

Une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* conduit, dès les premières heures, à un recrutement massif de neutrophiles au site de l'infection. Les neutrophiles représentent entre 50 et 70% des leucocytes circulants et jouent un rôle primordial dans les infections pulmonaires aiguës à *P. aeruginosa* grâce à un arsenal permettant la neutralisation et l'élimination du pathogène. Il a clairement été démontré que des souris neutropéniques étaient extrêmement sensibles à ce pathogène. En effet, des souris rendues neutropéniques par traitement à la cyclophosphamide ou administration d'anticorps monoclonaux anti-Ly6b, sont sensibles à de très faibles inocula, 10 à 100 UFC/souris de différentes souches de *P. aeruginosa* [247]. De plus, dans un modèle de pneumonie chez des souris immunocompétentes, l'élimination de *P. aeruginosa* par les granulocytes semble être saturable conduisant à une augmentation de la charge pulmonaire bactérienne en cas d'inoculum administré augmenté [286]. Par conséquent, deux facteurs sont déterminants pour l'évolution de l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, la capacité de recruter rapidement un nombre suffisant de neutrophiles et la capacité de ces neutrophiles à éliminer le pathogène. Cependant, le recrutement et l'activité des granulocytes peuvent être influencés par l'hôte ainsi que des facteurs bactériens [287, 288].

En effet, différents mécanismes développés par *P. aeruginosa* peuvent entraîner la mort des neutrophiles. Le pathogène peut injecter des exotoxines dans les granulocyte *via* son T3SS ce qui induit la mort de la cellule par destruction du cytosquelette [289]. Il a également été démontré que le 3-oxo-C12-HSL et la pyocyanine ont la capacité d'induire l'apoptose des granulocytes [159, 290].

a- Le chimiotactisme

Au niveau du site de l'infection, les signaux inflammatoires sont nombreux. Le LPS ou autres dérivés issus des bactéries et les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-17 favorisent la production et l'expression de molécules d'adhésion du côté luminal des cellules endothéliales (les P-sélectines, E-sélectines et les ICAM (InterCellular Adhesion Molecule)). De plus, il a été montré que l'IL-17, en synergie avec le TNF- α , accroît la

production par les cellules endothéliales de chimiokines telles que CXCL1, CXCL2 et CXCL5 qui se fixent au récepteur CXCR2 des neutrophiles [291]. Les neutrophiles expriment constitutivement à leur surface la PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) et la L-sélectine permettant leur liaison avec les P et E-sélectines de l'endothélium [292]. Les neutrophiles étant en contact de chimioattractants tels que des produits bactériens et des produits inflammatoires issus de l'hôte entament une phase de « rolling » le long de l'endothélium. Après activation, les intégrines se lient à l'endothélium grâce aux récepteurs ICAM entraînant une adhésion ferme des neutrophiles. Afin de traverser la couche cellulaire endothéliale et guidés par un gradient de concentration de chimioattractants, les neutrophiles réorganisent leur cytosquelette [293]. Cette phase est appelée diapédèse. De plus, beaucoup de molécules chimioattractantes ont un effet de « priming » sur les neutrophiles. Le "priming" permet une réponse rapide et efficace pour éliminer les pathogènes, mais peut entraîner la production d'une grande quantité de formes réactives de l'oxygène (FRO) et donc causer des dommages aux tissus environnants [294, 295]. Une fois sur le site d'inflammation, les neutrophiles sont activés et peuvent détruire les pathogènes

Le recrutement de neutrophiles dans les poumons lors d'une infection à *P. aeruginosa* peut être significativement inhibé *via* l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CXCR2 qui inhibe la liaison des ligands de chimiokines tels que de MIP-2 et KC. Les souris traitées par l'anticorps anti-CXCR2 ont montré une diminution de la survie ainsi qu'une augmentation de la charge bactérienne dans un modèle de pneumonie aiguë à *P. aeruginosa* [296]. La principale fonction du recrutement des neutrophiles au site de l'infection est l'élimination du pathogène. Pour cela différentes options s'offrent à lui comme la phagocytose et la dégranulation.

b- La phagocytose

La phagocytose est le mécanisme principal pour l'élimination des agents pathogènes et des débris cellulaires. Il s'agit d'un processus actif au cours duquel une particule est internalisée par la membrane cellulaire dans une vacuole appelée phagosome. La phagocytose se découpe en plusieurs étapes : la reconnaissance, l'ingestion, la digestion puis le rejet. La mécanistique de l'internalisation est dépendante du type d'interaction entre le micro-organisme et les neutrophiles. L'interaction peut être directe, par la reconnaissance de PAMPs par les PRR ou médiée par l'opsonisation. Grâce aux TLR et aux récepteurs des opsonines tels que

les FcγR, les phagocytes reconnaissent le pathogène ce qui entraîne l'adhérence des microorganismes à ces cellules.

Cette interaction conduit à l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Des études indépendantes ont identifié que la phagocytose repose sur l'activité de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dans la cellule hôte [297, 298]. PI3K convertit les lipides de la membrane de la cellule hôte PIP2 (phosphatidylinositol biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol triphosphate) [299]. Le PIP3 est un ligand permettant le recrutement de la protéine kinase B ou Akt à partir du cytoplasme, entraînant le remodelage de l'actine pour la phagocytose des pathogènes [300, 301].

L'activation de PI3K est un mécanisme clé dans la phagocytose de *P. aeruginosa* par les neutrophiles et les macrophages [302, 303]. Suite à cette activation, les phagocytes englobent les bactéries pour former le phagosome ou vacuole phagocytaire.

c- La dégranulation

Les neutrophiles doivent transporter de nombreux produits toxiques dans la circulation sanguine et ensuite correctement les déployer au moment opportun. Ils possèdent un organe de stockage, la granule dont il existe trois types fondamentaux.

Les granules azurophiles ou primaires sont les plus grands, mesurant environ 0,3 µm de diamètre, et sont formés au cours de la première maturation des neutrophiles. Ils contiennent de la myéloperoxydase (MPO), une enzyme essentielle dans la libération oxydative [304]. Ces granules contiennent également des défensines, du lysozyme, de la BPI (Bactericidal / Permeability-Increasing protein), et un certain nombre de sérine protéases (l'élastase, la protéinase 3 (PR3), et la cathepsine G) [305]. Ces granules sont remplis de composés antimicrobiens et fonctionnent comme un centre de stockage de l'armement moléculaire des neutrophiles.

Les granules spécifiques ou secondaires sont plus petits (0,1 µm de diamètre) et ne contiennent pas de MPO. Ils sont caractérisés par la présence de lactoferrine. Ces granules sont formés après les granules azurophiles; ils contiennent également une large gamme de composés antimicrobiens, comme le NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated lipocalin) et le lysozyme [304, 305].

Les granules tertiaires sont également dépourvus de MPO, ils sont plus petits que les granules spécifiques. Ils contiennent quelques antimicrobiens, mais stockent un certain nombre de métalloprotéases, telles que la gélatinase et leukolysin. Ils sont aussi la dernière population de granules formés au cours de la maturation des neutrophiles [292].

Plusieurs de ces protéines granulaires sont connues pour jouer un rôle clé dans la clairance de *P. aeruginosa*.

L'élastase de neutrophiles (NE) est une sérine-protéase qui cible la porine OprF de *P. aeruginosa*. Cela génère une augmentation de la perméabilité membranaire et donc diminue la croissance et la viabilité de ces bactéries. Les souris déficientes pour la NE sont plus sensibles aux infections à *P. aeruginosa* avec une clairance bactérienne réduite [306]. Néanmoins, l'élastase des neutrophiles peut avoir un impact néfaste sur l'hôte en ciblant les cellules hôtes lors d'infection pulmonaire et participe ainsi aux dommages tissulaires et à l'inflammation [307].

La lactoferrine, un chélateur du fer, a une action à la fois bactéricide et bactériostatique, le fer étant un élément important dans le développement de *P. aeruginosa*. De plus, cette protéine prévient également la formation de biofilm par ces bactéries, en stimulant un type de motilité, le "twitching". Cela empêche l'agrégation des bactéries et donc la formation de biofilm.

Le lysozyme est un peptide cationique capable de perturber la membrane des bactéries par hydrolyse du peptidoglycane. Des expériences menées sur des souris KO pour le lysozyme ont montré que cette enzyme est nécessaire pour une clairance optimale [308]. De plus, l'administration par aérosol de lysozyme recombinant humain, dans un modèle d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* chez le hamster, a montré une amélioration des symptômes de pneumonie, avec une diminution de la charge bactérienne pulmonaire et du recrutement des leucocytes, en particulier des neutrophiles [309].

d- Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Lors de leur activation, les neutrophiles produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote. Toutes les espèces réactives peuvent modifier et endommager d'autres molécules et c'est cette propriété qui est exploitée par la cellule hôte pour la signalisation et l'action antimicrobienne. Ainsi, l'inhalation d'oxyde nitrique exogène a permis de réduire la

charge bactérienne à 24 heures post infection dans un modèle de pneumonie à *P. aeruginosa* chez le rat [310]. De plus, l'inhibition de l'oxyde nitrique synthase (NOS) entraîne une diminution de la survie des souris ainsi qu'une augmentation de la charge bactérienne lors d'une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* [311]. Une étude récente a démontré le rôle protecteur de l'enzyme iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) dans un modèle murin déficient pour Ksr1 (kinase suppressor of Ras-1) de pneumonie aiguë à *P. aeruginosa* [312]. Les souris déficientes ont montré une augmentation significative de la mortalité lors d'une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. De plus, les souris infectées semblaient recruter un nombre suffisant de neutrophiles dans les poumons, mais sans pouvoir contrôler la réplication bactérienne. Le système de la NADPH oxydase dans les macrophages et les neutrophiles sont responsables de la génération d'espèces réactives de l'oxygène à l'intérieur de phagolysosomes pour détruire les bactéries ingérées. La réponse inflammatoire à *P. aeruginosa* se traduit également par le déversement de ROS extracellulaire entraînant la mort précoce de cellules inflammatoires ou lorsqu'elle est mal dirigée la NADPH oxydase peut s'attaquer directement à la membrane plasmique [313]. Le produit du gène p47phox possède également un rôle important contre *P. aeruginosa*. En effet, des souris déficientes pour ce gène étaient plus sensibles à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* que les souris de type sauvage [314].

5.2 Macrophages alvéolaires

Les premières cellules immunitaires susceptibles de rencontrer *P. aeruginosa* dans les poumons sont les macrophages alvéolaires résidents. Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée issues des monocytes. Selon leur localisation, ces cellules peuvent prendre différents noms : cellules de Kupffer dans le foie, les cellules gliales au niveau du cerveau et les macrophages alvéolaires dans les poumons. Les macrophages peuvent internaliser et tuer les bactéries pathogènes. Il existe plusieurs types de macrophages, ayant chacun une fonction dans la régulation de l'immunité. Les macrophages dit "activés classiquement" ou M1 sont importants dans la réponse pro-inflammatoire et pour l'élimination des pathogènes. Les macrophages dit "activés alternativement" ou M2 ont différents rôles dont des fonctions immunomodulatrices favorisant le remodelage matriciel et la réparation tissulaire.

Ils ont également un rôle de première importance dans la détection du pathogène au cours des infections à *P. aeruginosa*. *In vitro*, les macrophages alvéolaires murins sécrètent des chimiokines comme KC et des cytokines telles que le TNF- α et IL-6 après l'activation du

TLR4 et TLR5 respectivement par le LPS et la flagelline de *P. aeruginosa*, ainsi les macrophages sont capables de produire des chimiokines de recrutement des neutrophiles [278]. La réponse des macrophages alvéolaires au SST3 de *P. aeruginosa* est associée à l'activation de la caspase-1. L'IL-1 β produite par les macrophages peut être détectée par des cellules épithéliales des voies respiratoires, qui sécrètent en retour des chimiokines attractantes de neutrophiles [264].

La déplétion des macrophages alvéolaires par aérosol de clodronate dans des modèles d'infection pulmonaire aiguë de rats et de souris à *P. aeruginosa* a entraîné des réponses inflammatoires considérablement atténuées : la sécrétion des chimiokines MIP-2 et KC, le recrutement des neutrophiles ainsi que la clairance bactérienne ont été significativement réduits [315, 316].

Un autre rôle important des macrophages alvéolaires au cours de l'infection pulmonaire est la phagocytose des neutrophiles morts. La cytokine MCP-1, sécrétée par les cellules épithéliales alvéolaires de type II en réponse à l'infection à *P. aeruginosa*, stimule la migration des macrophages alvéolaires et la phagocytose *in vitro* et *in vivo* [317]. L'infection à *P. aeruginosa* de souris déficientes en MCP-1 a entraîné une faible diminution de la clairance bactérienne, mais semble également avoir entraîné une augmentation de la mort des cellules pulmonaire et de la lésion pulmonaire [318]. Par conséquent, les macrophages ont une contribution majeure dans la clairance bactérienne.

5.3 Les cellules dendritiques

De même que les macrophages, les cellules dendritiques (DC) sont issues des monocytes. *In vitro*, la différenciation des DC est induite par le GM-CSF et l'IL-4. Les DC sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles (CPA) qui relient l'immunité innée et adaptative. Les DC immatures ont une capacité élevée de phagocytose et d'internalisation, mais possèdent une faible capacité à présenter l'antigène. En effet, à un stade immature les DC expriment faiblement les TLR et des récepteurs Fc γ . L'activation des DC se fait par l'exposition aux pathogènes, tel que *P. aeruginosa*, et l'environnement cytokinique, tel que le TNF- α , l'IL-6 et l'IFN- β . Cette activation génère une augmentation de l'expression du CMH II, de molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CD40) et de la production de cytokines. La présentation de l'antigène aux lymphocytes T helper ainsi que l'environnement cytokinique conduira à une polarisation de ces lymphocytes en Th1 ou Th2.

Des expériences ont également montré que *P. aeruginosa* active l'inflammasome dans les DC, induisant une production d'IL-1 β et d'IL-18

Le rôle des DC dans la réponse à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* a été examiné et des expériences de vaccination ont montré la capacité des DC à induire une réponse contre *P. aeruginosa*. Worgall et al ont mis en évidence une amélioration de la survie des souris ayant reçu des DC issus de moelle osseuse pré-exposées à *P. aeruginosa* avant l'infection pulmonaire par cette bactérie [319]. De plus, des souris ayant reçu par injection des DC "pulsées" avec la porine OprF de *P. aeruginosa* une heure avant l'infection par cette même bactérie ont présenté une orientation de l'immunité vers une réponse Th1 permettant une réponse immunologique adéquat et une résistance à l'infection [320]

5.4 Les lymphocytes

Une réponse à haut degré de spécificité et une réponse dite "mémoire" caractérisent l'immunité adaptative. Les lymphocytes ont la capacité de reconnaître des antigènes entraînant une expansion clonale des lymphocytes spécialisés. L'activation de l'immunité adaptative est initiée simultanément ou peu de temps après l'activation de la réponse immunitaire innée, mais avec un certain temps d'inertie. L'immunité innée et adaptative agissent en synergie et influent l'une sur l'autre. L'activation de la réponse lymphocytaire se déroule en différentes étapes. Les CPA, tels que les macrophages et les DC, présentent l'antigène aux lymphocytes T helper naïfs ou Th0. L'environnement cytokinique induit par les CPA permet ensuite d'orienter vers différents types de réponses : Th1, Th2, Th17 ou Treg.

Les lymphocytes T ont un rôle important dans l'infection à *P. aeruginosa*. En effet, Koh et al ont mis en évidence que des souris Rag déficiente, dépourvues de lymphocytes fonctionnels, ont une mortalité accrue par rapport aux contrôles de type sauvage après une infection intranasale à *P. aeruginosa* [247]. De plus, il a été montré que des souris CD1d déficientes présentaient une réduction de la clairance bactérienne, du recrutement de neutrophiles et une mortalité accrue par rapport aux contrôles de type sauvage [321].

6-Signaux qui modulent la réponse immunitaire innée à *P. aeruginosa*

Comme évoqué précédemment, de nombreuses chimiokines et cytokines sont produites par les cellules résidentes du poumon lors d'une infection à *P. aeruginosa*, et ont un rôle important dans le recrutement et l'activation des cellules immunitaires vers le site de l'infection.

6-1. TNF- α

Initialement décrit comme facteur inducteur de nécrose des cellules cancéreuses [322], le TNF- α est la cytokine la plus étudiée de la superfamille du TNF, qui comprend plus de 40 membres. Les sources cellulaires principales du TNF- α sont les monocytes, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales stimulées mais il peut également être sécrété par d'autres cellules comme les lymphocytes T et B, les mastocytes et les kératinocytes. Sa synthèse est principalement induite par l'IL-1, l'IL-17 ou encore les endotoxines bactériennes et son activité biologique est principalement centrée sur l'inflammation. En effet, le TNF- α joue un rôle clé dans l'initiation des réactions inflammatoires de l'immunité innée en induisant la production de cytokines et en activant l'expression de molécules d'adhésion. Il existe deux récepteurs capables de lier le TNF- α , le TNFR1 et le TNFR2. Ces récepteurs du TNF- α activent des voies de signalisations différentes. D'une part, la liaison du TNF- α au TNFR1 entraîne l'activation des caspases 8 et 3, impliquées dans l'apoptose, et est également un activateur indirect de NF- κ B et de la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinase). D'autre part, la liaison de TNF- α au TNFR2 conduit à l'activation directe de NF- κ B et de la voie des MAPK ou bien de AP-1 (Activator protein 1) [323].

Le rôle du TNF- α dans l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* a été étudié. Skerrett et al ont rapporté que des souris de fond génétique C57Bl/6 déficientes en TNFR1 / TNFR2 éliminaient la souche PAK (SST3 positif et flagellée) de leurs poumons légèrement plus rapidement que les contrôles de type sauvage et recrutaient deux fois plus de neutrophiles [324]. Ces résultats contrastent avec ceux de Lee et al. En effet, des souris déficientes pour le TNF- α ne parvenaient pas à recruter des neutrophiles après l'infection et présentaient une augmentation de la charge bactérienne avec diminution de la survie [325]. Cette deuxième étude utilise des souris d'un autre fond génétique (B612SF2/J) et une souche *P. aeruginosa* incomplètement caractérisée, ces variables peuvent donc influencer l'importance relative du TNF- α au cours de l'infection. L'importance de ces variables a pu être mise en évidence.

L'administration d'anti-TNF- α a altéré la clairance de *P. aeruginosa* chez les souris BALB/c, mais n'a pas induit d'effet chez les souris C57Bl/6 à part une faible augmentation de l'expression du TNF- α [326]. L'expression variable des facteurs de virulence bactériens peut également influencer l'induction de TNF- α . Par exemple, la souche PA103 de type sauvage induit vingt fois plus de TNF- α qu'un mutant SST3-négatif lorsqu'elle est inoculée dans les voies respiratoires de souris C57Bl/6 [327]. Il est également possible que l'absence permanente de TNF- α favorise un des mécanismes compensatoires chez des souris déficientes en TNFR ou ayant reçu de l'anti-TNF- α . Ces mécanismes de compensation peuvent alors influencer la réponse pulmonaire à *P. aeruginosa*.

Pour récapituler ces études, le TNF- α semble favoriser la clairance bactérienne du poumon, bien que l'ampleur de cet effet soit relativement modeste. Cela peut être dû au fait que le TNF- α , possède non seulement des effets pro-inflammatoires, mais induit également l'expression de molécules anti-inflammatoires, tels que Muc1 et IL-10, *via* le TNFR1 [328, 329]. Muc1 supprime la signalisation TLR [330] et favorise l'apoptose des neutrophiles [328] ainsi que la promotion de la résolution de l'inflammation des voies respiratoires. Les souris déficientes pour le TNFR1 ou pour Muc1 montrent une légère augmentation de la clairance bactérienne et l'augmentation du nombre de neutrophiles dans les voies respiratoires [330].

6-2. IL-6

L'interleukine 6 est une cytokine intervenant dans la régulation de différents processus cellulaires. En effet, cette cytokine joue un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire, et l'activation de gènes intervenant dans la réponse immune de la phase aiguë de l'inflammation. L'IL-6 est sécrétée par de nombreux types cellulaires tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages, les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules endothéliales. De plus son action est pléiotropique et s'exerce sur différents types de cellules cibles par l'intermédiaire de ses deux récepteurs composés de l'interleukine 6 récepteur (IL-6R) et de la glycoprotéine 130 (gp130) [331]. La liaison de l'IL-6 à ses récepteurs entraîne leur dimérisation ce qui induit l'activation de JAK (Janus kinase). STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) est alors activé par JAK *via* une phosphorylation. Une fois phosphorylé, STAT forme un dimère afin de pénétrer dans le noyau cellulaire et d'y exercer son rôle de facteur de transcription. La voie de signalisation JAK/STAT ainsi activée permettra la régulation de l'expression de gènes de l'inflammation

[332]. Une inflammation aiguë se caractérise par une infiltration de neutrophiles sur le site de lésion. Les cellules endothéliales sont activées par l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 en vue de produire des chimiokines afin de participer au processus d'attraction des neutrophiles.

Dans un second temps, l'IL-6 R subit un clivage protéolytique par le biais des neutrophiles infiltrés conduisant à l'activation de la trans-signalisation de l'IL-6. L'activation de cette voie permet de réprimer des chimiokines comme CXCL1, CXCL8 et CX3CL1 attractant les neutrophiles et augmente la production de chimiokines attirant les monocytes comme CCL2, CXCL5 et CXCL6. En effet, une accumulation trop importante de neutrophiles pourrait entraîner des dommages tissulaires *via* leur production de protéases et de ROS. Cette activation permet également d'augmenter la régulation des molécules d'adhésion cellulaire et réduit l'apoptose. L'IL-6 est aussi impliquée dans la différenciation des lymphocytes T et B et augmente la production d'Ig. L'IL-6 joue un rôle important dans la transition de l'immunité innée vers l'immunité acquise. Suite à l'activation par des cellules présentatrices d'antigènes, les cellules T-helper (Th) naïves peuvent se différencier en différentes sous populations. Ainsi, l'IL-6 peut induire l'activation de sous populations pro-inflammatoires comme les Th17 ou inhiber l'activation de la population T régulatrice (Treg) anti-inflammatoire [333].

Il a été montré dans de nombreuses études que des souris déficientes pour l'IL-6 présentaient une sensibilité augmentée à différents pathogènes [334]. Par exemple, ces souris déficientes mourraient plus rapidement que les souris de type sauvage dans un modèle d'infection pulmonaire à *S. pneumoniae* [335]. Cependant, l'administration d'IL-6 recombinante n'a pas amélioré la survie de souris granulopénique développant une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* [336].

6-3. IL-1 / IL-18.

Les cytokines de la superfamille de l'IL-1 sont produites par les macrophages et ont tendance à conduire à une réponse Th1 lors de stimuli infectieux. Le rôle de l'IL-1 et de l'IL-18 dans les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* semblent être plutôt néfaste que bénéfique dans les modèles de pneumonie aiguë. Les souris déficientes en récepteur de l'IL-1 ou incapables de produire de l'IL-18 sont protégées de l'infection à *P. aeruginosa* lorsqu'un inoculum élevé est utilisé [337, 338]. Néanmoins, une étude menée sur des souris IL-1R

knock-out a mis en évidence une plus grande sensibilité de ces souris à une pneumonie chronique induite par un faible inoculum administré dans l'eau de boisson [339].

6-4. IL-17 / IL-23.

Certaines sous-population de lymphocytes T coordonnent la réponse immunitaire adaptative afin d'adapter un profil cytokinique élaboré dans le but de répondre au mieux à l'infection. Le paradigme décrit différents sous-ensembles Th1, Th2, Th17, Th3 et Treg. Les cellules Th17 CD4 + sont générées en présence d'IL-6 et TGF- β et sont maintenues par la présence d'IL-23, qui est produite par les macrophages alvéolaires. Les cellules Th17 recrutent des neutrophiles au site de l'infection par le biais de l'IL-17. L'importance de l'IL-23 dans le recrutement des neutrophiles vers le poumon a également été mis en évidence dans un modèle de pneumonie à *Pseudomonas* chez des souris IL-23 knock-out [340].

6-5. IL-10

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire dont le pic de production arrive relativement tard lors d'une infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa* et coïncide au moment où les cytokine pro-inflammatoire et les niveaux de chimiokines diminuent [341]. Le rôle de l'IL-10 dans l'infection pulmonaire est complexe.

En effet, un excès d'IL-10, dans un modèle murin transgéniques surexprimant l'IL-10 dans les poumons, induit une diminution de la survie et de la réponse protectrice pro-inflammatoire à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* [342]. D'autre part, l'infection à *P. aeruginosa* de souris déficientes en l'IL-10 entraîne une légère augmentation de la réponse pro-inflammatoire par rapport aux témoins mais sans différence de clairance bactérienne [343]. Ces résultats contrastent avec une étude menée par Sawa et al dans laquelle l'administration d'IL-10 recombinante 1 heure avant et 8 après l'infection à *P. aeruginosa* entraînait une amélioration de la lésion pulmonaire et de la survie des souris [344]. Ainsi, ces études ont mis en avant la nécessité d'un recrutement rapide de neutrophiles pour l'élimination de *P. aeruginosa* mais qu'un excès d'IL-10 par rapport aux cytokines pro-inflammatoires est préjudiciable pour le contrôle et l'élimination du pathogène. Néanmoins, ces travaux illustrent également les conséquences négatives d'une réponse immunitaire innée trop exubérante sur la fonction pulmonaire.

6-6. Les Chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines de 8 à 10 kDa possédant une action chimiotactique envers les cellules avoisinantes. Les chimiokines jouent un rôle dans l'adhésion, le chimiotactisme et l'activation de nombreux types de cellules immunitaires. Les chimiokines sont produites en réponse à des stimuli infectieux et régulent le trafic cellulaire. Ainsi, ces molécules vont former un gradient chimioattractant pour les leucocytes afin de les diriger sur le site de l'inflammation. Enfin, les chimiokines servent à faire le lien entre l'immunité innée et acquise [345]. La souris ne possède pas d'homologue structurale de l'IL-8 humaine mais possède des homologues fonctionnels qui sont CXCL1 / KC et CXCL2 / MIP-2 [346].

CXCL1 aussi appelé KC (keratinocyte-derived chemokine) est produite par les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales, et possède une activité chimiotactique sur les neutrophiles.

MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2) ou CXCL2, est sécrétée par les macrophages et les monocytes et entraîne le recrutement des granulocytes.

CXCL9 est produit par les macrophages après induction par l'IFN γ afin de recruter les lymphocytes T.

La production de CXCL10 se fait par les monocytes et les macrophages, après une induction par l'IFN γ , le LPS ou une infection virale. Ses fonctions sont pléiotropes et agissent sur le recrutement cellulaire

Chapitre 4 : La réponse immune détermine le pronostic de l'hôte

1. La théorie: « The damage-response framework of microbial pathogenesis »

Depuis la fin du XXe siècle les maladies infectieuses touchent rarement des hôtes immunocompétents. L'émergence d'infection ne touchant pas que les individus sains met en évidence que les concepts existants de pathogénicité et de virulence ne prennent pas en compte que l'hôte contribue autant que le micro-organisme à la pathogénèse et aux symptômes résultants. Ceci a motivé une nouvelle approche théorique de la compréhension de la pathogénèse microbienne connue sous le nom de « damage-response » proposée par Casadevall et Pirofski [347].

Cette théorie repose sur 3 principes :

- La pathogénèse des infections microbiennes est due à l'interaction entre l'hôte et le micro-organisme.
- Le pronostic de l'hôte est déterminé par la gravité des dommages tissulaires issus de l'interaction hôte pathogène.
- Les dommages tissulaires induits sont dus à la fois au pathogène mais aussi à la réponse de l'hôte.

Par conséquent, les interactions entre l'hôte et un micro-organisme peuvent être bénéfiques ou néfastes soit pour le micro-organisme soit pour l'hôte soit pour les deux. Le mutualisme et le commensalisme sont deux exemples d'interactions qui sont à la fois bénéfiques pour l'hôte et le micro-organisme. Néanmoins, ces dommages observés ne sont pas seulement liés à l'agent pathogène mais implique la réponse immunitaire de l'hôte.

2. Une réponse immunitaire excessive est néfaste pour l'hôte

Les premières cellules immunitaires susceptibles de rencontrer *P. aeruginosa* dans les poumons sont les macrophages alvéolaires résidents. Lorsque ces cellules perçoivent un signal de danger elles s'activent et sécrètent de nombreuses cytokines.

Le recrutement des cellules immunitaires est sous la dépendance de chimiokines telles que CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL9 et CXCL10. Cependant certaines de ces chimiokines comme CXCL1 et CXCL2 seraient impliquées dans la détérioration des paramètres physiologiques fonctionnels des poumons [341]. De plus, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α ont été impliquées dans les lésions inflammatoires du poumon. Wölbeling et al se sont intéressés à l'impact de l'IL-6 sur la fonction respiratoire. Ils ont mis en évidence qu'une forte concentration d'IL-6 dans le LBA est corrélée à une diminution des paramètres de la fonction pulmonaire (volume). La sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 matures *via* l'inflammasome est impliquée dans le recrutement des neutrophiles au niveau des alvéoles pulmonaires. L'activation de l'inflammasome favoriserait les lésions tissulaires et une diminution de la survie [348]. Les cytokines et chimiokines sécrétées vont entraîner le recrutement majoritairement de granulocytes neutrophiles.

Les neutrophiles jouent un rôle primordial dans la clairance bactérienne mais sont aussi incriminés dans la lésion pulmonaire aiguë consécutive à une infection bactérienne. En effet, la gravité de ces lésions est dépendante de l'intensité ainsi que de la durée du processus inflammatoire. Ainsi lors de l'infection, les neutrophiles traversent l'épithélium pulmonaire et pénètrent dans les voies aériennes où ils phagocytent ou détruisent les bactéries contribuant ainsi à la clairance bactérienne. La réponse inflammatoire à *P. aeruginosa* se traduit également par la production de ROS extracellulaire entraînant la mort précoce de cellules inflammatoires ou lorsqu'elle est mal dirigée la NADPH oxydase peut léser directement la membrane plasmique [294, 295, 313]. De plus, l'élastase des neutrophiles peut avoir un impact néfaste sur l'hôte en ciblant les cellules hôtes lors d'infection pulmonaire participant ainsi aux dommages tissulaires et l'inflammation [307].

Par conséquent, lorsque ce recrutement est excessif, l'activité lytique est exercée sur les cellules épithéliales détruisant les jonctions serrées et induisant l'apoptose et la nécrose des cellules alvéolaires de type I et de type II. Les lésions d'un côté sur l'épithélium alvéolaire et de l'autre côté sur l'endothélium conduisent à une augmentation de la perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire. Cette inflammation localisée peut se généraliser et entraîner un

syndrome inflammatoire systémique. La réponse inflammatoire étant excessive et inadaptée devient délétère et conduit aux lésions d'organes comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë [349]. La lésion pulmonaire aiguë est un syndrome clinique d'œdème pulmonaire non cardiogénique causée principalement par l'augmentation de la perméabilité aux protéines de la barrière alvéolo-capillaire. Ces lésions pulmonaires peuvent alors aboutir au choc septique [215].

Chapitre 5 : Objectif de ce travail

La première souche de norovirus murin, MNV1, a été isolée en 2003 à partir du cerveau de souris RAG2/STAT1^{-/-} [17]. Ce virus est proche du norovirus humain qui est jugé responsable de près de 90% des gastro-entérites épidémiques non bactériennes à travers le monde [19]. Le norovirus humain n'étant pas cultivable, la biologie de ce virus est étudiée à travers le MNV seul *Norovirus* capable de se répliquer *in vitro*. Comme pour le norovirus humain, de nombreuses souches de MNV ont été isolées et leurs diversités biologiques rapportées [18]. Certaines souches sont rapidement éliminées des souris de type sauvage comme les souches MNV-1 CW1, CW3 et WU11. D'autres souches peuvent être excrétées jusqu'à 35 jours post-infection et sont dites persistantes. C'est le cas des souches CR1, CR3, CR6, CR7 et S99 [86].

Aujourd'hui, le norovirus murin est le principal contaminant des animaleries de recherche [103]. En Amérique du Nord, 22,1% des 12 639 sérums de souris testés était positifs pour les anticorps anti-MNV-1 [104], une enquête sérologique en Europe a mis en évidence un taux de contamination semblable. [105]. Des taux de prévalence similaires ont été observés au Japon et en Corée du Sud après une analyse sérologique ou par RT-PCR d'échantillons murins [106–108].

Une infection par MNV est asymptomatique chez les souris sauvages et est donc très difficilement détectable par les animaliers. Une fois le virus détecté, son élimination est difficile de par sa résistance aux facteurs environnementaux et aux agents désinfectants.

Cette forte prévalence dans le monde entier offre un énorme potentiel pour ce virus d'interférer avec les modèles de recherche murins. Cependant, les effets de l'infection au MNV sur la recherche biomédicale ne sont pas clairs.

Certaines études ont mis en évidence que le norovirus murin pourrait interférer dans des modèles animaux spécifiques. Parmi ces études figurent les travaux de Lencioni et al qui ont mis en évidence que le norovirus murin augmentait l'inflammation intestinale induite par les bactéries chez les souris Mdr1a^{-/-} [115]. Le MNV-1 a aussi été rapporté comme augmentant l'inflammation et de la mortalité chez des souris surinfectées à *Escherichia coli* [116].

Les phénomènes de co-infections peuvent avoir des conséquences imprévisibles avec des altérations de la réponse immunitaire de l'hôte. Potentiellement, une contamination d'un modèle murin par le MNV pourrait entraîner une modification des paramètres physiologiques étudiés et induire une erreur dans les résultats.

Pour mieux comprendre l'impact de l'infection au MNV dans des modèles murin d'infection bactérienne, l'effet de la souche MNV S99 dans un modèle de pneumonie aiguë à *P. aeruginosa* a été testé chez des souris C57BL/6J. Les paramètres physiologiques étudiés permettront ainsi de mettre en évidence un éventuel impact du MNV sur ce modèle animal.

Partie 2 : Matériels et Méthodes

Chapitre 1 : Lignées cellulaire, souches bactérienne et virale

1- Lignées cellulaire

1-1. Les cellules RAW 264.7

La lignée cellulaire RAW 264.7 a été obtenue à partir d'un liquide d'ascite d'une tumeur induite chez la souris mâle par injection intrapéritonéale du virus Abelson Murine Leukemia (A-MuLV). La lignée cellulaire (ATCC TIB-71) provient de « the European Collection of Cell Cultures » (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France) et a été maintenue comme décrit précédemment [89].

Après décongélation des cellules conservées dans l'azote liquide, la lignée est cultivée dans une étuve à 37°C sous 5% de CO₂ en flasques à bouchons ventilés de 25cm² (Sarstedt, Newton, USA) contenant 15mL de milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), (high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate) supplémenté avec 10% de sérum foetal bovin inactivé par la chaleur (HI FBS) (Gibco® Life Sciences, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Lorsque les cellules RAW 264.7, cellules semi-adhérentes, sont sub-confluentes (70 à 80%), c'est-à-dire tous les 3 à 4 jours, le milieu est éliminé et les cellules décollées à l'aide d'un grattoir en plastique stérile ou cell scraper (Sarstedt, Newton, USA) dans du milieu neuf. Afin de réaliser un nouveau passage, les cellules en suspension sont introduites dans une nouvelle flasque contenant du milieu neuf puis réincubées. Les passages réalisés vont du 1 :2 au 1 :12.

1-2. Les cellules L929

Les cellules L929 [350] sont une lignée de fibroblaste murin sous-clone de la souche parentale L, établi par WR Earle en 1940 [351]. La souche L a été dérivée de cellules de tissus sous-cutané et tissus adipeux d'un vieux mâle C3H/An âgé de 100 jours. Les cellules L929 sécrètent du M-CSF (Macophage colony-stimulating factor), un facteur qui favorise la différenciation des macrophages dérivés de moelle osseuse (BMDMs). Le milieu conditionné des cellules L929 est utilisé fréquemment comme une source brute de M-CSF murin.

Après décongélation des cellules conservées dans l'azote liquide, la lignée est cultivée dans une étuve à 37°C sous 5% de CO₂ en flasques à bouchons ventilés de 25cm² contenant

15mL de milieu DMEM (high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate) supplémenté avec 10% de HI FBS.

Un jour après la décongélation des cellules, le milieu de la flasque est éliminé et les cellules décollées par méthode chimique et mécanique. Ainsi, 2 ml de Versène 1X (Gibco® Life Sciences, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) sont ajoutés par flasque puis incubés à 37°C. Après 5 minutes, au microscope les cellules se décollent et ne doivent plus être adsorbées sur la flasque mais flotter. Le Versène est pipeté vigoureusement pour décoller le tapis cellulaire encore adsorbé. Les cellules sont récupérées dans un tube stérile et centrifugées 10min à 4°C et 300g. Le culot cellulaire est suspendu dans 4 ml de milieu neuf. Des flasques de 75cm² sont ensemencées avec 2 ml de la suspension cellulaire et 23ml milieu de culture puis incubées à 37°C.

Lorsque les cellules sont confluentes, 4 à 5 jours après la décongélation de la lignée, les cellules subissent un nouveau passage. Le milieu de la flasque est éliminé et les cellules décollées. Le milieu contenant les cellules est centrifugé puis le culot cellulaire resuspendu dans un volume de milieu connu. Les cellules sont dénombrées et réensemencées dans de nouvelles flasques 125cm² à raison de 10⁴ cellules /ml dans 30 ml de milieu de culture pour L929.

14 jours après la décongélation de la lignée ou avant selon la densité du tapis cellulaire les surnageants de culture des flasques sont récupérés.

A nouveau, 30 ml de milieu frais sont introduits dans chaque flasque puis incubés à nouveau à 37°C pendant 10 jours. Cette opération peut être répétée de façon à obtenir trois lots de surnageants. Après centrifugation du surnageant à 3500rpm pendant 15 minutes, il peut être filtré sur membrane 0,2µm (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) puis congelé à -20°C afin d'être dosé ultérieurement en M-CSF par ELISA (DY416, R&D systems, Minneapolis, USA) et utilisé pour la culture de BMDM.

2- Norovirus murin

2-1. La souche MNV S99

Toutes les expériences ont été réalisées avec le norovirus murin S99 (Berlin / 2006 / DE) acheté à l'institut the Friedrich-Loeffler (Greifswald-Insel Riems, Deutschland). Les stocks de virus ont été générés en utilisant des cellules RAW 264.7 comme décrit précédemment [132]. Pour générer un stock de virus concentré, la suspension virale a été concentrée par ultrafiltration. Le titre de la suspension virale a été obtenu par titrage en point final de la manière décrite précédemment et a été exprimé en DICT50/ml (dose infectieuse cytopathogène 50%) selon le procédé de Spearman-Kärber [352, 353]. La relation théorique entre la DICT50 et les unités formant des plages (UFP) est d'environ 0,69 en appliquant la loi de Poisson [354].

2-2. Production virale

Les stocks de virus ont été générés en utilisant des cellules RAW 264.7 comme décrit précédemment [132]. En bref, les stocks de MNV ont été générés par la propagation du virus dans des cellules RAW 264.7, une lignée cellulaire de macrophage murin transformé.

Une dizaine de flasque 125cm² sontensemencées par des cellules RAW 264.7 en milieu DMEM (high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate) supplémenté avec 10% de HI FBS de façon à avoir le lendemain un tapis cellulaire sub-confluent.

Le jour de l'infection, le milieu des flasques est éliminé. Chaque flasque 125 cm² reçoit 15ml de milieu DMEM supplémenté avec seulement 2% HI FBS et le tapis cellulaire est infecté avec le MNV à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,05. Les flasques sont incubées 1 heure à 37°C et homogénéisées tous les quarts d'heures. Un volume de 10ml de DMEM 2% HI FBS est ajouté. Les flasques sont incubées 48 à 72 h.

Lorsque l'effet cytopathologique (ECP) observé atteint 80%, les flasques subissent trois cycles de congélation à -80°C et de décongélation. Le milieu des flasques est récupéré afin d'être centrifugé à 3500rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est collecté ainsi débarrassé des débris cellulaires. Le surnageant contenant les virus est conservée à -80°C avant d'être titré ou concentré.

2-3. Concentration de la suspension virale

Les surnageants de la production virale débarrassés des débris cellulaires sont récupérés. Douze millilitres de surnageant sont introduits dans la colonne Amicon Ultra-15, PLHK Ultracel-PL membrane, 100 kDa (Merck Millipore, Minnesota, USA). Les colonnes sont centrifugées à 5000g sur rotor fixe 15 à 25 minutes ou jusqu'au passage total de l'échantillon. L'opération est répétée pour l'ensemble des surnageants afin de récupérer au final 3 ml de suspension virale concentrée.

Cette opération permet de concentrer à peu près 100 fois la suspension virale. La suspension virale concentrée est alors aliquotée et conservée à -80°C jusqu'à la titration

2-4. Titrage du virus par effet cytopathique

Cette technique de titrage peut être appliquée à tous les virus provoquant un effet cytopathique ou cytopathogène caractéristique. Le titre du virus est évalué par une formule statistique en fonction du nombre de cupules inoculées. Ce titrage peut être réalisé soit en ensemençant le virus sur un tapis cellulaire déjà établi ou encore en mélangeant le virus au moment de la préparation des cellules. Le titre MNV a été obtenu par dosage en plaques comme décrit précédemment [352, 353]

La veille de la titration, 50µL d'une suspension cellulaire de RAW 264.7 à 4.10^5 cellules par millilitres en DMEM supplémenté avec seulement 2% de HI FBS sont introduits dans chaque cupule d'une plaque 96 puits (Sarstedt, Newton, USA) et incubés à 37°C. Au moment du titrage, des dilutions décimales (10^{-2} à 10^{-9}) du virus à titrer sont préparées dans du milieu DMEM supplémenté avec seulement 2% HI FBS. Cent microlitres de chaque dilution sont ajoutés dans 6 cupules et la plaque incubée 1 heure à 37°C. Plus le nombre de cupule utilisé pour une même dilution est important, plus la précision du titre obtenu sera grande. Cent microlitres de DMEM supplémenté avec seulement 2% HI FBS sont ajoutés dans chaque puits et la plaque incubée à 37°C. Les plaques sont observées quotidiennement au microscope et les cupules dans lesquelles les cellules sont dégénérées notées. Lorsque l'ECP a cessé de progresser (3 à 6 jours), le titre infectieux est évalué selon la méthode de Spearman-Kärber.

La méthode de Spearman-Kärber utilise la formule ci-dessous afin de déterminer la dose infectieuse cytopathogène 50% ou DICT50.

$$\text{DICT50} = -\Delta - \delta(S-0,5)$$

Où $\Delta = \text{Log}_{10}$ de la dilution montrant 100% de dégénérescence.

$\delta = \text{Log}_{10}$ du facteur de dilution.

S=Somme des cupules dégénérées incluant celles de la dilution où il y a 100% de dégénérescence. Cette dernière a pour valeur l'unité et chaque autre dilution est une fraction de l'unité.

La grande majorité des études publiées sur le norovirus murin exprime le titre viral en UFP/mL. Afin d'homogénéiser l'unité d'expression de la concentration virale, les titres viraux obtenus en DICT50/ml ont été convertis en UFP/ml. La relation théorique entre DICT50 et UFP est d'environ 0,69 en appliquant la loi de Poisson [354].

3- Pseudomonas aeruginosa

3-1. La souche CHA

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* utilisée lors de cette étude est la souche CHA. Elle a été isolée à partir d'un lavage broncho-pulmonaire de patient atteint de mucoviscidose, au CHU de Grenoble en 1993 (Université Joseph Fourier, Laboratoire TheREx) [355]. La souche CHA adopte un phénotype mucoïde dans les conditions de culture du laboratoire. Elle possède un système de sécrétion de type III actif *in vivo*, dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez la souris, et *in vitro*, lors d'une déplétion du milieu en calcium ou un contact cellulaire. La souche possède tous les gènes codant les exotoxines du système de sécrétion de type III (ExoS, ExoT, ExoY) excepté le gène codant ExoU. Son phénotype de résistance aux antibiotiques est celui d'une souche sauvage, n'ayant pas acquis de modes de résistance supplémentaires.

3-2. Conditions de culture des bactéries.

La souche CHA est cultivée sur la nuit en milieu Lysogeny broth Lennox (LB) liquide (DifcoTM Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), en aérobiose à 37°C sous agitation (250rpm). Le jour suivant, une dilution au 1/40 de la culture de nuit est réalisée en LB préchauffé à 37°C et incubée 2 heures à 37°C sous agitation. Les bactéries sont lavées deux

fois avec une solution saline tamponnée au phosphate stérile (PBS) (Gibco® Life Sciences, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Le culot bactérien est remis en suspension dans du PBS et la densité optique à 600nm (A600) ajustée à DO=0,9 nm (Amersham, General electric healthcare, Life science, UK).

La dose infectieuse souhaitée est extrapolée à partir d'une courbe de croissance standard. L'inoculum bactérien est vérifié par dilutions et étalements successifs sur boîtes de Bromo-Cresol Purple agar (BCP, BioMérieux, Marcy l'étoile, France). Le dénombrement bactérien est réalisé après une incubation de 24h à 37°C. Les colonies présentes sur les boîtes sont dénombrées et les UFC (Unités Formant Colonies) / ml sont calculées d'après la formule suivante.

$$N = \frac{\Sigma colonies}{(n1 + 0,1 n2)dV}$$

Avec :

- n1 : nombre de boîtes retenues à la dilution la plus faible
- n2 : nombre de boîtes retenues à la dilution la plus forte
- Σ colonies : somme des UFC comptées sur l'ensemble des dilutions
- V= Volume d'inoculum (μ L)
- d : dilution la plus faible
- N= UFC / ml

Chapitre 2 : Etude de la réponse de l'hôte *in vitro*

1- Récupération et culture des macrophages dérivés de la moelle osseuse

Les macrophages dérivés de la moelle osseuse ou Bone marrow-derived macrophages (BMDM) ont été préparés comme décrit précédemment [356]. Les BMDMs sont obtenus à partir de souris mâles C57BL/6 âgées de 8 à 10 semaines (élevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France).

1-1. Obtention des cellules de la moelle osseuse

L'animal est euthanasié par inhalation de CO₂ ou dislocation cervicale. La souris est dépecée au niveau des membres inférieurs, puis le fémur déboité de la hanche en faisant attention à ne pas endommager la tête du fémur. Les ligaments et tendons, la chaire et la graisse sont rapidement éliminés afin de libérer les membres inférieurs. Les os prélevés stérilement sont sectionnés au niveau des épiphyses.

Une aiguille 22G (Gauge) (Terumo Neolus, Leven, Belgium), montée sur une seringue (Terumo Neolus, Leven, Belgium) contenant 2ml de DMEM supplémenté avec 10% de HI FSB et 30% de surnageant de culture de L929 contenant des facteurs de stimulation des macrophages dont du M-CSF, est enfoncée parallèlement au canal osseux. Le milieu est rapidement injecté à travers le canal osseux et la pression exercée pousse la moelle osseuse en dehors de l'os dans une boîte de Petri (Sarstedt, Newton, USA). Les agrégats cellulaires sont cassés par aspiration / refoulement à travers l'aiguille 22G. La suspension cellulaire une fois homogène est filtrée au travers d'un tamis cellulaire 70µm (Falcon®, Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) afin d'éliminer d'éventuels fragments d'os. Le volume de la suspension cellulaire est complétée QSP (quantité suffisante pour) 40ml avec du DMEM.

1-2. Culture et différenciation des cellules de la moelle osseuse

A jour 0, 10ml de suspension cellulaire sont dispatchés dans quatre boîtes de Petri 100mm qui sont incubées à 37°C en présence de 5% CO₂.

Au jour 3, 5ml de milieu DMEM pour BMDM sont ajoutés dans chaque boîte de Petri puis l'incubation poursuivie.

Au jour 7, le milieu ainsi que les cellules non adhérentes sont éliminés. 2ml de PBS 1X sont ajoutés par boîte de Petri et les cellules mises en suspension à l'aide d'un cellScaper. Les cellules ainsi récupérées sont centrifugées à 300g à 4°C pendant 10 minutes, puis le culot est suspendu dans 10 ml de milieu. En ayant pris soin de ne plus avoir d'agrégats, les cellules sont dénombrées en cellule de Malassez après coloration au bleu trypan 0,04% (Invitrogen corporation, CA, USA). La solution est ensuite calibrée à raison de 5.10^6 à 5.10^7 cellules par 10ml par boîte de Petri en milieu DMEM pour BMDM.

Au jour 10, les cellules sont différenciées et prêtes à être utilisées. Le milieu ainsi que les cellules non adhérentes sont éliminés. Un volume de 2ml de PBS est ajouté par boîte de Petri et les cellules mises en suspension à l'aide d'un cellScaper. Les cellules ainsi récupérées sont centrifugées à 300g à 4°C pendant 10 minutes, puis le culot est suspendu dans 10 ml de milieu. En ayant pris soin de ne plus avoir d'agrégats, les cellules sont dénombrées en cellule de Malassez après coloration au bleu trypan. La solution est ensuite calibrée à la concentration souhaitée.

2- Infection des BMDM

La suspension cellulaire de BMDMs est déposée sur plaque 96 puits à raison de 100 μ l par puit soit 5.10^4 cellules par puit et la plaque incubée à 37°C. Le lendemain de la mise en plaque des BMDMs, les cellules sont infectées par la souche MNV S99 (MOI: 0,01 ; 0,1 et 1) puis ré-incubées. Vingt-quatre heures après la stimulation des BMDMs par le MNV, les macrophages sont infectés avec la souche CHA (MOI 2 et 5) puis la plaque centrifugée brièvement afin de favoriser le contact cellules / bactéries. Après 30 minutes d'exposition à 37°C, afin de stopper l'infection, du DMEM contenant de la gentamicine a été ajouté dans chaque puits afin d'avoir une concentration finale à 400 μ g/ml. Après 24 heures, les surnageants ont été récupérés et stockés à -80°C jusqu'à l'analyse des cytokines (Figure 8).

3- Dosage des cytokines dans les surnageants de BMDMs par ELISA

Les différentes cytokines dosées sont le TNF- α (900-T-54) et l'interleukine-6 (900-T-50) (PeproTech, Rocky Hill, USA). Les dosages cytokiniques des surnageants de LBA ont été effectués par méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Il s'agit ici d'ELISA dit en sandwich, pour cela, une quantité connue d'anticorps de capture est liée à la surface

d'un plaque 96 puits (Costar®, Corning Incorporated, New York, USA). Les échantillons ainsi que différents points de gamme étalon, obtenus grâce à une protéine recombinante, sont ensuite déposés. La cytokine d'intérêt présente dans l'échantillon se lie à l'anticorps de capture. Un anticorps de détection biotinylé est ajouté et se lie à l'antigène. De la streptavidine HRP (horseradish peroxidase) se lie à l'anticorps de détection. Le substrat, du 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TBM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), est ajouté et est converti par l'enzyme HRP en une forme détectable (coloration). La réaction est stoppée par l'addition d'une solution d'acide sulfurique 2N. La lecture est réalisée par absorptiométrie aux longueurs d'onde de 450 nm et 540 nm sur un lecteur Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne). Les résultats obtenus sont ensuite comparés à une gamme étalon.

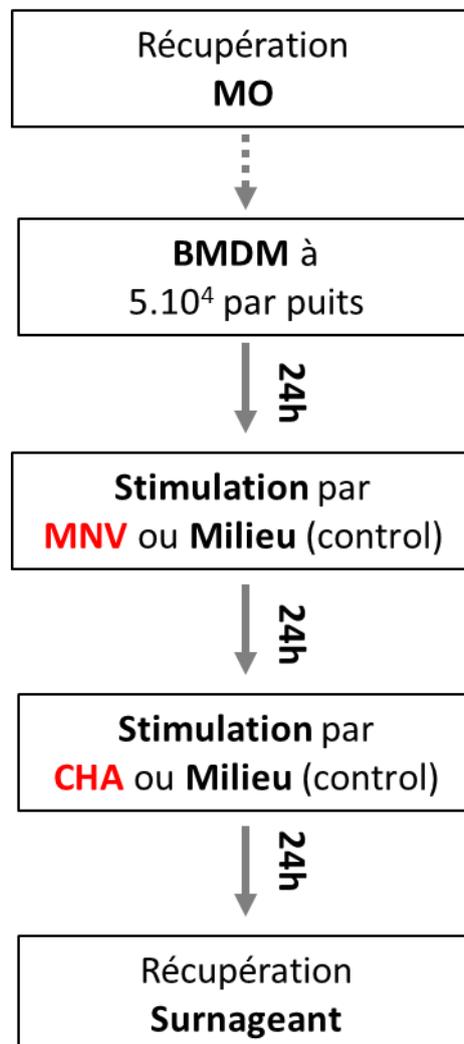


Figure 8 : Protocole d'infection des macrophages dérivés de moelle osseuse. MO : Moelle osseuse ; BMDM : Bone marrow derived macrophage ; MNV : Norovirus murin ; CHA : souche de *P. aeruginosa*.

Chapitre 3 : Détection du MNV

1- Extraction des ARN viraux de fèces

Des prélèvements de fèces ont été réalisés et les échantillons conservés à -80°C . Le jour de l'extraction, $200\mu\text{L}$ de PBS 1X froid sont ajoutés dans les microtubes contenant les fèces. Les fèces sont mises en suspension dans le PBS à l'aide d'une öse puis centrifugées 20 minutes à $4000g$ et 4°C . Le surnageant est prélevé afin de réaliser l'extraction des ARN viraux à l'aide du kit High pure viral nucleic acid (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA) et selon le protocole indiqué par le fabriquant.

La lyse du virus est accomplie par incubation de l'échantillon dans un tampon de liaison spécifique et de lyse en présence de Proteinase K. Les acides nucléiques contenus dans le lysat se lient spécifiquement à la surface de la membrane de la colonne de purification en présence de sel chaotropique. Le processus de liaison étant spécifique pour les acides nucléiques, les sels, protéines et autres impuretés sont éliminés par une étape de lavage de la colonne. Enfin, l'ARN retenu sur la membrane est élué grâce à l'ajout de $50\mu\text{L}$ d'eau exempte d'ARNase. Les produits d'éluion contenant les ARN viraux des fèces peuvent être directement utilisés ou conservés à -80°C .

2- Rétrotranscription

La rétrotranscription permet la synthèse d'ADNc simple brin à partir d'une matrice d'ARN, grâce à une étape de transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique. Elle est réalisée grâce au Kit The High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster city, USA) qui utilise le schéma d'amorce aléatoire pour initier la synthèse d'ADNc. Les milieux réactionnels étaient composés de $10\mu\text{L}$ de Master Mix Reverse Transcription au 2X ($2,0\mu\text{L}$ de 10X RT Buffer, $0,8\mu\text{L}$ de 25X dNTP Mix (100 mM), $2,0\mu\text{L}$ de 10X RT Random Primers, $1\mu\text{L}$ de MultiScribe™ Reverse Transcriptase et $4,2\mu\text{L}$ d'eau nuclease-free) et de $10\mu\text{L}$ de chaque élué d'ARN viraux.

A l'aide du thermocycleur Mastercycler® egradient S (Eppendorf, Hambourg, Allemagne), les mélanges réactionnels sont incubés 10 minutes à 25°C afin de permettre l'hybridation des amorces, puis 120 minutes à 37°C pour réaliser la synthèse d'ADNc et enfin

5 minutes à 85°C pour inactiver l'enzyme. Les produits réactionnels sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

3- La polymérisation en chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro* qui permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN à partir d'une faible quantité.

Le mélange réactionnel était composé, suivant les recommandations du fabricant (InvitrogenTM, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) : de 2,5µL de High Fidelity PCR Buffer 10X, 0,5µL de dNTP à 10 mM, 2 µl de MgSO4 à 50 mM, 0,5 µL d'amorce sens à 10 µM, 0,5 µL d'amorce anti-sens à 10 µM (Tableau 2), 0,1µL de Platinum® Taq High Fidelity, 6µL de produit de rétrotranscription et de 12,9 µL d'eau exempte de nucléase. L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler® egradient S dans les conditions suivantes: dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C, 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 58°C et 30 secondes à 68°C, puis une étape d'élongation finale de 10 minutes à 68°C.

Tableau 2 : Amorces pour l'amplification du MNV

Amorces	Séquence 5'->3'	référence
MNV	CCGCAGGAACGCTCAGCAG GGCTGAATGGGGACGGCCTG	[357]

4- Electrophorèse de l'ADN

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose. La concentration d'agarose est dépendante de la taille des fragments à séparer, plus la taille de l'amplicon est faible plus la concentration en agarose doit être importante. L'amplicon à séparer faisant 129pb, une concentration de 3% d'agarose (Fisher scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) a été adoptée.

Les produits PCR, une fois le bleu de charge ajouté (6X Mass ruler loading dye solution, Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), ont été séparés par électrophorèse à 3 Volts/cm pendant 45 minutes dans un tampon TBE 1X (Tris 0,1M, Borate 0,09M, EDTA 1mM) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Un marqueur de taille a également été déposé afin d'évaluer et vérifier la taille de l'amplicon (50 bp DNA Ladder, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).Après une coloration de 15 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), les bandes d'intérêts correspondantes aux amplicons ont été visualisées par fluorescence du BET sous exposition aux UV (UV, 312 nm).

Chapitre 4 : Modèle murin d'infection pulmonaire

1- Animaux

Les animaux utilisés lors de cette étude sont des souris mâles de type sauvage de fond génétique C57BL/6J, de huit à dix semaines, provenant des laboratoires Janvier (Le Genest St-isle F-53941 Saint Berthevin). Les souris sont toutes exemptes de microorganismes recherchés sur liste FELASA (the Federation of Laboratory Animal Science Associations) et les rapports des fournisseurs ont indiqué que les souris étaient négatives pour le norovirus murin.

Les animaux ont été hébergés en portoir ventilé ou en micro-isolateur à l'institut Pasteur de Lille. Les souris avaient libre accès à un régime alimentaire standard de laboratoire dans des conditions de températures et d'exposition à un cycle de la lumière d'une demi-journée.

Toutes les études sur les animaux ont été approuvées par la commission d'examen expérimental du Nord-Pas-de-Calais. Tous les expériences animales ont été réalisées dans un établissement agréé (N ° B59-108) selon les directives gouvernementales N ° 86/609 / CEE.

2- Instillation par gavage de l'inoculum viral

Les souris C57BL/6J ont été infectées par gavage oral (Animal feeding needles, Havard Apparatus, Holliston, USA) avec 100µL de suspension virale de MNV S99, les souris contrôles ont reçu 100µl de PBS *per os*. Lorsque les souris sont infectées par la suspension virale de MNV S99, elles ont reçu à chaque fois 1.10^7 UFP. Cet inoculum viral n'induit pas de pathologie, cependant, un laps de temps d'une semaine semble nécessaire à la colonisation de la souris par le virus.

3- Instillations intra-nasales et inocula bactériens

Les souris ayant préalablement reçu le MNV ou le PBS *per os*, sont anesthésiées pour une courte durée (30 secondes) au Sevoflurane (Sevoflurane, Baxter, Maurepas, France). Elles sont instillées par voie intra-nasale à l'aide d'une micropipette avec 40 µL de suspension bactérienne contenant l'inoculum bactérien désiré ou avec du PBS. Les souris sont remises en

cage après leur réveil et appréciation clinique de leur vitalité. Différents inocula bactériens ont été utilisés afin de réaliser les différents modèles d'agression pulmonaire aiguë *in vivo*. L'inoculum du modèle d'agression pulmonaire aiguë, soit 2.10^6 UFC/souris, a été calibré afin d'obtenir une lésion pulmonaire suffisante et une mortalité nulle à 24 heures et 48 heures. A l'inverse l'inoculum utilisé pour les expériences de survie, soit 5.10^6 UFC/souris, induit une mortalité de 100% à 96 heures chez les souris sauvages C57BL/6J.

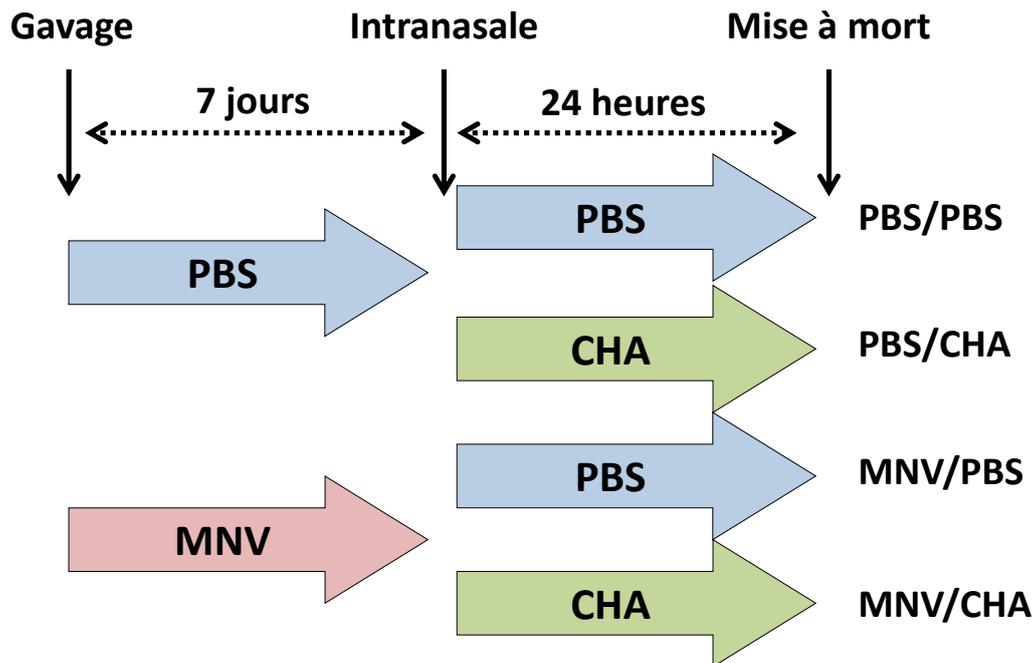


Figure 9 : Chronologie du protocole d'infection. PBS : Phosphate buffer saline ; MNV : Norovirus murin ; CHA : souche de *P. aeruginosa*.

4- Modèle de survie à 96 heures

Les souris C57BL/6J ont été infectées par gavage oral avec 1.10^7 UFP de MNV S99, les souris témoins ont reçu du PBS. Sept jours plus tard, le modèle d'infection pulmonaire aiguë a été induit par instillation intranasale de *P. aeruginosa*. L'inoculum létal de 5.10^6 UFC/souris ou le PBS a été administré par voie intranasale selon la figure 10 ci-contre. Les souris ont été pesées quotidiennement et la souffrance animale évaluée.

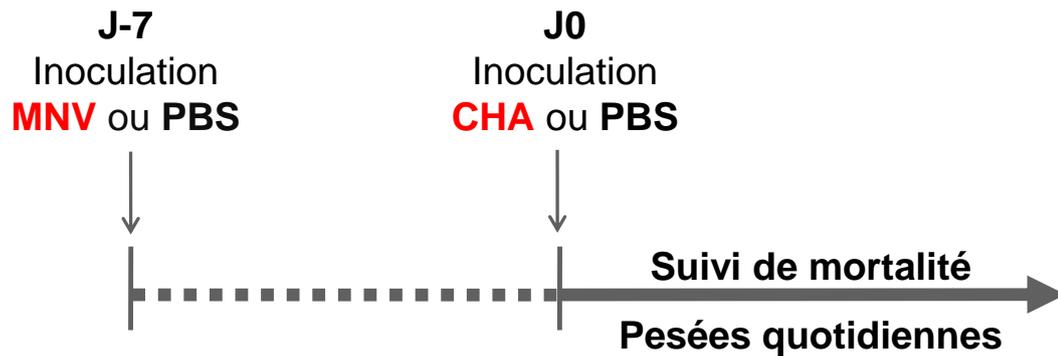


Figure 10 : Protocole du modèle de survie

5- Modèle d'agression pulmonaire aiguë

Les souris C57BL6/J ont été infectées par gavage oral avec 1.10^7 UFP de MNV S99, les souris témoins ont reçu du PBS. Sept jours plus tard, l'infection pulmonaire aiguë a été réalisée par instillation intranasale de *P. aeruginosa*. L'inoculum sub-létal de 2.10^6 UFC/souris ou le PBS ont été administrés par voie intranasale (Figure 11). Les souris ont été pesées quotidiennement et la souffrance animale évaluée. Toutes les souris ont été sacrifiées 24 heures après instillation de *P. aeruginosa*.

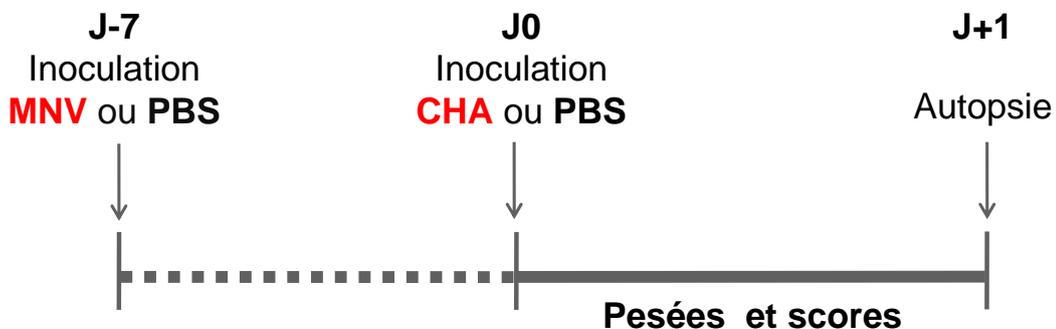


Figure 11 : Protocole du modèle d'infection aiguë

6- Score clinique

L'évolution du score clinique se base sur l'évaluation de l'aspect des animaux sur 4 critères pour un score final de 0 à 10 (la température du corps, l'apparence du poil, le comportement et la perte de poids), (Tableau 3).

Tableau 3 : Critère d'évaluation du score clinique

Score	Mouvement	Fourrure	Température
0	Mobile	Lisse	Normale
1	Peu mobile	Hérissée	
2	Prostrée		Froide

Le score clinique est calculé avec la formule ci-dessous :

Score de maladie

$$= [(score fourrure + score température + score mouvement) + (% perte de poids/(-5))]$$

7- Mise à mort des souris

La mise à mort des animaux est réalisée 24 heures après l'instillation de *P. aeruginosa* dans le modèle d'agression pulmonaire aiguë par surdosage de Pentobarbital sodique. L'euthanasie se fait par l'injection en intra-péritonéale de Pentobarbital sodique 20% à la dose de 60 mg/Kg (CEVA laboratoire, Libourne, France).

Chapitre 5 : Analyse de la réponse de l'hôte

1- Exsanguination

Après ouverture de la cage thoracique, le sang est prélevé par ponction au niveau du ventricule droit au moyen d'une aiguille montée sur une seringue pré-héparinée. Le sang est centrifugé 15 minutes à 2000g afin de récupérer le sérum. Le sérum permettra de réaliser l'évaluation de la lésion pulmonaire. Il sera ensuite conservé à -80°C afin de réaliser d'éventuels dosages cytokiniques par ELISA.

2- Lavage broncho alvéolaire

La trachée est mise à nue par méthode chirurgicale et une aiguille de 24 G montée sur un cathéter (Popper & Sons, New Hyde Park, USA) est introduite, *via* l'oropharynx, en endotrachéale. Après avoir étanchéifié le système en nouant un fil autour de la trachée dans laquelle se trouve la canule, 500 microlitres de PBS sont injectés dans les poumons *via* la seringue montée sur la canule puis récupérés. Cette opération est répétée deux fois. Les 1,5ml de liquide de lavage broncho alvéolaire (LBA) sont conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation. Le LBA est centrifugé 10 minutes à 300g. Le surnageant est prélevé afin de réaliser l'évaluation de la lésion pulmonaire, puis conservé à - 80°C afin de réaliser d'éventuels dosages cytokiniques par ELISA.

3- Formule des liquides de lavage broncho alvéolaire

Le culot cellulaire obtenu à l'issue du LBA est repris dans 500µL de tampon de lyse ACK-lysing Buffer (Gibco[®] Life Sciences, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) puis laisser 10 min à température ambiante afin de lyser les globules rouges. Après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans 1ml de PBS. Dix microlitres de cette suspension sont prélevés et mélangés à 10 µl de bleu trypan. Une numération cellulaire est effectuée en cellule de Malassez. Les concentrations des LBA sont normalisées en PBS à 1.10^6 cellules/ml. Un dépôt sur lame de verre dégraissée d'une monocouche cellulaire à partir de 100µl de cette suspension est réalisé par centrifugation au cytopspin (Cytospin shandon, Waltham, USA).

Après séchage, les lames sont colorées au May Grünwald Giemsa (CML, Nemours, France). Les formules cellulaires ont été obtenues par comptage de 200 cellules / échantillon et chaque type de cellule est exprimé en tant que pourcentage du nombre total de cellules comptées.

4- Quantification de la charge bactérienne pulmonaire

Après récupération du LBA, les poumons sont prélevés et homogénéisés dans 1 ml de PBS stérile dans un microtube. Le microtube contenant le PBS a été préalablement pesé avant de recevoir l'organe. L'échantillon est broyé (Ultra-Turrax, IKA, Wilmington, USA) pendant 10 secondes et le broyeur est lavé entre chaque selon un protocole comprenant quatre lavages (eau stérile, éthanol absolu, eau stérile, eau stérile). Le broyat de poumon est dilué en cascade dans du PBS 1X stérile et les dilutions en série étalées sur géloses BCP. Après 24 heures d'incubation à 37°C des géloses ensemencées, les souches de *P. aeruginosa* sont dénombrées selon leur aspect visuel et leur caractère lactose négatif. Le dénombrement bactérien est rapporté au poids du poumon pesé pour chaque échantillon.

5- Dissémination splénique

Une incision est réalisée afin de prélever la rate. Celle-ci est ensuite déposée dans un microtube contenant 1 ml de PBS puis broyée selon la même procédure que le poumon. Les colonies de *P. aeruginosa* sont comptées après étalement de dilutions en série sur gélose BCP et incubation à 37°C pendant 24h.

6- Evaluation de la lésion pulmonaire

La perméabilité alvéolo-capillaire est évaluée par la mesure du passage alvéolo-interstitiel d'albumine marquée à l'Iso-ThioCyanate de Fluoresceine (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), injectée en intra-péritonéal. La fluorescence du LBA mesurée est proportionnelle à la concentration d'albumine-FITC dans le sang et au degré de lésion de la barrière alvéolo-capillaire.

Une injection par voie intra-péritonéale de 200 µl de PBS contenant 2 mg/ml d'albumine-FITC a été réalisée 2 heures avant l'euthanasie des souris. Un volume de 100 µl

de sérum et de LBA préalablement prélevés sont déposés dans une plaque 96 puits et la fluorescence mesurée pour chacun des échantillons (Excitation: 487nm, Emission:520nm), (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Un ratio est établi, permettant de calculer la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire [358].

7- Dosage des cytokines dans le surnageant de LBA par ELISA

Les dosages cytokiniques des surnageants de LBA ont été effectués par méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) à l'aide des kits de Peptotech, selon les informations du fabricant. Les trois cytokines dosées sont le TNF α , l'IL-6 et l'IL-10.

8- Mesures de l'expression des transcrits par PCR quantitative

8-1. Extraction des ARN du tissu pulmonaire.

Des prélèvements de poumon ont été réalisés lors du sacrifice et les échantillons conservés à -80°C dans du Lysis Buffer. Les extractions des ARN du tissu pulmonaire ont été réalisées à l'aide du kit GeneJET RNA Purification Kit[®] (ThermoScientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), et selon le protocole indiqué par le fabricant. Les poumons sont broyés à l'aide de l'ultraturex dans un tampon de lyse contenant du dithiothréitol (DTT) et un agent chaotropique (thiocyanate de guanidine) capable de protéger l'ARN de l'activité des ARNases. Le lysat de poumon ainsi obtenu est mélangé à une solution contenant de la protéinase K et de l'éthanol afin de fluidifier l'échantillon, puis transféré dans une colonne de purification en silice. L'ARN contenu dans le lysat pulmonaire est retenu au niveau de la membrane de la colonne de purification grâce à des centrifugations successives. L'ajout de tampons de lavage dans la colonne de purification suivis par des centrifugations permet d'éliminer les impuretés de la membrane. Enfin l'ARN retenu sur la membrane est élué par ajout dans la colonne, d'eau sans ARNases.

8-2. Dosages des acides nucléiques

La quantité d'ARN totale obtenue pour chaque échantillon est mesurée par densité optique à 260nm et 280nm au moyen d'un spectrophotomètre NanoVue PlusTM (GE Healthcare, France). Le rapport de l'absorbance à 260 nm et 280 nm est utilisé pour évaluer la

pureté de l'ARN. Un ratio de ~2,0 est généralement accepté comme «pur» pour l'ARN. Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

8-3. PCR quantitative

Après une étape de rétro-transcription de l'ARN tissulaire extrait, les réactions de PCR quantitative en temps réel ont été réalisées en chimie SYBR[®]Green à l'aide du kit Kapa SYBR[®] fast universal Q-PCR (Kapa biosystems, Wilmington, USA) sur un appareil thermocycleur Applied Biosystems 7900 HT Fast Real Time PCR.

Le SYBR[®]Green est un agent intercalant capable de se lier à l'ADN double brin. Lorsque le SYBR[®]Green est en solution, il émet peu de fluorescence mais son émission de fluorescence augmente en étant lié à l'ADN double brin. Cette technique repose exclusivement sur la spécificité des amorces choisies. Lors de l'étape d'élongation, l'agent intercalant se fixe à l'ADN double brin naissant, ce qui conduit à une augmentation de la fluorescence. A chaque fin de cycle d'élongation, l'émission de fluorescence est mesurée et diminue à l'étape suivante lorsque l'ADN est dénaturé. La Q-PCR est positive lorsque le nombre de cycle permet la détection d'un signal. Le moment d'apparition du signal est appelé cycle seuil ou Ct (cycle threshold). Afin de valider la Q-PCR, la courbe de dissociation doit être étudiée. Chaque produit d'ADN double brin synthétisé possède une température de fusion qui lui est spécifique appelée melting temperature ou T_m, définie comme étant la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme double brin et l'autre moitié sous forme simple brin. Cette température est représentée par un unique pic sur la courbe de dissociation. Lorsque plusieurs pics sont observés, cela signale la présence d'amplification non spécifique avec un T_m différent de l'amplicon d'intérêt.

Les amorces utilisées dans les réactions d'amplification ont dû être évaluées. Les quantités d'amorces, donnant la meilleure efficacité de la réaction d'amplification, ont été sélectionnées. Ainsi, des concentrations d'amorces allant de 150nM à 800nM ont été testées pour les gènes cibles. Les séquences des amorces ainsi que leurs concentrations d'utilisation sont présentées dans le tableau 4.

Les produits issus de la rétrotranscription ont été préalablement dilués avec de l'eau sans ARNases afin d'obtenir une concentration finale à 2,5 ng/μl. Le volume de chaque

réaction est de 20 µl, contenant 10µl de Kapa SYBR®, 150 à 600 nM de chaque amorce (Tableau 4), 0, 4µl de High Rox, 4 µl d'ADN matrice et de l'eau sans ARNases QSP 20µl.

L'amplification PCR a été effectuée dans les conditions suivantes : dénaturation initiale de 4 minutes à 95°C, suivie de 40 cycles d'amplification avec une dénaturation de 5 secondes à 95°C, une étape d'appariement et d'extension simultanée de 30 secondes à 60°C complétée par une courbe de dissociation (15 secondes à 95°C, 15 secondes à 60°C et 15 secondes à 95°C).

Tableau 4 : Oligonucléotides utilisées lors de cette étude

Amorces	Séquences 5' -> 3'	Concentration (mM)	références
β-actin	GAATGGGTCAGAAGGACTCCTATG CCATGTCGTCCCAGTTGGTAA	300	[359]
IL-6	ACACATGTTCTCTGGGAAATCGT AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	300	[360]
TNF-α	ACGGCATGGATCTCAAAGAC GTGGGTGAGGAGCACGTAGT	300	[361]
IL-1β	CCAAAAGATGAAGGGCTGCT TCATCAGGACAGCCCAGGTC	300	[362]
IL-17 A	GCACTGAGCTTCCCAGAT ACCGCAATGAAGACCCTGATA	300	[363]
IFN-α	AGCAGATCCAGAAGGCTCAA GGAGGGTTGTATTCCAAGCA	300	[364]
CXCL1	TGCACCCAAACCGAAGTCAT TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC	600	[365]
CXCL2	AGTGA ACTGGCGTGTCAATGC CCGCCCTTGAGAGTGGCTAT	600	[366]
CXCL9	AGCAGTGTGGAGTTCGAGGAAC AGGAGCATCGTGCATTCTT	600	[367]
CXCL10	AGCTTGAAATCATCCCTGCG CAATGATCTCAACACGTGGGC	150	[368]

8-4. Analyse par la méthode des comparatives Ct.

L'expression de chaque gène a été normalisée grâce à la β -actine, un gène rapporteur de contrôle, et les résultats ont été analysés selon la méthode du $\Delta\Delta Ct$ à l'aide du logiciel SDS V2.3 (Applied Biosystem).

Chapitre 6 : Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Prism 5 (Graph-Pad Software, San Diego, USA). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (écart standard à la moyenne). Les variables quantitatives des expérimentations de culture cellulaire sont analysées grâce à une analyse de variance à deux facteurs (Two- way Anova) suivi d'un post test de Bonferonni lorsque celles-ci sont significatives. Dans le cadre des expérimentations animales, les comparaisons des groupes ont été analysées avec le test non paramétrique de Mann-Whitney. Les courbes de survie ont été analysées à l'aide du Log-rank test (Mantel-Cox). La significativité a été acceptée à * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Partie 3 : Résultats

Chapitre 1 : Le MNV induit une inhibition de l'IL-6 et du TNF- α par les BMDMs en réponse à *P. aeruginosa*

Afin de visualiser un possible phénomène d'immunomodulation induit par le norovirus murin S99, des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris ont d'abord été infectés par le MNV S99 et 24 heures plus tard avec la souche CHA de *Pseudomonas aeruginosa*. L'IL-6 et le TNF- α ont été dosés dans les surnageants de culture par ELISA et les résultats obtenus présentés dans la figure 12.

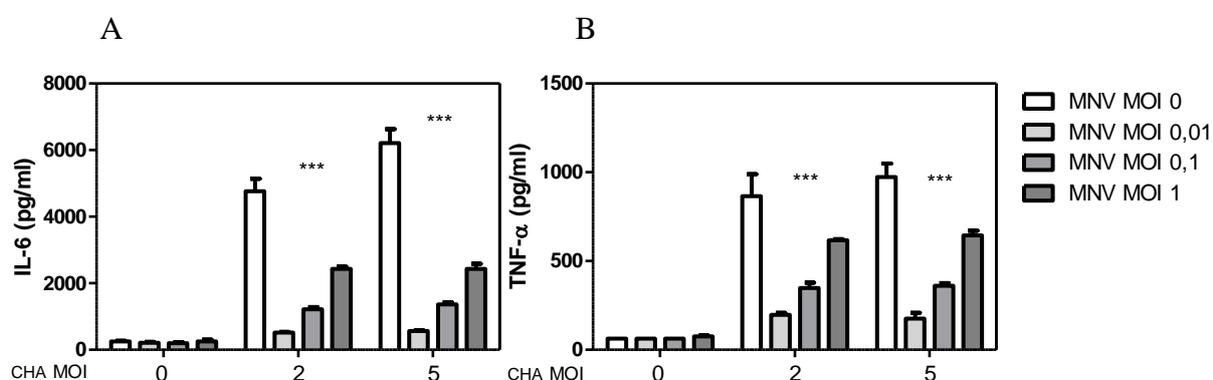


Figure 12: Le norovirus murin S99 induit une inhibition de la production d'IL-6 et du TNF- α par les BMDMs en réponse à *P. aeruginosa*. (A, B, C) Les BMDMs de souris WT ont été infectés par le MNV S99 (MOI: 0,01, 0,1 et 1) puis après 24h d'incubation, surinfectés par la souche CHA (MOI: 2, 5). (A) L'IL-6 et (B) le TNF- α des surnageants cellulaires ont été dosés par ELISA. (A, b) Les analyses statistiques ont été réalisées par Two way ANOVA suivi par un post-test de Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Les concentrations en IL-6 et TNF- α obtenues dans les conditions contrôles, CHA et MNV MOI 0, sont proches du seuil de détection de l'ELISA.

Les doses infectieuses de MNV utilisées lors de la simple stimulation (MOI CHA de 0) n'induisent pas de production d'IL-6 et de TNF- α , les concentrations obtenues étant similaires aux conditions contrôles. A l'inverse, la production d'IL-6 et de TNF- α a été fortement augmentée en réponse à une stimulation simple par la souche CHA de *P.*

aeruginosa, de plus un effet dose peut être observé. En effet, la concentration d'IL-6 obtenue à MOI 5 est 1,5 fois plus élevée qu'à MOI 2.

Dans les conditions de double stimulation, la production d'IL-6 et de TNF- α par les BMDMs pré-stimulés avec le MNV en réponse à CHA a été très significativement réduite. De plus, le phénomène de diminution de sécrétion de cytokines pro-inflammatoire est d'autant plus important aux faibles multiplicités d'infections du MNV S99 utilisées.

A la vue des résultats, cette expérience a permis de mettre en évidence l'existence d'un phénomène d'immunomodulation par le norovirus murin S99 de la réponse pro-inflammatoire consécutive à une infection bactérienne.

Chapitre 2 : Vérification du statut sanitaire

Les animaux utilisés lors de cette étude sont négatifs pour la recherche de norovirus murin d'après les statuts sanitaires joints par le fournisseur. Néanmoins, il est important de montrer que les souris une fois hébergées ne contractent pas le norovirus murin, afin de s'assurer de la qualité des expériences. En effet, le norovirus murin n'étant pas sur la liste FELASA, des animaux hébergés dans le même environnement peuvent être source de contamination. Ainsi, des fèces d'animaux hébergés ont été récupérées 1, 2 et 3 semaines après leurs arrivées afin de détecter par PCR une éventuelle contamination (Figure 13).

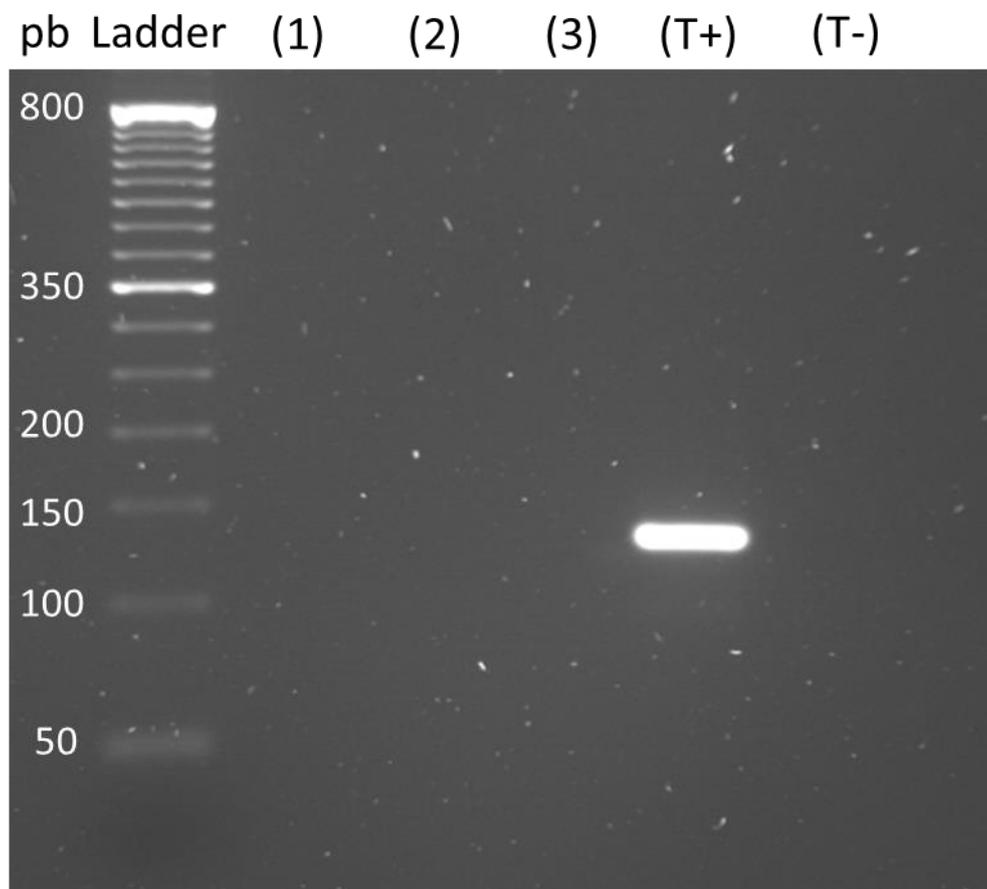


Figure 13 : Recherche de MNV par PCR. Des échantillons de fèces ont été récupérés 1 semaine (1), 2 semaines (2) et 3 semaines (3) après la réception des souris afin de tester la présence de MNV. Les ARN viraux extraits des fèces ont été rétrotranscrits puis amplifiés par PCR. Les produits PCR des échantillons (1-3), du témoin négatif (T-) et du témoin positif (T+) ont été additionnés de bleu de charge puis déposés sur gel d'agarose 3%. Après 45 minutes de migration à 3V/cm et un bain de BET, les amplicons sont visualisés sous UV.

La visualisation sur le gel d'une bande correspondant à un amplicon de 129pb pour le puits témoin positif ainsi que l'absence d'amplicon pour le dépôt du contrôle négatif assurent du bon déroulement de la PCR. De plus, aucune bande n'est visible pour les échantillons de fèces prélevées. Par conséquent, les souris n'ont pas contractées le norovirus murin lors de leur hébergement.

Chapitre 3: L'infection au norovirus murin augmente la survie des souris dans un modèle de pneumonie aiguë à *P. aeruginosa*

Il a été démontré précédemment, *in vitro*, que la pré-stimulation par le MNV S99 module la production de cytokines par les BMDMs en réponse à l'infection à *P. aeruginosa*. Ces diminutions de sécrétions de cytokines pro-inflammatoires engendrées par le virus pourraient avoir des conséquences *in vivo* sur le pronostic vital des souris infectées à *P. aeruginosa*.

Afin de déterminer si une infection établie par le MNV module l'infection à *P. aeruginosa*, une survie de 96h a été réalisée. Après 7 jours de colonisation par le virus, les souris ont été infectées par instillation intranasale de *P. aeruginosa*. Les courbes de survie des quatre groupes de souris sont présentées dans la figure 14.

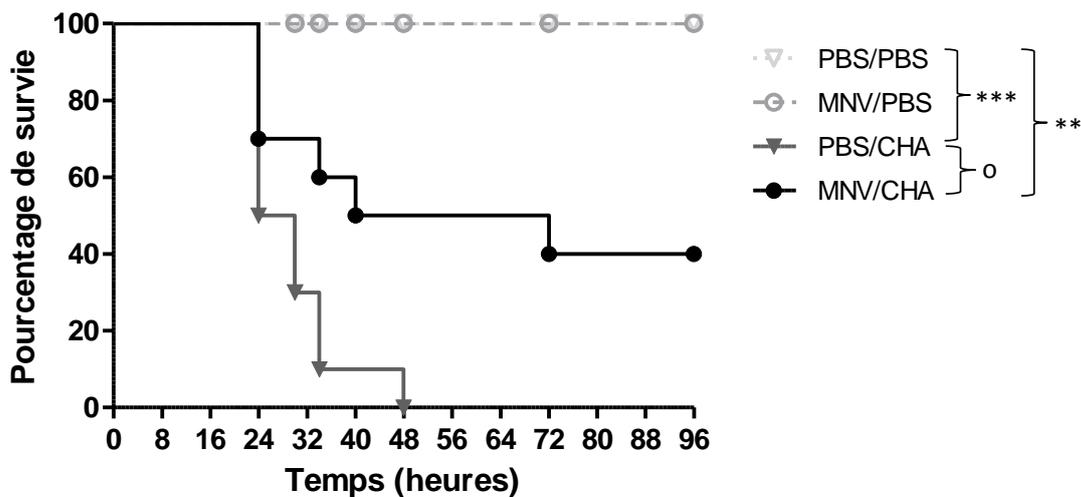


Figure 14: Survie à 96 heures. Les souris ont été infectées par voie orale avec 1.10^7 UFP de MNV ou ont reçu du PBS (n = 10 / groupe). Une semaine plus tard, les souris ont été infectées par instillation intranasale de 5.10^6 UFC de *P. aeruginosa* ou ont reçu du PBS. La létalité a été surveillée au cours des 96 heures suivants l'infection à *P. aeruginosa*.*, P < 0.05 par comparaison avec le contrôle PBS / PBS; **, P < 0.01 par comparaison avec le contrôle PBS / PBS; ***, P < 0.001 par comparaison avec le contrôle PBS / PBS; °P < 0.05 par comparaison avec le groupe PBS / CHA.

Aucune mortalité n'a été observée pour les deux groupes contrôles PBS / PBS et MNV / PBS. Une dose de 5.10^6 UFC de la souche CHA de *P. aeruginosa* a induit en 48 heures 100% de létalité pour le groupe PBS / CHA. En revanche, l'infection à *P. aeruginosa* chez les souris pré-infectées par le MNV a été associée à un taux de survie de 40% (Figure 14).

Par conséquent, la souche de norovirus murin S99 est capable de moduler l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* en augmentant la survie des souris dans un modèle de pneumonie aiguë.

Chapitre 4 : Le norovirus murin entraîne une variation des paramètres de réponse de l'hôte à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*

1- L'infection au norovirus murin diminue les lésions pulmonaires à *P. aeruginosa* ainsi que le recrutement cellulaire et la dissémination bactérienne

Précédemment, il a clairement été démontré que le norovirus murin module l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* en entraînant une amélioration du pronostic vital. Afin d'élucider, les raisons d'une meilleure survie en cas de pré-infection par le MNV, les mécanismes physiologiques de réponse d'une pneumonie à *P. aeruginosa*, ont été étudiés. Ainsi, une semaine après avoir reçu 1.10^7 UFP de MNV S99 ou du PBS pour les contrôles, les souris ont été infectées avec une dose sub-létale de *P. aeruginosa* à 2.10^6 UFC et euthanasiées 24 heures après l'instillation. Toutes les analyses ont été effectuées 24 heures après l'infection bactérienne.

Les groupes contrôles, PBS / PBS et MNV / PBS, n'ont montré aucune variation de poids ni de modification de la symptomatologie clinique. Chez les souris infectées par *P. aeruginosa*, le poids a diminué de manière significative et le score clinique a augmenté significativement. La pré-infection par le MNV n'a pas empêché la perte de poids consécutive à l'infection à *P. aeruginosa*, mais a permis de réduire considérablement la valeur du score clinique par rapport au groupe de souris PBS / CHA (Figure 15AB).

En ce qui concerne la perméabilité alvéolo-capillaire pulmonaire à 24 heures, le flux sortant du traceur de la protéine dans le groupe MNV / PBS a été comparable au groupe PBS / PBS témoin. Chez les animaux infectés PBS / CHA, une augmentation significative de la perméabilité a été observée. Les souris prétraitées au MNV puis infectées par *P. aeruginosa* présentent une légère augmentation de la perméabilité par rapport aux groupes témoins, mais significativement inférieure au groupe PBS / CHA (Figure 15C).

Les numérations cellulaires des lavages broncho-alvéolaire étaient similaires pour les groupes PBS / PBS et MNV / PBS. L'infection à *P. aeruginosa* a induit une augmentation significative du nombre de cellules totales. Par ailleurs, la pré-infection au MNV a entraîné une diminution significative de la cellularité du LBA par rapport au groupe PBS / CHA

(Figure 15D). De plus, l'analyse différentielle des cellules a montré une diminution du recrutement des neutrophiles et des lymphocytes dans le groupe MNV / CHA par rapport au groupe PBS / CHA (Figure 15EF).

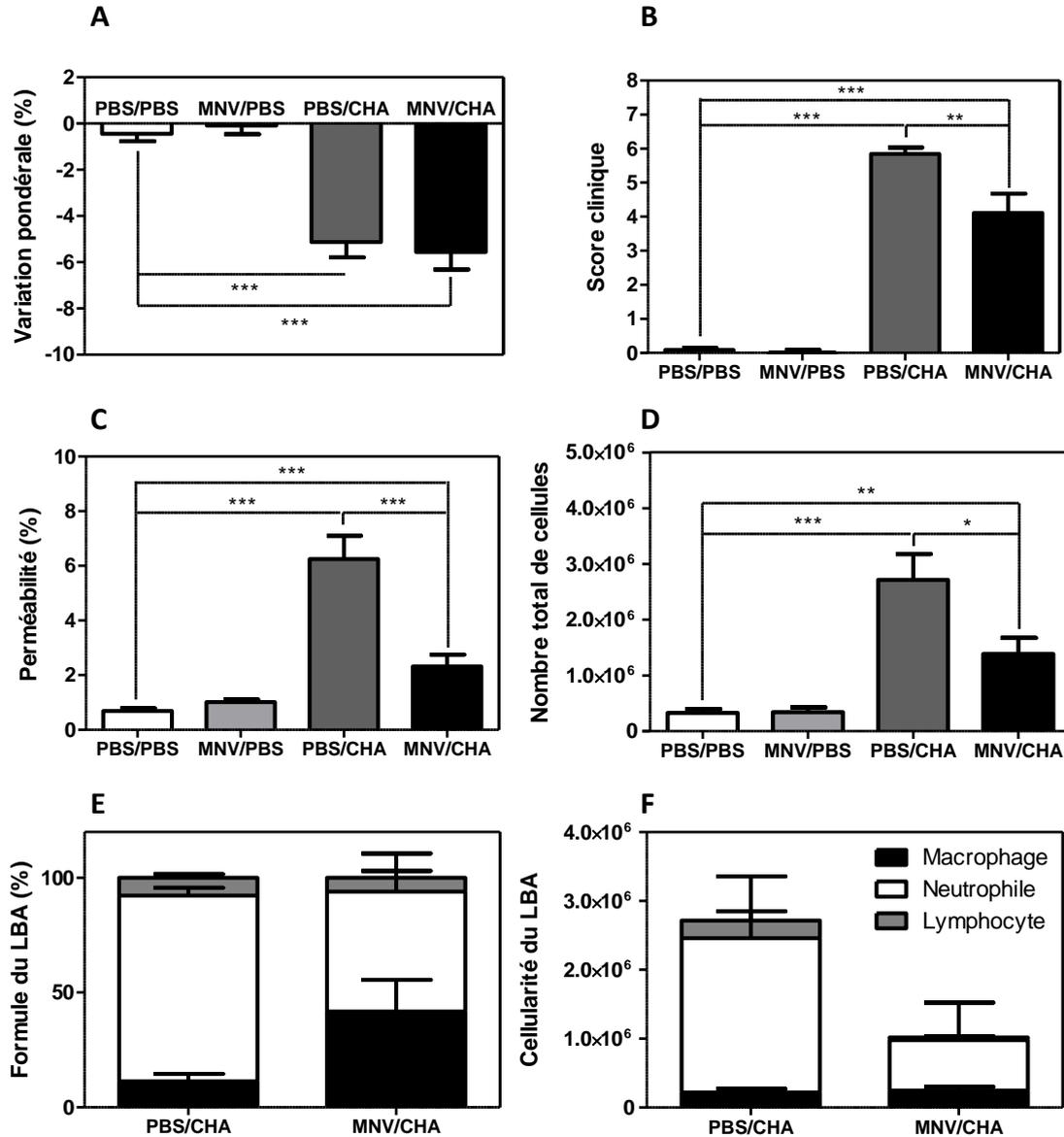


Figure 15: Evaluation physiologique et de la perméabilité alvéolo-capillaire. Les souris ont été infectées par voie orale avec 1.10^7 UFP de MNV ou ont reçu du PBS (n = 10 / groupe). Une semaine plus tard, les souris ont été infectées par instillation intranasale de 2.10^6 UFC de *P. aeruginosa* ou ont reçu du PBS. La variation pondérale (A) et le score de maladie (B) ont été évalués et les souris sacrifiées à 24 h post-infection. La lésion pulmonaire a été évaluée par la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire (C) et les cellules du lavage broncho-alvéolaire ont été comptées (BAL) (D-E-F).*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

Aucune colonie de *Pseudomonas aeruginosa* n'a été observée chez les souris non infectées par la souche CHA. Les charges bactériennes pulmonaires ne sont pas significativement différentes entre les groupes PBS / CHA et MNV / CHA. Cependant, la charge bactérienne obtenue dans la rate, signant une dissémination de la bactérie, a été significativement diminuée pour le groupe MNV / CHA par rapport au groupe PBS / CHA (Figure 16).

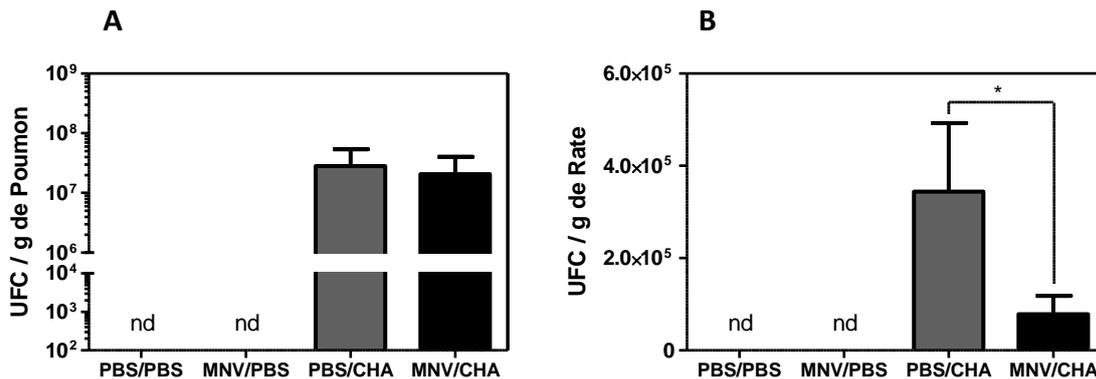


Figure 16: Paramètres microbiologiques. Les souris ont reçu *per os* 1.10^7 UFP de MNV ou du PBS (n = 10 / groupe). Une semaine plus tard, les souris ont été infectées par instillation intranasale de 2.10^6 UFC de *P. aeruginosa* ou ont reçu du PBS. La charge bactérienne dans les poumons (A) et la rate (B) a été évaluée par dilution et étalement d'homogénat de rate ou du poumon. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; nd: non détecté.

2- L'infection au norovirus murin module la réponse pro-inflammatoire induite par *P. aeruginosa*

Dans les mêmes conditions expérimentales, le niveau de concentration de cytokines pro-inflammatoire dans le lavage broncho-alvéolaire a été étudié.

Les concentrations en IL-6 et TNF- α obtenues dans les LBA des deux groupes contrôle PBS / PBS et MNV / PBS sont très faibles et non significativement différentes. En réponse à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, les niveaux de concentrations en cytokines pro-inflammatoire sont significativement augmentés par rapport au groupe contrôle PBS / PBS. De plus, la production de ces deux cytokines pro-inflammatoires en réponse à une infection aiguë a été significativement réduite chez les souris pré-exposées au MNV par

rapport au souris non exposées PBS / CHA. La réponse anti-inflammatoire a été explorée par le biais d'un dosage de l'IL-10 dans le LBA. L'infection simple par le MNV, groupe MNV / PBS, a induit une production d'IL-10 significativement supérieure au groupe contrôle PBS / PBS. L'infection simple par la souche CHA, groupe PBS / CHA, a induit une augmentation significative de la sécrétion d'IL-10 en comparaison au groupe contrôle PBS / PBS et significativement supérieure au groupe MNV / CHA. Le groupe MNV / CHA présente une production d'IL-10 non significativement différente du groupe contrôle MNV / PBS mais significativement augmentée par rapport au groupe PBS / PBS (Figure 17).

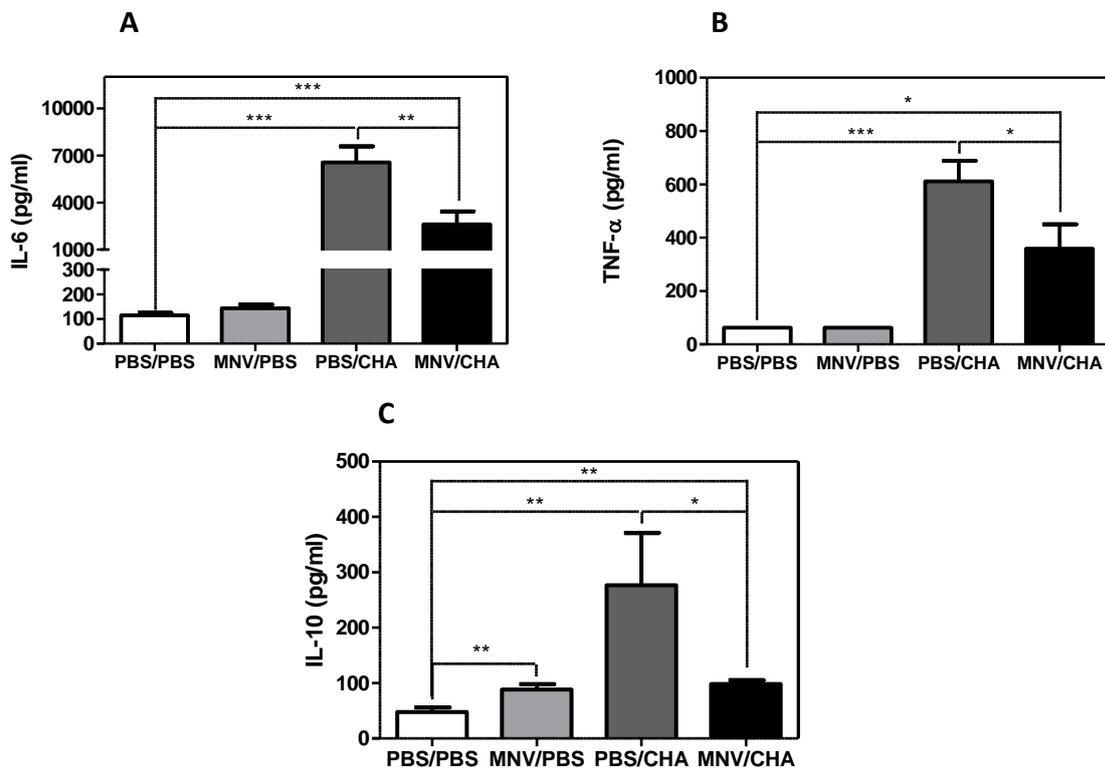


Figure 17: La réponse inflammatoire analysée par ELISA. Les souris ont été infectées *per os* avec 1.10^7 UFP de MNV ou ont reçu du PBS (n = 10 / groupe). Une semaine plus tard, les souris ont reçu par instillation intranasale 2.10^6 UFC de *P. aeruginosa* ou du PBS. (A) L'IL-6 (B) le TNF- α et (C) l'IL-10 ont été mesurés par ELISA dans des surnageants de LBA. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

L'investigation de la réponse pro-inflammatoire a été poursuivie par la réalisation de RT Q-PCR sur des échantillons de poumon avec une mesure des expressions relatives de l'IL-6, du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-17A et de l'IFN- α (Figure 18).

Toutes les cytokines pro-inflammatoires analysées ont un profil similaire entre elles et à ceux obtenues par la technique ELISA. Les niveaux d'expression relative sont inchangés pour le groupe MNV / CHA par rapport au groupe contrôle PBS / PBS. Lors de l'infection pulmonaire à CHA, les niveaux d'expression relative des différentes cytokines pro-inflammatoires ont significativement augmentés. A nouveau, chez les souris prétraitées au MNV, l'augmentation de l'expression relative des cytokines pro-inflammatoire est significativement inférieure au groupe PBS / CHA.

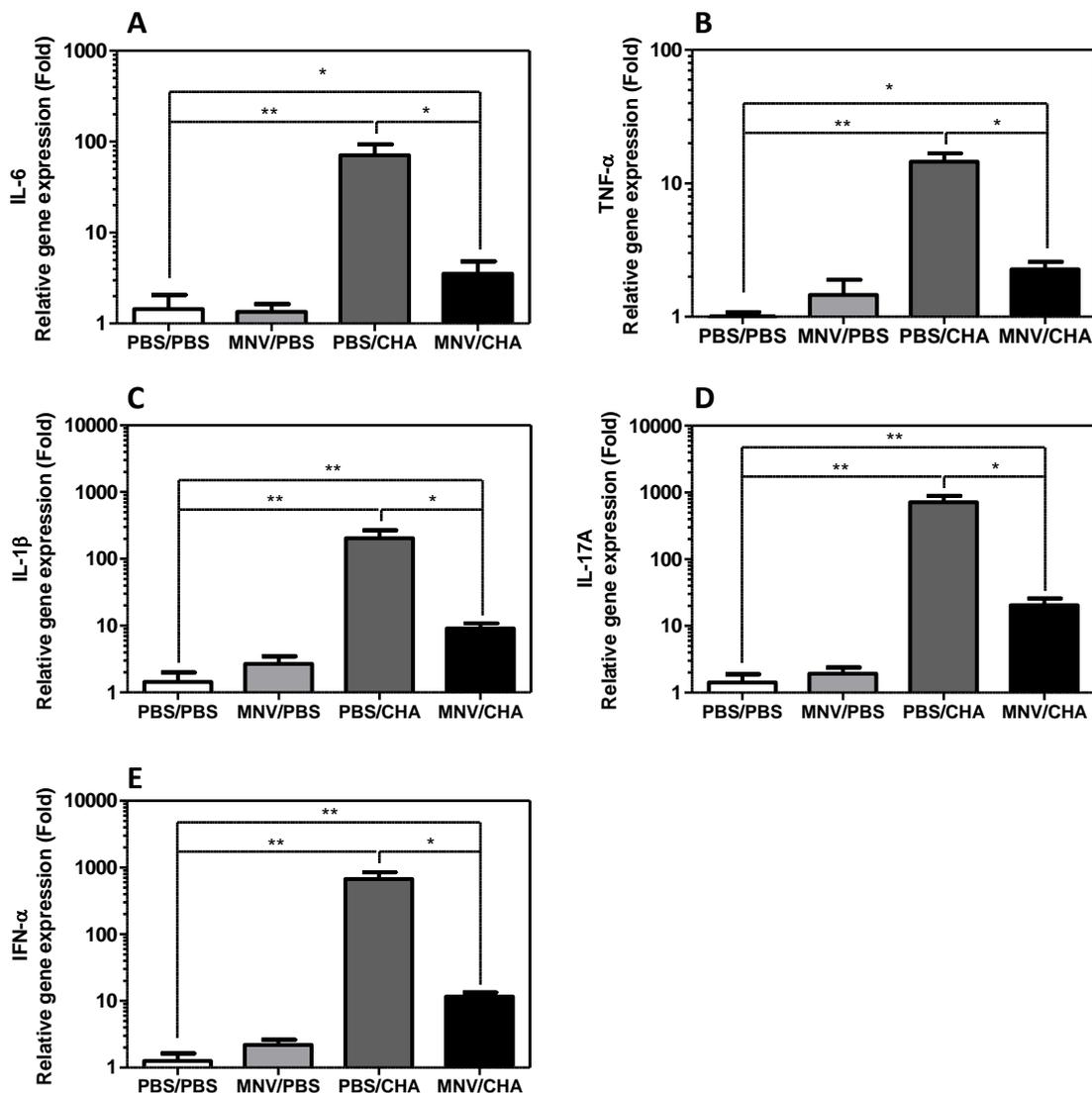


Figure 18: La réponse pro-inflammatoire analysée par RT-QPCR. Les souris ont été infectées *per os* avec 1.10^7 UFP de MNV ou ont reçu PBS (n = 10 / groupe). Une semaine plus tard, les souris ont reçu par instillation intranasale 2.10^6 UFC de *P. aeruginosa* ou du PBS. L'expression relative de (A) l'IL-6, (B) du TNF- α , (C) IL-1 β , (D) IL-17A et (E) IFN- α a été mesurée par Q-PCR. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

3- L'infection au norovirus murin module la production de chimiokines en réponse à une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*.

Afin d'expliquer la diminution de recrutement cellulaire, l'expression relative d'un panel de chimiokines a été étudiée par RT Q-PCR sur les échantillons de poumons prélevés lors de l'autopsie des souris, dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment (Figure 19).

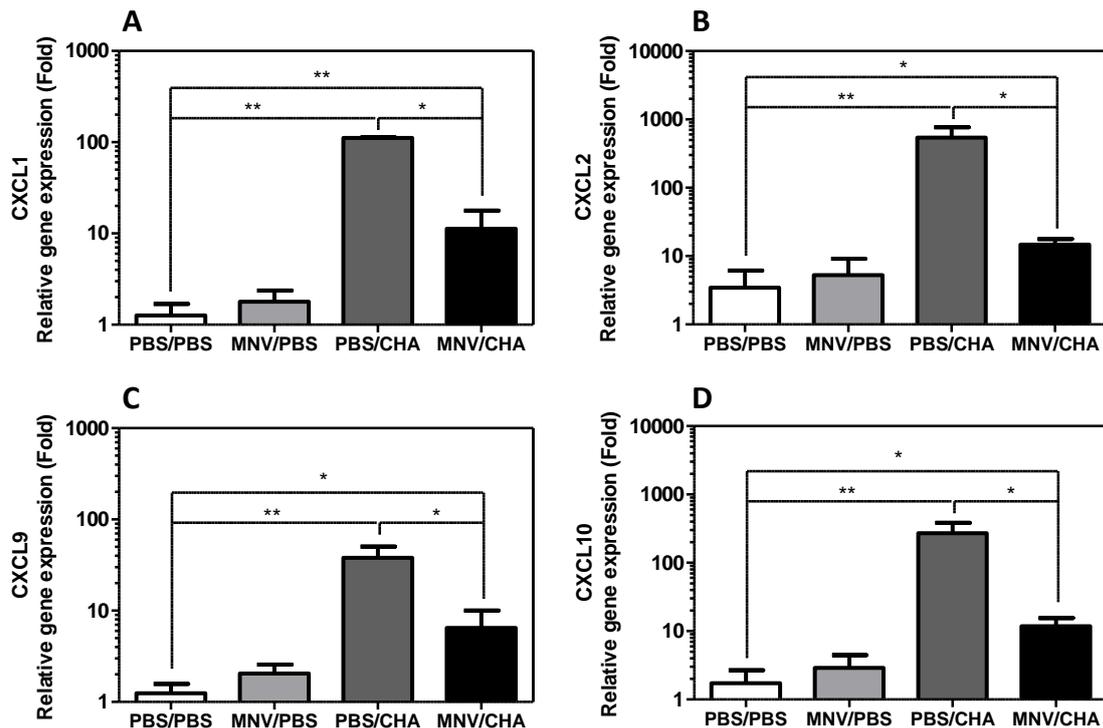


Figure 19: La production de chimiokines. Les souris ont été infectées *per os* avec 1.10^7 UFP de MNV ou ont reçu du PBS (n = 10 / groupe). Une semaine plus tard, les souris ont reçu par instillation intranasale 2.10^6 UFC de *P. aeruginosa* ou du PBS. L'expression relative de (A) CXCL1, (B) CXCL2, (C) CXCL9 et CLXCL10 (D) a été mesurée par Q-PCR. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

L'expression relative des gènes d'intérêts est inchangée chez les souris MNV / PBS par rapport au groupe contrôle PBS / PBS. Les niveaux de l'expression relative de toutes les chimiokines étudiées sont significativement augmentés suite à l'infection par la souche CHA de *P. aeruginosa*. Enfin, il a été constaté une augmentation significativement plus faible chez les souris pré-exposées à la souche S99 du norovirus murin en comparaison aux souris non exposées (Figure 19).

Partie 4 : Discussion

Le norovirus murin est fréquemment rencontré dans les animaleries de recherche soulevant la question de son influence potentielle dans des modèles murins. Le MNV affiche un tropisme pour les cellules immunitaires et peut établir une infection persistante sans causer de maladie évidente chez des souris immunocompétentes [89]. Ce tropisme pour ces cellules de l'immunité suggère un effet potentiel sur l'inflammation et les réponses immunitaires.

Afin de visualiser un possible phénomène d'immunomodulation induit par le norovirus murin S99, des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris ont d'abord été infectés par le MNV S99 puis avec la souche CHA de *Pseudomonas aeruginosa*. Dans les conditions de double stimulation, la production d'IL-6 et de TNF- α par les BMDMs pré-stimulés avec le MNV en réponse à CHA a été très significativement réduite. Un protocole similaire de stimulation des BMDMs a été réalisé dans l'étude de Kim et al [116]. Dans cette étude, une stimulation simple des BMDMs avec la souche CW3 du MNV n'a pas induit de production de TNF- α , mais lors d'une double stimulation des BMDMs par le MNV puis *P. aeruginosa* la production de TNF- α s'est avérée significativement augmentée par rapport à une simple stimulation par *P. aeruginosa*. Lencioni et al ont également réalisé un protocole de double stimulation des BMDMs [115] et ont montré que l'incubation de BMDM avec le MNV 4 seul a provoqué des augmentations de l'expression des cytokines inflammatoires dont le TNF- α , et l'IL6. De plus, dans les conditions de double stimulation, MNV 4 et *H. bilis* tué par sonication, une augmentation de l'expression relative de l'IL-6 et du TNF- α des BMDMs a été observée. Les différences de résultats constatées peuvent être attribuées à des spécificités de paramètres de protocole, souches bactérienne et virale utilisées. Notre travail a permis de mettre en évidence l'existence d'un phénomène d'immunomodulation par le norovirus murin S99 de la réponse pro-inflammatoire consécutive à une infection bactérienne

Depuis la découverte de ce virus, la plupart des études publiées ont porté sur l'interférence du MNV dans des modèles murins de maladie inflammatoire de l'intestin (IBD). Par exemple, des souris ATG16L1 infectées par la souche MNV CR6 présentent plusieurs caractéristiques de la maladie de Crohn humaine après administration de dextran sulfate de sodium par rapport à des souris infectées avec la souche MNV CW3 [118].

Malgré le grand nombre d'études publiées sur le norovirus murin, les conséquences du MNV dans des modèles infectieux murins autres que ciblant le tractus gastro-intestinal sont

méconnues. D'un point de vue général, les infections d'un modèle murin ne sont pas considérablement modifiées par le MNV. En effet, MNV CR6 ne modifie pas les réponses immunitaires chez les souris C57BL/6 co-infectées par le virus de Friend [369], le virus influenza A [109], le virus de la vaccine [109] ou le cytomegalovirus murin [117].

Il a été démontré précédemment, *in vitro*, que la pré-stimulation par le MNV S99 module la production de cytokines par les BMDMs en réponse à l'infection à *P. aeruginosa*. Ces diminutions de sécrétions de cytokines pro-inflammatoires engendrées par le virus pourraient avoir des conséquences *in vivo* sur le pronostic vital des souris infectées à *P. aeruginosa*.

Avant, la réalisation d'expérimentation animale, la présence du MNV a été testée dans l'animalerie. Les recherches de MNV dans des échantillons de fèces murines se sont avérées négatives.

Afin de déterminer si une infection établie par le MNV module l'infection à *P. aeruginosa*, une survie de 96 heures a été réalisée. Après 7 jours de colonisation par le virus, les souris ont été infectées par instillation intranasale de *P. aeruginosa*. En effet, une colonisation d'une semaine de l'hôte par le virus semble être nécessaire à l'observation du phénotype.

Le MNV administré seul, groupe MNV / PBS, n'a induit aucune mortalité. Cette observation est en adéquation avec la littérature. Ainsi, de nombreuses souches norovirus murin n'entraînent pas de mortalité chez les souris sauvages et reste asymptomatique [17, 104]. Une dose de 5.10^6 UFC de la souche CHA de *P. aeruginosa* a induit en 48 heures 100% de létalité pour le groupe PBS / CHA. Ce résultat obtenu est cohérent avec ceux publiés dans la littérature. En effet, un inoculum de 3.10^6 UFC de la souche CHA administré en intratrachéal aux souris a induit 100% de mortalité en 40 heures [370]. En revanche, l'infection à *P. aeruginosa* chez les souris pré-infectées par le MNV a été associée à un taux de survie de 40%. Par conséquent, la souche de norovirus murin S99 est capable de moduler l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* en augmentant la survie des souris dans un modèle de pneumonie aiguë. A notre connaissance, il s'agit de la première étude mettant en évidence un effet protecteur du norovirus murin lors d'une infection bactérienne pulmonaire. La majorité des études publiées à l'heure actuelle n'a pas mis en évidence d'impact du MNV dans un modèle murin de survie et d'autres impliquent certaines souches de MNV dans un pronostic

plus défavorable des souris. Les différences constatées peuvent résulter de la souche virale utilisée et des paramètres d'infections.

Afin d'élucider, les raisons d'une meilleure survie en cas de pré-infection par le MNV, les mécanismes physiologiques de réponse d'une pneumonie à *P. aeruginosa*, ont été étudiés. Ainsi, un protocole similaire a été appliqué avec pour seules différences une dose sub-létale de *P. aeruginosa* et une euthanasie des animaux à 24 heures post-infection bactérienne.

Le MNV inoculé seul n'a induit aucune variation de poids ni de modification du score clinique en corrélation avec les études précédemment publiées [17, 104]. Chez les souris infectées par *P. aeruginosa*, le poids a diminué de manière significative et le score clinique a augmenté significativement en accord avec la littérature [341]. La pré-infection par le MNV n'a pas empêché la perte de poids consécutive à l'infection à *P. aeruginosa*, mais a permis de réduire considérablement le score clinique par rapport au groupe de souris PBS / CHA. Ainsi, les souris ayant reçu le MNV avant l'infection bactérienne étaient objectivement moins malades.

De plus, le prétraitement des souris au MNV a permis de réduire de manière très significative la perméabilité alvéolo-capillaire consécutive à l'infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa*. La perméabilité alvéolo-capillaire est un paramètre peu étudié dans la littérature, mais les valeurs obtenues dans le cadre de cette étude sont du même ordre que celles obtenues dans la littérature lors d'une infection pulmonaire aiguë [277, 358, 371]. Une augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire traduit la présence d'une lésion pulmonaire qui ici a pu être induite par les facteurs de virulence de la bactérie mais aussi par une réponse pro-inflammatoire excessive. Cette lésion peut aussi conduire à une dissémination bactérienne dans la circulation sanguine et un choc septique.

Les charges bactériennes pulmonaires ne sont pas significativement différentes entre les groupes infectés par *P. aeruginosa* avec ou sans pré-infection par le MNV. Cependant, une dissémination bactérienne a été observée pour les groupes infectés par CHA, mais la charge bactérienne splénique a été significativement diminuée pour le groupe MNV / CHA par rapport au groupe PBS / CHA. Ces localisations secondaires sont une conséquence de la lésion pulmonaire est non la cause. La littérature met en évidence la capacité de certaines souches de *P. aeruginosa* à détruire l'intégrité de la barrière épithéliale alvéolaire, ce qui provoque une nécrose rapide de l'épithélium pulmonaire et la diffusion des bactéries dans la

circulation [277, 372] Des analyses permettant d'expliquer ces différences de lésion pulmonaire ont été effectuées.

Ainsi, les numérations cellulaires des lavages broncho-alvéolaire ont mis en évidence une forte augmentation du recrutement cellulaire au niveau du poumon en cas d'infection à CHA. En cas d'infection pulmonaire avec la souche CHA, un fort recrutement cellulaire et particulièrement de neutrophiles a déjà été décrit [277, 373]. Néanmoins, la pré-infection au MNV a entraîné une diminution significative du recrutement cellulaire et en particulier des neutrophiles. Ce recrutement modéré de neutrophiles permettrait d'éviter la lésion tissulaire consécutive au déversement de l'arsenal enzymatique de ces cellules.

Des cytokines et chimiokines sont capables de recruter et d'entretenir l'activation des neutrophiles. En réponse à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, les niveaux de concentrations en cytokines pro-inflammatoires du LBA, IL-6 et TNF- α , sont significativement augmentés par rapport au groupe contrôle non infecté. En effet, il a précédemment été démontré qu'une infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa* entraîne une importante réponse pro-inflammatoire [341, 370]. De plus, la production de ces deux cytokines pro-inflammatoires en réponse à une infection aiguë a été significativement réduite chez les souris pré-exposées au MNV par rapport aux souris non exposées.

L'investigation de la réponse pro-inflammatoire a été poursuivie par RT-QPCR sur des échantillons de poumon récupérés lors de la mise à mort des souris. Egalement, les niveaux d'expression relative de L'IL-6, du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-17A et de l'IFN- α se sont avérés augmentés en réponse à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. Et pareillement, ces niveaux d'expression relative sont significativement réduits en cas de pré-sensibilisation au MNV avant l'infection bactérienne.

A nouveau, les niveaux d'expression relative de toutes les chimiokines étudiées sont significativement augmentés suite à l'infection *P. aeruginosa* comme précédemment décrit dans la littérature scientifique [341, 370]. Enfin, il a été constaté une augmentation significativement plus faible chez les souris pré-exposées à la souche S99 du norovirus murin en comparaison aux souris non exposées.

Par conséquent, la forte mortalité et la lésion pulmonaire observée chez les souris infectées par la souche CHA est consécutive à la réponse inflammatoire excessive. En effet, la

souche de norovirus murin S99 induit une atténuation de la réponse pro-inflammatoire protégeant ainsi les souris prétraitées.

La réponse anti-inflammatoire a été explorée par le biais d'un dosage de l'IL-10 dans le LBA afin d'étudier son implication dans le phénomène d'atténuation de la réponse inflammatoire en cas de pré-infection des animaux par le virus. L'infection simple par le MNV a induit une production d'IL-10 significativement supérieure au groupe contrôle PBS / PBS. Néanmoins, lors de l'infection bactérienne ce profil cytokinique s'inverse. L'infection simple par la souche CHA, a induit une augmentation significative de la sécrétion d'IL-10 en comparaison au groupe contrôle PBS / PBS et significativement supérieure au groupe MNV / CHA. Il a précédemment été démontré que la production d'IL-10 était augmentée en cas d'infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa* et que ce pic de production était maximal à 24 heures post infection [341, 344]. De plus, de l'IL-10 recombinante administrée aux souris améliore la survie et la lésion pulmonaire consécutive à l'infection [344]. Ainsi, un modèle de survie à 96 heures a été réalisé selon la même procédure que précédemment sauf que les souris du groupe PBS / MNV avaient reçu de l'IL-10 recombinante 1 heure avant et 8 heures après l'infection à la souche CHA (données non montrées). Cependant, l'injection d'IL-10 n'a pas permis d'améliorer la survie de ces souris au niveau du groupe pré-sensibilisé au MNV. Par conséquent, l'IL-10 n'est peut-être pas responsable de l'atténuation du processus inflammatoire.

Ainsi, le déroulement de la réponse immunitaire à *Pseudomonas aeruginosa*, suivant la pré-infection ou non au norovirus murin, est résumé dans la figure 20.

Lors d'une infection simple, les acteurs de l'immunité innée vont détecter la présence de *P. aeruginosa* et en réponse produire des cytokines et chimiokines afin de recruter les cellules immunitaires. Néanmoins, le recrutement massifs et l'entretien de ces cellules par l'environnement cytokinique peut être délétère pour l'hôte. Les molécules pro-inflammatoires telles que le TNF- α contribuent à la défense de l'hôte contre le pathogène, mais peuvent aussi participer aux dommages des organes et à la létalité [374]. Par exemple, Kim et ses collègues ont montré que l'infection par la souche MNV-1 a augmenté la létalité induite par une infection secondaire par *E. coli*, et cela a été médiée en partie par la production de TNF- α [116].

De plus, l'activité lytique est exercée sur les cellules épithéliales détruisant les jonctions serrées et induisant l'apoptose et la nécrose des cellules alvéolaires. Les lésions d'un

côté sur l'épithélium alvéolaire et de l'autre côté sur l'endothélium conduisent à une augmentation de la perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire et à une diminution de la fonction respiratoire. L'intégrité des barrières pulmonaires étant touchée, cela offre un accès aux bactéries à la voie systémique.

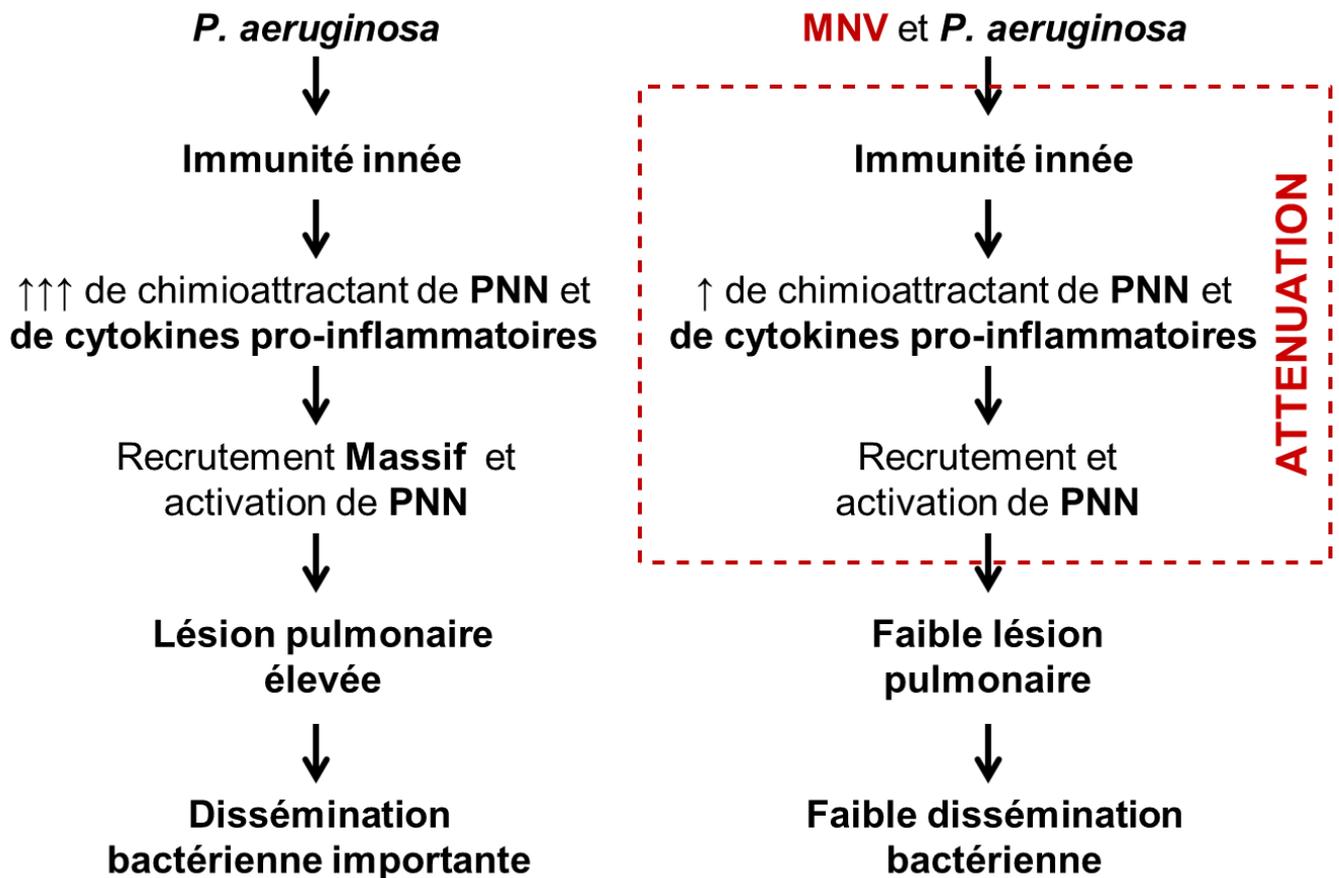


Figure 20 : Déroulement de la réponse immunitaire à *Pseudomonas aeruginosa*, suivant la pré-infection ou non au norovirus murin

Un phénomène pro-inflammatoire est également observé chez les souris prétraitées au MNV en réponse à l'infection bactérienne. Néanmoins, le norovirus a entraîné une réponse pro-inflammatoire atténuée, avec une diminution de la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoire et du recrutement cellulaire. Cette réponse immunitaire est diminuée d'une manière inconnue par la souche S99 du norovirus murin mais est toute aussi efficace, la charge pulmonaire étant contrôlée au même niveau que le groupe non sensibilisé au MNV. De plus, l'immunomodulation par le norovirus murin entraîne une réponse pro-inflammatoire moins délétère et un meilleur pronostic en diminuant la perméabilité et la dissémination splénique.

L'IL-10 ne semble pas être impliquée dans l'atténuation de la réponse pro-inflammatoire par le norovirus murin. D'autres acteurs peuvent être impliqués dans ce phénomène d'atténuation.

Des études ont mis en évidence que le MNV pouvait diffuser dans l'organisme par l'intermédiaire des cellules qu'il infecte. Par conséquent, le MNV peut se retrouver au niveau pulmonaire et détourner la machinerie cellulaire des cellules de l'immunité en faveur de sa réplication diminuant ainsi la réponse immunitaire.

Récemment, Kernbauer et ses collègues ont mis en évidence un effet protecteur des souches CR6 et Ski du norovirus murin. En effet, l'administration de ces souches a amélioré la survie de souris traitées à un cocktail d'antibiotiques soumises à un protocole de colite chimique. De plus, les auteurs ont montré que l'infection virale par le MNV pouvait fournir une protection contre les lésions intestinales induite par *C. rodentium* [119].

Ainsi, un virus entérique animal peut fonctionner d'une manière analogue aux bactéries commensales et la présence de certaines souches de virus être bénéfique pour l'hôte.

Partie 5 : Conclusions et Perspectives

Les norovirus humains sont la principale cause de gastro-entérites épidémiques non bactériennes à travers le monde [19]. L'étude du norovirus humain a été entravée par l'absence d'un système de culture cellulaire efficace. En 2003, la première souche de norovirus murin a été isolée et caractérisée comme un agent pathogène sporadique et létal chez les souris knock-out immunodéprimées [17]. Comme pour le norovirus humain, de nombreuses souches de MNV ont été isolées et leurs diversités biologiques rapportées [18]. Certaines souches sont rapidement éliminées des souris de type sauvage comme les souches MNV-1 CW1, CW3 et WU11. D'autres souches peuvent être excrétées jusqu'à 35 jours post-infection et sont dites persistantes. C'est le cas des souches CR1, CR3, CR6, CR7 et S99 [86]. Le norovirus humain n'étant pas cultivable, la biologie de ce virus est étudiée à travers le MNV seul norovirus capable de se répliquer efficacement *in vitro*. Ainsi, le MNV est devenu un substitut afin d'évaluer la résistance des norovirus humains aux désinfectants et est utilisé afin d'étudier les mécanismes d'infection des *Norovirus* dans un modèle animal.

Les infections au norovirus murin sont très répandues dans les animaleries à travers le monde faisant du MNV l'un des principaux contaminants des animaleries de recherche [103]. En Amérique du Nord, 22,1% des 12 639 sérums de souris testés étaient positifs pour les anticorps anti-MNV-1 [104], une enquête sérologique en Europe a mis en évidence un taux de contamination semblable. [105]. Des taux de prévalence similaires ont été observés au Japon et en Corée du Sud après une analyse sérologique ou par RT-PCR d'échantillons murins [106–108].

Une infection au MNV est asymptomatique chez des souris sauvages et peut être donc très difficilement détectable par le personnel des animaleries. Une fois le virus détecté, son élimination est difficile de par sa résistance aux facteurs environnementaux et aux agents désinfectants. Cette forte prévalence dans le monde entier offre un énorme potentiel pour ce virus d'interférer avec des modèles de recherche murins. Cependant, les effets de l'infection au MNV sur la recherche biomédicale ne sont pas clairs.

Certaines études ont mis en évidence que le norovirus murin pourrait interférer dans des modèles animaux spécifiques. Parmi ces études figurent les travaux de Lencioni et al mettant en évidence que le norovirus murin augmente l'inflammation intestinale induite par les bactéries chez les souris *Mdr1a*^{-/-} [115]. Le MNV-1 a également été rapporté comme

promoteur de l'inflammation et de la mortalité chez des souris surinfectées à *Escherichia coli* [116].

Les phénomènes de co-infections peuvent avoir des conséquences imprévisibles avec des altérations de la réponse immunitaire de l'hôte. Potentiellement, une contamination d'un modèle murin par le MNV pourrait entraîner une modification des paramètres physiologiques étudiés et induire en erreur le chercheur sur une mauvaise hypothèse basée sur les résultats.

A notre connaissance, cette étude est la première à tester directement l'effet de la souche S99 du norovirus murin sur un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë. Cette étude démontre sans équivoque que la souche S99 du norovirus murin module la réponse induite à une infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*.

En effet, *in vitro*, la souche S99 est capable de diminuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les BMDMs en réponse à une infection à la souche CHA de *P. aeruginosa*. Les modèles *in vivo*, mis au point lors de cette étude, ont mis en évidence que le MNV augmente la survie des souris ayant une infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa*. L'amélioration, par le MNV, du pronostic vital de ces souris est consécutive à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines, ainsi que du recrutement de cellules immunitaires, en particulier des neutrophiles. Par conséquent, la lésion pulmonaire provoquée par l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* et la réponse pro-inflammatoire excessive est réduite. La perméabilité alvéolo-capillaire ainsi restreinte, moins de bactéries peuvent se propager dans la circulation systémique et causer un choc septique.

Ainsi, le paramètre d'immunomodulation induit par la souche S99 du norovirus murin pourrait être par la suite exploité afin d'améliorer le pronostic d'individu développant une réaction pro-inflammatoire incontrôlée consécutive à une infection. En effet, il serait intéressant de tester si le phénomène de diminution de réponse pro-inflammatoire est induit par la biologie du virus ou par un de ces constituants. Pour cela, un protocole de survie pourrait être appliqué avec un MNV inactivé. En cas d'un phénotype de protection, il resterait à déterminer quelle particule du MNV est à injecter afin d'avoir le même phénomène dans la survie. Cependant, il reste plus probable que la biologie du virus soit impliquée car un délai de colonisation de l'hôte par le MNV semble nécessaire.

Les mécanismes d'action, directs ou indirects, par lesquels le MNV parvient à diminuer la réponse pro-inflammatoire restent inconnus et différentes hypothèses sont à étayer.

Il est possible que la colonisation du tractus gastro-intestinal par certaines souches de MNV conduise à une dysbiose, un changement qualitatif ou quantitatif du microbiote. Néanmoins, à ce jour aucune étude n'a démontré qu'une infection par le MNV avait des conséquences majeures sur le microbiote intestinal [375]. Cependant, ces résultats restent à confirmer pour le MNV, car le norovirus humain est quant à lui capable de perturber la flore intestinale humaine [376]. Ce microbiote qui comporte 10 fois plus de cellules que celles composant l'être humain joue un rôle dans l'absorption des vitamines ainsi que dans la défense de l'hôte aux stress infectieux [377, 378]. Il apparaît clairement un rôle spécifique de chacune des composantes du microbiote sur la régulation de la réponse inflammatoire et antimicrobienne de la muqueuse intestinale, comme en témoigne le rôle régulateur de souches de *Clostridia* sur la fonctionnalité des lymphocytes T régulateurs [379]. Des études réalisées sur des bactéries filamenteuses segmentées (SBF) ont montré qu'elles étaient associées à un profil inflammatoire Th17 lors de colonisation de souris gnotobiotique [380, 381]. A l'inverse, certaines bactéries du TIG, tel que *Faecalibacterium prausnitzii* semblaient présenter une action immuno-régulatrice en inhibant les voies pro-inflammatoires lors de la colite [382]. L'importance du microbiote intestinal a été démontrée dans de nombreuses études cliniques et en utilisant des modèles animaux qui montrent que la perturbation des interactions hôte-commensal est associée à une variété de maladies dont une susceptibilité accrue à l'infection par des bactéries. Actuellement, la compréhension de la façon dont le microbiote régit l'immunité antibactérienne au niveau des sites extra-intestinaux est pauvre. Mais, certaines études ont mis en évidence que la flore commensale aide à protéger contre des infections bactérienne à l'extérieur de l'intestin [383–386]. Ainsi il serait intéressant de réaliser une analyse comparative de microbiote intestinale entre des souris infectées ou non au MNV afin de déceler d'éventuelles perturbations. En parallèle, les populations des cellules immunitaires intestinales et pulmonaires pourraient être analysées par cytométrie en flux. En effet, une augmentation de la population T reg pourrait être impliquée dans le phénomène de protection observé chez les souris pré-sensibilisé avant l'infection pulmonaire. Ce changement dans la balance immunologique pourrait alors être attribué directement au MNV ou par l'intermédiaire d'un composant du microbiote perturbé.

Le norovirus murin est un virus répandu et endémique dans les animaleries de recherche. Ces travaux suggèrent que l'infection au MNV peut profondément modifier les paramètres étudiés dans les modèles classiques d'infection pulmonaire aiguë. Compte tenu de la prévalence du norovirus murin dans la recherche animale, il est maintenant nécessaire de considérer ce paramètre importun. Une modification de la réglementation avec l'ajout du MNV sur la liste FELASA serait une solution.

Partie 6 : Publications:

1- Articles Scientifiques

Boukerb AM, Rousset A, Galanos N, Méar JB, Thépaut M, Grandjean T, Gillon E, Cecioni S, Abderrahmen C, Faure K, Redelberger D, Kipnis E, Dessein R, Havet S, Darblade B, Matthews SE, de Bentzmann S, Guéry B, Cournoyer B, Imberty A, Vidal S. **Anti-adhesive properties of glycoclusters against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection.** *J Med Chem.* 2014. **57**(24):10275-10289

Thépaut M, Grandjean T, Hober D, Lobert PE, Bortolotti P, Faure K, Dessein R, Kipnis E, Guery B. **Protective role of murine norovirus against *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia** *Vet res.* 2015. **46**(91) doi: 10.1186/s13567-015-0239-3

2- Communication oral

Norovirus in the laboratory, do you trust your results? Groupe de recherche *Pseudomonas aeruginosa* ; 2014, 23 au 25 novembre 2014. Marseille.

3- Communication affichée

Immunomodulation induite par la pré-sensibilisation per os à *Norovirus* dans un modèle murin de pneumonie aigue à *Pseudomonas aeruginosa*. Journées André Verbert, Lille, 18 septembre 2013,

Partie 7 : Travaux réalisés en collaboration au cours de la thèse

Test de deux inhibiteurs glycosidique (GMI 1051 et GMI 1387) des lectines de *P. aeruginosa* dans un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë ou chronique. Dr John Magnani, Glycomimetics inc ; Gaithersburg, MD, USA

Etude de l'implication des Kinurénines de *P. aeruginosa* dans un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë. EA 7366

Evaluation de l'effet anti adhésion des glycoclusters lors d'une pneumonie aiguë à *P. aeruginosa* dans le cadre du projet FUI ANTI-PYO.

Evaluation de l'effet d'un composé anti Pvd/Pch dans un modèle de pneumonie aiguë ou chronique à *P. aeruginosa*. Sanofi R&D Toulouse

Etude de la réponse immunitaire induite par PscI, un composant du SST 3 de *P. aeruginosa*. EA7366

Mis au point d'un modèle animal permettant l'étude de l'impact d'une perturbation du microbiote digestif sur la réponse à une infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa*. EA 7366

Partie 8 : Bibliographie

1. Adler JL, Zickl R: **Winter vomiting disease.** *J Infect Dis* 1969, **119**:668–673.
2. Zahorsky J: **Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease.** *Arch Pediat* 1929, **46**:391–395.
3. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM: **Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis.** *J Virol* 1972, **10**:1075–1081.
4. Kapikian AZ: **The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective.** *J Infect Dis* 2000, **181 Suppl**:S295–302.
5. Appleton H, Higgins PG: **Letter: Viruses and gastroenteritis in infants.** *Lancet* 1975, **1**:1297.
6. Madeley CR, Cosgrove BP: **Letter: Caliciviruses in man.** *Lancet* 1976, **1**:199–200.
7. Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, Honma S: **Sapporo virus: history and recent findings.** *J Infect Dis* 2000, **181 Suppl**:S303–308.
8. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK: **Norwalk virus genome cloning and characterization.** *Science* 1990, **250**:1580–1583.
9. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK: **Sequence and genomic organization of Norwalk virus.** *Virology* 1993, **195**:51–61.
10. Oliver SL, Dastjerdi AM, Wong S, El-Attar L, Gallimore C, Brown DWG, Green J, Bridger JC: **Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans.** *J Virol* 2003, **77**:2789–2798.
11. Oliver SL, Asobayire E, Charpilienne A, Cohen J, Bridger JC: **Complete genomic characterization and antigenic relatedness of genogroup III, genotype 2 bovine noroviruses.** *Arch Virol* 2007, **152**:257–272.
12. Wang Q-H, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ: **Porcine noroviruses related to human noroviruses.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:1874–1881.
13. Mauroy A, Scipioni A, Mathijs E, Miry C, Ziant D, Thys C, Thiry E: **Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium.** *Arch Virol* 2008, **153**:1927–1931.
14. Wolf S, Williamson W, Hewitt J, Lin S, Rivera-Aban M, Ball A, Scholes P, Savill M, Greening GE: **Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms.** *Vet Microbiol* 2009, **133**:184–189.

15. Martella V, Campolo M, Lorusso E, Cavicchio P, Camero M, Bellacicco AL, Decaro N, Elia G, Greco G, Corrente M, Desario C, Arista S, Banyai K, Koopmans M, Buonavoglia C: **Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*)**. *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1071–1073.
16. Martella V, Decaro N, Lorusso E, Radogna A, Moschidou P, Amorisco F, Lucente MS, Desario C, Mari V, Elia G, Banyai K, Carmichael LE, Buonavoglia C: **Genetic heterogeneity and recombination in canine noroviruses**. *J Virol* 2009, **83**:11391–11396.
17. Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW: **STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus**. *Science* 2003, **299**:1575–1578.
18. Hsu CC, Riley LK, Wills HM, Livingston RS: **Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses**. *Comp Med* 2006, **56**:247–251.
19. Lopman B, Gastañaduy P, Park GW, Hall AJ, Parashar UD, Vinjé J: **Environmental transmission of norovirus gastroenteritis**. *Curr Opin Virol* 2012, **2**:96–102.
20. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA: **Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis**. *Lancet Infect Dis* 2014, **14**:725–730.
21. **Norovirus outbreak in an elementary school--District of Columbia, February 2007**. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008, **56**:1340–1343.
22. **Norovirus outbreaks on three college campuses - California, Michigan, and Wisconsin, 2008**. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009, **58**:1095–1100.
23. Zingg W, Colombo C, Jucker T, Bossart W, Ruef C: **Impact of an outbreak of norovirus infection on hospital resources**. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005, **26**:263–267.
24. Mattner F, Mattner L, Borck HU, Gastmeier P: **Evaluation of the impact of the source (patient versus staff) on nosocomial norovirus outbreak severity**. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005, **26**:268–272.
25. Uchino K, Miyoshi T, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida Y, Teranaka Y, Sugimoto M, Sasaki Y, Shibata H, Fujii F, Tanaka T: **Combined genogroup I and II norovirus infection at a nursery**. *Jpn J Infect Dis* 2006, **59**:270–272.
26. Gunn RA, Terranova WA, Greenberg HB, Yashuk J, Gary GW, Wells JG, Taylor PR, Feldman RA: **Norwalk virus gastroenteritis aboard a cruise ship: an outbreak on five consecutive cruises**. *Am J Epidemiol* 1980, **112**:820–827.
27. **Outbreaks of gastroenteritis associated with noroviruses on cruise ships--United States, 2002**. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002, **51**:1112–1115.
28. Verhoef L, Boxman IL, Duizer E, Rutjes SA, Vennema H, Friesema IHM, de Roda Husman AM, Koopmans M: **Multiple exposures during a norovirus outbreak on a river-cruise sailing through Europe, 2006**. *Euro Surveill* 2008, **13**.

29. Koopmans M, Duizer E: **Foodborne viruses: an emerging problem.** *Int J Food Microbiol* 2004, **90**:23–41.
30. Matthews JE, Dickey BW, Miller RD, Felzer JR, Dawson BP, Lee AS, Rocks JJ, Kiel J, Montes JS, Moe CL, Eisenberg JNS, Leon JS: **The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup.** *Epidemiol Infect* 2012, **140**:1161–1172.
31. Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ: **Taxonomy of the caliciviruses.** *J Infect Dis* 2000, **181 Suppl**:S322–S330.
32. Mayo MA: **A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV.** *Arch Virol* 2002, **147**:1655–1656.
33. Bank-Wolf BR, König M, Thiel HJ: **Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses.** *Vet Microbiol* 2010, **140**:204–212.
34. Smiley JR, Chang KO, Hayes J, Vinjé J, Saif LJ: **Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus.** *J Virol* 2002, **76**:10089–10098.
35. Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X: **Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae.** *J Virol* 2008, **82**:5408–5416.
36. Farkas T, Dofour J, Jiang X, Sestak K: **Detection of norovirus-, sapovirus- and rhesus enteric calicivirus-specific antibodies in captive juvenile macaques.** *J Gen Virol* 2010, **91**:734–738.
37. L'Homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier É, Lamontagne AM, Ouardani M, Lacroix G, Simard C: **Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae.** *Virus Genes* 2009, **39**:66–75.
38. Wolf S, Reetz J, Otto P: **Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken.** *Arch Virol* 2011, **156**:1143–1150.
39. Wolf S, Reetz J, Hoffmann K, Gründel A, Schwarz BA, Hänel I, Otto PH: **Discovery and genetic characterization of novel caliciviruses in German and Dutch poultry.** *Arch Virol* 2012, **157**:1499–1507.
40. Karst SM, Zhu S, Goodfellow IG: **The molecular pathology of noroviruses.** *J Pathol* 2014, **235**:206–2016.
41. Vinjé J, Koopmans MPG: **Simultaneous detection and genotyping of “Norwalk-like viruses” by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**:2595–2601.

42. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, Ando T, Glass RI: **Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States.** *J Infect Dis* 2002, **186**:1–7.
43. Sugieda M, Nakajima S: **Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus “Norwalk-like viruses.”** *Virus Res* 2002, **87**:165–172.
44. Ando T, Noel JS, Fankhauser RL: **Genetic classification of “Norwalk-like viruses.”** *J Infect Dis* 2000, **181 Suppl**:S336–S348.
45. Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MSJ, Vinjé J: **Novel norovirus in dogs with diarrhea.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:980–982.
46. McFadden N, Bailey D, Carrara G, Benson A, Chaudhry Y, Shortland A, Heeney J, Yarovinsky F, Simmonds P, Macdonald A, Goodfellow I: **Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4.** *PLoS Pathog* 2011, **7**:e1002413.
47. Clarke IN, Lambden PR: **Organization and expression of calicivirus genes.** *J Infect Dis* 2000, **181 Suppl**:S309–S316.
48. Sosnovtsev S V, Belliot G, Chang K-O, Prikhodko VG, Thackray LB, Wobus CE, Karst SM, Virgin HW, Green KY: **Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells.** *J Virol* 2006, **80**:7816–7831.
49. Hyde JL, Sosnovtsev S V, Green KY, Wobus C, Virgin HW, Mackenzie JM: **Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway.** *J Virol* 2009, **83**:9709–19.
50. Hyde JL, Mackenzie JM: **Subcellular localization of the MNV-1 ORF1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex.** *Virology* 2010, **406**:138–148.
51. Rzezutka A, Cook N: **Survival of human enteric viruses in the environment and food.** *FEMS Microbiol Rev* 2004, **28**:441–453.
52. Nims R, Plavsic M: **Inactivation of caliciviruses.** *Pharmaceuticals* 2013, **6**:358–392.
53. Belliot G, Lavaux A, Souihel D, Agnello D, Pothier P: **Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:3315–3318.
54. Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J: **Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals.** *Gastroenterology* 2002, **122**:1967–1977.

55. Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, Moe CL, Baric RS: **Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice.** *J Virol* 2002, **76**:12335–12343.
56. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS: **Norovirus pathogenesis: Mechanisms of persistence and immune evasion in human populations.** *Immunol Rev* 2008, **225**:190–211.
57. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS: **Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system.** *Nat Rev Microbiol* 2010, **8**:231–241.
58. Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X: **Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket.** *J Virol* 2003, **77**:12562–12571.
59. Taube S, Perry JW, Yetming K, Patel SP, Auble H, Shu L, Nawar HF, Lee CH, Connell TD, Shayman J a, Wobus CE: **Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses.** *J Virol* 2009, **83**:4092–101.
60. Taube S, Perry JW, McGreevy E, Yetming K, Perkins C, Henderson K, Wobus CE: **Murine noroviruses bind glycolipid and glycoprotein attachment receptors in a strain-dependent manner.** *J Virol* 2012, **86**:5584–93.
61. Gerondopoulos A, Jackson T, Monaghan P, Doyle N, Roberts LO: **Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway.** *J Gen Virol* 2010, **91**:1428–38.
62. Perry JW, Wobus CE: **Endocytosis of murine norovirus 1 into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol.** *J Virol* 2010, **84**:6163–76.
63. Thorne LG, Goodfellow IG: **Norovirus gene expression and replication.** *J Gen Virol* 2014, **95**:278–291.
64. Schmid M, Wimmer E: **IRES-controlled protein synthesis and genome replication of poliovirus.** *Arch Virol Suppl* 1994, **9**:279–289.
65. Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JWB, Hardy ME: **The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment.** *EMBO J* 2003, **22**:2852–2859.
66. Leen EN, Kwok KYR, Birtley JR, Simpson PJ, Subba-Reddy C V, Chaudhry Y, Sosnovtsev S V, Green KY, Prater SN, Tong M, Young JC, Chung LMW, Marchant J, Roberts LO, Kao CC, Matthews S, Goodfellow IG, Curry S: **Structures of the compact helical core domains of feline calicivirus and murine norovirus VPg proteins.** *J Virol* 2013, **87**:5318–5330.
67. Goodfellow I: **The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses - A multifaceted protein.** *Curr Opin Virol* 2011, **1**:355–362.

68. Chaudhry Y, Nayak A, Bordeleau ME, Tanaka J, Pelletier J, Belsham GJ, Roberts LO, Goodfellow IG: **Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components.** *J Biol Chem* 2006, **281**:25315–25325.
69. Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, Laliberté J-F, Roberts L: **Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E.** *EMBO Rep* 2005, **6**:968–972.
70. Simmonds P, Karakasiliotis I, Bailey D, Chaudhry Y, Evans DJ, Goodfellow IG: **Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:2530–2546.
71. Vashist S, Urena L, Chaudhry Y, Goodfellow I: **Identification of RNA-Protein Interaction Networks Involved in the Norovirus Life Cycle.** *J Virol* 2012, **86**:11977–11990.
72. Gutiérrez-Escolano AL, Brito ZU, del Angel RM, Jiang X: **Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA.** *J Virol* 2000, **74**:8558–8562.
73. Gutiérrez-Escolano AL, Vázquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J, Hernández-Acosta J: **La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **311**:759–766.
74. May J, Viswanathan P, Ng KK-S, Medvedev A, Korba B: **The P4-P2' amino acids surrounding human norovirus polyprotein cleavage sites define the core sequence regulating self-processing order.** *J Virol* 2014, **88**:10738–10747.
75. Prasad B V, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK: **Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids.** *J Virol* 1994, **68**:5117–5125.
76. Naphine S, Lever RA, Powell ML, Jackson RJ, Brown TDK, Brierley I: **Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy.** *PLoS One* 2009, **4**:e8390.
77. Hyde JL, Gillespie LK, Mackenzie JM: **Mouse Norovirus 1 Utilizes the Cytoskeleton Network To Establish Localization of the Replication Complex Proximal to the Microtubule Organizing Center.** *J Virol* 2012, **86**:4110–4122.
78. Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, Prasad BVV, Estes MK: **Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles.** *J Virol* 2002, **76**:4044–4055.
79. Sosnovtsev S V, Belliot G, Chang K-O, Onwudiwe O, Green KY: **Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions.** *J Virol* 2005, **79**:4012–4024.
80. Vongpunsawad S, Venkataram Prasad B V, Estes MK: **Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain.** *J Virol* 2013, **87**:4818–25.
81. Bok K, Prikhodko VG, Green KY, Sosnovtsev S V: **Apoptosis in murine norovirus-infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin.** *J Virol* 2009, **83**:3647–56.

82. Furman LM, Maaty WS, Petersen LK, Ettayebi K, Hardy ME, Bothner B: **Cysteine protease activation and apoptosis in Murine norovirus infection.** *Virology* 2009, **6**:139.
83. Troeger H, Loddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple H-J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke J-D: **Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection.** *Gut* 2009, **58**:1070–1077.
84. Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW: **Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis.** *J Virol* 2006, **80**:5104–12.
85. Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus L-A, Vinjé J: **Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus.** *J Food Prot* 2006, **69**:2761–2765.
86. Thackray LB, Wobus CE, Chachu KA, Liu B, Alegre ER, Henderson KS, Kelley ST, Virgin HW: **Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence.** *J Virol* 2007, **81**:10460–10473.
87. Gonzalez-Hernandez MB, Liu T, Blanco LP, Auble H, Payne HC, Wobus CE: **Murine norovirus transcytosis across an in vitro polarized murine intestinal epithelial monolayer is mediated by M-like cells.** *J Virol* 2013, **87**:12685–93.
88. Mumphrey SM, Changotra H, Moore TN, Heimann-Nichols ER, Wobus CE, Reilly MJ, Moghadamfalahi M, Shukla D, Karst SM: **Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses.** *J Virol* 2007, **81**:3251–63.
89. Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang K-O, Sosnovtsev S V, Belliot G, Krug A, Mackenzie JM, Green KY, Virgin HW: **Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages.** *PLoS Biol* 2004, **2**:e432.
90. Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, Gonzalez-Hernandez MB, Iovine NM, Wobus CE, Vinje J, Tibbetts S a., Wallet SM, Karst SM: **Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells.** *Science (80-)* 2014, **346**:755–759.
91. Baldrige MT, Nice TJ, McCune BT, Yokoyama CC, Kambal A, Wheadon M, Diamond MS, Ivanova Y, Artyomov M, Virgin HW: **Commensal microbes and interferon- λ determine persistence of enteric murine norovirus infection.** *Science* 2015, **347**:266–269.
92. Elftman MD, Gonzalez-Hernandez MB, Kamada N, Perkins C, Henderson KS, Núñez G, Wobus CE: **Multiple effects of dendritic cell depletion on murine norovirus infection.** *J Gen Virol* 2013, **94**:1761–8.
93. McCartney S a, Thackray LB, Gitlin L, Gilfillan S, Virgin HW, Virgin Iv HW, Colonna M: **MDA-5 recognition of a murine norovirus.** *PLoS Pathog* 2008, **4**:e1000108.

94. Thackray LB, Duan E, Lazear HM, Kambal A, Schreiber RD, Diamond MS, Virgin HW: **Critical role for interferon regulatory factor 3 (IRF-3) and IRF-7 in type I interferon-mediated control of murine norovirus replication.** *J Virol* 2012, **86**:13515–13523.
95. Rodriguez MR, Monte K, Thackray LB, Lenschow DJ: **ISG15 functions as an interferon-mediated antiviral effector early in the murine norovirus life cycle.** *J Virol* 2014, **88**:9277–9286.
96. Changotra H, Jia Y, Moore TN, Liu G, Kahan SM, Sosnovtsev S V, Karst SM: **Type I and type II interferons inhibit the translation of murine norovirus proteins.** *J Virol* 2009, **83**:5683–5692.
97. Nice TJ, Baldrige MT, McCune BT, Norman JM, Lazear HM, Artyomov M, Diamond MS, Virgin HW: **Interferon- λ cures persistent murine norovirus infection in the absence of adaptive immunity.** *Science* 2015, **347**:269–73.
98. Basic M, Keubler LM, Buettner M, Achard M, Breves G, Schröder B, Smoczek A, Jörns A, Wedekind D, Zschemisch NH, Günther C, Neumann D, Lienenklaus S, Weiss S, Hornef MW, Mähler M, Bleich A: **Norovirus Triggered Microbiota-driven Mucosal Inflammation in Interleukin 10-deficient Mice.** *Inflamm Bowel Dis* 2014, **20**:431–443.
99. Chachu KA, Strong DW, LoBue AD, Wobus CE, Baric RS, Virgin HW: **Antibody is critical for the clearance of murine norovirus infection.** *J Virol* 2008, **82**:6610–6617.
100. Chachu K a, LoBue AD, Strong DW, Baric RS, Virgin HW: **Immune mechanisms responsible for vaccination against and clearance of mucosal and lymphatic norovirus infection.** *PLoS Pathog* 2008, **4**:e1000236.
101. Zhu S, Regev D, Watanabe M, Hickman D, Moussatche N, Jesus DM, Kahan SM, Naphine S, Brierley I, Hunter RN, Devabhaktuni D, Jones MK, Karst SM: **Identification of immune and viral correlates of norovirus protective immunity through comparative study of intra-cluster norovirus strains.** *PLoS Pathog* 2013, **9**:e1003592.
102. Tomov VT, Osborne LC, Dolfi D V, Sonnenberg GF, Monticelli L a, Mansfield K, Virgin HW, Artis D, Wherry EJ: **Persistent enteric murine norovirus infection is associated with functionally suboptimal virus-specific CD8 T cell responses.** *J Virol* 2013, **87**:7015–7031.
103. Henderson KS: **Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice.** *Lab Anim (NY)* 2008, **37**:314–320.
104. Hsu CC, Wobus CE, Steffen EK, Riley LK, Livingston RS: **Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, **12**:1145–1151.
105. Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB: **Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats.** *Lab Anim* 2009, **43**:165–173.

106. Kitajima M, Oka T, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K: **Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan.** *Microbiol Immunol* 2009, **53**:531–534.
107. Kim M, Lee H, Chang K-O, Ko G: **Molecular characterization of murine norovirus isolates from South Korea.** *Virus Res* 2010, **147**:1–6.
108. Kim JR, Seok SH, Kim DJ, Baek M, Na Y, Han J, Kim T, Park J, Turner P V, Chung DH, Kang B: **Prevalence of murine norovirus infection in Korean laboratory animal facilities.** *J Vet Med Sci* 2011, **73**:687–691.
109. Hensley SE, Pinto AK, Hickman HD, Kastenmayer RJ, Bennink JR, Virgin HW, Yewdell JW: **Murine norovirus infection has no significant effect on adaptive immunity to vaccinia virus or influenza A virus.** *J Virol* 2009, **83**:7357–7360.
110. Higgins PDR, Johnson LA, Sauder K, Moons D, Blanco L, Taube S, Wobus CE: **Transient or persistent norovirus infection does not alter the pathology of Salmonella typhimurium induced intestinal inflammation and fibrosis in mice.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2011, **34**:247–257.
111. Hsu CC, Paik J, Treuting PM, Seamons A, Meeker SM, Brabb TL, Maggio-Price L: **Infection with murine norovirus 4 does not alter Helicobacter-induced inflammatory bowel disease in Il10(-/-) mice.** *Comp Med* 2014, **64**:256–263.
112. Paik J, Fierce Y, Drivdahl R, Treuting PM, Seamons A, Brabb T, Maggio-Price L: **Effects of Murine Norovirus Infection on a Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance.** *Comp Med* 2010, **60**:189–195.
113. Paik J, Fierce Y, Mai P, Phelps SR, McDonald T, Treuting P, Drivdahl R, Brabb T, Leboeuf R, Brien KDO, Maggio-price L: **Murine Norovirus Increases Atherosclerotic Lesion Size and Macrophages in Ldlr - / - Mice.** 2011, **61**:330–338.
114. Paik J, Kwok F, Seamons A, Brabb T, Kim J, Sullivan B, Hsu C, O'Brien KD, Maggio-Price L: **Effects of murine norovirus on atherosclerosis in Ldlr(-/-) mice depends on the timing of infection.** *Comp Med* 2015, **65**:114–122.
115. Lencioni KC, Drivdahl R, Seamons A, Treuting PM, Brabb T, Maggio-Price L: **Lack of effect of murine norovirus infection on a mouse model of bacteria-induced colon cancer.** *Comp Med* 2011, **61**:219–226.
116. Kim Y-G, Park J-H, Reimer T, Baker DP, Kawai T, Kumar H, Akira S, Wobus C, Núñez G: **Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections.** *Cell Host Microbe* 2011, **9**:496–507.
117. Doom CM, Turula HM, Hill AB: **Investigation of the impact of the common animal facility contaminant murine norovirus on experimental murine cytomegalovirus infection.** *Virology* 2009, **392**:153–161.

118. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu T-C, Ng ACY, Storer CE, Head RD, Xavier R, Stappenbeck TS, Virgin HW: **Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine.** *Cell* 2010, **141**:1135–1145.
119. Kernbauer E, Ding Y, Cadwell K: **An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria.** *Nature* 2014, **516**:94–98.
120. Schroeter J: **Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente.** *Beitrage zur Biol der Pflanz* 1872, **1**:109–126.
121. Gessard C: **Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. By Carle Gessard (1850-1925).** *Rev Infect Dis* 1984, **6 Suppl 3**:S775–S776.
122. Vasil ML: **Pseudomonas aeruginosa: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology.** *J Pediatr* 1986, **108**:800–805.
123. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, et al.: **Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen.** *Nature* 2000, **406**:959–964.
124. Khan NH, Ishii Y, Kimata-Kino N, Esaki H, Nishino T, Nishimura M, Kogure K: **Isolation of Pseudomonas aeruginosa from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates.** *Microb Ecol* 2007, **53**:173–186.
125. Kamei A, Koh AY, Gadjeva M, Priebe GP, Lory S, Pier GB: **Transmission in a Murine Model.** 2011, **201**:71–80.
126. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A: **Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, **30**:627–634.
127. DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A: **Diverse Pseudomonas aeruginosa gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8.** *J Clin Invest* 1995, **96**:2204–2210.
128. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP: **Nonmotility and phagocytic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis.** *Infect Immun* 1994, **62**:596–605.
129. O'Toole GA, Kolter R: **Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development.** *Mol Microbiol* 1998, **30**:295–304.
130. Hahn HP: **The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of Pseudomonas aeruginosa - A review.** *Gene* 1997, **192**:99–108.

131. Wall D, Kaiser D: **Type IV pili and cell motility.** *Mol Microbiol* 1999, **32**:1–10.
132. Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A: **The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:6911–6916.
133. Hobbs M, Collie ES, Free PD, Livingston SP, Mattick JS: **PilS and PilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Mol Microbiol* 1993, **7**:669–682.
134. Lynn WA, Golenbock DT: **Lipopolysaccharide antagonists.** *Immunol Today* 1992, **13**:271–276.
135. Lam MYC, McGroarty EJ, Kropinski AM, MacDonald LA, Pedersen SS, Hoiby N, Lam JS: **Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Clin Microbiol* 1989, **27**:962–967.
136. Cryz SJ, Pitt TL, Furer E, Germanier R: **Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Infect Immun* 1984, **44**:508–513.
137. Dasgupta T, De Kievit TR, Masoud H, Altman E, Richards JC, Sadovskaya I, Speert DP, Lam JS: **Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes O3, O5, and O6.** *Infect Immun* 1994, **62**:809–817.
138. Remminghorst U, Rehm BHA: **Bacterial alginates: From biosynthesis to applications.** *Biotechnology Letters* 2006:1701–1712.
139. Roychoudhury S, Sakai K, Chakrabarty AM: **AlgR2 is an ATP/GTP-dependent protein kinase involved in alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:2659–2663.
140. Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, Lindum PW, Campbell JIA, Jensen P, Johnsen AH, Givskov M, Ohman DE, Molin S, Høiby N, Kharazmi A: **Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: A mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung.** *Microbiology* 1999, **145**:1349–1357.
141. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Molin S, Givskov M, Matthew R, Heydorn A, Parsek MR: **Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function** **Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function.** *J Bacteriol* 2001, **183**:5395–5401.
142. Cobb LM, Mychaleckyj JC, Wozniak DJ, López-Boado YS: ***Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease.** *J Immunol* 2004, **173**:5659–5670.
143. Wozniak DJ, Wyckoff TJO, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA, Parsek MR: **Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14**

- and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:7907–7912.
144. Gilboa-Garber N: **Pseudomonas aeruginosa lectins**. *Methods Enzymol* 1982, **83**:378–385.
145. Imberty A, Wimmerová M, Mitchell EP, Gilboa-Garber N: **Structures of the lectins from Pseudomonas aeruginosa: Insights into the molecular basis for host glycan recognition**. *Microbes Infect* 2004, **6**:221–228.
146. Blanchard B, Nurisso A, Hollville E, Tétaud C, Wiels J, Pokorná M, Wimmerová M, Varrot A, Imberty A: **Structural Basis of the Preferential Binding for Globo-Series Glycosphingolipids Displayed by Pseudomonas aeruginosa Lectin I**. *J Mol Biol* 2008, **383**:837–853.
147. Lanne B, Ciopraga J, Bergstrom J, Motas C, Karlsson KA: **Binding of the galactose-specific Pseudomonas aeruginosa lectin, PA-I, to glycosphingolipids and other glycoconjugates**. *Glycoconj J* 1994, **11**:292–298.
148. Mitchell E, Houles C, Sudakevitz D, Wimmerova M, Gautier C, Pérez S, Wu AM, Gilboa-Garber N, Imberty A: **Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of Pseudomonas aeruginosa in the lungs of cystic fibrosis patients**. *Nat Struct Biol* 2002, **9**:918–921.
149. Perret S, Sabin C, Dumon C, Pokorná M, Gautier C, Galanina O, Iliá S, Bovin N, Nicaise M, Desmadril M, Gilboa-Garber N, Wimmerová M, Mitchell EP, Imberty A: **Structural basis for the interaction between human milk oligosaccharides and the bacterial lectin PA-III of Pseudomonas aeruginosa**. *Biochem J* 2005, **389**:325–332.
150. Glick J, Garber N: **The intracellular localization of Pseudomonas aeruginosa lectins**. *J Gen Microbiol* 1983, **129**:3085–3090.
151. Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, Rosenau F, Jaeger KE: **Pseudomonas aeruginosa lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation**. *Microbiology* 2005, **151**:1313–1323.
152. Eierhoff T, Bastian B, Thuenauer R, Madl J, Audfray A, Aigal S, Juillot S, Rydell GE, Müller S, de Bentzmann S, Imberty A, Fleck C, Römer W: **A lipid zipper triggers bacterial invasion**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:12895–12900.
153. Chemani C, Imberty A, De Bentzmann S, Pierre M, Wimmerová M, Guery BP, Faure K: **Role of LecA and LecB lectins in Pseudomonas aeruginosa-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands**. *Infect Immun* 2009, **77**:2065–2075.
154. Laughlin RS, Musch MW, Hollbrook CJ, Rocha FM, Chang EB, Alverdy JC: **The key role of Pseudomonas aeruginosa PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis**. *Ann Surg* 2000, **232**:133–142.

155. Adam EC, Mitchell BS, Schumacher DU, Grant G, Schumacher U: **Pseudomonas aeruginosa II lectin stops human ciliary beating: Therapeutic implications of fucose.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **155**:2102–2104.
156. Boukerb A, Rousset A, Galanos N, Méar J, Thépaut M, Grandjean T, Gillon E, Cecioni S, Abderrahmen C, Faure K, Redelberger D, Kipnis E, Dessein R, Havet S, Darblade B, Matthews S, de Bentzmann S, Guéry B, Cournoyer B, Imberty A, Vidal S: **Anti-adhesive properties of glycoclusters against Pseudomonas aeruginosa lung infection.** *J Med chem* 2014, **57**:10275–10289.
157. Leidal KG, Munson KL, Denning GM: **Small molecular weight secretory factors from Pseudomonas aeruginosa have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, **25**:186–195.
158. Denning GM, Wollenwebber LA, Railsback MA, Cox CD, Stoll LL, Britigan BE: **Pseudomonas pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells.** *Infect Immun* 1998, **66**:5777–5784.
159. Allen L, Dockrell DH, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, Whyte MKB: **Pyocyanin production by Pseudomonas aeruginosa induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo.** *J Immunol* 2005, **174**:3643–3649.
160. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D: **Pseudomonas aeruginosa pyocyanin is critical for lung infection in mice.** *Infect Immun* 2004, **72**:4275–4278.
161. O'Malley YQ, Reszka KJ, Spitz DR, Denning GM, Britigan BE: **Pseudomonas aeruginosa pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **287**:94–103.
162. O'Malley YQ, Reszka KJ, Rasmussen GT, Abdalla MY, Denning GM, Britigan BE: **The Pseudomonas secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, **285**:1077–1086.
163. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F: **The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection.** *Trends Mol Med* 2004, **10**:599–606.
164. Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA: **Pyoverdin is essential for virulence of Pseudomonas aeruginosa.** *Infect Immun* 1996, **64**:518–523.
165. Takase H, Nitanai H, Hoshino K, Otani T: **Impact of siderophore production on Pseudomonas aeruginosa infections in immunosuppressed mice.** *Infect Immun* 2000, **68**:1834–1839.
166. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML: **Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in Pseudomonas aeruginosa.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:7072–7077.

167. Guzzo J, Pages JM, Duong F, Lazdunski A, Murgier M: **Pseudomonas aeruginosa alkaline protease: Evidence for secretion genes and study of secretion mechanism.** *J Bacteriol* 1991, **173**:5290–5297.
168. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J: **Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis.** *Med Mal Infect* 2006, **36**:78–91.
169. Kipnis E, Guery BP, Tournoy A, Leroy X, Robriquet L, Fialdes P, Neviere R, Fourrier F: **Massive alveolar thrombin activation in Pseudomonas aeruginosa-induced acute lung injury.** *Shock* 2004, **21**:444–451.
170. Matsumoto K: **Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis.** *Biol Chem* 2004, **385**:1007–1016.
171. Malloy JL, Veldhuizen RAW, Thibodeaux BA, O’Callaghan RJ, Wright JR: **Pseudomonas aeruginosa protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, **288**:409–418.
172. Peters JE, Galloway DR: **Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from Pseudomonas aeruginosa: Enhancement of elastase activity.** *J Bacteriol* 1990, **172**:2236–2240.
173. Bever RA, Iglewski BH: **Molecular characterization and nucleotide sequence of the Pseudomonas aeruginosa elastase structural gene.** *J Bacteriol* 1988, **170**:4309–4314.
174. Galloway DR: **Pseudomonas aeruginosa elastase and elastolysis revisited: recent developments.** *Mol Microbiol* 1991, **5**:2315–2321.
175. Toder DS, Ferrell SJ, Nezezon JL, Rust L, Iglewski BH: **lasA and lasB genes of Pseudomonas aeruginosa: Analysis of transcription and gene product activity.** *Infect Immun* 1994, **62**:1320–1327.
176. Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH: **LasR of Pseudomonas aeruginosa is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression.** *Infect Immun* 1993, **61**:1180–1184.
177. Azghani AO: **Pseudomonas aeruginosa and Epithelial Permeability: Role of Virulence Factors Elastase and Exotoxin A.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, **15**:132–140.
178. Azghani AO, Gray LD, Johnson AR: **A bacterial protease perturbs the paracellular barrier function of transporting epithelial monolayers in culture.** *Infect Immun* 1993, **61**:2681–2686.
179. Azghani AO, Miller EJ, Peterson BT: **Virulence factors from Pseudomonas aeruginosa increase lung epithelial permeability.** *Lung* 2000, **178**:261–269.

180. Kon Y, Tsukada H, Hasegawa T, Igarashi K, Wada K, Suzuki E, Arakawa M, Gejyo F: **The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999, **25**:313–321.
181. Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR: ***Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, **28**:528–537.
182. Heck LW, Alarcon PG, Kulhavy RM, Morihara K, Russell MW, Mestecky JF: **Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase.** *J Immunol* 1990, **144**:2253–2257.
183. Schultz DR, Miller KD: **Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement derived chemotactic and phagocytic factors.** *Infect Immun* 1974, **10**:128–135.
184. Hong Y, Ghebrehiwet B: **Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3.** *Clin Immunol Immunopathol* 1992, **62**:133–138.
185. Park PW, Biedermann K, Mecham L, Bissett DL, Mecham RP: **Lysozyme binds to elastin and protects elastin from elastase-mediated degradation.** *J Invest Dermatol* 1996, **106**:1075–1080.
186. Zückert WR, Marquis H, Goldfine H: **Modulation of enzymatic activity and biological function of *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase C by amino acid substitutions and by replacement with the *Bacillus cereus* ortholog.** *Infect Immun* 1998, **66**:4823–4831.
187. Liu P V: **Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Infect Dis* 1974, **130** Suppl:S94–S99.
188. König B, Jaeger KE, Sage AE, Vasil ML, König W: **Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes).** *Infect Immun* 1996, **64**:3252–3258.
189. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, Pittet JF, Frank D, Dobbs L, Vasil ML, Matthay MA: **Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits.** *J Appl Physiol* 1993, **75**:1661–1669.
190. Iglewski BH, Sadoff JC: **Toxin Inhibitors of protein synthesis: production, purification, and assay of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A.** *Methods Enzymol* 1979, **60**:780–793.
191. D'Argenio DA, Gallagher LA, Berg CA, Manoil C: ***Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection.** *J Bacteriol* 2001, **183**:1466–1471.
192. Wick MJ, Hamood AN, Iglewski BH: **Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A.** *Mol Microbiol* 1990, **4**:527–535.

193. Gallant C V., Raivio TL, Olson JC, Woods DE, Storey DG: **Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with altered ADP-ribosyltransferase activity and cytotoxicity.** *Microbiology* 2000, **146**:1891–1899.
194. Foley BT, Moehring JM, Moehring TJ: **Mutations in the elongation factor 2 gene which confer resistance to diphtheria toxin and Pseudomonas exotoxin A: Genetic and biochemical analyses.** *J Biol Chem* 1995, **270**:23218–23225.
195. Miyazaki S, Matsumoto T, Tateda K, Ohno A, Yamaguchi K: **Role of exotoxin A in inducing severe Pseudomonas aeruginosa infections in mice.** *J Med Microbiol* 1995, **43**:169–175.
196. HAUSER G, KARNOVSKY ML: **Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by Pseudomonas aeruginosa.** *J Biol Chem* 1957, **224**:91–105.
197. Kownatzki R, Tümmler B, Döring G: **Rhamnolipid of Pseudomonas aeruginosa in sputum of cystic fibrosis patients.** *Lancet* 1987, **1**:1026–1027.
198. Read RC, Roberts P, Munro N, Rutman A, Hastie A, Shryock T, Hall R, McDonald-Gibson W, Lund V, Taylor G: **Effect of Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating.** *J Appl Physiol* 1992, **72**:2271–2277.
199. McClure CD, Schiller NL: **Inhibition of macrophage phagocytosis by Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids in vitro and in vivo.** *Curr Microbiol* 1996, **33**:109–117.
200. Kohler T, Curty LK, Barja F, Van Delden C, Pechere JC: **Swarming of Pseudomonas aeruginosa is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili.** *J Bacteriol* 2000, **182**:5990–5996.
201. Davey ME, Caiazza NC, O’Toole GA: **Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in Pseudomonas aeruginosa PAO1.** *J Bacteriol* 2003, **185**:1027–1036.
202. Hauser AR: **The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection.** *Nat Rev Microbiol* 2009, **7**:654–665.
203. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, Leaf IA, Aderem A: **Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:3076–3080.
204. Barbieri JT: **Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin.** *Int J Med Microbiol* 2000, **290**:381–387.
205. Ganesan AK, Frank DW, Misra RP, Schmidt G, Barbieri JT: **Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites.** *J Biol Chem* 1998, **273**:7332–7337.
206. Goehring UM, Schmidt G, Pederson KJ, Aktories K, Barbieri JT: **The N-terminal domain of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases.** *J Biol Chem* 1999, **274**:36369–36372.

207. Shaver CM, Hauser AR: **Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung.** *Infect Immun* 2004, **72**:6969–6977.
208. Sundin C, Hallberg B, Forsberg Å: **ADP-ribosylation by exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* induces an irreversible effect on the host cell cytoskeleton in vivo.** *FEMS Microbiol Lett* 2004, **234**:87–91.
209. Garrity-Ryan L, Kazmierczak B, Kowal R, Comolli J, Hauser A, Engel JN: **The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages.** *Infect Immun* 2000, **68**:7100–7113.
210. Geiser TK, Kazmierczak BI, Garrity-Ryan LK, Matthay MA, Engel JN: ***Pseudomonas aeruginosa* ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair.** *Cell Microbiol* 2001, **3**:223–236.
211. Lee VT, Smith RS, Tümmler B, Lory S: **Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection.** *Infect Immun* 2005, **73**:1695–1705.
212. Sato H, Frank DW, Hillard CJ, Feix JB, Pankhaniya RR, Moriyama K, Finck-Barbançon V, Buchaklian A, Lei M, Long RM, Wiener-Kronish J, Sawa T: **The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU.** *EMBO J* 2003, **22**:2959–2969.
213. Sato H, Feix JB, Hillard CJ, Frank DW: **Characterization of phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxin, ExoU.** *J Bacteriol* 2005, **187**:1192–1195.
214. Finck-Barbançon V, Goranson J, Zhu L, Sawa T, Wiener-Kronish JP, Fleiszig SM, Wu C, Mende-Mueller L, Frank DW: **ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury.** *Mol Microbiol* 1997, **25**:547–557.
215. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier GB: **Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread.** *Infect Immun* 2000, **68**:3998–4004.
216. Howell HA, Logan LK, Hauser AR: **Type III secretion of ExoU is critical during early *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia.** *MBio* 2013, **4**:e00032–13.
217. Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW: **ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:13899–13904.
218. Prasain N, Alexeyev M, Balczon R, Stevens T: **Soluble adenylyl cyclase-dependent microtubule disassembly reveals a novel mechanism of endothelial cell retraction.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009, **297**:L73–L83.
219. Vallis AJ, Finck-Barbançon V, Yahr TL, Frank DW: **Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells.** *Infect Immun* 1999, **67**:2040–2044.

220. Sayner SL, Frank DW, King J, Chen H, VandeWaa J, Stevens T: **Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by pseudomonas aeruginosa ExoY.** *Circ Res* 2004, **95**:196–203.
221. Pearson JP, Gray KM, Passador L, Tucker KD, Eberhard A, Iglewski BH, Greenberg EP: **Structure of the autoinducer required for expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:197–201.
222. Gambello MJ, Iglewski BH: **Cloning and characterization of the Pseudomonas aeruginosa lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression.** *J Bacteriol* 1991, **173**:3000–3009.
223. Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH: **Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of Pseudomonas aeruginosa.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:11229–11234.
224. Hays, E. E., I. C. Wells, P. A. Katzman, C. K. Cain, F. A. Jacobs, S. A. Thayer, E. A. Doisy, W. L. Gaby, E. C. Roberts, R. D. Muir, C. J. Carroll, L. R. Jones and NJW: **Antibiotic substances produced by Pseudomonas aeruginosa.** *J Biol Chem* 1945, **159**:725–750.
225. LIGHTBOWN JW: **An antagonist of streptomycin and dihydrostreptomycin produced by Pseudomonas aeruginosa.** *J Gen Microbiol* 1954, **11**:477–492.
226. Bredenbruch F, Nimtz M, Wray V, Morr M, Müller R, Häussler S: **Biosynthetic pathway of Pseudomonas aeruginosa 4-hydroxy-2-alkylquinolines.** *J Bacteriol* 2005, **187**:3630–3635.
227. Farrow JM, Pesci EC: **Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the Pseudomonas quinolone signal.** *J Bacteriol* 2007, **189**:3425–3433.
228. Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R, Rahme LG: **A quorum sensing-associated virulence gene of Pseudomonas aeruginosa encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:14613–14618.
229. Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE, Saucier M, Xiao G, Rahme LG: **The contribution of MvfR to Pseudomonas aeruginosa pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: Multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhIRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones.** *Mol Microbiol* 2005, **55**:998–1014.
230. Diggle SP, Matthijs S, Wright VJ, Fletcher MP, Chhabra SR, Lamont IL, Kong X, Hider RC, Cornelis P, Cámara M, Williams P: **The Pseudomonas aeruginosa 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment.** *Chem Biol* 2007, **14**:87–96.
231. Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP, Pesci EC: **Regulation of Pseudomonas quinolone signal synthesis in Pseudomonas aeruginosa.** *J Bacteriol* 2005, **187**:4372–4380.

232. McKnight SL, Iglewski BH, Pesci EC: **The Pseudomonas quinolone signal regulates rhl quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa.** *J Bacteriol* 2000, **182**:2702–2708.
233. Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámara M, Williams P: **The Pseudomonas aeruginosa quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR.** *Mol Microbiol* 2003, **50**:29–43.
234. Nadal Jimenez P, Koch G, Thompson J a., Xavier KB, Cool RH, Quax WJ: **The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in Pseudomonas aeruginosa.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2012, **76**:46–65.
235. Tang HB, Dimango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB, Prince A: **Contribution of specific Pseudomonas aeruginosa virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection.** *Infect Immun* 1996, **64**:37–43.
236. Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A: **Pseudomonas aeruginosa cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection.** *Infect Immun* 2000, **68**:4331–4334.
237. Lesprit P, Faurisson F, Join-Lambert O, Roudot-Thoraval F, Foglino M, Vissuzaine C, Carbon C: **Role of the Quorum-sensing System in Experimental Pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa in Rats.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**:1478–1482.
238. Telford G, Wheeler D, Williams P, Tomkins PT, Appleby P, Sewell H, Stewart GSAB, Bycroft BW, Pritchard DI: **The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity.** *Infect Immun* 1998, **66**:36–42.
239. Smith RS, Harris SG, Phipps R, Iglewski B: **The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo.** *J Bacteriol* 2002, **184**:1132–1139.
240. Rahme LG, Tan MW, Le L, Wong SM, Tompkins RG, Calderwood SB, Ausubel FM: **Use of model plant hosts to identify Pseudomonas aeruginosa virulence factors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:13245–13250.
241. Rahme LG, Ausubel FM, Cao H, Drenkard E, Goumnerov BC, Lau GW, Mahajan-Miklos S, Plotnikova J, Tan MW, Tsongalis J, Walendziewicz CL, Tompkins RG: **Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:8815–8821.
242. Pukatzki S, Kessin RH, Mekalanos JJ: **The human pathogen Pseudomonas aeruginosa utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba Dictyostelium discoideum.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:3159–3164.

243. Comolli JC, Hauser AR, Waite L, Whitchurch CB, Mattick JS, Engel JN: **Pseudomonas aeruginosa gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia.** *Infect Immun* 1999, **67**:3625–3630.
244. Chitkara YK, Feierabend TC: **Endogenous and exogenous infection with Pseudomonas aeruginosa in a burns unit.** *Int Surg* 1981, **66**:237–240.
245. Öncül O, Öksüz S, Acar A, Ülkür E, Turhan V, Uygur F, Ulçay A, Erdem H, Özyurt M, Görenek L: **Nosocomial infection characteristics in a burn intensive care unit: Analysis of an eleven-year active surveillance.** *Burns* 2014, **40**:835–841.
246. Bendig JW, Kyle PW, Giangrande PL, Samson DM, Azadian BS: **Two neutropenic patients with multiple resistant Pseudomonas aeruginosa septicaemia treated with ciprofloxacin.** *J R Soc Med* 1987, **80**:316–317.
247. Koh AY, Priebe GP, Ray C, Van Rooijen N, Pier GB: **Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute Pseudomonas aeruginosa pneumonia.** *Infect Immun* 2009, **77**:5300–5310.
248. Franzetti F, Cernuschi M, Esposito R, Moroni M: **Pseudomonas infections in patients with AIDS and AIDS-related complex.** *J Intern Med* 1992, **231**:437–443.
249. Pachigolla G, Blomquist P, Cavanagh HD: **Microbial keratitis pathogens and antibiotic susceptibilities: a 5-year review of cases at an urban county hospital in north Texas.** *Eye Contact Lens* 2007, **33**:45–49.
250. Berradi S, Hafidi Z, Lezrek M, Daoudi R: **Acute fulminant endophthalmitis complicating traditional lens couching.** *Lancet* 2015, **385**:1229.
251. Stapleton F, Carnt N: **Contact lens-related microbial keratitis: how have epidemiology and genetics helped us with pathogenesis and prophylaxis.** *Eye* 2012, **26**:185–193.
252. Qureishi A, Lee Y, Belfield K, Birchall JP, Daniel M: **Update on otitis media - Prevention and treatment.** *Infect Drug Resist* 2014, **7**:15–24.
253. Mirsoleymani SR, Salimi M, Shareghi Brojeni M, Ranjbar M, Mehtarpour M: **Bacterial pathogens and antimicrobial resistance patterns in pediatric urinary tract infections: a four-year surveillance study (2009-2012).** *Int J Pediatr* 2014, **2014**:126142.
254. Veber B: **Infections inhabituelles ?? Pseudomonas aeruginosa.** *Ann Fr Anesth Reanim* 2003, **22**:539–543.
255. Aydın N, Şirin E, Aydemir AN, Zengin G: **Pseudomonas osteomyelitis of the proximal humerus after arthroscopic rotator cuff repair.** *Acta Orthop Traumatol Turc* 2014, **48**:685–689.

256. Martínez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A, Martinez JL: **Chronic Pseudomonas aeruginosa infection in chronic obstructive pulmonary disease.** *Clin Infect Dis* 2008, **47**:1526–1533.
257. Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS: **Pseudomonas aeruginosa: Host defence in lung diseases.** *Respirology* 2010, **15**:1037–1056.
258. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley S a.: **Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis.** *Clin Microbiol Rev* 2011, **24**:29–70.
259. Hogardt M, Heesemann J: **Adaptation of Pseudomonas aeruginosa during persistence in the cystic fibrosis lung.** *Int J Med Microbiol* 2010, **300**:557–562.
260. Sagel SD, Davis SD, Campisi P, Dell SD: **Update of respiratory tract disease in children with primary ciliary dyskinesia.** *Proc Am Thorac Soc* 2011, **8**:438–43.
261. Höpken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C: **The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection.** *Nature* 1996, **383**:86–89.
262. Mueller-Ortiz SL, Drouin SM, Wetsel RA: **The Alternative Activation Pathway and Complement Component C3 Are Critical for a Protective Immune Response against Pseudomonas aeruginosa in a Murine Model of Pneumonia.** *Infect Immun* 2004, **72**:2899–2906.
263. Ganz T: **Defensins: Antimicrobial peptides of vertebrates.** *Comptes Rendus - Biol* 2004, **327**:539–549.
264. Mijares LA, Wangdi T, Sokol C, Homer R, Medzhitov R, Kazmierczak BI: **Airway epithelial MyD88 restores control of Pseudomonas aeruginosa murine infection via an IL-1-dependent pathway.** *J Immunol* 2011, **186**:7080–7088.
265. Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Wilson CB: **Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 is essential for pulmonary host defense against Pseudomonas aeruginosa but not Staphylococcus aureus.** *J Immunol* 2004, **172**:3377–3381.
266. Ramphal R, Balloy V, Jyot J, Verma A, Si-Tahar M, Chignard M: **Control of Pseudomonas aeruginosa in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin.** *J Immunol* 2008, **181**:586–592.
267. Feuillet V, Medjane S, Mondor I, Demaria O, Pagni PP, Gala JE, Flavell RA, Alexopoulou L: **Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:12487–12492.
268. Skerrett SJ, Wilson CB, Liggitt HD, Hajjar AM: **Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to Pseudomonas aeruginosa.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, **292**:L312–L322.

269. Faure K, Sawa T, Ajayi T, Fujimoto J, Moriyama K, Shime N, Wiener-Kronish JP: **TLR4 signaling is essential for survival in acute lung injury induced by virulent *Pseudomonas aeruginosa* secreting type III secretory toxins.** *Respir Res* 2004, **5**:1.
270. Travassos LH, Carneiro LAM, Girardin SE, Boneca IG, Lemos R, Bozza MT, Domingues RCP, Coyle AJ, Bertin J, Philpott DJ, Plotkowski MC: **Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Biol Chem* 2005, **280**:36714–36718.
271. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ: **Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection.** *J Biol Chem* 2003, **278**:8869–8872.
272. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G: **Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease.** *J Biol Chem* 2003, **278**:5509–5512.
273. Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE, Zouali H, Lesage S, Chareyre F, Bui TH, Giovannini M, Zaehring U, Penard-Lacronique V, Sansonetti PJ, Hugot J-P, Thomas G: **Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:3455–3460.
274. Tsay TB, Chang CJ, Chen PH, Hsu CM, Chen LW: **Nod2 mutation enhances NF-kappaB activity and bacterial killing activity of macrophages.** *Inflammation* 2009, **32**:372–378.
275. Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, Aderem A: **TLR5 and Ipaf: Dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system.** *Semin Immunopathol* 2007, **29**:275–288.
276. Vijay-Kumar M, Carvalho FA, Aitken JD, Fifadara NH, Gewirtz AT: **TLR5 or NLRC4 is necessary and sufficient for promotion of humoral immunity by flagellin.** *Eur J Immunol* 2010, **40**:3528–3534.
277. Faure E, Mear JB, Faure K, Normand S, Couturier-Maillard A, Grandjean T, Balloy V, Ryffel B, Dessein R, Chignard M, Uyttenhove C, Guery B, Gosset P, Chamaillard M, Kipnis E: ***Pseudomonas aeruginosa* type-3 secretion system dampens host defense by exploiting the NLRC4-coupled inflammasome.** *Am J Respir Crit Care Med* 2014, **189**:799–811.
278. Raoust E, Balloy V, Garcia-Verdugo I, Touqui L, Ramphal R, Chignard M: ***Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells.** *PLoS One* 2009, **4**:e7259.
279. Sadikot RT, Zeng H, Joo M, Everhart MB, Sherrill TP, Li B, Cheng D, Yull FE, Christman JW, Blackwell TS: **Targeted immunomodulation of the NF-kappaB pathway in airway epithelium impacts host defense against *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Immunol* 2006, **176**:4923–4930.

280. Hajjar AM, Harowicz H, Liggitt HD, Fink PJ, Wilson CB, Skerrett SJ: **An essential role for non-bone marrow-derived cells in control of pseudomonas aeruginosa pneumonia.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005, **33**:470–475.
281. Giannoni E, Sawa T, Allen L, Wiener-Kronish J, Hawgood S: **Surfactant proteins A and D enhance pulmonary clearance of Pseudomonas aeruginosa.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, **34**:704–710.
282. Glasser SW, Senft AP, Whitsett JA, Maxfield MD, Ross GF, Richardson TR, Prows DR, Xu Y, Korfhagen TR: **Macrophage dysfunction and susceptibility to pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection in surfactant protein C-deficient mice.** *J Immunol* 2008, **181**:621–628.
283. Vladimer GI, Marty-Roix R, Ghosh S, Weng D, Lien E: **Inflammasomes and host defenses against bacterial infections.** *Curr Opin Microbiol* 2013, **16**:23–31.
284. Lamkanfi M, Kanneganti T-D, Franchi L, Núñez G: **Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation.** *J Leukoc Biol* 2007, **82**:220–225.
285. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A: **Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria.** *Nat Immunol* 2010, **11**:1136–1142.
286. Drusano GL, VanScoy B, Liu W, Fikes S, Brown D, Louie A: **Saturability of granulocyte kill of Pseudomonas aeruginosa in a murine model of pneumonia.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**:2693–2695.
287. Conway Morris A, Kefala K, Wilkinson TS, Dhaliwal K, Farrell L, Walsh T, Mackenzie SJ, Reid H, Davidson DJ, Haslett C, Rossi AG, Sallenave JM, Simpson AJ: **C5a mediates peripheral blood neutrophil dysfunction in critically ill patients.** *Am J Respir Crit Care Med* 2009, **180**:19–28.
288. Diaz MH, Shaver CM, King JD, Musunuri S, Kazzaz JA, Hauser AR: **Pseudomonas aeruginosa induces localized immunosuppression during pneumonia.** *Infect Immun* 2008, **76**:4414–4421.
289. Dacheux D, Attree I, Schneider C, Toussaint B: **Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system.** *Infect Immun* 1999, **67**:6164–6167.
290. Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere JC, Standiford TJ, Ishiguro M, Yamaguchi K: **The Pseudomonas aeruginosa autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils.** *Infect Immun* 2003, **71**:5785–5793.
291. Griffin GK, Newton G, Tarrío ML, Bu D, Maganto-García E, Azcutia V, Alcaide P, Grabie N, Luscinskas FW, Croce KJ, Lichtman AH: **IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation.** *J Immunol* 2012, **188**:6287–6299.

292. Borregaard N: **Neutrophils, from Marrow to Microbes.** *Immunity* 2010, **33**:657–670.
293. Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, Kelly K, Takuwa Y, Sugimoto N, Mitchison T, Bourne HR: **Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils.** *Cell* 2003, **114**:201–214.
294. El-Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidallo MA: **Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: Role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane.** *Semin Immunopathol* 2008, **30**:279–289.
295. Hurtado-nedelec M, Makni-maalej K, Dang PM: **Chapter 23 Assessment of Priming of the Human Neutrophil Respiratory Burst.** *Methods Mol Biol* 2014, **1124**:405–412.
296. Tsai WC, Strieter RM, Mehrad B, Newstead MW, Zeng X, Standiford TJ: **CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine Pseudomonas aeruginosa pneumonia.** *Infect Immun* 2000, **68**:4289–4296.
297. Kannan S, Audet A, Huang H, Chen L, Wu M: **Cholesterol-rich membrane rafts and Lyn are involved in phagocytosis during Pseudomonas aeruginosa infection.** *J Immunol* 2008, **180**:2396–2408.
298. Kierbel A, Gassama-Diagne A, Mostov K, Engel JN: **The phosphoinositol-3-kinase-protein kinase B/Akt pathway is critical for Pseudomonas aeruginosa strain PAK internalization.** *Mol Biol Cell* 2005, **16**:2577–2585.
299. Weichhart T, Säemann MD: **The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications.** *Ann Rheum Dis* 2008, **67 Suppl 3**:iii70–i74.
300. Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M: **Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via girdin/APE.** *Dev Cell* 2005, **9**:389–402.
301. Lovewell RR, Patankar YR, Berwin B: **Mechanisms of phagocytosis and host clearance of Pseudomonas aeruginosa.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014, **306**:L591–603.
302. Hubbard LLN, Wilke CA, White ES, Moore BB: **PTEN limits alveolar macrophage function against Pseudomonas aeruginosa after bone marrow transplantation.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011, **45**:1050–1058.
303. Wrann CD, Tabriz NA, Barkhausen T, Klos A, van Griensven M, Pape HC, Kendoff DO, Guo R, Ward PA, Krettek C, Riedemann NC: **The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions.** *J Immunol* 2007, **178**:5940–5948.
304. Lacy P: **The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes.** *Pharmacol Ther* 2005, **107**:358–376.

305. Faurischou M, Borregaard N: **Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.** *Microbes Infect* 2003, **5**:1317–1327.
306. Hirche TO, Benabid R, Deslee G, Gangloff S, Achilefu S, Guenounou M, Lebargy F, Hancock RE, Belaouaj A: **Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Immunol* 2008, **181**:4945–4954.
307. Le Gars M, Descamps D, Roussel D, Sausseureau E, Guillot L, Ruffin M, Tabary O, Hong SS, Boulanger P, Paulais M, Malleret L, Belaouaj A, Edelman A, Huerre M, Chignard M, Sallenave JM: **Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo.** *Am J Respir Crit Care Med* 2013, **187**:170–179.
308. Cole AM, Thapa DR, Gabayan V, Liao H-I, Liu L, Ganz T: **Decreased clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from airways of mice deficient in lysozyme M.** *J Leukoc Biol* 2005, **78**:1081–1085.
309. Bhavsar T, Liu M, Hardej D, Liu X, Cantor J: **Aerosolized recombinant human lysozyme ameliorates *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in hamsters.** *Exp Lung Res* 2010, **36**:94–100.
310. Weibert KE, Vanderzwan J, Duggan M, Scott JA, McCormack DG, Lewis JF, Mehta S: **Effects of inhaled nitric oxide in a rat model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia.** *Crit Care Med* 2000, **28**:2397–2405.
311. Satoh S, Oishi K, Iwagaki A, Senba M, Akaike T, Akiyama M, Mukaida N, Atsushima KM, Nagatake T: **Dexamethasone impairs pulmonary defence against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS gene expression and peroxynitrite production in mice.** *Clin Exp Immunol* 2001, **126**:266–273.
312. Zhang Y, Li X, Carpinteiro A, Goettel JA, Soddemann M, Gulbins E: **Kinase suppressor of Ras-1 protects against pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections.** *Nat Med* 2011, **17**:341–346.
313. El-Benna J, Dang PM-C, Gougerot-Pocidallo MA, Marie JC, Braut-Boucher F: **p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases.** *Exp Mol Med* 2009, **41**:217–225.
314. Sadikot RT, Zeng H, Yull FE, Li B, Cheng D, Kernodle DS, Jansen ED, Contag CH, Segal BH, Holland SM, Blackwell TS, Christman JW: **p47phox deficiency impairs NF-kappa B activation and host defense in *Pseudomonas pneumonia*.** *J Immunol* 2004, **172**:1801–1808.
315. Hashimoto S, Pittet JF, Hong K, Folkesson H, Bagby G, Kobzik L, Frevert C, Watanabe K, Tsurufuji S, Wiener-Kronish J: **Depletion of alveolar macrophages decreases neutrophil chemotaxis to *Pseudomonas* airspace infections.** *Am J Physiol* 1996, **270**:819–828.

316. Kooguchi K, Hashimoto S, Kobayashi A, Kitamura Y, Kudoh I, Wiener-Kronish J, Sawa T: **Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia.** *Infect Immun* 1998, **66**:3164–3169.
317. Amano H, Morimoto K, Senba M, Wang H, Ishida Y, Kumatori A, Yoshimine H, Oishi K, Mukaida N, Nagatake T: **Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia.** *J Immunol* 2004, **172**:398–409.
318. Kannan S, Huang H, Seeger D, Audet A, Chen Y, Huang C, Gao H, Li S, Wu M: **Alveolar epithelial type II cells activate alveolar macrophages and mitigate *P. aeruginosa* infection.** *PLoS One* 2009, **4**:e4891.
319. Worgall S, Kikuchi T, Singh R, Martushova K, Lande L, Crystal RG: **Protection against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* following immunization with *P. aeruginosa*-pulsed dendritic cells.** *Infect Immun* 2001, **69**:4521–4527.
320. Peluso L, de Luca C, Bozza S, Leonardi A, Giovannini G, Lavorgna A, De Rosa G, Mascolo M, De Luna LO, Catania MR, Romani L, Rossano F: **Protection against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice by recombinant OprF-pulsed dendritic cell immunization.** *BMC Microbiol* 2010, **10**:9.
321. Nieuwenhuis EES, Matsumoto T, Exley M, Schleipman RA, Glickman J, Bailey DT, Corazza N, Colgan SP, Onderdonk AB, Blumberg RS: **CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung.** *Nat Med* 2002, **8**:588–593.
322. Bruns P: **Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulst.** *Beitr Klin Chir* 1868, **3**:443–446.
323. Baud V, Karin M: **Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**:372–377.
324. Skerrett SJ, Martin TR, Chi EY, Peschon JJ, Mohler KM, Wilson CB: **Role of the type 1 TNF receptor in lung inflammation after inhalation of endotoxin or *Pseudomonas aeruginosa*.** *Am J Physiol* 1999, **276**:715–727.
325. Lee J-H, Del Sorbo L, Khine AA, de Azavedo J, Low DE, Bell D, Uhlig S, Slutsky AS, Zhang H: **Modulation of bacterial growth by tumor necrosis factor-alpha in vitro and in vivo.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **168**:1462–1470.
326. Gosselin D, DeSanctis J, Boulé M, Skamene E, Matouk C, Radzioch D: **Role of tumor necrosis factor alpha in innate resistance to mouse pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*.** *Infect Immun* 1995, **63**:3272–3278.
327. Wangdi T, Mijares LA, Kazmierczak BI: **In vivo discrimination of type 3 secretion system-positive and -negative *Pseudomonas aeruginosa* via a caspase-1-dependent pathway.** *Infect Immun* 2010, **78**:4744–4753.

328. Choi S, Park YS, Koga T, Treloar A, Kim KC: **TNF- α is a key regulator of MUC1, an anti-inflammatory molecule, during airway *Pseudomonas aeruginosa* infection.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011, **44**:255–260.
329. Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F: **IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha.** *J Immunol* 1996, **157**:12–20.
330. Ueno K, Koga T, Kato K, Golenbock DT, Gendler SJ, Kai H, Kim KC: **MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, **38**:263–268.
331. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T: **The paradigm of IL-6: from basic science to medicine.** *Arthritis Res* 2002, **4 Suppl 3**:S233–S242.
332. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L: **Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway.** *Biochem J* 1998, **334**:297–314.
333. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S: **The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6.** *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2011, **1813**:878–888.
334. Dalrymple SA, Lucian LA, Slattery R, McNeil T, Aud DM, Fuchino S, Lee F, Murray R: **Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: Correlation with inefficient neutrophilia.** *Infect Immun* 1995, **63**:2262–2268.
335. Van der Poll T, Keogh C V, Guirao X, Buurman WA, Kopf M, Lowry SF: **Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia.** *J Infect Dis* 1997, **176**:439–444.
336. Van der Meer JW, Helle M, Aarden L: **Comparison of the effects of recombinant interleukin 6 and recombinant interleukin 1 on nonspecific resistance to infection.** *Eur J Immunol* 1989, **19**:413–416.
337. Schultz MJ, Rijneveld AW, Florquin S, Edwards CK, Dinarello CA, van der Poll T: **Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, **282**:L285–L290.
338. Schultz MJ, Knapp S, Florquin S, Pater J, Takeda K, Akira S, Van der Poll T: **Interleukin-18 impairs the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*.** *Infect Immun* 2003, **71**:1630–1634.
339. Reiniger N, Lee MM, Coleman FT, Ray C, Golan DE, Pier GB: **Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection requires cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modulated interleukin-1 (IL-1) release and signaling through the IL-1 receptor.** *Infect Immun* 2007, **75**:1598–1608.

340. Dubin PJ, Kolls JK: **IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, **292**:L519–L528.
341. Wöbeling F, Munder A, Kerber-Momot T, Neumann D, Hennig C, Hansen G, Tümmler B, Baumann U: **Lung function and inflammation during murine *Pseudomonas aeruginosa* airway infection.** *Immunobiology* 2011, **216**:901–908.
342. Sun L, Guo RF, Newstead MW, Standiford TJ, Macariola DR, Shanley TP: **Effect of IL-10 on neutrophil recruitment and survival after *Pseudomonas aeruginosa* challenge.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009, **41**:76–84.
343. Chmiel JF, Konstan MW, Saadane A, Krenicky JE, Lester Kirchner H, Berger M: **Prolonged inflammatory response to acute *pseudomonas* challenge in interleukin-10 knockout mice.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**:1176–1181.
344. Sawa T, Corry DB, Gropper MA, Ohara M, Kurahashi K, Wiener-Kronish JP: **IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia.** *J Immunol* 1997, **159**:2858–2866.
345. Adams DH, Lloyd AR: **Chemokines: Leucocyte recruitment and activation cytokines.** *Lancet* 1997, **349**:490–495.
346. Hol J, Wilhelmsen L, Haraldsen G: **The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies.** *J Leukoc Biol* 2010, **87**:501–508.
347. Casadevall A, Pirofski LA: **Host-pathogen interactions: Basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease.** *Infect Immun* 2000, **68**:6511–6518.
348. Dos Santos G, Kutuzov M a, Ridge KM: **The inflammasome in lung diseases.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012, **303**:627–633.
349. Bhattacharya J, Matthay M a: **Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury.** *Annu Rev Physiol* 2013, **75**:593–615.
350. SANFORD KK, EARLE WR, LIKELY GD: **The growth in vitro of single isolated tissue cells.** *J Natl Cancer Inst* 1948, **9**:229–246.
351. Earle WR, Schilling EL, Stark TH, Straus NP, Brown MF, Sbelton E: **Production of Malignancy in Vitro. IV. The Mouse Fibroblast Cultures and Changes Seen in the Living Cells.** *J Nat Cancer Inst* 1943, **4**:165–212.
352. Hamilton MA, Russo RC, Thurston R V.: **Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays.** *Environmental Science and Technology* 1977, **11**:714–719.

353. Firquet S, Beaujard S, Lobert P-E, Sané F, Caloone D, Izard D, Hober D: **Viruses Contained in Droplets Applied on Warmed Surface Are Rapidly Inactivated.** *Microbes Environ* 2014, **29**:408–412.
354. Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA: **Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay.** *Biotechniques* 2003, **34**:260–264.
355. Toussaint B, Delic-Attree I, Vignais PM: **Pseudomonas aeruginosa contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **196**:416–421.
356. Celada A, Gray PW, Rinderknecht E, Schreiber RD: **Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity.** *J Exp Med* 1984, **160**:55–74.
357. Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K: **Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses.** *J Virol Methods* 2010, **169**:269–273.
358. Boutoille D, Marechal X, Pichenot M, Chemani C, Guery B, Faure K: **FITC-albumin as a marker for assessment of endothelial permeability in mice: comparison with 125I-albumin.** *Exp Lung Res* 2009, **35**:263–271.
359. Yanagiya T, Tanabe A, Iida A, Saito S, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Kamohara S, Nakata Y, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Masuzaki H, Yoneda M, Nakajima A, Miyazaki S, Tokunaga K, Kawamoto M, Funahashi T, Hamaguchi K, Tanaka K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Yoshimatsu H, Nakao K, Sakata T, Matsuzawa Y, et al.: **Association of single-nucleotide polymorphisms in MTMR9 gene with obesity.** *Hum Mol Genet* 2007, **16**:3017–3026.
360. Kuipers H, Heirman C, Hijdra D, Muskens F, Willart M, van Meirvenne S, Thielemans K, Hoogsteden HC, Lambrecht BN: **Dendritic cells retrovirally overexpressing IL-12 induce strong Th1 responses to inhaled antigen in the lung but fail to revert established Th2 sensitization.** *J Leukoc Biol* 2004, **76**:1028–1038.
361. Zhang M, Qian J, Xing X, Kong F-M, Zhao L, Chen M, Lawrence TS: **Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha pathway is radioprotective for the lung.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**:1868–1876.
362. Jones TB, Basso DM, Sodhi A, Pan JZ, Hart RP, MacCallum RC, Lee S, Whitacre CC, Popovich PG: **Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy.** *J Neurosci* 2002, **22**:2690–2700.
363. Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, Normand S, De Arcangelis A, Haesler R, Huot L, Grandjean T, Bressenot A, Delanoye-Crespin A, Gaillot O, Schreiber S, Lemoine Y, Ryffel B, Hot D, Núñez G, Chen G, Rosenstiel P, Chamaillard M: **NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer.** *J Clin Invest* 2013, **123**:700–711.

364. Rasschaert J, Ladrière L, Urbain M, Dogusan Z, Katabua B, Sato S, Akira S, Gysemans C, Mathieu C, Eizirik DL: **Toll-like receptor 3 and STAT-1 contribute to double-stranded RNA+ interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells.** *J Biol Chem* 2005, **280**:33984–33991.
365. Hu L, Dixit VD, de Mello-Coelho V, Taub DD: **Age-associated alterations in CXCL1 chemokine expression by murine B cells.** *BMC Immunol* 2004, **5**:15.
366. Lee S, Kim JH, Kim JH, Seo JW, Han HS, Lee WH, Mori K, Nakao K, Barasch J, Suk K: **Lipocalin-2 is a chemokine inducer in the central nervous system: Role of chemokine ligand 10 (CXCL10) in lipocalin-2-induced cell migration.** *J Biol Chem* 2011, **286**:43855–43870.
367. He X, Yan J, Zhu X, Wang Q, Pang W, Qi Z, Wang M, Luo E, Parker DM, Cantorna MT, Cui L, Cao Y: **Vitamin D Inhibits the Occurrence of Experimental Cerebral Malaria in Mice by Suppressing the Host Inflammatory Response.** *J Immunol* 2014, **193**:1314–1323.
368. Debes GF, Dahl ME, Mahiny AJ, Bonhagen K, Campbell DJ, Siegmund K, Erb KJ, Lewis DB, Kamradt T, Hamann A: **Chemotactic responses of IL-4-, IL-10-, and IFN-gamma-producing CD4+ T cells depend on tissue origin and microbial stimulus.** *J Immunol* 2006, **176**:557–566.
369. Ammann CG, Messer RJ, Varvel K, Debuysscher BL, Lacasse RA, Pinto AK, Hasenkrug KJ: **Effects of acute and chronic murine norovirus infections on immune responses and recovery from Friend retrovirus infection.** *J Virol* 2009, **83**:13037–13041.
370. Guillemot L, Medina M, Pernet E, Leduc D, Chignard M, Touqui L, Wu Y: **Cytosolic phospholipase A2 α enhances mouse mortality induced by Pseudomonas aeruginosa pulmonary infection via interleukin 6.** *Biochimie* 2014, **107**:95–104.
371. Mear JB, Gosset P, Kipnis E, Faure E, Desein R, Jawhara S, Fradin C, Faure K, Poulain D, Sendid B, Guery B: **Candida albicans airway exposure primes the lung innate immune response against Pseudomonas aeruginosa infection through innate lymphoid cell recruitment and interleukin-22-associated mucosal response.** *Infect Immun* 2014, **82**:306–315.
372. Sawa T: **The molecular mechanism of acute lung injury caused by Pseudomonas aeruginosa : from bacterial pathogenesis to host response.** *J Intensive Care* 2014, **2**:1–11.
373. Ader F, Le Berre R, Faure K, Gosset P, Epaulard O, Toussaint B, Polack B, Nowak E, Viget NB, Kipnis E, Guery BP: **Alveolar response to Pseudomonas aeruginosa: Role of the type III secretion system.** *Infect Immun* 2005, **73**:4263–4271.
374. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC: **Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin.** *Science* 1985, **229**:869–871.
375. Nelson AM, Elftman MD, Pinto AK, Baldrige M, Hooper P, Kuczynski J, Petrosino JF, Young VB, Wobus CE: **Murine norovirus infection does not cause major disruptions in the murine intestinal microbiota.** *Microbiome* 2013, **1**:7.

376. Nelson AM, Walk ST, Taube S, Taniuchi M, Houpt ER, Wobus CE, Young VB: **Disruption of the human gut microbiota following Norovirus infection.** *PLoS One* 2012, **7**:e48224.
377. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI: **The Human Microbiome Project.** *Nature* 2007, **449**:804–810.
378. O'Mahony C, Scully P, O'Mahony D, Murphy S, O'Brien F, Lyons A, Sherlock G, MacSharry J, Kiely B, Shanahan F, O'Mahony L: **Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kB activation.** *PLoS Pathog* 2008, **4**:e1000112.
379. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K: **Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species.** *Science* 2011, **331**:337–341.
380. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch S V., Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR: **Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria.** *Cell* 2009, **139**:485–498.
381. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lécuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, Rochet V, Pisi A, De Paepe M, Brandi G, Eberl G, Snel J, Kelly D, Cerf-Bensussan N: **The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses.** *Immunity* 2009, **31**:677–689.
382. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, Blugeon S, Bridonneau C, Furet J-P, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré J, Marteau P, Seksik P, Langella P: **Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:16731–16736.
383. Fagundes CT, Amaral F a, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Teixeira MM, Souza DG: **Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice.** *J Immunol* 2012, **188**:1411–1420.
384. Inagaki H, Suzuki T, Nomoto K, Yoshikai Y: **Increased susceptibility to primary infection with Listeria monocytogenes in germfree mice may be due to lack of accumulation of L-selectin+ CD44+ T cells in sites of inflammation.** *Infect Immun* 1996, **64**:3280–3287.
385. Ivanov II, Frutos R de L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay BB, Littman DR: **Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine.** *Cell Host Microbe* 2008, **4**:337–349.
386. Clarke TB: **Early innate immunity to bacterial infection in the lung is regulated systemically by the commensal microbiota via NLR ligands.** *Infect Immun* 2014, **82**:4596–4606.

