

# Pneumopathies bactériennes secondaires aux infections respiratoires virales: de l'étude expérimentale in vitro à l'analyse descriptive des données hospitalières en passant par l'étude prospective d'une cohorte de patients

Marion Jeannoël

# ▶ To cite this version:

Marion Jeannoël. Pneumopathies bactériennes secondaires aux infections respiratoires virales : de l'étude expérimentale in vitro à l'analyse descriptive des données hospitalières en passant par l'étude prospective d'une cohorte de patients. Virologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1039 . tel-02150592

# HAL Id: tel-02150592 https://theses.hal.science/tel-02150592

Submitted on 7 Jun2019

**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.



N°d'ordre NNT : 2019LYSE1039

# THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de l'Université Claude Bernard Lyon 1

# Ecole Doctorale N° 341 (Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation)

**Spécialité de doctorat** : Micro-organismes, interactions, infections

Soutenue publiquement le 15/03/2019, par : Marion Jeannoël

Pneumopathies bactériennes secondaires aux respiratoires virales infections de l'étude expérimentale in vitro à l'analyse descriptive des données hospitalières en passant par l'étude prospective d'une cohorte de patients

Devant le jury composé de :

Dr BOISSET Sandrine Pr COMBADIERE Behazine Pr ADER Florence Dr HRAIECH Sami Pr LINA Bruno Dr OTTMANN Michèle Dr CASALEGNO Jean-Sébastien

MCU-PH Université Grenoble Alpes DR INSERM Université de la Sorbonne Rapporteure PU-PH Université Lyon 1 MCU-PH Université d'Aix-Marseille PU-PH Université Lyon 1 MCU Université Lyon 1 MCU-PH Université Lyon 1

Rapporteure Examinatrice Examinateur Examinateur Directrice de thèse Co-directeur de thèse

# **UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1**

# Président de l'UniversitéM. le Professeur Frédéric FLEURYPrésident du Conseil AcadémiqueM. le Professeur Hamda BEN HADIDVice-président du Conseil d'AdministrationM. le Professeur Didier REVELVice-président du Conseil Formation et Vie UniversitaireM. le Professeur Philippe CHEVALIERVice-président de la Commission RechercheM. Fabrice VALLÉEDirecteur Général des ServicesM. Alain HELLEU

# **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Faculté d'Odontologie	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie	
Humaine	

# COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

#### RESUME

Le virus influenza peut être responsable d'infections respiratoires sévères. Les pneumonies bactériennes post-influenza font partie des complications les plus graves et *S. aureus* est l'une des bactéries les plus fréquemment retrouvée dans ce contexte. L'efficacité des traitements dans ces infections graves est modérée ce qui souligne l'importance de progresser dans la compréhension de la physiopathologie de ces infections graves. Une réponse immunitaire inadéquate (soit excessive, soit trop faible) à l'infection pulmonaire joue un rôle considérable dans la gravité du tableau clinique et le pronostic du patient.

Nous avons montré que le virus influenza potentialise l'inflammation et la cytotoxicité engendrée par des facteurs de virulence de *S. aureus* dans des monocytes isolés de témoins sains. Cependant l'étude du système immunitaire de patients hospitalisés pour grippe grave, a montré qu'au lieu d'être dans un état d'activation massive, il était en phase d'anergie et possédait une altération de la réponse immunitaire fonctionnelle en cas d'exposition à des facteurs de virulence de *S. aureus*. L'immunomonitoring de ces patients au pronostic sévère, qui permet la détermination de l'état proou anti-inflammatoire dans lequel se trouve le patient pourrait participer à l'amélioration de la prise en charge de ces patients en permettant l'utilisation de traitements immunomodulateurs adaptés à la situation clinique de chaque patient.

Cette problématique peut être étendue à d'autres co-infections virus/bactérie et notamment au VRS. Nous avons étudié l'épidémiologie des co-infections VRS/bactérie chez l'adulte dans le contexte d'une pneumonie et nous avons observé qu'elle était similaire à celle des co-infections influenza/bactérie. Cette connaissance de l'épidémiologie est importante afin d'adapter la prise en charge des patients.

Mots clés : influenza, Staphylococcus aureus, co-infection, pneumonie

Laboratoire :

CIRI UCBL1 ENS INSERM U1111 CNRS Equipe Virologie et Pathologie Humaine Faculté de médecine Laennec 7-11 rue Guillaume Paradin 69008 Lyon

## ABSTRACT

Post-influenza bacterial pneumonia is a leading cause of morbidity and mortality with severe influenza virus illness. *Staphylococcus aureus* is one of the most common pathogen found in this context. The severity of post-influenza *Staphylococcus aureus* pneumonia is due both to an inadequate responsiveness of the immune system (either too important or too weak) and to the weak efficacy of treatments used during these severe infections. A better knowledge of the pathophysiology of influenza/*S. aureus* co-infection is needed in order to improve patients care.

In this study, we showed using *in vitro* experiments that influenza virus increased the inflammation and cytotoxicity induced by *S. aureus* virulence factors in human monocytes. However *ex vivo* experiments performed on leucocytes isolated from hospitalized patients with severe influenza showed an anergy of the immune system after exposition to *S. aureus* virulence factors. Immunomonitoring of patients with severe post-influenza *Staphylococcus aureus* pneumonia may allow to optimize the therapeutic regimen towards a more individualized immunomodulatory therapy. This can be extended to other viral/bacterial co-infections including RSV. We studied the epidemiology of bacterial superinfections associated with RSV pneumonia in adults. Our results suggested that there was no main differences between the microbiological epidemiology of RSV/bacterial coinfections and influenza/bacterial co-infections. Knowledge of this epidemiology is important to assess to improve patients care.

Key words : influenza, Staphylococcus aureus, co-infection, pneumonia

# **REMERCIEMENTS**

Tout d'abord, je tiens sincèrement à remercier les **Docteurs Sandrine Boisset** et **Béhazine Combadière** pour avoir accepté de lire et de juger ce travail. Mes remerciements vont également au **Professeur Florence Ader** et au **Docteur Sami Hraiech** pour la participation à ce jury de thèse.

Un grand merci au **Docteur Michèle Ottmann** pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse. Merci pour ton aide tout au long de la thèse. Travailler à tes côtés m'a été extrêmement bénéfique, notamment sur le plan scientifique.

A mon co-directeur de thèse, le **Docteur Jean-Sébastien Casalegno**. Merci de m'avoir confié ce projet qui alliait recherche fondamentale et recherche appliquée, ce qui convenait parfaitement à mon statut de bi-appartenant. Je te remercie également d'avoir pris le temps de m'aider lorsque les dead-lines se rapprochaient dangereusement.

#### Au Professeur Bruno Lina,

Je vous remercie de m'avoir accueillie à la fois dans votre service et dans votre unité de recherche. Merci de m'avoir donnée l'opportunité de me plonger dans l'univers de la recherche.

Je remercie également les **Docteurs Sami Hraiech, Fabienne Venet, Anne Vianney et Cyrille Mathieu** pour avoir suivi l'évolution de mon travail au sein de mon comité de suivi de thèse. Vos remarques ont permis de faire avancer ce travail et d'enrichir la discussion.

\*\*\*\*\*

Je tiens également à témoigner ma plus grande reconnaissance à toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce travail :

A tout le personnel du laboratoire laboratoire Virpath, biologistes et techniciennes, je vous remercie pour vos conseils lors de nos discussions ainsi que pour votre aide technique.

Au Professeur Guillaume Monneret, au Docteur Fabienne Venet et aux techniciens du laboratoire d'immunologie, la collaboration entre nos deux laboratoires a permis de réaliser une partie des travaux de cette thèse. Votre rigueur scientifique et votre aide dans l'interprétation des données obtenues m'ont été précieuses.

Merci au Professeur Gérard Lina d'avoir suivi et apporté votre expertise à mes travaux.

Merci à Cédric Badiou pour ta patience et tes explications concernant le fonctionnement du cytomètre.

\*\*\*\*\*

# **TABLE DES MATIERES**

Résun	ne	
Abstra	act	5
Reme	erciements	6
Table	des matières	
Table	des illustrations	
Liste d	des tableaux	
Liste d	des abréviations	
Introc	duction	
Objec	tifs	
Partie	e bibliographique	19
1	Le virus influenza	19
1.1	Classification	19
1.2	Structure de la particule virale	20
1.3	Facteurs de virulence du virus influenza	
1.3.1	Hémagglutinine	21
1.3.2	Neuraminidase	
1.3.3	PB1-F2	25
1.3.4	NS1	26
1.3.5	PA-X	
1.4	Cycle de réplication virale	
1.5	Mécanismes de variations antigéniques des virus influenza	
1.5.1	La dérive antigénique	
1.5.2	La cassure antigénique	
1.6	Epidémiologie des infections saisonnières	
1.7	Epidémiologie des pandémies grippales	
1.8	Physiopathologie et clinique de l'infection grippale simple	
2	La réponse immunitaire à l'infection grippale	
2.1	Immunité innée	
2.1.1	Les monocytes et macrophages	
2.1.2	Les polynucléaires neutrophiles	40
2.1.3	Les cellules NK	
2.1.4	Les cellules T <i>natural killer</i> (NKT)	

2.1.5	Les cellules dendritiques	42
2.2	Immunité adaptative	43
2.2.1	Immunité humorale	43
2.2.2	Immunité cellulaire	45
3	Complications respiratoires de l'infection par le virus influenza	47
3.1	Pneumonie virale et syndrome de détresse respiratoire aigu	47
3.1.1	Epidémiologie et définitions	47
3.1.2	Physiopathologie de la pneumonie virale et de l'apparition d'un SDRA	48
3.2	Pneumonies bactériennes post-influenza	52
3.2.1	Epidémiologie	52
3.2.2	Physiopathologie de la pneumonie bactérienne post-influenza	52
3.3	Exemple des co-infections influenza/S. aureus	55
3.3.1	Epidémiologie des co-infections influenza/S. aureus	55
3.3.2	Staphylococcus aureus	56
3.3.3	Infection pulmonaire à Staphylococcus aureus	57
3.3.4	Facteurs de virulence de Staphylococcus aureus impliqués dans les infections pulmonaires	57
3.3.5	La pneumonie nécrosante	65
4	Infections à VRS chez l'adulte	67
4.1	Caractéristiques du VRS	67
4.2	Epidémiologie de l'infection à VRS	67
4.3	Physiopathologie de l'infection à VRS	68
4.4	Clinique de l'infection à VRS	68
4.5	Traitement de l'infection à VRS	69
Partie	expérimentale	71
A) Etu	de <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i> de l'activation pro-inflammatoire des cellules myéloïdes	71
, B) Etu	de dans une cohorte de patients	87
1	Introduction	87
2	Matériels et méthodes	88
2	Population átudiáe	00
2.1		00
2.2	The formation of the second seco	90
2.2.1	Etude ancillaire	90
2.2.2		92
2.2.3	Pácultate	99
5		99
3.1.1	Population incluse	99
3.2	Resultats de l'étude anclilaire	101

3.2.1	Dosage du mHLA-DR à l'admission et statut SDRA	. 101
3.2.2	Autres marqueurs d'immunodépression et statut SDRA	. 103
3.3	Résultats de l'étude fonctionnelle nichée	105
3.3.1	Profil d'activation des PBMC et PNN	. 105
3.3.2	Maturité des PNN	. 106
3.3.3	Capacité de migration des monocytes et PNN	. 107
3.3.4	Capacité de phagocytose des monocytes et PNN	. 108
3.4 aureus	Etude de la réponse des PNN et PBMC à une exposition aux facteurs de virulence de <i>S.</i> 110	
4 D	viscussion et perspectives	111
C) Epidér	miologie des co-infections VRS/bactéries dans les pneumopathies chez l'adulte	116
Conclusio	ons et perspectives	122
Bibliogra	phie	126

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation schématique du virus Influenza A ou B, adapté de Kramer et al (18)	. 21
Figure 2 : Représentation cristallographique de la HAO. Adapté de Galloway et al (20)	. 22
Figure 3 : Réarrangements structurels associés au clivage de la HA par des protéases cellulaires.	
Adapté de Bertram (19)	. 22
Figure 4 : Les différentes fonctions de PB1-F2, adapté de Hsu (58).	. 25
Figure 5 : Cycle de réplication du virus influenza, adapté de Medina et al, 2011 (70)	. 28
Figure 6 : Mécanismes d'évolution du virus influenza, d'après Van de Sandt (84)	. 29
Figure 7 : Evolution du taux d'incidence hebdomadaire des cas de syndromes grippaux vus en	
consultation de médecine générale lors de la campagne de surveillance de la grippe 2017/2018.	
D'après les données du réseau sentinelle (87).	. 31
Figure 8 : Détection du virus influenza par les PRR, d'après Pulendran (111)	. 35
Figure 9 : Réponse immunitaire innée à l'infection par le virus influenza, adapté de Cole (122)	. 37
Figure 10 : Réponse immunitaire durant les infections primaires et secondaires par le virus influen	za,
adapté de Petrova (184)	. 45
Figure 11 : Réponse immunitaire humorale et cellulaire à l'infection grippale. D'après Van de sand	t et
al (84)	. 47
Figure 12 : Rôle des cellules épithéliales et endothéliales alvéolaires dans l'apparition du SDRA lors	5
d'une infection grippale, adapté de Short (1).	. 50
Figure 13 : Rôle des PNN et macrophages dans la physiopathologie du SDRA lors d'une infection	
grippale, d'après Short (1)	. 50
Figure 14 : Physiopathologie du SDRA grippal, d'après Short (1)	. 51
Figure 15 : Interactions entre le virus influenza, la bactérie et l'hôte lors des co-infections, d'après	
McCullers (224).	. 53
Figure 16 : Mécanismes d'action des PFT de S. aureus pour la formation de pores membranaires,	
d'après Dumont (266)	. 59
Figure 17 : Propriétés des PFT à concentration sublytique. D'après Alonzo (269)	. 60
Figure 18 : Activités du complexe Hla/ADAM 10 au niveau des cavéoles, d'après Wilke (273)	. 61
Figure 19: Représentation des fonctions biologiques des PSM, d'après Peschel et Otto (288)	. 63
Figure 20 : Physiopathologie de la pneumonie nécrosante, d'après Löffler (302).	. 66
Figure 21 : Structure du VRS, d'après Jha (309)	. 67
Figure 22 : Flow chart de l'étude ancillaire et de l'étude nichée fonctionnelle	. 90
Figure 23 : Fenêtrage des PBMC et PNN.	. 93
Figure 24 : Principe du Migratest	. 94
Figure 25 : Choix des différentes fenêtres de cytométrie pour le test Migratest	. 95
Figure 26 : Mesure de l'expression de la L-sélectine	. 95
Figure 27 : Stratégie de sélection des leucocytes	. 96
Figure 28 : Exemple de la quantification des PNN ayant phagocyté des bactéries et quantification c	du
nombre de bactéries phagocytées par PNN	. 97
Figure 29 : Répartition des différentes fractions cellulaires après réalisation d'un Ficoll sur sang tot	tal,
d'après la procédure du CNR des Staphylocoques.	. 98
Figure 30 : Expression du mHLA-DR en fonction du statut SDRA.	102

Figure 31 : Expression du mHLA-DR chez 37 patients admis en réanimation pour grippe avec ou sans
SDRA
Figure 32 : Cinétique des marqueurs biologiques d'immunodépression chez les patients de l'étude
ancillaire en fonction de la présence d'un SDRA ou non104
Figure 33 : Profil d'activation des PBMC et PNN des patients de réanimation et des témoins sains. 106
Figure 34 : maturité des PNN 107
Figure 35 : Capacité de migration des monocytes et PNN des patients de réanimation et des témoins
sains
Figure 36 : Capacité de phagocytose des PNN et monocytes des patients de réanimation et des
témoins sains
Figure 37 : Cytotoxicité des facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> sur les PNN et PBMC des témoins EFS
et des patients de réanimation 110
Figure 38 : Expression du CD11b par les PNN des témoins de l'EFS et des patients de réanimation
après exposition aux facteurs de virulence de S. aureus

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principales caractéristiques des pandémies de grippe du XXème et XXIème siècle. D'après
Saunders-Hastings (98)
Tableau 2 : Principales cytokines et chimiokines produites lors de l'infection par le virus influenza et
leurs fonctions, d'après La Gruta (119) 37
Tableau 3: Description des patients inclus dans l'étude ancillaire et dans l'étude fonctionnelle 100

# LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide aminé
ADAM 10 : A desintegrin and metalloprotease 10
ADCC : cytotoxicité dépendante des anticorps
AP-1 : protéine activatrice 1
ARN : Acide ribonucléqiue
AS : acide sialique
BAFF : B cell-activating factor
CA-MRSA : Staphylococcus aureus communautaire résistant à la méthicilline
CCL : Chemokine ligand
CCR : Récepteur de chemokine CC
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
CXCR : Récepteur de chemokine CXC
E. coli : Escherichia coli
HA : Hémagglutinine
HKSA : heat killed Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus inactivé par la chaleur
Hla : Hémolysine α
HLA : Human leukocyte antigen
IFN : Interféron
lg : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IRF : Interferon-regulatory factor
IP : lodure de propidium
ISG : Interferon stimulated gene
LBA : Lavage broncho-alvéolaire

Lymphocyte Th : Lymphocyte T helper

Lymphocyte Trég : Lymphocytes T régulateurs

- MAPK : Mitogen-activated protein kinase
- MCP : Monocyte chimoattractant protein
- MSCRAMM : Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
- NA : Neuraminidase
- NET : Neutrophil extracellular trap
- NF-кВ : Nuclear factor-kappa B
- NK : Natural killer
- NKT : Lymphocytes T natural killer
- NLR : NOD-like receptor
- NOD : Nucleotide oligomerization domain
- NP : Nucléoprotéine
- NS1 : Protéine non-structurale 1
- OMS : Organisation mondiale de la santé
- PAMPs : Pathogen-associated molecular paterns
- PFT : Pore-forming toxin, toxine formant des pores
- PNN : Polynucléaires neutrophiles
- PRR : Pattern Recognition Receptor
- PSM : Phénol-soluble modulines
- PVL : Leucocidine de Panton-Valentine
- RBS : Receptor binding site, site de liaison au récepteur
- RIG-I : Retinoic acid inducible protein 1
- RNPv : Ribonucléoprotéine virale
- SA : Staphylococcus aureus
- S. aureus : Staphylococcus aureus
- SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline

- SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aigu
- SEAP : Phosphatase alkaline embryonaire sécrétée
- SVF : Sérum de veau fœtal
- TCR : Récepteur des cellules T
- TLR : Toll-like receptor
- TNF : Tumor necrosis factor
- TNFR1 : Récepteur 1 du TNF
- VRS : Virus respiratoire syncytial

## **INTRODUCTION**

Chaque année, d'après l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'épidémie de grippe entraine 3 à 5 millions de cas graves et 250 000 à 500 000 décès dans le monde. Le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) est une des complications les plus sévères de l'infection par le virus influenza (1). Ainsi en France, 1072 cas admis en réanimation ont été déclarés à Santé Publique France lors de la saison 2015-2016. Parmi ces cas, 62% présentaient un SDRA et 16% sont décédés. Ce syndrome résulte d'une atteinte respiratoire basse où les lésions des cellules épithéliales et endothéliales provoquent une rupture de la barrière alvéolo-capillaire, un remplissage des alvéoles pulmonaires et une perturbation des échanges gazeux (2). Dans le cas des SDRA grippaux, la destruction des alvéoles pulmonaires peut être soit directement liée à une réplication du virus (pneumonie virale) soit liée à une surinfection bactérienne pulmonaire. Les deux bactéries les plus fréquemment retrouvées lors de surinfection post-influenza sont *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (3).

A l'heure actuelle, les thérapeutiques spécifiques (antiviraux et antibiotiques) associées à l'assistance respiratoire ont une efficacité somme toute modérée avec une létalité allant jusqu'à 45 % pour les SDRA les plus graves (4). Ce constat souligne la nécessité de progresser dans la compréhension de la physiopathologie de ces SDRA grippaux. Il est maintenant bien décrit qu'une réponse inadéquate (soit excessive, soit trop faible) de la réaction innée et adaptative du système immunitaire à l'infection pulmonaire joue un rôle considérable dans la gravité du tableau clinique et le pronostic du patient (5–10). La réaction inflammatoire de l'hôte, bien que primordiale dans la lutte contre le pathogène, peut être délétère en cas d'activation excessive au premier jour de l'infection. Ce phénomène est notamment observé lors des co-infections lorsque la synergie des facteurs de virulence viraux et bactériens accentue le versant pro-inflammatoire de la réponse immunitaire. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires entraine un recrutement excessif de polynucléaires neutrophiles (PNN) et monocytes au niveau pulmonaire qui aggrave les lésions pulmonaires (5–8). Inversement, dans les jours qui suivent l'infection virale une anergie de la réponse immunitaire favorise la surinfection secondaire ou diminue la clairance de l'infection pulmonaire (9,10).

Une meilleure compréhension de cette réponse immunitaire, locale et générale, dans l'apparition et l'évolution des formes de grippes graves est donc nécessaire. L'immuno-monitoring, concept validé dans d'autres pathologies telles que le sepsis, des patients présentant des signes de gravité pourrait permettre de différencier les patients en fonction de leur réponse immunitaire et d'améliorer ainsi leur prise en charge par l'utilisation de traitements immunomodulateurs adaptés (11).

Cette problématique ne se limite probablement pas à la seule pneumonie post-grippale et pourrait être étendue à d'autres infections respiratoires virales aigües. Très récemment, l'attention s'est portée sur le virus respiratoire syncytial (VRS) qui est apparu comme une cause majeure de pneumonies dans la population adulte et notamment âgée (12,13). Il s'agit là d'un nouveau champ d'investigation susceptible de bénéficier de la connaissance des mécanismes impliqués dans la pneumonie post-influenza.

# **OBJECTIFS**

Les objectifs de ce travail sont :

- Améliorer notre compréhension de la physiopathologie des co-infections grippe/Staphylococcus aureus. Pour cela nous avons étudié in vitro l'effet d'une coexposition de différentes lignées monocytaires au virus influenza et à des toxines de S. aureus sur l'inflammation et la cytotoxicité.
- 2) Valider les résultats observés et décrire l'état (anergique ou activé) des cellules immunitaires circulantes, sur une cohorte de patients hospitalisés en réanimation ou en soins continus pour infection respiratoire par le virus influenza.
- 3) Fournir une première description de la microbiologie aux Hospices Civils de Lyon des infections bactériennes chez l'adulte associées en clinique aux pneumonies lors d'une coinfection avec le VRS et la comparer aux pneumonies lors d'une co-infection avec le virus influenza. Il s'agit de déterminer s'il n'existerait pas certaines similarités entre l'épidémiologie de pneumonies bactériennes post-VRS et post-grippales.

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

Dans le cadre de ces objectifs, nous avons dans une première partie bibliographique décrit ces agents infectieux (virus influenza, *S. aureus* et VRS) ainsi que leur interaction avec le système immunitaire dans le cadre des infections pulmonaires.

## 1 Le virus influenza

#### 1.1 Classification

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*, famille de virus enveloppés à ARN simple brin de polarité négative. Ils sont divisés en quatre genres qui contiennent chacun une espèce virale (Alphainfluenzavirus qui contient le virus influenza A, Betainfluenzavirus qui contient le virus influenza B, Deltainfluenzavirus qui contient le virus influenza D et Gammainfluenzavirus qui contient le virus influenza de tréalisée en fonction de leurs protéines de matrice, de leurs glycoprotéines de surface et de la taille de leur génome.

Afin de différencier les souches entre elles, l'OMS a établi une nomenclature officielle composée par : le type du virus, l'hôte d'origine (excepté pour les souches humaines), le lieu où la souche a été isolée, le numéro de la souche, l'année où la souche a été isolée. Le sous-type peut être mentionné entre parenthèses. Par exemple la souche de virus influenza A H1N1 présente dans le vaccin pour l'hiver 2018-2019 est la souche A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09.

Les quatre types de virus n'ont pas le même potentiel pathogène chez l'Homme. Les seuls virus qui possèdent un intérêt clinique chez l'Homme sont les virus influenza A et B. Les virus de type C sont seulement responsables d'infections asymptomatiques (14) et la pathogénicité des virus de type D n'a pas été démontrée (15).

Les virus influenza de type A ont pour réservoir les oiseaux sauvages aquatiques (16). Leur transmission et leur adaptation à l'Homme a donné lieu à plusieurs pandémies au cours de l'histoire (par exemple la pandémie de grippe A(H1N1) espagnole en 1918 ou la pandémie de grippe porcine A(H1N1)pdm09 de 2009) suivie d'une circulation saisonnière de ces virus (actuellement 2 sous-types de A circulent: A(H1N1) et A(H3N2)). La classification des virus influenza A en plusieurs sous-types se fait grâce à leurs glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Actuellement 18 HA et 11 NA ont été décrites, la plupart chez les oiseaux sauvages, mais seules les deux combinaisons H1N1 et

H3N2 sont responsables d'épidémies saisonnières chez l'Homme dont la forme clinique varie d'une infection banale à une infection sévère potentiellement mortelle.

Les virus de type B infectent uniquement l'Homme. Depuis les années 1970 deux lignages co-circulent (B/Victoria et B/Yamagata). Ils sont responsables de tableaux cliniques moins sévères que ceux provoqués par les souches influenza A (17).

#### 1.2 Structure de la particule virale

L'enveloppe virale est formée lors du bourgeonnement viral. Elle est composée d'éléments issus de la cellule hôte (double couche lipidique riche en phospholipides résistants aux détergents et en cholestérol) et de protéines virales (HA, NA et canal à protons M2) (Figure 1). A l'intérieur de cette enveloppe se trouve le génome viral qui est composé de huit segments d'acide ribonucléique (ARN) pour les virus de type A et B et de sept segments pour les virus influenza de type C. Le génome viral code 11 protéines : l'hémagglutinine (HA), la neuraminidase (NA), la nucléoprotéine (NP), les deux protéines de la matrice (M1, M2), les deux protéines non structurales (NS1, NEP), les trois protéines du complexe réplicase/transcriptase (PB1, PB2, PA) et la protéine PB1-F2 produite à partir du gène PB1. L'association des différents segments d'ARN viraux avec les nucléoprotéines et les protéines du complexe réplicase/transcriptase forme les complexes ribonucléoprotéiques (vRNP).



Figure 1 : Représentation schématique du virus Influenza A ou B, adapté de Kramer et al (18).

Le virus influenza A possède 8 segments d'ARN de polarité négative. 11 protéines sont codées par ces ARN : les trois sousunités de l'ARN-polymérase ARN-dépendante (PB1, PB2, et PA), les deux glycoprotéines d'enveloppe (HA et NA), la nucléoprotéine NP, les protéines de matrice (M1 et M2), la protéine non structurale NS1 et la protéine d'export nucléaire NEP. Le virus peut aussi coder des protéines additionnelles : PB1-F2 et PA-X qui sont présentes dans les cellules infectées mais pas dans les particules virales ou à très faible concentration.

#### 1.3 Facteurs de virulence du virus influenza

#### 1.3.1 Hémagglutinine

L'hémagglutinine est la principale glycoprotéine de surface du virus influenza (elle représente environ 75% des protéines de surface du virus). C'est une protéine de type IC qui est homotrimérique. Chaque monomère est synthétisé sous forme d'un précurseur polypeptidique inactif (HAO) (Figure 2) : les virus ayant des HA non clivées ne sont pas infectieux. Pour être biologiquement actifs, ces monomères doivent être clivés par des sérines-protéases cellulaires entrainant la formation de deux sous-unités HA1 et HA2 liées entre elles par un pont disulfure (Figure 3). La tête globulaire HA1 possède le site de liaison au récepteur (*Receptor Binding Site*, RBS) et les sites antigéniques. La queue HA2 est impliquée dans la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire (19).



**Figure 2 : Représentation cristallographique de la HAO. Adapté de Galloway et al (20).** Le domaine HA1 (en bleu) comprend les sites de liaison à l'acide sialique et les sites antigéniques. Le domaine HA2 (en rouge) possède le peptide de fusion (en jaune).



**Figure 3 : Réarrangements structurels associés au clivage de la HA par des protéases cellulaires. Adapté de Bertram (19).** Le précurseur HAO est clivé en deux sous-unités HA1 et HA2 par des protéases cellulaires. Les deux sous-unités sont liées de façon covalente par un pont disulfure.

La séquence du site de clivage définit par quelles protéases cellulaires le précurseur HAO peut être clivé en HA1 et HA2 et détermine ainsi le tropisme et la virulence. Les virus humains et les virus aviaires peu pathogènes (*low pathogens*) ont un site de clivage monobasique constitué par une séquence consensus qui contient une arginine ou une lysine, clivé par des protéases *trypsin-like* présentes seulement dans le tractus respiratoire haut des humains et dans le tractus intestinal des oiseaux, ce qui limite la réplication du virus à ces tissus (19,21). Chez les virus aviaires H5 et H7 *low pathogens*, la substitution au niveau de la séquence consensus du site de clivage de HAO (R-E/K-T/K-R) de plusieurs arginines ou lysines produit un site de clivage polybasique. C'est l'un des facteurs de virulence des virus aviaires hautement pathogènes (22). Ce site de clivage polybasique permet à la HAO d'être clivée par des protéases ubiquitaires de type *furin-like*, ce qui facilite la réplication systémique du virus chez le poulet (23). Chez les mammifères l'introduction d'un site de clivage polybasique engendre une réplication systémique virale chez le furet ou la souris mais pas chez le macaque (24–26). Ce site de clivage polybasique n'a jamais été observé dans les virus responsables d'épidémies saisonnières ou de pandémies chez l'Homme.

L'hémagglutinine permet l'entrée du virus dans la cellule hôte grâce à la liaison aux acides sialiques (AS) des glycoprotéines de surfaces cellulaires. Le tropisme viral est lié au type d'AS présent à la surface des cellules. Il existe deux types de liaison entre l'AS et le galactose présent dans les chaînes polyosiques des membranes cellulaires : une liaison de type  $\alpha$ -2,3 et une liaison de type  $\alpha$ -2,6. Les virus humains se lient préférentiellement aux AS α-2,6 exprimés majoritairement par les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur alors que les virus aviaires se lient préférentiellement aux AS  $\alpha$ -2,3 présents à la surface des cellules épithéliales intestinales des oiseaux et dans le tractus respiratoire inférieur chez l'Homme (27,28). Cette différence dans la spécificité de liaison aux AS et la répartition des différents résidus AS explique en partie pourquoi les virus aviaires hautement pathogènes ne présentent pas de transmission interhumaine actuellement. En revanche, le porc possède au niveau trachéal à la fois des AS  $\alpha$ -2,6 et  $\alpha$ -2,3 ce qui lui permet d'être un hôte intermédiaire sensible à la fois aux virus aviaires et humains, phénomène à l'origine de la souche H1N1 pandémique de 2009. La spécificité de la liaison aux AS est déterminée par quelques acides aminés (AA) : les AA en position 190 et 225 (numérotation H3) des virus H1 humains et aviaires et les AA en position 205, 226 et 228 des virus H2 et H3 saisonniers (29-32). L'apparition de substitutions d'AA dans la HA qui affectent les préférences de liaison au récepteur peuvent influencer le tropisme tissulaire du virus. Par exemple, il a été montré que la HA des virus humains contient une leucine en position 226 alors que les virus aviaires contiennent une glutamine (33–35).

La glycosylation de la HA permet aussi de moduler la virulence. Elle varie en fonction des souches virales ainsi qu'en fonction de la cellule infectée. LA HA est la cible la plus importante de la réponse immunitaire humorale : la majorité des anticorps sont dirigés contre le domaine globulaire. Au cours des années, le nombre de sites de glycosylation dans les souches circulantes a augmenté ce qui empêche sa reconnaissance par les anticorps et permet au virus d'échapper à l'immunité humorale (36–38).

#### 1.3.2 Neuraminidase

La NA est la deuxième glycoprotéine de surface la plus abondante du virus influenza (estimée à 25%). C'est une glycoprotéine transmembranaire homotétramérique de type II. Sa partie globulaire possède 4 monomères qui comprennent chacun une poche catalytique (39). Le site actif de la NA est composé de deux types d'AA : 11 AA structuraux dont le rôle est de stabiliser le site actif et 8 AA fonctionnels qui permettent l'activité sialidase de l'enzyme (40,41). Cette activité sialidase permet de couper la liaison entre les AS  $\alpha$ -2,3 ou  $\alpha$ -2,6 et les hydrates de carbone des glycoprotéines.

Un équilibre, appelé balance HA-NA, entre l'affinité de la HA pour les AS et l'activité sialidase de la NA est nécessaire afin de permettre une infection productive en assurant une réplication virale et une transmission optimales (42).

La NA favorise l'infection par le virus influenza de plusieurs manières :

Les mucines présentes dans le tractus respiratoire possèdent les mêmes AS que ceux présents à la surface des cellules épithéliales. Ces mucines sont donc capables de se lier au virus et d'empêcher sa pénétration jusqu'aux cellules épithéliales. Lors de la phase d'infection des voies respiratoires hautes, la NA clive la liaison entre les AS et les mucines ce qui inhibe le rôle protecteur des mucines et empêche la clairance du virus (43). Le virus peut alors infecter les cellules épithéliales sous-jacentes. La NA limite aussi la clairance virale en activant le TGF- $\beta$  : grâce à son activité sialidase, elle clive les AS du TGF- $\beta$  et permet ainsi son passage d'une forme latente inactive à une forme biologiquement active (44).

L'activité sialidase de la NA permet la diffusion de l'infection grâce à la coupure de la liaison entre les AS et les glycoprotéines de surface (45). En l'absence d'activité NA , le virus influenza peut infecter les cellules et se répliquer mais les virions nouvellement formés restent agrégés à la surface cellulaire sans parvenir à infecter de nouvelles cellules (46).

Enfin la NA a la capacité de muter afin de devenir résistante aux inhibiteurs de neuraminidase (oseltamivir, zanamivir, peramivir et laninamivir) seuls antiviraux actifs contre les 2 types de virus influenza A H1N1 et H3N2 et les 2 lignages de virus influenza B. Ces antiviraux sont utilisés en cas d'épidémies et de pandémies. En 2007, une souche de virus influenza A (H1N1) résistante à l'oseltamivir a émergé et en 2008-2009, plus de 99% des souches de virus influenza A (H1N1) circulantes étaient résistantes à l'oseltamivir (47). La mutation H274Y sur la NA était la mutation la plus fréquemment observée (48,49). Actuellement, la résistance à l'oseltamivir est faible dans les souches épidémiques, avec moins de 1% de résistance parmi les souches de virus influenza A et B circulantes (50).

24

#### 1.3.3 PB1-F2

PB1-F2 est une protéine accessoire qui est transcrite à partir d'un cadre de lecture alternatif de PB1 (51). Ce facteur de virulence est majoritairement exprimé par les virus hautement pathogènes tels que H5N1. Sa forme tronquée, incapable de migrer dans les mitochondries est exprimée par des souches moins virulentes telles que H1N1 (52).

PB1-F2 module la réponse immunitaire innée à plusieurs niveaux : elle entraine une augmentation de la réponse inflammatoire et altère la réponse antivirale (Figure 4) (51). PB1-F2 participe à la virulence des souches influenza A en augmentant l'apoptose des cellules infectées : elle se lie aux membranes mitochondriales et rompt leur intégrité menant à l'apoptose (53). PB1-F2 inhibe la voie de signalisation initiée par la reconnaissance de l'ARN viral par RIG-I (*Retinoic Acid-Inducible Gene I*) ce qui diminue la production d'interféron (IFN) de type I et III dont le rôle est de limiter la réplication virale (54). Il a été montré que la protéine PB1-F2 du virus H7N9 active la voie de l'inflammasome NLRP3 (protéine 3 de la famille des NLR : *Nucleotide oligomerization domain-like receptor*). Ceci permet la production de cytokines pro-inflammatoires telle que l'interleukine (IL) 1 $\beta$  et augmente la survenue de pneumonies virales dans des modèles murins (55,56). De plus, dans un modèle murin, en cas de pneumonie bactérienne post-influenza, PB1-F2 est responsable d'une augmentation de la sévérité de l'infection et d'une réduction du taux de survie suite à l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (57).



#### Figure 4 : Les différentes fonctions de PB1-F2, adapté de Hsu (58).

PB1-F2 inhibe la voie de signalisation RIG-I, diminue la transcription d'IFN de type I et III et la réponse antivirale qui en découle. PB1-F2 active l'inflammasome et stimule la production d'IL-1β. NS1 est une protéine codée par le gène NS, le plus petit segment du virus influenza (890 paires de base), ce qui lui confère la capacité d'être synthétisée rapidement et en grande quantité dans les cellules épithéliales infectées (59).

Cette protéine multifonctionnelle possède deux domaines. Le domaine N-terminal de liaison à l'ARN reconnait les ARN double brins viraux et les protège en empêchant leur détection par l'hôte. Le domaine effecteur en C-terminal participe au détournement de la machinerie cellulaire : il inhibe la synthèse protéique de l'hôte dans les cellules infectées et favorise ainsi la synthèse des protéines virales (60–62).

NS1 a également un rôle inhibiteur de la réponse immunitaire ce qui permet l'établissement d'une infection productive. Elle inhibe la voie de signalisation RIG-I ce qui bloque la production d'IFN de type I (63,64). La pression de sélection et l'évolution des virus dans la population humaine aboutit à des variations dans la composition en acides aminés de la protéine NS1 ce qui module sa capacité d'inhibition de la production d'IFN (58). Ainsi, le remplacement du gène NS1 d'un virus aviaire hautement pathogène H5N1 par le gène NS1 d'un virus porcin faiblement pathogène H5N1 avec une délétion naturelle de 15 nucléotides en positions 612 à 626 diminue la capacité d'inhibition de la voie IFN de la protéine NS1 chez le poulet (65). La suppression de l'immunité antivirale par la protéine NS1 apparait également plus efficace avec une souche humaine H3N2 par rapport à une souche aviaire H11N9 faiblement pathogène et permet une augmentation de la réplication virale (66).

#### 1.3.5 PA-X

La protéine PA-X est codée par le gène PA (67). Cette protéine réprime rapidement l'expression des gènes de la cellule hôte ce qui lui permet d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. PA-X peut moduler l'activité polymérase de l'hôte en dégradant sélectivement les ARNm transcrits par l'ARN polymérase II (68). PA-X est aussi capable de moduler la réplication virale, l'apoptose induite par le virus et la localisation nucléaire de PA (69).

Les virus déficients en PA-X entrainent une réponse immunitaire de l'hôte plus intense, avec une augmentation de l'inflammation et de l'apoptose et sont ainsi responsables de formes d'infections plus sévères chez la souris (67).

#### 1.4 Cycle de réplication virale

La première étape de l'infection est constituée par l'attachement du virus influenza aux cellules épithéliales du tractus respiratoire. Cet attachement est possible grâce à la liaison de la HA à son récepteur, l'acide N-acétylneuraminique qui appartient à la famille des acides sialiques (Figure 5).

Après cette étape d'attachement, le virus est internalisé dans la cellule hôte par endocytose. Le pH acide de la vésicule d'endocytose ouvre le canal à proton M2 ce qui entraine l'acidification du virion, le détachement des complexes ribonucléoprotéiques viraux (vRNP) liés à la membrane virale et l'exposition du peptide fusion de la HA suite à un changement conformationnel de celle-ci. Ce peptide fusion est responsable de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale et le contenu viral est finalement libéré dans le cytoplasme cellulaire. Les vRNP migrent alors vers le noyau où l'ARN polymérase ARN-dépendante transcrit et réplique l'ARN de polarité négative aboutissant à la formation de trois types d'ARN : les ARN messagers, les ARN complémentaires et de petits ARN génomiques de polarité négative. Ces petits ARN génomiques de polarité négative sont impliqués dans la régulation du *switch* entre la transcription et la réplication virale (70).

La phase de transcription permet la formation d'ARN messagers (ARNm) qui sont exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines. Les protéines virales produites lors de la phase précoce (complexe polymérase, NP, NEP et M1) qui sont nécessaires à la réplication et à la transcription sont réimportées vers le noyau. LA HA, la NA et la M2 sont transportées via le trans-golgi jusqu'à la membrane cellulaire et subissent des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique dont la glycosylation de la HA et de la NA (71).

La phase de réplication permet la formation d'ARN complémentaire de polarité positive qui est ensuite utilisé comme matrice pour la synthèse de nouveaux ARNv. De nouveaux vRNP sont alors formés grâce à l'association de ces ARN viraux avec le complexe de la polymérase et les nucléoprotéines. Ces nouveaux vRNP formés dans le noyau cellulaire sont exportés dans le cytoplasme.

L'assemblage de la particule virale se fait au site apical de la cellule polarisée, grâce à l'interaction entre M1 et la partie cytoplasmique des glycoprotéines virales (70).

Le bourgeonnement permet le relargage de nouveaux virions grâce à l'action de la NA qui clive les AS cellulaires et permet la libération des nouveaux virions (72).





LA HA du virus influenza se lie à son récepteur cellulaire, l'acide sialique  $\alpha$ -2,6 ou  $\alpha$ -2,3, puis le virus pénètre dans la cellule par endocytose. Le clivage de la HA par des protéases cellulaires expose le peptide fusion qui permet la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane endosomale. L'acidification de la vésicule d'endocytose provoque l'ouverture du canal à proton M2 ce qui acidifie le virion et permet la libération dans le cytoplasme des complexes ribonucléoprotéiques contenant le génome viral. Les complexes ribonucléoprotéiques migrent alors dans le noyau. L'ARN polymérase ARN-dépendante transcrit et réplique l'ARN viral de polarité négative en trois types d'ARN : l'ARN complémentaire qui permet la réplication de l'ARN viral, des ARN de petite taille de polarité négative qui régulent la transcription et la réplication et des ARN messagers qui sont exportés dans le cytoplasme et traduits en protéines virales. Les protéines virales nécessaires à la réplication et la transcription sont réimportées dans le noyau où elles forment les complexes ribonucléoprotéiques après association à l'ARN viral nouvellement synthétisé puis ces complexes sont exportés dans le cytoplasme pour l'étape de packaging avec l'aide des protéines M1 et NP. La HA, la NA et la protéine M2 subissent des modifications post-traductionnelles dans le trans-golgi, les protéines matures arrivent à la membrane puis sont assemblées pour former les nouveaux virions. Le bourgeonnement permet le relargage des nouveaux virions après que la NA ait coupé la liaison entre les acides sialiques cellulaires et les glycoprotéines virales.

## 1.5 Mécanismes de variations antigéniques des virus influenza

#### 1.5.1 La dérive antigénique

La dérive antigénique est le résultat de l'accumulation de mutations qui provoquent une modification de l'antigénicité de la HA et de la NA par rapport à la souche de l'année précédente (73). Lors de la réplication virale l'ARN polymérase ARN-dépendante, qui ne possède pas de fonction de correction, commet des erreurs qui aboutissent à la substitution d'acides aminés et au final à l'apparition de nouvelles souches virales. Ce glissement antigénique permet aux virus influenza d'échapper partiellement à la réponse immunitaire humorale et de produire une nouvelle épidémie dans une population déjà immunisée contre le virus parent (Figure 6).

L'évolution antigénique des souches est variable d'une espèce à l'autre ainsi que d'une souche à l'autre. Ainsi l'évolution des souches aviaires est plus lente que l'évolution des souches humaines ce qui traduirait une faible pression exercée par le système immunitaire et une très bonne adaptation du virus à son réservoir principal aviaire (18,74). Des variants antigéniques de la souche A(H3N2) apparaissent tous les 3 à 5 ans alors que les variants antigéniques de A(H1N1) et virus B apparaissent tous les 3 à 8 ans (75–78).

Certaines positions de la HA de la grippe ont une importance cruciale dans la détermination de l'antigénicité. Seuls sept AA autour du RBS ont été les déterminants primaires des changements antigéniques du virus A(H3N2) entre 1968 et 2003 : un seul changement sur un de ces sept AA est suffisant pour générer un nouveau variant antigénique (79). L'importance d'un nombre restreint d'AA immédiatement adjacents au RBS pour l'apparition de nouveaux variants a aussi été montrée pour les virus aviaire A(H5N1), porcin A(H3N2) et équin A(H3N8) (80–83).



#### Figure 6 : Mécanismes d'évolution du virus influenza, d'après Van de Sandt (84).

La dérive antigénique (*antigenic drift*) est l'accumulation graduelle de mutations, principalement dans la région globulaire hypervariable de la tête de la HA. Elle permet l'échappement viral à la reconnaissance par les anticorps neutralisants, ce qui est responsable des épidémies saisonnières.

La cassure antigénique (*antigenic shift*) est l'introduction d'un nouveau sous-type viral dans la population humaine, ce qui entraine l'apparition d'une pandémie. Elle résulte soit d'un réassortiment génétique entre plusieurs souches, soit de la transmission directe d'une souche du réservoir animal à la population humaine.

#### 1.5.2 La cassure antigénique

Contrairement au glissement antigénique, la cassure antigénique (*antigenic drift*) est un changement majeur dans l'antigénicité de la HA et parfois de la NA des virus influenza A circulants. La cassure antigénique est observée chez les virus influenza humains et animaux. Elle entraine l'apparition d'un nouveau lignage contre lequel les populations ne sont pas immunisées ce qui provoque alors une pandémie (Figure 6).

Deux mécanismes sont responsables de cette cassure antigénique : l'introduction chez l'Homme d'une souche animale ou le réassortiment génétique entre des souches humaines et animales. Ces réassortiments génétiques sont possibles grâce à la nature segmentée du génome de la grippe. Ainsi deux virus du même type qui infectent la même cellule peuvent échanger du matériel génétique. La circulation des virus influenza A non seulement chez l'Homme mais aussi chez les animaux domestiques (porcs, poulets, chevaux) et chez les oiseaux sauvages migrateurs procure une source d'HA et de NA variées qui peuvent se recombiner entre différentes souches après co-infection du même hôte. Cependant toutes les combinaisons ne sont pas possibles car les 8 segments d'ARN sont interdépendants. D'après Villa *et al* ceci serait une barrière au réassortiment entre lignages co-circulants. Cet évènement est en effet très rare car il est difficile pour le virus réassortant de trouver un équilibre et de maintenir son *fitness* avec une combinaison de segments séparés par des distances génétiques importantes (85).

#### 1.6 Epidémiologie des infections saisonnières

Les virus influenza A et B sont responsables chaque année dans les zones tempérées d'épidémies saisonnières avec un pic de fréquence en hiver. Durant cette période les conditions atmosphériques (air froid et sec) et le confinement des populations facilitent la propagation du virus (Figure 7). En revanche dans les régions intertropicales le virus circule toute l'année (86).



Figure 7 : Evolution du taux d'incidence hebdomadaire des cas de syndromes grippaux vus en consultation de médecine générale lors de la campagne de surveillance de la grippe 2017/2018. D'après les données du réseau sentinelle (87). En bleue, la courbe épidémique et son intervalle de confiance à 95% et en rouge le seuil épidémique.

D'après les données de l'OMS, 5 à 15 % de la population mondiale est touchée chaque année, avec 3 à 5 millions de formes graves et 500 000 décès par an dans le monde. La majorité des formes graves observées sont liées à des pneumonies virales ou secondaires à des surinfections bactériennes de l'arbre respiratoire bas mais il existe aussi des complications non respiratoires (myocardite, encéphalite, rhabdomyolyse ou atteinte d'autres organes) (88–92).

Les enfants scolarisés sont la principale source de transmission du virus comme le montrent des études où la vaccination des enfants réduit l'incidence des infections grippales sévères chez les personnes âgées (93). Les formes graves sont observées majoritairement chez les enfants âgés de moins d'un an et chez les personnes âgées (18,94). Chez les jeunes enfants, l'absence complète d'immunité spécifique lors de la première infection par le virus influenza les rend complètement sensibles à l'infection, ils présentent des symptômes plus sévères et libèrent de grandes quantités de virions avec une excrétion prolongée. Chez les personnes âgées, l'immunosénescence et l'existence de pathologies chroniques sous-jacentes expliquent les formes graves d'infection grippale (95). Les autres facteurs de risque de développement d'une forme grave sont l'existence de pathologies chroniques respiratoires ou cardiaques, le diabète, l'obésité, la grossesse et l'immunodépression (95–97).

#### 1.7 Epidémiologie des pandémies grippales

En plus des infections saisonnières annuelles, quatre pandémies grippales d'origine aviaire ou porcine ont été observées depuis 1918 (Tableau 1). Elles apparaissent de façon sporadique et imprévisible et surviennent tous les 10 à 50 ans. Elles sont définies par l'introduction d'une souche de virus influenza A exprimant de nouveaux antigènes de surface pour lesquels la population actuelle ne possède aucune immunité.

Cette absence d'immunité préexistante permet au virus d'avoir un taux d'attaque supérieur aux souches saisonnières dans les populations. Le virus se répand donc très rapidement à travers le monde provoquant plusieurs vagues d'infection durant l'année. Ces virus peuvent ensuite continuer à circuler et donner des épidémies saisonnières classiques les années suivant ces pandémies.

La pandémie de 1918, appelée grippe espagnole a entrainé la mort de 40 à 50 millions de personnes (98). Le virus, une souche H1N1, a infecté la moitié de la population mondiale au cours de plusieurs vagues successives. Lors de cette pandémie la moitié des décès a été observée chez les adultes jeunes de 18 à 40 ans. L'hypothèse avancée pour expliquer cette forte létalité chez les adultes jeunes est une réaction excessive du système immunitaire entrainant un orage cytokinique qui aboutit à l'apparition de lésions pulmonaires. Un système immunitaire fonctionnel (c'est-à-dire non immature et non immunosénescent) étant dans ce cas un facteur de risque de développer une forme grave (99,100).

En 1957, l'émergence d'une souche A(H2N2) issu du réassortiment de 3 gènes d'origine aviaire (H2, N2 et PB1) et d'un virus Influenza A(H1N1) humain est responsable de la grippe asiatique qui a provoqué 1 à 2 millions de morts dans le monde.

En 1968, un réassortiment de la souche A(H2N2) humaine avec 2 gènes d'origine aviaire (H3 et PB1) entraine l'émergence d'une souche A(H3N2) responsable de la grippe de Hong-Kong qui a engendré 500 000 à 2 millions de morts dans le monde. En 1977 un virus A(H1N1) très proche du sous-type A(H1N1) ayant circulé dans les années 50 réapparait et engendre la pandémie de grippe russe qui a touché majoritairement les personnes nées après 1957 mais sans augmentation de la mortalité dans la population générale. Deux souches de grippes A (A(H1N1) et A(H3N2)) se mettent alors à circuler en parallèle des deux lignages de virus influenza B.

Enfin, en 2009, la première pandémie du siècle, connue sous le nom de grippe porcine ou grippe mexicaine, a été provoquée par un nouveau virus A(H1N1) issu d'un réassortiment d'une souche porcine eurasienne avec un triple réassortant porcin A(H3N2) (101,102). 18500 décès ont été

32

documentés biologiquement mais des modèles mathématiques suggèrent que la mortalité associée à cette pandémie se situerait plutôt entre 150 000 et 575 000 décès (103,104).

Pandemic Name	Year	Strain	Suspected Origin of Outbreak	Approximate Number of Deaths
Spanish flu	1918–1920 1957–1958	H1N1	China	40–50 million
Hong Kong flu	1957–1958 1968–1970	H2N2 H3N2	China	500,000–2 million
Swine flu	2009–2010	H1N1	Mexico	Up to 575,000

Tableau 1: Principales caractéristiques des pandémies de grippe du XXème et XXIème siècle. D'après Saunders-Hastings (98)

Des systèmes de surveillance du virus influenza ont été mis en place suite à la crainte de voir apparaitre une nouvelle pandémie grippale. Des infections zoonotiques avec des virus influenza aviaires tels que H5N1, H7N9 ou porcin tel que H3N2 surviennent de façon sporadique dans des zones géographiques limitées où ces souches circulent beaucoup suite au contact rapproché entre les Hommes et les animaux. A l'heure actuelle, seuls de très rares cas de transmission interhumaine ont été décrits indiquant que ces souches nécessitent une adaptation à l'homme pour acquérir un potentiel pandémique.

## 1.8 Physiopathologie et clinique de l'infection grippale simple

Les symptômes de l'infection par le virus de la grippe varient d'une infection respiratoire modérée confinée au tractus respiratoire haut à des formes sévères voire létales qui atteignent les voies respiratoires basses.

Cliniquement, l'infection modérée est caractérisée par l'apparition de fièvre, maux de gorge, rhinite, toux, maux de tête, douleurs musculaires et fatigue.

D'un point de vue physiopathologique, trois phases successives sont observées lors d'une infection grippale résolutive :

Une première phase de réplication virale, qui dure environ trois jours, permet au virus de se multiplier dans les cellules ciliées et les cellules à mucus et ainsi d'infecter l'ensemble du tractus respiratoire. La destruction de l'épithélium respiratoire est responsable d'une inflammation locale et d'un afflux de leucocytes qui sont à leur tour infectés par le virus. La phase inflammatoire apparait à partir du deuxième jour pour une durée de 7 à 10 jours. La nécrose des cellules épithéliales entraine la libération de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules phagocytaires.

Enfin la phase de réparation de l'épithélium respiratoire commence à partir du troisième jour et se prolonge pendant six semaines après le début de la maladie.

## 2 La réponse immunitaire à l'infection grippale

#### 2.1 Immunité innée

Le tractus respiratoire est une interface majeure de notre organisme avec l'environnement extérieur ce qui le rend particulièrement vulnérable aux infections. L'anatomie de la structure pulmonaire impose que la réponse immunitaire à une infection virale soit compartimentée et séquentielle afin de limiter la perte de fonction durant l'inflammation. Un équilibre étroit entre les réponses pro- et anti-inflammatoires est nécessaire afin de protéger les poumons de l'infection et de limiter les symptômes tout en évitant une inflammation excessive qui contribue aux lésions tissulaires et à l'aggravation de la pathologie.

Afin d'établir une infection, les virus respiratoires doivent passer une première barrière de protection mécanique constituée par le mucus et les peptides antiviraux qui limitent l'attachement et l'entrée du virus dans les cellules de l'épithélium respiratoire. Si cette barrière est franchie, l'initiation d'une réponse immunitaire innée rapide se met en place dès l'internalisation du virus dans les cellules épithéliales. Le virus est reconnu comme un élément étranger à l'organisme grâce à des déterminants moléculaires : les *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) qui sont identifiés comme pathogènes par les *pattern recognition receptor* (PRR). Trois familles de PRR sont impliquées dans la reconnaissance du virus influenza : les *Toll Like Receptor* (TLR), le récepteur RIG-I et les récepteurs de la famille NLR dont NLRP3 (105,106) (Figure 8). Les TLR sont les premiers récepteurs à détecter le virus. Ils détectent soit les virus extracellulaires grâce aux TLR 2 et 4 soit l'ARN viral présent dans les vésicules d'endocytose grâce aux TLR3 et TLR7/8 (107–109). RIG-I et NLRP3 détectent l'ARN viral présent dans le cytoplasme des cellules infectées (110).



#### Figure 8 : Détection du virus influenza par les PRR, d'après Pulendran (111).

L'activation de différents TLR (TLR3 et TLR7/8) par la détection de l'ARN viral ou la liaison de PAMPs par le TLR4 permet le recrutement de molécules adaptatrices (MyD88 et TRIF). Ces molécules adaptatrices activent différentes voies de signalisation ce qui permet la translocation nucléaire de facteurs de transcription (IRF3/7 et NF-κB) et aboutit au final à la production d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF, pro-IL-1β et pro-IL-18). La reconnaissance de l'ARN par RIG-I active le recrutement de protéines mitochondriales (*Mitochondrial Antiviral Signaling Proteins*, MAVS), induisant la production de cytokines par l'intermédiaire de IRF3/IRF7. NOD2 détecte les ARN simples brins ce qui active la translocation de MAPK et IRF3/IRF7 par le recrutement des molécules adaptatrices RIPK2 et MAVS et induit la production de cytokines. L'activation de NLRP3 recrute ASC (*apoptosis associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) qui interagit avec la pro-caspase-1 pour former l'inflammasome NLRP3. L'autoactivation de la caspase-1 clive le pro-IL-18 et IL-18 et IL-18 mature.

Différentes cascades de signalisation sont alors activées. La reconnaissance du virus par les TLR et par RIG-I active les voies de signalisation du facteur de transcription nucléaire *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) et de *l'Interferon Regulator Factor* (IRF) ainsi que les *Mitogen-Activated kinases* (MAPKs). La reconnaissance du virus par l'inflammasome NLRP3 active la caspase I ce qui aboutit à la production d'IL1- $\beta$  et d'IL-18 biologiquement actives (112–114). Ces voies de signalisation entrainent une sécrétion rapide d'IFN de type I, de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (115,116). Les IFN de type I, produits par les macrophages, l'épithélium respiratoire, les
cellules dendritiques conventionnelles et plasmacytoïdes, stimulent l'expression de centaines de gènes connus sous l'appellation *IFN-Stimulated Genes* (ISG) à la fois dans les cellules infectées et dans les cellules voisines des cellules infectées. Les ISG ont des propriétés antivirales, immunomodulatrices et de régulation cellulaire qui permettent de limiter la permissivité des cellules voisines à l'infection virale et contribuent à la différentiation des cellules du système immunitaire adaptatif (117,118). Les cytokines et chimiokines produites par les cellules de l'épithélium respiratoire et les leucocytes ont des rôles redondants pour attirer de nouveaux leucocytes et les activer (

Tableau 2).

Chimiokine/ cytokine	Fonctions	Cellules productrices
IFN-γ	Inhibe la réplication virale Stimule la cytotoxicité des lymphocytes T cytotoxiques Augmente l'expression du CMHI (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) Active les macrophages et les PNN Favorise la prolifération des lymphocytes T	Lymphocytes T Cellules NK
ΤΝΓ-α	Effets antiviraux directs et indirects Chemoattractant pour les PNN Stimule la phagocytose par les macrophages et la production d'IL- 1 Augmente la perméabilité vasculaire	Lymphocytes T Monocytes/macrophages Cellules dendritiques PNN
IL-1	Augmente l'expression endothéliale de facteurs d'adhésion Augmente la perméabilité vasculaire Stimule la production d'IL-6	Monocytes/macrophages Cellules dendritiques
IL-6	Cytokine pro-inflammatoire Active les lymphocytes T	Cellules de l'épithélium respiratoire Lymphocytes T Monocytes/macrophages Cellules dendritiques
MIP-1β (CCL4)	Chemoattractant pour les monocytes et les lymphocytes T Active les PNN	Monocytes/macrophages PNN Lymphocytes T Cellules dendritiques
MIG (CXCL9)	Chemoattractant pour les monocytes et les lymphocytes T	Cellules de l'épithélium respiratoire Monocytes/macrophages
IP-10 (CXCL10)	Chemoattractant pour les monocytes et les lymphocytes T	Monocytes/macrophages Lymphocytes T Cellules de l'épithélium respiratoire
RANTES (CCL5)	Chemoattractant pour les monocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T	Lymphocytes T Cellules de l'épithélium respiratoire
IL-8 (CXCL8)	Chemoattractant pour les PNN et les lymphocytes T Active les PNN	Cellules de l'épithélium respiratoire Monocytes/macrophages PNN

Tableau 2 : Principales cytokines et chimiokines produites lors de l'infection par le virus influenza et leurs fonctions, d'après La Gruta (119).

Cette phase initiale de production de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires permet le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée dans les trois premiers jours suivant l'infection virale (Figure 9) (120). Les lymphocytes *natural killer* (NK) recrutés éliminent les cellules épithéliales infectées. Les monocytes et les PNN, par leur activité phagocytaire, participent à la clairance des cellules en nécrose suite à l'infection virale. Bien que la réponse immunitaire soit nécessaire pour recruter des leucocytes au niveau pulmonaire et obtenir la clairance du virus, elle peut entrainer également des lésions tissulaires et elle peut contribuer ainsi à aggraver la pathologie (121).

L'efficacité de cette réponse immunitaire innée est liée à l'inoculum viral, à la virulence de la souche ainsi qu'à des facteurs génétiques de l'hôte qui affectent la puissance de cette réponse immunitaire.



#### Figure 9 : Réponse immunitaire innée à l'infection par le virus influenza, adapté de Cole (122).

A : le virus influenza infecte les cellules épithéliales du tractus respiratoire et les macrophages alvéolaires. La reconnaissance du virus par les PRR entraine l'activation des voies de signalisation intracellulaires et aboutit à la production de cytokines et chimiokines. L'IFN de type I entraine l'activation des *Interferon-Stimulated Genes* (ISG), ce qui permet l'établissement d'un état de défense antivirale. Les cellules NK permettent l'apoptose des cellules infectées grâce à la sécrétion de granzyme. La sécrétion de facteurs solubles dans la circulation sanguine permet l'augmentation de la production de cellules myéloides.
B : L'infection entraine la mort des macrophages alvéolaires augmentent le recrutement de PNN et monocytes dans les voies respiratoires. Lors de la phagocytose, les PNN produisent des radicaux oxygénés libres (ROS) et des filaments extracellulaires

appelés *Neutrophil ExtracellularTraps* (NET) et limitent la diffusion du virus. Les monocytes se différencient en macrophages ou cellules dendritiques et contribuent ainsi à la clairance virale.

### 2.1.1 Les monocytes et macrophages

#### 2.1.1.1 Recrutement des monocytes/macrophages

Les monocytes forment un réservoir systémique rapidement mobilisable participant au renouvellement des macrophages et cellules dendritiques. La détection d'un signal pro-inflammatoire entraine l'augmentation de leur production au niveau médullaire (123), leur migration au niveau tissulaire et leur différenciation en macrophage (124). L'augmentation du nombre de monocytes à la fois dans le compartiment sanguin et dans le tractus respiratoire est observé dans les infections par le virus influenza A (125–127). Le recrutement des monocytes au niveau pulmonaire est médié à la fois par la production de chimiokines telle que la *monocyte chimioattractant protein 1* (MCP-1, aussi appelée *chemokine ligand* 2, CCL-2) par les cellules de l'épithélium respiratoire et les monocytes eux-mêmes et par une augmentation de l'expression monocytaire du récepteur de MCP-1, le CCR2 (128).

Les macrophages alvéolaires font partie des cellules présentes à l'état basal dans les alvéoles pulmonaires. On trouve en moyenne 7 macrophages par alvéole (129). Ils regroupent les macrophages résidents d'origine embryonnaire qui sont capables d'auto-renouvellement et les macrophages issus de la différentiation des monocytes sanguins. Ces cellules participent à l'initiation de la réponse immunitaire anti-grippale.

#### 2.1.1.2 Rôle des monocytes/macrophages dans le contrôle de l'infection

Les macrophages ont un rôle central dans le contrôle de l'infection. Ils représentent la majorité des leucocytes au niveau pulmonaire au cinquième jour de l'infection (130). Au stade précoce de l'infection, la réplication virale dans les cellules épithéliales est importante et les virions produits infectent les macrophages qui viennent d'être recrutés au niveau pulmonaire. Les monocytes et les macrophages sont sensibles à l'infection par le virus influenza mais le cycle est abortif (131,132). Ainsi la production de nouveaux virions par les monocytes et macrophages est minime par rapport à la production de virions par les cellules épithéliales. De plus les monocytes et macrophages meurent par apoptose dans les 24-48h suivant l'infection, ce qui limite leur contribution au relargage de virions et à l'expansion de l'infection (131,132).

En absence d'infection les macrophages alvéolaires sont dans un état quiescent, produisent peu de cytokines et ont un rôle inhibiteur sur l'immunité innée et adaptative (133,134). En revanche, l'infection par le virus influenza entraine leur activation rapide, dans les 2 heures. Les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et de la protéine activatrice 1 (AP-1) permettent alors la transcription et la production rapide de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines dont le facteur de nécrose tumorale (TNF)  $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et les IFN $\alpha/\beta$  (132,135,136).

Les macrophages limitent la diffusion du virus en phagocytant les cellules épithéliales infectées en apoptose et les particules virales opsonisées (137,138). Ils sont aussi impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative : ils participent à la présentation antigénique aux lymphocytes, régulent la réponse Th1 et augmentent la survie, la prolifération et la production d'anticorps par les lymphocytes B (139). Une déplétion en macrophages alvéolaires avant l'infection virale entraine une réduction du titre d'anticorps et une réduction des cellules T cytotoxiques post-infection dans un modèle d'infection porcine (137).

#### 2.1.1.3 Rôle des monocytes/macrophages dans l'apparition de formes sévères de grippe

Au début de l'infection par le virus influenza, les chimiokines les plus abondantes sont celles qui permettent le recrutement des monocytes/macrophages (140). Cependant, un recrutement excessif de monocytes est délétère. Plusieurs études ont montré que les souches de virus influenza telles que le virus pandémique H1N1 de 1918 ou le virus aviaire H5N1 entrainent une plus grande production de MCP-1 que les souches saisonnières à la fois dans des modèles murins et dans des modèles d'infection de macrophages humains (141,142). Une réduction du nombre de monocytes inflammatoires au niveau pulmonaire est aussi associée à un meilleur pronostic dans des modèles d'infections murines sévères par le virus influenza A et à une diminution de l'inflammation (8,143,144).

Un excès de macrophages participe à l'apparition de formes de grippe graves. Ils provoquent des lésions pulmonaires de façon directe et indirecte. Directement par la production de quantité importantes de réactifs oxygénés libres et d'oxyde nitrique qui sont responsables de lésions épithéliales (119,145). Indirectement par leur grande capacité de production de cytokines et de chimiokines : ils augmentent l'afflux de leucocytes qui engendrent à leur tour des lésions de l'épithélium pulmonaire (119,132,135,146).

Une altération fonctionnelle des monocytes et macrophages est aussi décrite dans les infections sévères. Une étude a montré que l'expression du HLA-DR, un antigène des leucocytes humains appartenant au CMHII, est diminuée à la surface des monocytes pendant l'infection par le virus influenza H7N9 et un mois après l'infection, bien que le nombre de monocytes se soit normalisé, l'expression du HLA-DR restait diminuée avec une capacité réduite de présentation antigénique conduisant à une baisse de la réponse des lymphocytes T (147). De plus le niveau d'expression du HLA-DR était négativement corrélé à la sévérité de l'infection comme cela a déjà été montré dans le sepsis (11).

#### 2.1.2 Les polynucléaires neutrophiles

Les PNN sont parmi les premières cellules immunitaires à arriver au niveau pulmonaire lors d'une infection.

Ils participent au contrôle de l'infection virale grâce à la phagocytose des virions et des cellules apoptotiques infectées (111). Lors de la phagocytose, les PNN utilisent des enzymes protéolytiques, des peptides antimicrobiens et des radicaux oxygénés libres pour tuer ou inactiver les virus (148). Les PNN peuvent aussi former des filaments extracellulaires appelés *neutrophil extracellular traps* (NET) composés de chromatine décondensée, d'histones, de protéases et de protéines antimicrobiennes, dont le rôle est d'immobiliser les virus et d'empêcher leur dissémination (149)(Figure 9).

En plus de leur rôle dans la phagocytose et la clairance virale, les PNN sécrètent des cytokines et des chimiokines qui agissent sur les acteurs de l'immunité adaptative. Certains PNN sécrètent la cytokine BAFF (*B-cell Activating Factor*) qui active les lymphocytes B ou de l'IFNγ qui active la réponse cellulaire T, d'autres inhibent la multiplication et l'activité cellulaire T par la production d'oxyde nitrique synthase inductible et d'arginase 1 (148,150). Les PNN sécrètent aussi des chimiokines (IL-8 et CXCL2) qui augmentent leur propre recrutement au niveau pulmonaire (151,152).

Bien qu'ils aient un rôle protecteur contre la dissémination virale, un recrutement excessif de PNN peut être délétère et engendrer une inflammation non contrôlée et des lésions de l'épithélium respiratoire (111). En effet les NET et le relargage de radicaux oxygénés libres provoquent des lésions pulmonaires (153). Normalement les PNN sont des cellules à demi-vie courte qui meurent par apoptose et dont les débris sont phagocytés par les macrophages. Cependant une altération de ces phénomènes pourrait contribuer à la constitution de lésions pulmonaires aiguës (154).

Dans les infections dues au virus influenza seul, les PNN sont des acteurs de deuxième importance après les monocytes et macrophages pour la clairance virale. Mais lors des co-infections influenza et bactérie, les PNN deviennent essentiels pour contrôler l'infection. Les dommages tissulaires engendrés sont alors le prix à payer pour obtenir la guérison.

# 2.1.3 Les cellules NK

Les cellules NK sont de grands lymphocytes granuleux présents en grande quantité au niveau pulmonaire. Elles fonctionnent de façon indépendante de l'antigène. Leur activation est contrôlée par de nombreux récepteurs inhibiteurs qui se lient aux molécules du HLA sur les cellules saines ainsi que par de nombreux récepteurs activateurs qui détectent les cellules stressées ou endommagées et initient les fonctions effectrices de ces cellules (155).

Les cellules NK contribuent à la transition d'un environnement initial pro-inflammatoire à une réponse adaptative spécifique grâce à la production d'IFNy et au renforcement de la réponse lymphocytaire T CD8+ (156–158). Elles participent aussi à la clairance virale et limitent la propagation de l'infection virale par leur activité cytotoxique grâce au relargage de perforines et de granzymes ou à l'apoptose des cellules cibles par la voie Fas/Fas-ligand (159).

Il a été montré chez la souris que l'infection grippale entraine une augmentation de leur recrutement au niveau pulmonaire (160). Cette augmentation du recrutement des NK survient au bout de quelques jours, après le recrutement des monocytes et des PNN mais avant celui des lymphocytes (161).

La sévérité de l'infection influence le rôle bénéfique ou délétère des cellules NK : dans les modèles murins d'infection virale modérée elles sont protectrices, mais lors d'infections avec de fortes charges virales elles participent à la pathogénèse (162). Dans les modèles humains, il a été montré que le virus infecte directement les NK dans les poumons et altère leurs fonctions cytotoxiques (163). Une diminution du nombre de cellules NK sanguines a aussi été observée dans plusieurs études chez les patients qui présentent des formes de grippe graves (164–166).

## 2.1.4 Les cellules T natural killer (NKT)

Les cellules T *natural killer* sont des lymphocytes T innés qui expriment certains récepteurs des cellules NK. Les cellules NKT sont classées en différents sous-type (type I ou invariant et type II) en fonction du type de récepteur de cellule T (TCR) qu'elles expriment (167). Les cellules NKT de type I sont celles dont le rôle est le plus étudié dans les infections virales. Elles augmentent la réponse effectrice par la production d'IFNy qui stimule les lymphocytes T et les cellules NK et elles participent à la maturation des cellules dendritiques (167,168). Elles ont aussi un rôle protecteur dans l'infection par le virus influenza en régulant l'activité des monocytes et en sécrétant de l'IL-22 qui favorise la réparation cellulaire durant la phase de guérison (168). Dans un modèle murin d'infection modérée par le virus influenza, l'activation des cellules NKT diminue la perte de poids ainsi que les titres viraux et augmente la réponse immunitaire innée sans affecter la réponse spécifique des lymphocytes T CD8 (169). Dans un modèle d'infection sévère, les souris déficientes en cellules NKT présentent une atteinte plus grave ainsi qu'une infiltration pulmonaire de monocytes pro-inflammatoires plus importante (170). La présence des cellules NKT semble donc nécessaire afin d'éviter un emballement de la réponse monocytaire et permet d'assurer une activation optimale des cellules T.

#### 2.1.5 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules professionnelles présentatrices de l'antigène. Elles font le lien entre la réponse immunitaire innée et adaptative : en effet elles présentent les antigènes viraux aux lymphocytes T et B naïfs et matures ce qui permet d'initier la réponse immunitaire adaptative. Elles sont présentes dans le tractus respiratoire haut et bas même en dehors de toute infection et elles y jouent un rôle de sentinelle (171). Les cellules dendritiques sont divisées en trois sous-populations : les cellules dendritiques conventionnelles, les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les cellules dendritiques dérivées des monocytes.

L'acquisition d'antigènes viraux par les cellules dendritiques conventionnelles lors d'une infection se fait par deux mécanismes : soit par l'infection des cellules dendritiques par le virus influenza, soit par la phagocytose de particules virales ou de cellules épithéliales apoptotiques. Elles migrent alors dans les ganglions lymphatiques où elles présentent ces antigènes aux lymphocytes T CD4 et CD8 ce qui entraine leur prolifération et leur différentiation (171,172).

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes produisent de l'IFN de type I en réponse à l'infection virale et participent ainsi à l'initiation de la réponse inflammatoire et de la réponse immunitaire innée. Elles semblent cependant avoir un rôle limité dans la réponse à l'infection par le virus influenza car leur délétion n'a pas d'impact sur la clairance virale ni sur la sévérité de l'infection (173).

Les cellules dendritiques dérivées des monocytes augmentent la réponse inflammatoire en produisant des chimiokines CXCL10 et CCL2 qui attirent de nouveaux monocytes au niveau pulmonaire. Elles participent aussi à la clairance virale par la production de cytokines pro-inflammatoires qui activent les lymphocytes T CD8 et les cellules NK (171). Une balance entre la clairance virale et l'activation de l'inflammation est nécessaire car des études ont montré des rôles à la fois protecteurs et délétères de ces cellules. Un excès de cellules dendritiques dérivées des monocytes produisant de fortes concentrations de TNF- $\alpha$  et d'oxyde nitrique est associé à une morbidité et une mortalité plus élevée, mais la délétion complète de ces cellules aboutit à une infection virale incontrôlée (171,174).

# 2.2 Immunité adaptative

#### 2.2.1 Immunité humorale

La reconnaissance d'antigènes spécifiques du virus influenza par les lymphocytes B entraine leur différenciation en plasmocytes et la production d'anticorps spécifiques. Une fraction des lymphocytes TCD4 appelée cellules T helper folliculaires (T<sub>FH</sub>) facilite la réponse des lymphocytes B pendant l'infection. Elles favorisent la formation de centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires où les lymphocytes B maturent, prolifèrent, subissent une commutation de classe et se différencient en plasmocytes ou en lymphocytes mémoire. Le nombre de lymphocytes T<sub>FH</sub> est corrélé à la production d'immunoglobulines (Ig) spécifiques du virus influenza après vaccination chez l'adulte jeune en bonne santé (175).

Chez les individus naïfs, l'immunité humorale a peu de rôle car la production *de novo* d'anticorps spécifiques nécessite 7 à 10 jours, alors que la charge virale maximale est observée 24 à 72 heures après l'infection en fonction de l'inoculum viral et qu'elle diminue rapidement (Figure 10)(176). L'immunité humorale a, en revanche, un rôle très important lors des réinfections. La sécrétion rapide d'IgA spécifiques de la HA au niveau des muqueuses respiratoires prévient l'infection des cellules épithéliales. Les IgG qui sont présents en faible quantité dans les sécrétions nasales ont un rôle plus important dans la défense du tractus respiratoire inférieur où elles sont plus abondantes (177).

Les anticorps sont impliqués dans la résolution de l'infection par différents mécanismes d'action : limitation de la propagation de l'infection par neutralisation ou inactivation virale, et participation à l'élimination des cellules infectées. Les anticorps neutralisants anti-HA sont dirigés contre des épitopes de la tête de la HA. Ce sont les anticorps qui ont le rôle le plus important dans la prévention de l'infection cellulaire. En effet leur liaison à la HA empêche l'entrée du virus dans la cellule hôte (178). En raison de la grande variabilité antigénique de la tête de la HA, ces anticorps sont assez spécifiques d'une souche virale et ne confèrent pas de protection croisée entre souches différentes ce qui explique la survenue des épidémies saisonnières. En revanche ils protègent de façon durable contre l'infection par des souches proches de la souche rencontrée : ceci a été observé lors de la pandémie A/H1N1 de 2009 où les personnes âgées qui avaient été exposées à un virus proche dans les années 50 possédaient des anticorps qui offraient une protection croisée avec la souche pandémique (179). Les anticorps anti-HA dirigés contre la région très conservée de la queue de la HA neutralisent différents sous-types de virus influenza mais sont présents à des titres faibles chez l'Homme (180,181).

Les anticorps spécifiques de la NA agissent par inhibition de l'activité sialidase de la NA et limitent ainsi la diffusion virale et donc la sévérité et la durée de l'infection (182). L'opsonisation des virus par les anticorps facilite l'activation du complément et la phagocytose par les macrophages et les PNN. Enfin, les anticorps peuvent se lier aux protéines virales présentes à la surface des cellules infectées, initier la cascade du complément et la cytotoxicité dépendante des anticorps qui permet l'élimination des cellules infectées (183).

Comme pour les cellules de l'immunité innée, la réponse immunitaire adaptative est essentielle à la clairance virale mais si cette réponse est trop intense, elle peut endommager les fonctions respiratoires suite à la perte de l'intégrité de l'épithélium respiratoire, la rupture de la barrière épithéliale-endothéliale et l'accumulation de corps apoptotiques et de débris cellulaires dans les voies respiratoires.



# Figure 10 : Réponse immunitaire durant les infections primaires et secondaires par le virus influenza, adapté de Petrova (184).

L'axe vertical de chaque panel représente la contribution relative des différents composants de la réponse immunitaire lors de l'infection par le virus influenza.

La ligne rouge correspond à l'axe vertical de droite qui représente le titre viral relatif.

- a) Chez un individu naïf, la réponse immunitaire innée est majoritaire. La charge virale est élevée. La mise en place de la réponse adaptative nécessite environ 6 jours et apparait alors que la charge virale s'est quasiment négativée.
- b) Lors d'une réinfection avec une souche possédant une antigénicité croisée avec les souches déjà rencontrées par l'individu, une réponse immunitaire mémoire se met en place rapidement (en vert) en parallèle de la réponse immunitaire innée. Elles permettent de limiter la multiplication virale. La génération d'une immunité adaptative spécifique intervient de nouveau après le pic de charge virale.
- c) En cas d'infection avec un nouveau variant antigénique, il n'y a pas d'immunité croisée. La charge virale est similaire à celle observée lors d'une infection primaire.

## 2.2.2 Immunité cellulaire

La réponse immunitaire cellulaire à l'infection par le virus influenza est composée d'une réponse lymphocytaire T CD4 et T CD8 (Figure 11).

Les lymphocytes T CD4 sont activés après reconnaissance de peptides antigéniques viraux présentés par des molécules du CMH de classe II portées par des cellules présentatrices d'antigène. En fonction des cytokines présentes ils se différencient en lymphocytes T CD4 auxilliaires de type 1 (lymphocyte T helper 1, Th1) ou de type 2 (lymphocyte T helper 2, Th2) (185). Ils ont un rôle important dans la clairance du virus influenza en permettant l'augmentation du nombre de lymphocytes TCD8 et des lymphocytes B (84). Les Th1 favorisent l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et sont essentiels

au développement d'une réponse T CD8 mémoire (186). Les Th2 favorisent l'activation et la différenciation des lymphocytes B et donc la production d'anticorps.

Lors d'une infection par le virus influenza, des épitopes viraux associés au CMH de classe I activent les lymphocytes T CD8 naïfs dans les ganglions lymphatiques. Les lymphocytes se différencient alors en lymphocytes T cytotoxiques. L'activation de ces cellules entraine leur migration vers le site de l'infection (187). Les lymphocytes T cytotoxiques provoquent l'apoptose des cellules infectées suite à l'activation de la voie Fas/Fas ligand et à la production de perforines et de granzymes (188). Ils produisent aussi des cytokines telles que l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  qui augmentent l'expression du CMH et favorisent ainsi la présentation antigénique (189,190).

Les lymphocytes T CD8 sont également impliqués dans le contrôle de l'inflammation : en réponse à l'IL2 produite par les lymphocytes T CD4 et à l'IL27 produite par les macrophages, ils produisent de l'IL10 qui est une cytokine anti-inflammatoire (191).

L'activité des lymphocytes T CD8 peut aussi être responsable de lésions du tractus respiratoire notamment lorsque les lymphocytes TCD8 n'arrivent pas à contrôler la charge virale : dans les modèles murins, une infection avec un faible inoculum met en évidence un effet protecteur des lymphocytes T CD8 alors qu'avec un fort inoculum ils sont associés à des formes sévères et à une mortalité accrue (192). Le rôle aggravant des lymphocytes TCD8 dans l'infection grippale est lié en grande partie à la dérégulation de la production de cytokines pro-inflammatoires. Ce phénomène apparait lorsque la clairance virale est retardée : en effet l'activation des lymphocytes TCD8 et la production de cytokines est alors prolongée, participant ainsi aux lésions de l'épithélium pulmonaire et augmentant l'infiltration pulmonaire (119).

En plus des lymphocytes T CD4 et CD8, deux autres types de lymphocytes sont activés lors d'une infection grippale : les lymphocytes Th17 et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Ils contrôlent la réponse des lymphocytes T CD8 et CD4 afin de limiter l'effet pathogène de ces cellules (193,194). Les lymphocytes Th17 inhibent les fonctions des lymphocytes Treg grâce à la production d'IL-6. Ils favorisent ainsi la réponse lymphocytaire T *helper* (193).



**Figure 11 : Réponse immunitaire humorale et cellulaire à l'infection grippale. D'après Van de sandt et al (84).** Les flèches en traits pleins représentent la réponse immunitaire lors d'une infection primaire. Les flèches en pointillés représentent la réponse immunitaire mémoire plus rapide lors d'une réinfection. Les cellules présentatrices d'antigènes présentent les peptides viraux aux lymphocytes T CD4 ou CD8. Les cellules T CD4 se différencient en lymphocytes Th1 ou Th2 et en lymphocytes mémoires. Les lymphocytes T CD8 se différencient en lymphocytes T cytotoxiques ou en lymphocytes mémoires.

# 3 Complications respiratoires de l'infection par le virus influenza

Les complications pulmonaires sont les complications les plus fréquentes de l'infection par le virus influenza. Deux types de pneumonies sont observés lors de l'infection par le virus influenza : les pneumonies virales qui sont la conséquence d'une réplication virale au niveau de l'appareil respiratoire bas et les pneumonies bactériennes qui apparaissent soit lors d'une co-infection soit lors d'une surinfection bactérienne post-influenza.

# 3.1 Pneumonie virale et syndrome de détresse respiratoire aigu

# 3.1.1 Epidémiologie et définitions

La première description de pneumonie virale liée au virus Influenza date de la pandémie de 1958-1959 (195). La majorité des cas de pneumonies virales sévères ont été observés lors de pandémies grippales

ou lors d'infection par des virus aviaires tels que H5N1 et H7N9 (196,197). En dehors des épisodes pandémiques, les cas de pneumonies virales dues au virus influenza sont observés chez des patients qui présentent des facteurs de risque de gravité tels que des pathologies cardiaques ou pulmonaires chroniques (198). D'un point de vue clinique les patients présentent les symptômes classiques de la grippe suivis d'une aggravation brutale. Au niveau anatomo-pathologique, les observations ont révélé la présence d'une bronchite nécrosante, de membranes hyalines, d'hémorragies et d'oedèmes intra-alvéolaires, et d'une inflammation interstitielle sans qu'une co-infection bactérienne puisse être mise en évidence (195).

Dans les formes les plus graves, la pneumonie virale peut conduire à l'apparition d'un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) (199–201). C'est un œdème pulmonaire lésionnel caractérisé par une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales des capillaires pulmonaires et des cellules épithéliales alvéolaires. Il est responsable d'une hypoxémie aigue dont la sévérité est classée en trois grades (léger, modéré, sévère) selon le rapport entre la pression partielle en oxygène et la fraction inspirée d'oxygène (ratio PaO2/FiO2) (202). Cliniquement le SDRA est caractérisé par une cyanose, une hypoxémie, un œdème pulmonaire et une aggravation de la détresse respiratoire dans le temps, qui peut engendrer une déficience multi-organes et possède un fort taux de mortalité (jusqu'à 60%) (1). Dans les cas d'infections grippales, il est responsable de la majorité des décès observés (200,203).

## 3.1.2 Physiopathologie de la pneumonie virale et de l'apparition d'un SDRA

Le bon fonctionnement de l'arbre respiratoire nécessite la préservation de l'architecture pulmonaire et de l'intégrité de la barrière endothéliale-épithéliale entre le tractus respiratoire et la circulation sanguine qui permet l'oxygénation correcte des tissus. Lors d'une infection sévère par le virus influenza, l'épithélium respiratoire peut être endommagé par la réponse immunitaire et par la réplication virale intracellulaire. Le degré de modification de l'architecture et d'altération fonctionnelle des fonctions respiratoires, et donc par conséquent la présentation clinique, dépendent de la diffusion du virus dans le tractus respiratoire.

Suite à l'infection du tractus respiratoire haut, le virus influenza a la capacité d'atteindre le tractus respiratoire inférieur : d'abord les bronches et les bronchioles puis, si l'infection n'est pas contrôlée, les alvéoles pulmonaires (204). Cette diffusion progressive du virus dans l'arbre respiratoire est corrélée à la présentation clinique : des symptômes correspondants à une infection du tractus respiratoire supérieur sont observés avant que les manifestations cliniques correspondant à une

infection profonde n'apparaissent. Ces symptômes cliniques sont le reflet de la perte d'intégrité des jonctions intercellulaires suite à l'apoptose et la nécrose des cellules épithéliales infectées (Figure 12). Cette rupture de la barrière alvéolo-capillaire entraine une augmentation de la production de mucus, une fuite de liquide vasculaire et un œdème (205–207). De plus, les cellules épithéliales infectées produisent des chimiokines (CCL2, CCL5, CXCL10) qui augmentent la migration des polynucléaires neutrophiles et monocytes au niveau des alvéoles pulmonaires. Les cellules endothéliales sont elles aussi activées et présentent une surexpression des molécules d'adhésion pour l'extravasation des leucocytes à leur surface et elles sécrètent aussi des chimiokines (CCL2 et CXCL10, IFNa, IL6, TNFa et IFNy). L'action conjuguée des cytokines produites par les cellules épithéliales et endothéliales augmente la migration des PNN et monocytes au niveau des alvéoles pulmonaires. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre consacré à la réponse immunitaire, le recrutement de leucocytes en réponse aux cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules épithéliales infectées et par les cellules de l'immunité résidentes pulmonaires participe à l'aggravation des lésions (Figure 13). Les leucocytes recrutés propagent l'œdème, augmentent les sécrétions de mucus et participent ainsi à l'exacerbation des symptômes. Le recrutement excessif de leucocytes au niveau pulmonaire est aussi responsable d'un relargage de quantité importante de métabolites de l'oxyde nitrique et de radicaux oxygénés qui provoquent des lésions pulmonaires (145,208).

Une boucle d'amplification pro-inflammatoire peut se mettre en place : plus il y a de cytokines proinflammatoires et de chimiokines, plus l'afflux de leucocytes est important, plus ces leucocytes produisent de nouvelles cytokines et chimiokines. De plus les cytokines proinflammatoires produites (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN $\alpha/\beta$ ) ont la capacité d'augmenter la production de chimiokines (MCP-1, MCP-3 et IP-10) ce qui augmente encore la quantité de leucocytes recrutés (146). L'emballement de la réponse pro-inflammatoire associé à une perte de contrôle par la réponse anti-inflammatoire est appelé orage cytokinique. Des cas d'orages cytokiniques ont été observés après l'infection de souris par la souche de grippe pandémique de 1918 ou de grippe aviaire H5N1 et lors d'infections avec de fortes charges virales de virus H5N1 chez l'homme (141,209). Des concentrations particulièrement élevées d'IFNs, de TNFs, d'interleukines et de chimiokines ont été observées chez des patients hospitalisés pour grippe grave avec la souche aviaire H5N1 (210).



# Figure 12 : Rôle des cellules épithéliales et endothéliales alvéolaires dans l'apparition du SDRA lors d'une infection grippale, adapté de Short (1).

A) (i) Le virus influenza A inhibe l'activité du canal épithélial à sodium (ENaC). Il entraine l'apoptose ou la nécrose des cellules épithéliales (ii), la production de cytokines proinflammatoires (iii) et la rupture des jonctions intercellulaires (iv). Toutes ces perturbations permettent l'accumulation de fluide vasculaire dans les alvéoles pulmonaires.

B) Les cellules endothéliales permettent l'extravasation de PNN et monocytes vers les alvéoles pulmonaires (v et vi). Elles produisent aussi de nombreuses cytokines pro-inflammatoires suite à l'infection grippale (vii).



**Figure 13 : Rôle des PNN et macrophages dans la physiopathologie du SDRA lors d'une infection grippale, d'après Short (1).** A) Les PNN participent aux lésions de la barrière epithéliale-endothéliale via la production de radicaux oxygénés libres (i), de cytokines pro-inflammatoires (ii) et des NETs (iii). B) Les macrophages participent aux lésions de la barrière épithéliale-endothéliale par l'activation du domaine TRAIL (iv), par la production de cytokines pro-inflammatoires (v) et d'oxyde nitrique (vi).

En raison de la diminution progressive du diamètre des voies respiratoires, l'inflammation et les lésions du tractus respiratoire inférieur altèrent plus sérieusement les fonctions respiratoires que les lésions du tractus respiratoire supérieur. De plus, l'absence de cellules épithéliales ciliées dans les voies respiratoires inférieures limite l'expulsion du mucus, de l'exsudat accumulé, des bactéries et des débris cellulaires. Cet encombrement pulmonaire peut limiter le passage de l'air jusqu'aux alvéoles et empêcher ainsi les échanges gazeux. Dans les cas les plus graves, les lésions de la structure pulmonaire atteignent les alvéoles pulmonaires. Si ces changements sont importants ils conduisent à l'apparition de lésions alvéolaires diffuses et se manifestent cliniquement par l'apparition d'un SDRA (Figure 14) (1).



#### Figure 14 : Physiopathologie du SDRA grippal, d'après Short (1).

A) modèle schématique d'une alvéole pulmonaire. Le cadrant en haut à droite correspond à une alvéole normale qui permet des échanges gazeux optimaux. Le cadrant en bas à droite montre l'infection des cellules épithéliales par le virus influenza et leur apoptose ou nécrose. L'infection des cellules épithéliales entraine aussi la production de cytokines. Le cadrant en bas à gauche montre l'afflux de PNN et les lésions qu'ils provoquent suite à la production de cytokines et au relargage de réactifs oxygénés. Le cadrant en haut à gauche montre la participation des macrophages aux lésions de l'épithélium alvéolaire suite à la production de cytokines pro-inflammatoires, d'oxyde nitrique et l'activation du système TRAIL. Au fur et à mesure de l'aggravation des lésions de la barrière épithéliale-endothéliale, les alvéoles se remplissent de fluide vasculaire qui compromet de plus en plus les échanges gazeux. B) Ces coupes histologiques d'alvéoles de furet infecté par un virus H5N1 représentent les mêmes étapes de l'apparition du SDRA que le modèle schématique A).

En parallèle de l'inflammation pulmonaire, une immunosuppression systémique peut être observée chez les patients avec un SDRA non résolutif. Ceci a été montré sur une étude prospective clinique dans laquelle les leucocytes des patients présentant un SDRA consécutif à une blessure ou une chirurgie produisent de faibles concentrations de cytokines après exposition à des lipopolysaccharides (211).

# 3.2 Pneumonies bactériennes post-influenza

#### 3.2.1 Epidémiologie

Les pneumonies bactériennes post-influenza ont été rapportées pour la première fois durant la pandémie de 1918 (212). Elles sont observées à la fois lors des épidémies saisonnières et lors des pandémies mais elles sont plus fréquentes lors des pandémies que lors des épidémies saisonnières (213). Pour la pandémie de 1918, plus de 90% des décès sont attribués à une pneumonie bactérienne post-influenza (212). Pour les pandémies de 1957 et 1968, elles ont concerné 50 à 95 % des patients ayant présenté des infections engageant le pronostic vital (207) et lors de la dernière pandémie en 2009, les patients infectés par le virus influenza présentaient une pneumonie bactérienne dans 25 à 50% des cas (203,214,215). Au cours des épidémies annuelles, la fréquence de ces infections bactériennes post-influenza dépend de la population étudiée : elle est faible dans la population générale (1-2%), augmente chez les patients qui présentent des comorbidités (2,5%) et atteint son maximum chez le sujet âgé (13-27%) (216,217).

Les co-infections grippe-bactérie sont des complications graves de la grippe : environ 40% de ces coinfections nécessitent une hospitalisation (218). De plus, lors des épidémies saisonnières de grippe un quart des décès est lié à des pneumonies bactériennes secondaires (219).

Cliniquement les patients présentent d'abord les symptômes typiques de la grippe suivie par une résolution des symptômes puis 4 à 14 jours plus tard par une récurrence de la fièvre, de la dyspnée et d'une toux productive (220).

Les deux bactéries les plus fréquemment isolées dans les prélèvements respiratoires chez ces patients sont *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (3).

# 3.2.2 Physiopathologie de la pneumonie bactérienne post-influenza

Lors d'une infection par le virus Influenza, de nombreuses modifications au niveau pulmonaire facilitent une infection bactérienne secondaire. Les mécanismes de cette synergie entre influenza et bactérie incluent une augmentation de la liaison et de l'infection par les bactéries, une augmentation de la réplication virale et une modification de la réponse inflammatoire.

#### 3.2.2.1 Altération de la physiologie pulmonaire

En temps normal, les cellules de l'épithélium cilié respiratoire éliminent les bactéries grâce à leurs battements muco-ciliaires. La destruction de cet épithélium cilié par le virus entraine une diminution de la clairance muco-ciliaire accompagnée d'une augmentation de la stase bactérienne (Figure 15) (221). De plus, les dommages épithéliaux et la cicatrisation des cellules dans les voies respiratoires permettent l'accès des bactéries à de nombreux nutriments, ce qui favorise leur rapidité de multiplication (222,223).



#### Figure 15 : Interactions entre le virus influenza, la bactérie et l'hôte lors des co-infections, d'après McCullers (224).

A) De nombreux facteurs de virulence viraux interagissent directement avec les poumons ou avec le système immunitaire. LA HA permet l'attachement du virus par la liaison aux acides sialiques cellulaires. De nombreuses protéines extracellulaires peuvent se lier à la HA et ainsi neutraliser et éliminer le virus du tractus respiratoire inférieur. Les virus avec des HA capables de se lier à la fois aux acides sialiques  $\alpha 2,3$  et  $\alpha 2,6$  pénètrent plus profondément dans le poumon. La NA clive les acides sialiques des mucines et des cellules épithéliales, ce qui favorise l'adhésion des bactéries à l'épithélium pulmonaire. PB1-F2 a une action cytotoxique et pro-inflammatoire. NS1module la réponse immunitaire et la voie IFN. B) L'infection virale crée des dommages épithéliaux favorise la stase et la multiplication bactérienne. Elle entraine aussi la lyse des macrophages alvéolaires ainsi qu'une modification fonctionnelle des cellules de l'immunité qui créent une fenêtre de susceptibilité à la surinfection bactérienne. C) Certaines bactéries profitent de cette altération des défenses de l'hôte pour se multiplier et établir une infection. Les facteurs de virulence viraux et bactériens ont une action synergique pour aggraver les lésions pulmonaires soit en provoquant des lésions directes de l'épithélium pulmonaire, soit suite à l'activation excessive du système immunitaire.

#### 3.2.2.2 Augmentation de la disponibilité des récepteurs pour les bactéries

L'infection virale facilite aussi la transition entre un état de colonisation par des bactéries commensales des voies respiratoires hautes et un état d'infection en favorisant l'accès aux voies respiratoires basses. Différents mécanismes interviennent en fonction de la phase de la pathologie. En phase de réplication la neuraminidase clive les acides sialiques des mucines et de l'épithélium respiratoire et favorise l'adhésion des bactéries (Figure 15) (225). Lors de la phase d'inflammation l'adhésion bactérienne est facilitée par l'exposition de la membrane basale (226). Enfin, en phase de réparation de l'épithélium, il peut y avoir des dépôts de fibrine et de fibrinogène et la membrane basale peut être encore accessible dans certaines zones ce qui constitue des sites d'adhésion pour les bactéries (227). Ce mécanisme de synergie entre le virus influenza et les bactéries concorde avec les observations cliniques dans lesquelles certaines surinfections bactériennes surviennent lorsque les patients sont guéris de leur infection primitive par le virus Influenza (195).

Les virus influenza fortement pathogènes, tels que les virus responsables de pandémie sont de plus responsables de lésions pulmonaires intenses. Grâce à la desquamation de l'épithélium respiratoire, ils permettent l'exposition des sites d'attachement pour les bactéries tels que la membrane basale et des éléments de la matrice extracellulaire (fibrine, fibrinogène, collagène) reconnus par les MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) des bactéries (228–230). Lors des pandémies, l'autopsie de patients a montré l'adhérence de bactéries à des sites de dommages épithéliaux (212,215,231).

#### 3.2.2.3 Dysfonctionnement du système immunitaire pulmonaire

L'infection grippale provoque un déficit quantitatif et une altération fonctionnelle de nombreuses populations leucocytaires qui participent à l'immunité antibactérienne, notamment les macrophages alvéolaires et les PNN (Figure 15). Ainsi, il a été montré dans un modèle murin que l'infection par le virus influenza entraine l'apoptose de plus de 90% des macrophages alvéolaires, créant une fenêtre de susceptibilité à la surinfection bactérienne avant que ces macrophages alvéolaires ne soient remplacés au bout de deux semaines par des macrophages issus de la différentiation de monocytes circulants (232).

Bien que les IFNs de type I aient des propriétés antivirales reconnues, quand cette production n'intervient pas au bon moment ou en quantité trop faible ou trop importante, elle peut avoir des conséquences délétères. Des modèles d'infection murine ont montré que l'IFN de type I altère la

capacité de réponse des cellules NK en diminuant leur capacité de sécrétion de TNF- $\alpha$  (233) et qu'il diminue la capacité de phagocytose bactérienne des macrophages et des PNN en inhibant la production de chimiokines (234). L'inhibition de la production de réactifs oxygénés libres par les macrophages et les PNN en réponse à l'infection bactérienne est aussi observée suite à l'infection par le virus influenza (10). De plus, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T activés inhibe également la phagocytose bactérienne par les macrophages alvéolaires (235).

L'établissement d'un état anti-inflammatoire pendant la phase de réparation de l'épithélium respiratoire est nécessaire afin de restaurer l'homéostasie pulmonaire mais il supprime de nombreux mécanismes de reconnaissance et de clairance bactérienne (236). Dans des modèles murins une augmentation de l'IL-10 est observée lors des co-infections grippe/*Streptococcus pneumoniae* et l'utilisation d'anticorps neutralisants de l'IL-10 améliore la survie (237,238). Le seuil d'activation des cellules myéloïdes suite à l'augmentation de l'expression du CD200 favorise aussi la multiplication bactérienne (239). Par ailleurs, l'internalisation des TLR2, 4 et 5 des macrophages alvéolaires pendant plusieurs mois suite à l'infection virale ralentit la mise en place d'une réponse immunitaire efficace lors d'une infection secondaire et empêche la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires nécessaires au recrutement de leucocytes (9).

#### 3.2.2.4 Augmentation de l'inflammation

Une fois l'infection bactérienne établie, les facteurs de virulence viraux et bactériens peuvent agir de façon synergique et être responsables d'une inflammation excessive qui participe à la gravité des lésions. Cette synergie peut augmenter la production de cytokines jusqu'à l'orage cytokinique et l'apparition d'un SDRA dans les cas les plus graves. Ainsi, l'augmentation de la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, KC/IL-18, MIP-2, MIP-1 $\alpha$  et un recrutement excessif de PNN et monocytes au niveau pulmonaire été observés dans des modèles animaux ainsi que chez des patients en SDRA (5).

# 3.3 Exemple des co-infections influenza/S. aureus

#### 3.3.1 Epidémiologie des co-infections influenza/S. aureus

La pneumonie à *S. aureus* post-influenza a été documentée pour la première fois durant la pandémie de grippe de 1918 durant laquelle elle a entrainé le décès de nombreux patients jeunes et sans facteurs de risque (88). Lors de l'épidémie de grippe de 1957, *S. aureus* était de nouveau la bactérie la plus

fréquemment isolée chez les patients grippés (240). Depuis le début des années 2000, l'émergence du clone de *S. aureus* communautaire résistant à la méticilline USA 300 a renforcé la place de *S. aureus* comme pathogène majeur des co-infections avec le virus influenza, à la fois en terme de fréquence et de gravité (241,242).

#### 3.3.2 Staphylococcus aureus

*Staphylococcus aureus* est une bactérie qui a l'aspect de cocci à gram positif à la coloration de Gram classiquement regroupés en amas ou grappe de raisin. C'est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses chez l'homme. 20% de la population est porteuse de *S. aureus* de façon permanente, le reste de la population étant porteur de façon intermittente (243,244).

La rupture d'équilibre entre l'hôte et la bactérie est responsable de tableaux infectieux. Les mécanismes responsables de cette rupture d'équilibre peuvent être divisés en deux grandes catégories : soit la diminution des défenses de l'hôte (rupture de la barrière cutanéo-muqueuse, altération des défenses immunitaires (brûlures, escarres, ou immunodépression), soit l'augmentation de la virulence de *S. aureus* liée au niveau d'expression de facteurs de virulence différent d'une souche à l'autre.

*S. aureus* est responsable à la fois d'infections communautaires et d'infections nosocomiales que l'on divise classiquement en deux grandes classes d'infections : les infections suppuratives liées au caractère pyogène de *S. aureus* et les infections toxiniques liées à la production spécifique de différentes toxines.

Les infections suppuratives s'observent le plus fréquemment chez des patients porteurs de *S. aureus*. Elles se présentent sous forme d'infections loco-régionales cutanéo-muqueuses (folliculites, impétigo, furoncles, panaris, cellulites, otites, sinusites...). Leurs complications principales sont liées à une extension loco-régionale ou à une diffusion hématogène et des infections profondes peuvent alors être observées (septicémies, endocardites, pneumopathies, ostéomyélites, arthrites, méningites).

*S. aureus* a développé des mécanismes de résistance aux antibiotiques utilisés pour traiter les infections dont il est responsable. Ainsi 90% des souches sont actuellement résistantes à la pénicilline G, premier antibiotique utilisé pour traiter ces infections (245). De même des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM), première pénicilline semi-synthétique résistante à la pénicillinase, ont été observées deux ans seulement après le début de son utilisation (246). Ces souches ont dans un premier temps été isolées uniquement au cours d'infections nosocomiales (247). Le début des années 2000 a vu l'apparition d'infections communautaires liées à des souches de SARM communautaire (CA-MRSA) (241). Les CA-MRSA se différencient des SARM hospitaliers par leur fond

génétique et par leur plus grande virulence, avec notamment la production de la leucocidine de Panton-Valentine (PVL), d'hémolysine  $\alpha$  (HIa), et de phénol-solubles modulines (PSM) (241,248–253). En Europe la souche de CA-MRSA prédominante est la souche ST80 alors qu'aux Etats-Unis le clone majoritaire est le clone USA 300 qui est responsable de 60% des infections communautaires de la peau et des tissus mous (254).

# 3.3.3 Infection pulmonaire à Staphylococcus aureus

*Staphylococcus aureus* est une bactérie associée à de nombreuses formes d'infections touchant l'arbre respiratoire, allant de la colonisation asymptomatique à la pneumonie nécrosante fulminante. Les mécanismes impliqués dans le passage d'une colonisation à une infection invasive ne sont pas complètement élucidés mais ils reposent à la fois sur des facteurs de virulence de la bactérie et sur la réponse immunitaire de l'hôte.

La coordination de l'expression de nombreux facteurs de virulence est nécessaire à l'établissement d'une infection pulmonaire. Cela inclut des protéines de surface telles que les MSCRAMMs pour établir la colonisation, l'expression de systèmes d'acquisition du fer pour permettre la croissance bactérienne, et la possession de molécules de surface afin d'échapper au système immunitaire. De nombreuses toxines permettent à la fois de lyser leurs cellules cibles et d'échapper à la clairance par le système immunitaire.

Les facteurs de virulence et toxines jugés pertinents dans le cadre de cette thèse sont détaillés ci-après.

# 3.3.4 Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* impliqués dans les infections pulmonaires

## 3.3.4.1 Les facteurs d'adhésion

La physiopathologie de l'infection pulmonaire à *S. aureus* est habituellement initiée par l'aspiration de bactéries qui colonisent la cavité nasale. Ainsi les patients colonisés sont plus à risque de développer une infection invasive que les autres.

La première étape de l'infection est l'adhésion de la bactérie aux protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte (fibronectine, collagène, protéoglycane, élastine). *S. aureus* possède plusieurs facteurs d'adhésion aux rôles redondants qui facilitent cette étape de colonisation.

Le Clumping factor B est impliqué dans le développement des infections respiratoires en permettant l'attachement à la cytokératine 10 ce qui favorise la colonisation au niveau des cellules épithéliales nasales (255).

Les protéines de liaison à la fibronectine (FnbpA et FnbpB) se lient à la fibronectine, à l'élastine et FnbpA se lie aussi au fibrinogène. Elles sont impliquées dans l'adhérence de *S. aureus* aux cellules indifférenciées de l'épithélium respiratoire, et favorise l'internalisation dans les cellules épithéliales (256).

#### 3.3.4.2 La protéine A

La protéine A (SpA) est une protéine de surface de 40 à 60 KDa. Elle est produite en abondance par toutes les souches de S. aureus. Elle peut être soit liée à la paroi bactérienne soit sécrétée. C'est un des facteurs de virulence de S. aureus le plus complexe de par la multitude d'interactions avec le système immunitaire de l'hôte. Elle possède de nombreuses fonctions : au début d'une infection intravasculaire c'est une adhésine avec le facteur Willebrand et les cellules endothéliales, elle est antiopsonisante grâce à sa liaison au fragment Fc des IgG (257), c'est aussi un superantigène pour les lymphocytes B : elle provoque une activation polyclonale de ces lymphocytes puis leur apoptose (258). Enfin, la protéine A se lie au récepteur 1 du TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor Receptor* 1, TNFR1) (259), présent sur les leucocytes et les cellules épithéliales pulmonaires (260). La protéine A se lie au TNFR1 par son domaine de liaison aux IgG et elle reproduit les effets du TNF- $\alpha$  sur son récepteur : elle active les voies NF-κB et MAPK et engendre la production de nombreuses cytokines par les lymphocytes et les monocytes (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8 et IFN-γ) (261). Elle participe ainsi aux lésions tissulaires en permettant un recrutement massif de PNN ainsi que leur activation (259,262). La protéine A peut aussi limiter l'inflammation en favorisant le clivage de TNFR1 et la libération de sa forme soluble sTNFR1 qui neutralise le TNF-α circulant avant sa liaison à son récepteur membranaire et l'empêche ainsi d'exercer son activité pro-inflammatoire (263).

Le rôle de la protéine A dans la virulence de *S. aureus* a été démontré dans des modèles de sepsis et de pneumonies (259,264,265). Ainsi les souches de *S. aureus* délétées en protéine A provoquent moins de pneumonies que les souches sauvages (259). De plus les souches isolées dans les infections pulmonaires produisent souvent de grandes quantités de protéine A. L'interaction de la protéine A avec son récepteur TNFR1 est essentielle à la survenue d'une pneumonie à *S. aureus* : les souris knock-out pour le récepteur TNFR1 développent moins de pneumonies que les souris sauvages (264).

58

#### 3.3.4.3 Facteurs liés au développement / extension de l'infection

#### 3.3.4.3.1 Les toxines formant des pores

Les toxines formant des pores (*Pore Forming Toxins*, PFT) agissent localement. Elles sont sécrétées sous forme de monomères qui s'oligomérisent à la surface cellulaire et forment des pores dans la membrane cellulaire. Ces pores sont responsables de l'efflux de molécules ce qui provoque la lyse cellulaire et permet ainsi l'extension de l'infection (Figure 16). Les PFT sont classées en deux types de toxines en fonction de leur structure à une ou deux sous-unités.



Figure 16 : Mécanismes d'action des PFT de S. aureus pour la formation de pores membranaires, d'après Dumont (266). L'hémolysine  $\alpha$  se polymérise en heptamère et forme un pore en tonneau  $\beta$ . Pour les leucotoxines qui possèdent 2 sousunités, la formation d'un hétérodimère avec quatre unités de classe S et quatre unités de classe F permet la formation d'un pore en tonneau  $\beta$ .

A forte concentration les PFT sont cytolytiques, mais à concentration sublytique elles sont proinflammatoires. Ce sont les toxines de *S. aureus* les plus inflammatoires : mille fois plus que les superantigènes et 10<sup>6</sup> fois plus que les protéines de surface (267). Elles exercent leur activité proinflammatoire par dérégulation de l'homéostasie cellulaire : la formation de pores membranaires est responsable d'une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et d'une diminution de la concentration de potassium ce qui active différents facteurs de transcription dont NF-κB et l'inflammasome NLRP3 et entraine la production de cytokines pro-inflammatoires (Figure 17) (268). Elles activent aussi les PNN et augmentent leurs capacités de phagocytose et leur bactéricidie (Figure 17) (269).



#### Figure 17 : Propriétés des PFT à concentration sublytique. D'après Alonzo (269).

1 : La liaison de la toxine à son récepteur cellulaire provoque l'activation des PNN et aboutit à l'augmentation de la phagocytose et de leur activité bactéricide grâce à l'augmentation de la production de radicaux oxygénés et de l'exocytose de granules cytotoxiques.

Lorsque les conditions physiologiques sont respectées, les concentrations de potassium et de calcium plasmatiques et extracellulaires sont régulées de façon stricte. Les PFT dérégulent cet équilibre de différentes façons. 2 : La formation de pores membranaires entraine un efflux de potassium intracellulaire qui active l'inflammasome et aboutit à la production d'IL-1 $\beta$ . 3 : Les PFT sont responsables d'une augmentation directe ou indirecte du calcium intracellulaire ce qui entraine l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et la production de cytokines proinflammatoires. 4 : Chez la souris les TLR2 et 4 reconnaissent la PVL ce qui aboutit aussi à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B.

5 : La PVL a une activité apoptotique à concentration sublytique. Ce méchanisme surviendrait après formation de pore membranaire dans la membrane mitochondriale et l'activation des caspase 3 et 9.

## 3.3.4.3.2 L'hémolysine $\alpha$

L'hémolysine  $\alpha$  de *Staphylococcus aureus* (Hla,  $\alpha$  –toxine), est codée par le gène *hla*. 80 à 90% des souches de *S. aureus* sécrètent cette toxine en fin de phase exponentielle. L'expression d'Hla est dépendante du système de régulation globale Agr, elle augmente lors d'interactions avec les cellules

épithéliales. Sa concentration est souche dépendante : elle est en effet produite en plus grande quantité par les souches USA300 (248–251).

Chez l'Homme, Hla possède de nombreuses cellules cibles : cellules endothéliales, cellules épithéliales, érythrocytes, monocytes, macrophages, lymphocytes et plaquettes (270–272). Toutes ces cellules cibles possèdent le récepteur de l'hémolysine  $\alpha$  : la métallo-protéase ADAM 10 (A desintegrin and metalloprotease 10)(273).

A faible concentration (de l'ordre du nanomolaire), Hla établit une liaison spécifique qui nécessite à la fois la présence d'ADAM 10 et des lipides membranaires (273). Elle se polymérise alors en heptamère, entrainant la formation de pores de faibles diamètres (2-3 nm) dans la membrane cellulaire responsable de l'efflux des ions et de la lyse cellulaire (Figure 18) (274). A forte concentration (micromolaire), Hla se lie directement à la membrane lipidique de manière non spécifique, forme des canaux plus larges responsables de l'efflux d'un grand nombre de molécules ce qui provoque la lyse cellulaire (275).

De plus, à concentration sublytique (nanomolaire), Hla favorise la dissémination de la bactérie en augmentant l'activité metalloprotéase d'ADAM 10 responsable de la rupture des jonctions cellulaires et elle altère les battements ciliaires des cellules de l'épithélium respiratoire (276). Hla possède aussi une activité pro-inflammatoire suite à l'activation de caspase-1 et de l'inflammasome entrainant la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 dans de nombreux types cellulaires (cellules endothéliales et épithéliales, monocytes et macrophages) (277,278).





L'interaction entre Hla et son récepteur est responsable de la formation d'un pore transmembranaire et provoque la lyse des cellules cilbes et la rupture de l'adhésion intercellulaire.

Le rôle de l'Hla dans les infections à *S. aureus* a été démontré grâce à des données épidémiologiques et dans des études animales. Hla participe à la sévérité des infections pulmonaires à *S. aureus* : il a été montré que l'infection avec des souches Hla déficientes entrainent une abolition de la mortalité, associée à une réduction de l'inflammation pulmonaire, une réduction de l'afflux des PNNs et de l'inoculum bactérien (279,280).

#### 3.3.4.3.3 Phenol Soluble Modulines (PSMs) et Hémolysine $\delta$

Cette famille est composée de petits peptides (d'une vingtaine à une quarantaine d'AA) amphiphiles récemment découverts, d'abord chez *Staphylococcus epidermidis* puis chez d'autres espèces dont *S. aureus* (281). *S. aureus* possède sept PSMs: les PSM $\alpha$  (PSM $\alpha$ 1, PSM $\alpha$ 2, PSM $\alpha$ 3 et PSM $\alpha$ 4), les PSM $\beta$  (PSM $\beta$ 1 et PSM $\beta$ 2) et l'hémolysine  $\delta$  (252). Comme l'hémolysine  $\alpha$ , les PSM $\alpha$  sont surexprimés par les souches de CA-MRSA notamment pour le clone USA300 épidémique aux Etats-Unis et contribuent à leur virulence (252).

Grâce à leur propriété amphiphile, les PSMs sont des agents surfactants. Ils facilitent ainsi la colonisation des différentes zones de portage des staphylocoques. Ils participent aussi à la formation et au développement du biofilm : grâce à leur action surfactante qui leur permet de former des canaux à travers le biofilm, les nutriments parviennent jusqu'aux couches profondes du biofilm. Enfin ils participent à la dissémination de l'infection en favorisant le détachement du biofilm (282) (Figure 19). Les PSMs possèdent un récepteur, le Formyl Peptide Receptor 2 (FPR2), présent sur de nombreuses cellules dont les monocytes et les polynucléaires neutrophiles (283). L'interaction des PSMs avec leur récepteur leur permet d'exercer leurs propriétés inflammatoires à faible concentration (nanomolaire). Les PSMs de S. epidermidis activent la voie NF- $\kappa$ B et entrainent la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , et IL-6 par les cellules monocytaires (281). Cette activité pro-inflammatoire sur les monocytes n'a cependant pas été retrouvée pour les PSMs de S. aureus (252). L'interaction des PSMs de S. aureus avec leur récepteur au niveau des PNNs conduit à la production d'IL-8 et au recrutement massif de PNN, ainsi qu'à leur activation avec la production de radicaux oxygénés (252,284). Les PSMs possèdent également des propriétés chimioattractantes pour les cellules dendritiques. Ils augmentent leur production d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, et diminuent leur production de cytokines pro-inflammatoires. Ceci diminue la réponse lymphocytaire Th1 et favorise le développement d'une réponse lymphocytaire T régulatrice qui permet l'échappement de S. aureus au système immunitaire (285).

A forte concentration, de l'ordre du micromolaire, les PSMs (excepté les PSM $\beta$  et PSM $\alpha$ 4) et l'hémolysine  $\delta$  ont une activité cytolytique démontrée sur les érythrocytes et les PNNs,

indépendamment de leur interaction avec le FPR2 (252,284,286). PSM $\alpha$ 3 est le plus lytique, devant PSM $\alpha$ 1, PSM $\alpha$ 2 et l'hémolysine  $\delta$ . Le mécanisme n'est pas connu mais cette activité cytolytique pourrait être expliquée par la formation de pores, la déstabilisation de la membrane lors de la liaison, ou la solubilisation de la membrane grâce aux propriétés détergentes de l'hélice alpha amphiphile (268). Les PSMs  $\alpha$  de *S. aureus* sont également capables de lyser les PNNs après avoir été phagocytés (287).



#### Figure 19: Représentation des fonctions biologiques des PSM, d'après Peschel et Otto (288)

A concentration micromolaire, les PSM possèdent des activités indépendantes de la liaison au récepteur FPR2 : ils sont bactéricides vis à vis d'autres espèces bactériennes, ils participent à la restructuration du biofilm, ils permettent l'échappement de la bactérie au phagolysosome, ils ont des propriétés immunomodulatrices et les PSM $\alpha$  sont cytolytiques pour les érythrocytes et les PNN.

A concentration nanomolaire, les PSM possèdent des activités qui dépendent de la liaison aux récepteurs FPR2 : ils sont chimioattractants pour les PNN et ils ont une activité pro-inflammatoire.

Les PSMs participent à l'apparition d'une pneumonie lors d'une infection respiratoire à *S. aureus* et notamment lorsque cette pneumonie fait suite à une infection par le virus influenza. Il a été montré *in vitro* que les PSMs exercent une cytotoxicité et qu'ils entrainent la production d'IL-8 de façon dosedépendante sur les cellules épithéliales pulmonaires A549 et que ces propriétés sont augmentées lorsque les cellules sont infectées par le virus de la grippe (289). Les auteurs ont vérifié ces données *in vivo* dans un modèle murin où la co-infection avec un virus influenza et une souche de *S. aureus* USA300 qui produit des PSMs est associée à des pneumonies plus sévères et à une augmentation de la létalité en comparaison d'une co-infection entre le même virus influenza et la même souche de *S. aureus* USA300 mais qui a été délétée pour la production de PSMs.

#### 3.3.4.3.4 La leucocidine de Panton-Valentine

La PVL est une toxine codée par deux gènes co-transcrits, lukF-PV and lukS-PV, portés par un bactériophage (290) que l'on retrouve chez seulement 1 à 2% des isolats cliniques de *S. aureus*. Cependant cette toxine est produite par plus de 90% des souches CA-MRSA et par la majorité des souches qui sont isolées dans les pneumonies nécrosantes (241,253).

Les récepteurs de la PVL, le C5aR (CD88) et le C5L2, sont nécessaires à l'activité cytolytique de la PVL (291). Le composé S se lie en premier à son récepteur membranaire puis le composé F se fixe au composé S. L'oligomérisation de ce complexe et la formation d'un hétéro-octamère composé de 4 sous-unités S et 4 sous-unités F permet la formation d'un pore dans la membrane cellulaire (Figure 16) (292). La répartition des récepteurs de la PVL sur les cellules cibles est responsable de la différence de susceptibilité cellulaire observée entre leucocytes et inter-espèces (293,294). Ainsi les PNNs sont les leucocytes les plus sensibles à l'activité de la PVL, devant les monocytes et macrophages alors que les lymphocytes qui n'expriment pas de C5aR sont résistants à la PVL (294).

La lyse des cellules cibles par la PVL permet à *S. aureus* d'échapper à la phagocytose mais elle est aussi responsable d'une augmentation de l'inflammation : le relargage de médiateurs pro-inflammatoires et d'enzymes cytoplasmiques par les leucocytes lysés augmente le nombre de leucocytes recrutés et participe à l'apparition de lésions cellulaires (269). La lyse des PNNs entraine la production d'IL-8, chimiokine impliquée dans leur recrutement et leur migration (295). Cette inflammation excessive participe à la sévérité de l'infection, notamment dans les pneumonies nécrosantes (296).

A concentrations sublytiques, la PVL possède une activité pro-inflammatoire (Figure 17) (297). La liaison de la sous-unité S à son récepteur sur les PNNs augmente la phagocytose, la production d'espèces réactives oxygénées et la production de médiateurs pro-inflammatoires (291). Des concentrations sublytiques de PVL augmentent aussi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 $\beta$  par les monocytes et les macrophages suite à l'activation de l'inflammasome. L'IL-1 $\beta$  stimule alors la sécrétion d'IL-8 et de CCL2 par les cellules épithéliales pulmonaires, ce qui augmente le recrutement de PNNs et monocytes au niveau pulmonaire et offre de nouvelles cibles à la PVL (298). Le rôle de la PVL dans les pneumonies à *S. aureus* est controversé. Une méta-analyse des données épidémiologiques n'a pas montré de corrélation entre PVL et pneumonie (299) mais une étude de cas a montré que les pneumonies à *S. aureus* producteurs de PVL évoluaient plus rapidement et engendraient un plus fort taux de létalité que les pneumonies à *S. aureus* ne producteur de PVL a montré que leurs poumons étaient ulcérés et hémorragiques, suggérant une inflammation extrême chez ces patients que les auteurs ont attribuée à la lyse des PNNs et macrophages par la PVL. Une étude chez

le lapin a aussi montré que la délétion du gène codant la PVL dans une souche USA300 entraine des lésions moins sévères, moins de nécrose pulmonaire, moins d'hémorragie alvéolaire, moins d'hémoptysie et finalement une létalité moins élevée que la souche sauvage productrice de PVL (296).

# 3.3.5 La pneumonie nécrosante

La pneumonie nécrosante est une entité clinique rare due à des souches de *S. aureus* productrices de PVL. Elle touche principalement les enfants et les jeunes adultes sans antécédent particulier et elle est souvent précédée par une infection grippale ou un syndrome pseudo-grippal qui évolue rapidement vers une défaillance respiratoire ou un choc septique (301). L'étude de 43 cas cliniques a montré une infection documentée par le virus influenza chez 12 patients et la présence de symptômes typiques d'une infection grippale chez 16 patients (302). Si un traitement n'est pas introduit rapidement après l'apparition des premiers symptômes, le taux de mortalité est très élevé (40-60%) (300). La pneumonie nécrosante se distingue des autres pneumonies à *S. aureus* qui sont liées à des souches qui ne produisent pas de PVL, sont beaucoup plus fréquente, touchent des patients plus âgés (> 60 ans) et ont un taux de mortalité plus faible (47% vs 6%)(300,303).

Les données cliniques connues sur cette pathologie proviennent de l'étude de plusieurs séries de cas dans le monde. Elle est caractérisée par un accès soudain et une aggravation rapide des symptômes, une leucopénie, des hémoptysies et une défaillance respiratoire sévère. Elle est associée à la présence de grandes plages de destruction nécrotiques des poumons.

D'un point de vue physiopathologique, la synergie entre le virus influenza et *S. aureus* est liée aux mécanismes décrits dans le paragraphe « 3.2 Pneumonies bactériennes post-influenza » ainsi qu'aux propriétés de la PVL. De façon synthétique, l'infection par le virus influenza crée des dommages épithéliaux qui favorisent la survenue d'une infection bactérienne en facilitant l'adhérence des bactéries à l'épithélium respiratoire. Le virus inhibe aussi la réponse immunitaire anti-bactérienne : il lyse les macrophages alvéolaires et entraine une modification fonctionnelle des leucocytes ce qui crée une fenêtre de susceptibilité à la surinfection bactérienne. De plus l'infection des cellules épithéliales pulmonaires par le virus influenza entraine la sécrétion de cytokines et chimiokines et permet ainsi le recrutement massif de leucocytes au niveau pulmonaire. Les facteurs de virulence viraux et bactériens ont une action synergique pour aggraver les lésions pulmonaires soit en provoquant des lésions directes de l'épithélium pulmonaire, soit suite à l'activation excessive du système immunitaire. La surinfection par une souche de *S. aureus* productrice de PVL entraine la nécrose massive des PNN et macrophages recrutés. Le relargage du contenu cellulaire des leucocytes (réactifs oxygénés, protéases,

oxyde nitrique) est responsable d'une destruction massive des cellules épithéliales pulmonaires et de la barrière endothéliale aboutissant à l'apparition de grandes plages de nécroses et à une altération des capacités d'oxygénation au niveau des alvéoles pulmonaires (Figure 20).



#### Figure 20 : Physiopathologie de la pneumonie nécrosante, d'après Löffler (302).

L'infection des cellules épithéliales pulmonaires par le virus influenza entraine la sécrétion de cytokines et chimiokines responsables d'un recrutement massif de leucocytes au niveau pulmonaire. La surinfection par une souche de *S. aureus* productrice de PVL entraine la nécrose massive des PNN et macrophages recrutés. Le relargage du contenu cellulaire des leucocytes (réactifs oxygénés, protéases, oxyde nitrique) est responsable d'une destruction massive des cellules épithéliales pulmonaires et de la barrière endothéliale aboutissant à l'apparition de grandes plages de nécroses et à une altération des capacités d'oxygénation au niveau des alvéoles pulmonaires.

# 4 Infections à VRS chez l'adulte

# 4.1 Caractéristiques du VRS

La classification virale a été récemment mise à jour et le VRS, ou *Orthopneumovirus humain*, appartient désormais à la famille des *Pneumoviridae* et au genre *Orthopneumovirus* (304). C'est un virus enveloppé, à ARN simple brin de polarité négative non segmenté qui code 11 protéines (Figure 21) (305). Le VRS possède trois glycoprotéines de surface (la protéine de fusion F, la protéine d'attachement G, et la protéine hydrophobe SH), une protéine de matrice M, cinq protéines du complexe polymérase (la phosphoprotéine P, la nucléoprotéine N, la polymérase L, les protéines M2-1 et M2-2) et deux protéines non structurales (NS1 et NS2) (306).

Les souches de VRS sont divisées en 2 sous-types : les VRS-A et le VRS-B en fonction de l'antigénicité de la protéine G (307). Chaque sous-type A et B possède de nombreux génotypes (308).



#### Figure 21 : Structure du VRS, d'après Jha (309).

Le virus est représenté avec son unique ARN monocaténaire associé aux nucléoprotéines. Il est entouré de sa capside à symétrie hélicoïdale et de son enveloppe dans laquelle sont enchâssées les trois protéines de surface (G, F, SH).

# 4.2 Epidémiologie de l'infection à VRS

Dans les pays tempérés, les infections à VRS surviennent majoritairement l'hiver, avec un pic de fréquence en décembre-janvier alors que dans les pays tropicaux, les infections à VRS surviennent durant la saison des pluies (310). Le VRS est un virus très contagieux et peut entrainer à la fois des épidémies communautaires et nosocomiales (311,312). De nombreuses études rapportent également des épidémies d'infections à VRS dans des établissements d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (313,314).

Le VRS est l'agent étiologique le plus fréquent des infections respiratoires basses chez l'enfant, avec 33 millions de cas et 160000 à 190000 décès chaque année, ce qui représente 6,7% de la létalité chez les enfants de moins de un an (315). La majorité des enfants s'infecte avant l'âge d'un an et la quasitotalité des enfants ont rencontré ce virus avant l'âge de 3 ans (316). Comme l'immunité anti-VRS diminue au cours du temps, les réinfections sont fréquentes au cours de la vie et notamment avant l'âge de 5 ans (317).

Le rôle du VRS chez l'adulte et notamment la personne âgée a été reconnu seulement récemment (318). 3 à 10% des adultes sont infectés chaque année dans le monde, menant dans la majorité des cas à des formes asymptomatiques ou peu symptomatiques (318–323). Cependant, chez les patients présentant des facteurs de risque (âge, pathologies respiratoires chroniques, immunodépression) ce virus peut être responsable de formes graves : 5 à 15% des pneumonies communautaires, 10% des hospitalisations pour infection respiratoire aigüe, et une augmentation de la létalité durant le pic de circulation du VRS a été observé dans le monde (12,13). Plus de 75% des décès imputables au VRS surviennent chez des patients âgés de plus de 65 ans (324).

Chez la personne âgée, plusieurs études ont montré que le VRS entraine un taux d'hospitalisation et une morbi-mortalité similaires à ceux de la grippe (325–329).

# 4.3 Physiopathologie de l'infection à VRS

La contamination a lieu par voie nasale. Le VRS infecte les cellules épithéliales ciliées de l'épithélium respiratoire haut puis bas. Dans le tractus respiratoire bas, il infecte les cellules des bronchioles, les pneumocytes de type I et les cellules dendritiques (330).

L'infection entraine une inflammation avec une infiltration de monocytes et lymphocytes T, une nécrose épithéliale, un œdème sous-muqueux et une production excessive de mucus (331). L'obstruction des voies respiratoires est le résultat de la desquamation des cellules épithéliales et de la surproduction de mucus.

# 4.4 Clinique de l'infection à VRS

L'infection par le VRS est responsable de tableaux cliniques très variables qui vont de l'infection paucisymptomatique à des formes graves entrainant le décès. De nombreux facteurs de risque de développer une forme grave existent dont la prématurité, l'existence de comorbidités, l'immunosuppression et l'âge.

La primo-infection est quasiment toujours symptomatique. Cliniquement elle peut se limiter à une infection du tractus respiratoire haut et se manifester par une rhinopharyngite ou une otite. Dans 15 à 50% des cas, elle implique le tractus respiratoire inférieur avec l'apparition d'une bronchiolite ou d'une pneumonie (306,332–335). La première réinfection chez l'enfant est elle aussi souvent symptomatique mais elle entraine des manifestations cliniques moins sévères avec moins de bronchiolites et de fièvre (334).

Chez l'adulte, on estime que les réinfections surviennent tous les 5 à 7 ans. Dans la majorité des cas elles sont asymptomatiques ou peu symptomatiques (320). En cas d'infection symptomatique, les symptômes sont classiquement limités au tractus respiratoire supérieur et sont caractérisés par une toux productive, une congestion nasale ou une infection des sinus (336).

Chez les patients présentant des facteurs de risque (âge, pathologies respiratoires chroniques, immunodépression) le VRS peut atteindre le tractus respiratoire inférieur. Les sifflements respiratoires, la toux, l'essoufflement, et la fièvre sont alors les symptômes cliniques les plus fréquemment rencontrés (337,338) mais des formes graves sont observées avec l'apparition de pneumonies voire le décès du patient (12,13). De nombreuses études réalisées chez des patients âgés hospitalisés rapportent un taux de pneumonies qui varie de 30 à 67% et l'apparition d'un SDRA chez 8 à 16% des patients (323,337,339–342).

Les co-infections bactériennes et les infections bactériennes secondaires font partie des complications les plus sévères rapportées dans cette population (321,343,344). L'incidence de ces co-infections est mal documentée. Elle a été estimée dans certaines études entre 10 et 20% des hospitalisations pour une infection à VRS. Les bactéries les plus fréquemment retrouvées sont *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae*, et *S. aureus* (318,339–341,345,346).

# 4.5 Traitement de l'infection à VRS

Le traitement des infections à VRS est principalement symptomatique, avec un recours à l'oxygénation et aux bronchodilatateurs en cas de besoin.

La ribavirine, un analogue nucléosidique qui interfère avec la synthèse des virus à ARN et ADN, a été le premier antiviral approuvé pour le traitement des infections à VRS. Elle a actuellement un usage très

limité à cause de son manque d'efficacité (347). Elle est parfois utilisée chez des patients à haut risque de développer des formes graves et peut être associée à des immunoglobulines spécifiques (Palivizumab). Le Palivizumab est utilisé en prophylaxie chez les enfants qui présentent un haut risque de développer des formes graves. Il peut aussi être utilisé chez l'adulte receveur de cellules souches hématopoïétiques (348).

Actuellement, les recherches portent sur le développement d'un vaccin contre le VRS et plusieurs candidats en cours d'essais cliniques (349,350).

# A) Etude *in vitro* et *ex vivo* de l'activation pro-inflammatoire des cellules myéloïdes

Depuis les années 2000, *S. aureus* a émergé comme une des principales bactéries responsables de surinfections post-influenza (242,351). Actuellement, les mécanismes physiopathologiques permettant au virus influenza d'augmenter la susceptibilité de l'hôte et ainsi de favoriser la sévérité de la surinfection par *S. aureus* ne sont pas complètement élucidés. Des modèles expérimentaux *in vivo* de pneumonies bactériennes post-influenza suggèrent que la majorité des lésions observées dans les voies respiratoires sont produites par une augmentation de la réponse inflammatoire des cellules immunitaires recrutées au niveau pulmonaire et par la destruction des cellules épithéliales (6,7,57).

Le recrutement des monocytes/macrophages au niveau pulmonaire est caractéristique de la réponse immunitaire initiale. Bien que cette infiltration monocytaire des poumons soit nécessaire pour la protection de l'hôte et la guérison, un recrutement excessif contribue à la sévérité de l'infection (8). Ces cellules sont sensibles à la fois au virus influenza et aux différentes toxines de *S. aureus* (298,352,353). Dans les infections sévères, les dommages pulmonaires sont en partie liés à l'activation de la voie NF-kB qui aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires. Cette voie de signalisation est activée à la fois par le virus influenza et par *S. aureus*. Ainsi les acides nucléiques viraux sont reconnus par les TLR 3, 7 et 8 ce qui entraine l'activation de la voie NF-kB (354,355) et différents facteurs de virulence de *S. aureus* (facteurs membranaires tels que les lipoprotéines membranaires, les acides lipotéichoiques, le peptidoglycane et la protéine A et les toxines sécrétées telles que PVL, Hla et PSM) stimulent le système immunitaire par l'intermédiaire de différents récepteurs et activent la voie NF-kB (259,273,284,356–358).

Peu de données sont disponibles sur l'interaction entre les toxines de *S. aureus* et le virus influenza au niveau cellulaire. Nous avons donc étudié l'impact d'une co-exposition de différentes lignées monocytaires à influenza et à différentes toxines de *S. aureus* impliquées dans le développement de pneumopathies. Dans un premier temps nous avons mesuré *in vitro* les interactions entre les facteurs de virulence de *S. aureus* et influenza sur des lignées monocytaires continues puis nous avons testé dans un deuxième temps les associations avec un effet significatif dans un modèle *ex vivo* de monocytes humains.




## Article

# Synergistic Effects of Influenza and Staphylococcus aureus Toxins on Inflammation Activation and Cytotoxicity in Human Monocytic Cell Lines

Marion Jeannoel <sup>1,2,\*</sup>, Jean-Sebastien Casalegno <sup>1,2</sup>, Michèle Ottmann <sup>2</sup>, Cédric Badiou <sup>3</sup>, Oana Dumitrescu <sup>3,4</sup>, Bruno Lina <sup>1,2</sup> and Gérard Lina <sup>3,4,\*</sup>

<u>Contexte</u> : La morbi-mortalité des patients infectés par le virus influenza est aggravée lors de la survenue de surinfections à *S. aureus.* 

<u>Objectifs</u>: Notre objectif a été de tester l'impact d'une coexposition de différentes lignées monocytaires (THP-1, U937) et de monocytes humains au virus de la grippe A(PR8) et à différents facteurs de virulence de *S. aureus* (PVL, Hla, PSMα1 et 3, protéine A et souche de *S. aureus* inactivée par la chaleur [heat killed *S. aureus*, HKSA]). Nous avons mesuré la production de cytokines et l'activation de la voie NF-KB ainsi que l'incorporation d'IP des lignées monocytaires et nous les avons comparés à la cytotoxicité et à l'inflammation provoquées par une exposition des cellules seulement au virus influenza.

<u>Conclusions</u>: Les lignées cellulaires monocytaires continues et les monocytes fraichement isolés de sang total ont des sensibilités différentes à l'exposition au virus influenza et aux facteurs de virulence de *S. aureus*. Les synergies observées *in vitro* sur des lignées continues doivent être interprétées avec prudence car une partie seulement a été retrouvée *ex vivo* sur les monocytes isolés de sang total. Sur les monocytes humains, le virus influenza potentialise l'inflammation engendrée par HKSA et la cytotoxicité d'Hla.

Les résultats préliminaires de cette étude ont fait l'objet d'une présentation sous forme de poster en 2015 au cours du congrès de l'european society for clinical virology (ESCV) et les résultats finaux ont été publiés dans la revue *Toxins* (359)(reproduction ci-jointe).



Article

# Synergistic Effects of Influenza and *Staphylococcus aureus* Toxins on Inflammation Activation and Cytotoxicity in Human Monocytic Cell Lines

Marion Jeannoel <sup>1,2,\*</sup>, Jean-Sebastien Casalegno <sup>1,2</sup>, Michèle Ottmann <sup>2</sup> <sup>D</sup>, Cédric Badiou<sup>3</sup>, Oana Dumitrescu <sup>3,4</sup>, Bruno Lina <sup>1,2</sup> and Gérard Lina <sup>3,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord des Hospices Civils de Lyon, CEDEX 04, 69317 Lyon, France; jean-sebastien.casalegno@chu-lyon.fr (J.-S.C.); bruno.lina@univ-lyon1.fr (B.L.)

<sup>2</sup> Laboratoire de Virologie et Pathologies Humaines Virpath, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, Inserm U1111, CNRS UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CEDEX 08, 69372 Lyon, France; michele.ottmann@univ-lyon1.fr

<sup>3</sup> Pathogénie des Staphylocoques, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, Inserm U1111, CNRS UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CEDEX 08, 69372 Lyon, France; cedric.badiou@univ-lyon1.fr (C.B.); oana.dumitrescu-borne@univ-lyon1.fr (O.D.)

<sup>4</sup> Laboratoire de Bactériologie, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord des Hospices Civils de Lyon, CEDEX 04, 69317 Lyon, France

\* Correspondence: marion-j@hotmail.fr (M.J.); gerard.lina@univ-lyon1.fr (G.L.); Tel.: +33-680-402-799 (M.J.); +33-478-778-657 (G.L.)

Received: 28 May 2018; Accepted: 9 July 2018; Published: 11 July 2018



Abstract: In patients with influenza, morbidity and mortality are strongly influenced by infections with Staphylococcus aureus producing high amounts of certain toxins. Here we tested the impact of influenza virus on the pro-inflammatory and cytotoxic actions of a panel of S. aureus virulence factors, including Panton-Valentine Leucocidin (PVL), phenol-soluble modulin G1 (PSMG1) and 3 (PSMG3), G-hemolysin (Hla), and cell wall components, i.e., heat-killed S. aureus (HKSA) and protein A. We initially screened for potential synergic interactions using a standardized in vitro model in influenza-infected continuous human monocytic cell lines. Then we tested the identified associations using an ex vivo model in influenza-infected human monocytes freshly isolated from blood. Co-exposure to influenza virus and HKSA, PVL, PSMG1, and PSMG3 increased NF-KB/AP-1 pathway activation in THP1-XBlue cells, and co-exposure to influenza virus and PVL increased cytotoxicity in U937 cells. In monocytes isolated from blood, the synergy between influenza virus and HKSA was confirmed based on cytokine production (TNF-G, IL-1 $\beta$ , IL-6), and co-exposure to influenza virus and Hla-increased cytotoxicity. Our findings suggest that influenza virus potentiates the pro-inflammatory action of HKSA and contributes to the cytotoxicity of Hla on monocytes. Synergic interactions identified in the cell-line model must be cautiously interpreted since few were relevant in the ex vivo model.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; toxins; influenza A virus; monocyte; coinfection; inflammation; cytotoxicity

**Key Contribution:** Influenza virus potentiates the pro-inflammatory action of HKSA and contributes to the cytotoxicity of Hla on monocytes. Synergic interactions identified in the cell-line model must be cautiously interpreted since few were relevant in the ex vivo model. *Toxins* **2018**, *10*, 286; doi:10.3390/toxins10070286www.mdpi.com/journal/toxins

#### 1. Introduction

The World Health Organization estimates that influenza is responsible for 3 to 5 million cases of severe illness and 250,000 to 500,000 deaths per year worldwide [1]. Influenza-related morbidity and mortality are mainly associated with secondary bacterial infections [2,3]. *Staphylococcus aureus* has recently emerged as a major pathogen in influenza virus superinfection [4,5], seemingly concomitant with the emergence of community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) since the early 2000s [6].

CA-MRSA strains produce a diverse arsenal of virulence factors that contribute to the pathogenesis of *S. aureus* lung infection. The pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) are recognized by Toll-like receptors (TLR) and other pattern recognition receptors, prompting activation of innate immune responses [7]. Virulence determinants involved in the pathophysiology of *S. aureus* lung infection include *S. aureus* PAMPs, such as cell-wall anchored lipoproteins, lipoteichoic acid, peptidoglycan, and protein A; and excreted toxins, such as alpha-toxin (Hla), Panton-Valentine Leukocidin (PVL), and  $\alpha$ -type phenol-soluble modulins (PSM $\alpha$ ). These factors activate the immune system through different receptors, but all trigger the NF- $\kappa$ B pathway and release of pro-inflammatory mediators [8–13]. Recognition of influenza virus nucleic acids by TLR3, 7, and 8 also leads to NF- $\kappa$ B pathway activation [14,15].

We do not yet fully understand the pathogenic mechanisms through which influenza virus infection increases both host susceptibility and severity of *S. aureus* super-infection. Experimental in vivo models of post-influenza pneumonia suggest that most respiratory tract lesions are induced by an enhanced inflammatory response from immune cells recruited in the lungs, and their subsequent destruction[16–18].Theinitialimmuneresponseischaracterized by monocyte/macrophage recruitment into the lung parenchyma and alveolar spaces, which is necessary for host protection and recovery. However, excessive recruitment of these cells may contribute to potentially lethal lung pathology [19–21]. In severe infection, severe lung damage is accentuated by early and excessive production of type I interferons, amplifying the MCP-1 production responsible for inflammatory monocyte recruitment [22]. In human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) exposed to influenza virus, type I interferons also increase the expression of functional tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), thereby increasing the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in influenza-infected cells [23]. The inflammatory response mediated by increased monocyte recruitment to the lung is the main determinant of lung damage, more so than influenza virus replication [23,24].

Little information is presently available regarding the interactions between *S. aureus* toxins and the influenza virus at the cellular level. Therefore, in this study, we aimed to evaluate the potential synergic effects of influenza virus and *S. aureus* virulence factors on inflammation and cytotoxicity against human monocytes. We initially screened the potential synergic interactions using a standardized model of influenza-infected continuous human monocytes. Then we tested the significant associations using a more relevant model of influenza-infected primary human monocytes.

#### 2. Results

2.1. Co-Exposure of THP1-XBlue Cells to Influenza Virus S. aureus Virulence Determinants (PVL, PSM $\alpha$ 1, PSM $\alpha$ 3, Protein A, and HKSA) Is Associated with Higher NF- $\kappa$ B/AP-1 Pathway Activation than Exposure to Influenza Alone

We first incubated influenza virus-exposed and non-exposed THP1-XBlue cells for 24 h with sublytic concentrations of *S. aureus* products (PVL, protein A, HKSA, Hla, PSM01, and PSM03), and compared the NF- $\kappa$ B/AP-1 pathway activation. Compared to the cells exposed only to *S. aureus* virulence factors, the THP1-XBlue cells co-exposed to influenza virus and the tested virulence factors (except Hla) showed increased NF- $\kappa$ B/AP-1 activation by 2- to 10-fold (Figure1). In influenza-exposed cells, the lowest concentrations of toxins that triggered significant NF- $\kappa$ B/AP-1 activation were PVL 0.5 µg/mL (vs. 2.5 µg/mL in non-influenza-exposed cells), PSM01 1 µg/mL (vs. 25 µg/mL), and PSM03 5 µg/mL (vs.no activation) (Figure1). Co-exposure of the cells to influenza virus at a

74

multiplicity of infection (MOI) of 2, and to PVL (2.5  $\mu$ g/mL), HKSA (MOI 100), and PSMG1 (10  $\mu$ g/mL) yielded NF- $\kappa$ B/AP-1 activation to the same extent as that induced by the most potent activator (protein A, 1  $\mu$ g/mL). Although influenza virus alone and *S. aureus* virulence factors alone had only a modest effect (OD < 1) on NF- $\kappa$ B/AP-1 activation, our findings suggested that co-exposure of a continuous monocytic cell line to both influenza virus and *S. aureus* virulence factors potentiated the pro-inflammatory activity.



S. aureus virulence factor S. aureus virulence factor + influenza virus

**Figure 1.** Activation of NF- $\kappa$ B/AP-1 in THP1-XBlue cells by influenza virus and/or *S. aureus* virulence factors measured after a 24-h incubation period. THP1-XBlue cells were treated with influenza virus (MOI 2), and (a) PVL (0.05, 0.5, 2.5, and 5  $\mu$ g/mL), (b) Hla (0.01, 0.1, and 1  $\mu$ g/mL), (c) PSM01

(1, 5, 10, and 25 µg/mL), (d) PSMQ3 (1, 5, 10, and 25 µg/mL), (e) protein A (0.1, 0.5, and 1 µg/mL), and (f) HKSA (MOI 1, 10, 20, and 100). SEAP activity was measured as a proxy for NF- $\kappa$ B/AP-1 activation. Data are representative of three independent experiments and each condition was tested in duplicate. Error bars represent SD (*n* = 6). ANOVA and the Bonferroni post-hoc test were used to verify statistical significance. \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01. Each toxin concentration was compared to the culture medium, and each toxin concentration + influenza virus was compared to influenza virus alone, as indicated by stars. Each toxin concentration of toxin was compared to the culture medium, each concentration of toxin + influenza virus was compared to the same concentration of toxin + influenza virus was compared to the same to the culture medium, each concentration of toxin + influenza virus was compared to the same concentration of toxin + influenza virus was compared to the same concentration of toxin + influenza virus was compared to the same concentration of toxin + influenza virus was compared to the same concentration of toxin + influenza virus was compared to the same concentration of toxin + influenza virus was compared to the same concentration of toxin + influenza virus was compared to the same concentration of toxin + influenza virus was compared to the same concentration of toxin + influenza virus was compared to the same concentration of toxin + influenza virus was compared to the same concentration of toxin + influenza virus as indicated by lines. OD 650, optical density at 650 nm.

The pro-inflammatory synergistic associations identified in continuous cell lines were next tested in a model of human primary monocytes. Monocytes were isolated from human peripheral blood, co-exposed to influenza virus and *S. aureus* virulence determinants (PVL, protein A, HKSA, PSMa1, and PSMa3), and we measured production of the cytokines TNF-a, IL-1 $\beta$ , and IL-6 in the supernatants after 4- and 24-h incubation periods. We tested the combinations that showed the most potent synergic effects in continuous cell lines: influenza virus (MOI 2) plus PSM a1 (25 µg/mL), PSM a3 (25 µg/mL), and HKSA (MOI 100) (Figure2). Since protein A is a strong inflammation inducer, we used the lowest protein A concentration that showed synergy with influenza virus on inflammation (0.1 µg/mL). We used the PVL concentration having the lowest cytolytic action on human monocytes (0.05 µg/mL) (Figures3and4).

Protein A, HKSA, and PSMa1 induced significant cytokine production from human monocytes (Figure2). Under the tested conditions, protein A and HKSA were potent inducers of TNF a, IL-1 $\beta$ , and IL-6 production from monocytes as early as 4 h after exposure to toxins. Exposure to influenza virus alone did not induce significant cytokine production. The cytokine levels in human peripheral blood supernatant did not significantly differ following exposure to PVL, PSMa1, and PSMa3 alone versus co-exposure to these toxins and influenza virus (Figure2).

In monocytes exposed to HKSA for 4 h, co-exposure to influenza virus significantly increased TNFa and IL-1 $\beta$  production. Similarly, in monocytes exposed to protein A for 24 h, co-exposure to influenza virus significantly increased IL-6 production (Figure2). These results suggest that influenza virus may potentiate HKSA and protein A pro-inflammatory activity in human monocytes in vivo. Unlike in THP1-XBlue cells, co-exposure to influenza virus did not significantly increase cytokine production in human monocytes exposed to PVL, PSMa1, PSMa3.

#### 2.3. In U937 Cells, Co-Exposure to Influenza and PVL is Associated with Increased Cytotoxicity

We next co-stimulated THP1 monocytes with influenza virus (MOI 2) and sublytic to lytic concentrations of cytolysins (PVL, Hla, PSMa1, and PSMa3), with the aim of testing whether co-exposure to influenza virus could influence the cytotoxicity of *S. aureus* toxins towards monocytes. After 4- and 24-h incubation periods, we examined the toxicity of these conditions by staining THP1 cells with PI and using flow cytometry to detect necrosis-like membrane damage on monocytes. THP1 cells were found to be highly resistant to *S. aureus* toxins (only 7% cell death observed using the higher toxin concentrations; data not shown); therefore, we switched to U937 cells (Figure3).

Influenza virus alone did not significantly enhance cell death relative to the culture medium alone. We observed cytotoxicity following exposure to lytic concentrations of PVL (2.5 and 5  $\mu$ g/mL) and Hla (1  $\mu$ g/mL), and residual cytotoxicity following exposure to the tested concentrations of PSM01 and PSM03 (Figure3). Under these conditions, Hla was the most potent cytolysin, inducing 52% cell death. In contrast, PVL induced only 14% cell death (Figure3). Co-exposure of monocytes to influenza virus and PVL (2.5 and 5  $\mu$ g/mL) during a 24-h incubation resulted in significantly increased cell death compared to the activity of PVL alone (20% vs. 14% and 25% vs. 15%). These results suggested that influenza virus infection of monocytes increased the cells' susceptibility to PVL-induced cytotoxicity. Cell death was not increased by co-exposure of cells to influenza virus and the other toxins (Hla, PSM01, and PSM03).



**Figure 2.** Cytokine concentrations measured from supernatants of monocytes isolated from human peripheral blood, co-exposed to influenza virus and *S. aureus* virulence determinants (PVL, Hla, SpA, HKSA, PSM01, and PSM03). (a) TNF-0 after a 4-h incubation. (b) TNF-0 after a 24-h incubation.

(c) IL-1 $\beta$  after a 4-h incubation. (d) IL-1 $\beta$  after a 24-h incubation. (e) IL-6 after a 4-h incubation. (f) IL-1 $\beta$  after a 24-h incubation. Monocytes isolated from human peripheral blood were treated with influenza virus (MOI 2), PVL (0.05 µg/mL), protein A (0.1 µg/mL), HKSA (MOI 100), PSM01 (25 µg/mL), or PSM03 (25 µg/mL). Data are representative of three independent experiments. Error bars represent SD (n = 3). ANOVA and the Bonferroni post-hoc test were used to verify statistical significance.

\* p < 0.05. Cytokine concentrations determined for supernatants exposed to one *S. aureus* virulence determinant condition were compared to the culture medium. Cytokine concentrations determined for supernatants exposed to one *S. aureus* virulence determinant + influenza virus were compared to influenza virus alone, as indicated by stars. Cytokine concentrations determined for supernatants exposed to one *S. aureus* virulence determinant condition were compared to supernatants exposed to one *S. aureus* virulence determined for supernatants exposed to one *S. aureus* virulence determined for supernatants exposed to one *S. aureus* virulence determined for supernatants exposed to one *S. aureus* virulence determinant condition were compared to supernatants co-exposed to influenza virus, as indicated by lines. OD 450, optical density at 450 nm.



**Figure 3.** Cytolytic effects of influenza virus and *S. aureus* toxins on U937 cells after 4- and 24-h incubation periods. The monocyte population was gated using forward and side scatters (FSC and SSC, respectively). Cells were exposed to influenza virus (MOI 2) and (**a**,**b**) PVL (0.05 to 5  $\mu$ g/mL), (**c**,**d**) Hla (0.01 to 1  $\mu$ g/mL), (**e**,**f**) PSM01 (1 to 25  $\mu$ g/mL), and (**g**,**h**) PSM03 (1 to 25  $\mu$ g/mL). Propidium iodide (PI) incorporation was used to measure the % cell death within the gated monocyte population. Data are representative of three independent experiments, and each condition was tested in duplicate. Error bars represent SD (n = 6). Each toxin concentration was compared to culture medium, and each toxin concentration + influenza was compared to influenza virus alone, as indicated by stars. Each toxin concentration was compared to toxin + influenza virus as indicated by lines. ANOVA and the Bonferroni post-hoc test were used to verify statistical significance. \*\* p < 0.01.

# 2.4. In Monocytes Isolated from Human Peripheral Blood, Co-Exposure to Influenza Virus and Hla Is Associated with Increased Cytotoxicity

The cytolytic associations between influenza virus and PVL or Hla that were identified in continuous cell lines, were subsequently tested in a model of human primary monocytes. Compared to U937 cells, primary monocytes are much more sensitive to cytolysins; therefore, we selected low concentrations of PVL (0.05  $\mu$ g/mL) and Hla (0.01 and 0.1  $\mu$ g/mL). After 1- and 4-h incubation periods, monocytes were stained with PI, and toxicity was assessed by flow cytometry. Under our test conditions, we observed maximal cytotoxicity after the 4-h incubation period and thus did not test after a 24-h incubation period. PVL showed the most potent cytolytic activity, inducing 80% cell death at the lowest tested concentration (0.05  $\mu$ g/mL) after as little as 1 h of PVL exposure (Figure4). Hla (0.1  $\mu$ g/mL) induced significant cell death at both 1 h and 4 h. In contrast, influenza virus infection of monocytes did not induce significant cell death.



**Figure 4.** Cytolytic effects of influenza virus and *S. aureus* toxins on human monocytes after 1- and 4-h incubation periods. The monocyte population was gated using forward and side scatters (FSC and SSC, respectively). Cells were exposed to influenza virus (MOI 2) and PVL (0.05  $\mu$ g/mL) or Hla (0.01 to 0.1  $\mu$ g/mL) for (a) 1 h or (b) 4 h. Propidium iodide (PI) incorporation was used to measure the % cell death within the gated monocyte population. Data are representative of three independent experiments, and each condition was tested in duplicate. Error bars represent SD (*n* = 6). Each toxin concentration was compared to culture medium, and each toxin concentration + influenza virus was compared to influenza virus alone, as indicated by stars. Each toxin concentration was compared to toxin + influenza virus, as indicated by lines. ANOVA and the Bonferroni post-hoc test were used to verify statistical significance. \* *p* < 0.05.

Co-exposure of cells to influenza virus and a lytic concentration of Hla induced a significant increase in cell death. These findings suggested that influenza viral infection of monocytes increased the susceptibility of these cells to Hla cytotoxicity. Under our experimental conditions, PVL cytotoxicity was already too effective to detect any additional synergic effect of influenza virus on monocyte sensitivity to PVL. These results were confirmed by measurement of LDH release in monocytes supernatants, as we found no significant difference between monocytes exposed to cytolysin alone or co-exposed to cytolysin and influenza virus (data not shown).

Next, we tested how the supernatant of monocytes exposed to influenza virus and *S. aureus* cytolytic toxins affected confluent monolayers of A549 cells after incubation for 1 h and 24 h. After a 1-h incubation period, monocyte supernatant did not affect epithelial cell viability compared to control.

After a 24-h incubation period, Hla showed a tendency to increase A549 mortality, but this trend did not achieve statistical significance (Figure 5).



**Figure 5.** Effect of supernatants from monocytes exposed to influenza virus and *S. aureus* toxins on A549 cells after incubation periods of (**a**) 1 h and (**b**) 24 h. Supernatants of monocytes after 24-h exposure to influenza virus (MOI 2), PVL (0.05, 0.25, and 0.5  $\mu$ g/mL), and Hla (0.01 and 0.1  $\mu$ g/mL) were used to incubate epithelial cell monolayers for 24 h. Then the percentage of viable cells was estimated based on neutral red uptake assay. Data are representative of three independent experiments, and each condition was tested in

#### 3. Discussion

duplicate. Error bars represent SD (n = 6).

Broad pulmonary inflammatory infiltration is a key clinical feature of bacterial pneumonia following influenza viral infection. Lung histopathological analyses in murine models reveal severe lung injuries in cases of co-infections [16,17]. The influenza virus and *S. aureus* virulence factors induce inflammation via different cellular pathways that all converge to activation of the NF- $\kappa$ B classical pathway [8–12,14–16,25] and the subsequent secretion of inflammatory cytokines [26,27]. Most related studies have been conducted using animal models, and despite the convergence to the NF- $\kappa$ B pathway, few studies have examined the impact of various *S. aureus* toxins on human leukocytes exposed to influenza virus [28].

In our present study, we tested a broad range of *S. aureus* virulence factors—including PVL, Hla, PSMs, protein A, and cell wall components which are involved in the pathophysiology of *S. aureus* lung infection [29,30]. We performed our initial screening in a standardized in vitro model of influenza virus-infected continuous human monocytic cell lines, and subsequent testing in an ex vivo model of influenza virus-infected human monocytes. Our results in infected human primary monocytes demonstrated a new synergic action between influenza virus and HKSA on the induced inflammation, as well as synergy between influenza virus and Hla on the induced cytotoxicity.

Our results also highlighted the importance of validating results obtained in continuous monocytic cell lines in a more relevant ex vivo model of influenza virus-infected human monocytes. Indeed, cell susceptibility seemed to differ between continuous cell lines and human monocytes freshly isolated from blood. We observed synergy between influenza virus and all the tested toxins (except Hla) in THP1-XBlue cells. On the other hand, under similar conditions, influenza virus showed synergy with only HKSA and protein A in freshly isolated monocytes as determined based on increased inflammation through cytokine production. Moreover, cytotoxicity induced by PVL and Hla differed between U937 cells, THP1 cells, and blood-isolated monocytes. While influenza virus and PVL showed additive effects on cytotoxicity in U937 cells, this effect could not be detected in monocytes due to their extreme sensitivity to PVL alone, whereas additive cytotoxicity was observed between Hla and influenza virus in monocytes. These differences demonstrate the importance of the choice of a cellular model for these experiments.

polymorphonuclear cells but not monocytes [32,33].

The PVL and Hla concentrations used in our study are similar to those reported in vivo [29,31]. The literature does not include any reported in vivo concentrations of protein A, PSM  $\alpha$ 1, or PSM  $\alpha$ 3. We used concentrations of protein A and influenza virus that are similar to those currently employed in vitro to induce inflammation in monocytic cell lines [9,22,31]. We observed that PSM  $\alpha$ 1 and PSM  $\alpha$ 3 concentrations of above 10 µg/mL were required for NF-KB pathway activation, which is higher than the concentrations measured in vitro in culture supernatants of various *S. aureus* strains [32]. To our knowledge, *S. aureus* PSMs have been demonstrated to have inflammatory properties on

Clinical data support that PVL and Hla may play a major role in severe pediatric MRSA pneumonia associated with respiratory viral infection [34,35]. These two pore-forming toxins have inflammatory actions through osmotic stress that leads to NLRP3 activation and consequently to IL-1β production [24,36]. Here we observed that PVL induced a proinflammatory response in THP1-XBlue cells. However, unlike in the literature, we did not observe IL-1 $\beta$  production in supernatants of human monocytes [24,37]. This difference could be explained by the fast lysis of monocytes after their exposure to the toxin. Indeed, pro-IL-1 $\beta$  is not constitutively expressed in monocytes but must be produced following the activation of pattern recognition receptors by microbial products. After NLRP3 activation, pro-IL-1 $\beta$  is cleaved into mature and active IL-1 $\beta$  [38]. Thus, early cytotoxicity could prevent cells from producing IL-1<sup>β</sup>. We observed that HKSA induced robust IL-1<sup>β</sup> production from monocytes, and that exposure to HKSA with influenza virus co-infection increased the early IL-1<sup>β</sup> production of monocytes. This would contribute to disease severity, since higher IL-1ß levels have been associated with poor outcomes in acute respiratory distress syndrome [39]. The capacity of HKSA to induce IL-1β production by monocytic cells seems to be linked to the structure of S. aureus PGN and its degradability by immune cells. This could explain the discrepancies reported in the literature [24,40,41].

To investigate cytotoxicity, we had to use U937 cells because THP1 cells were highly resistant. In this model, we observed that high toxin concentrations were required to observe their cytolytic properties: 2.5 µg/mL PVL and 1 µg/mL Hla. We observed no cytotoxicity with PSMs, which are only weakly cytolytic, with the exception of PSMq3 [32]. These results were not unexpected, since U937 cells are relatively resistant to lysis compared to primary blood-derived monocytes [24]. We further observed that pre-exposure to influenza virus resulted in an almost 2-fold increase in the PVL-related death of U937 cells. In contrast, we did not observe any additive effect in cells co-exposed to influenza virus and to the other tested toxins (Hla, PSMq1, and PSMq3). It appears that the contribution of PSM to post-influenza pneumonia is likely linked to epithelial cell damage rather than monocyte damage [30]. Under our experimental conditions, human monocytes were already highly sensitive to the utilized PVL concentrations, preventing us from observing any potential synergy between influenza virus and PVL on primary monocytes. However, we observed synergy between Hla and influenza virus infection. It can be assumed that monocyte death results in a release of proteases that contribute to lung lesions, as has been shown for polymorphonuclear cells [28].

The synergy observed between influenza virus and HKSA or protein A regarding cytokine production presumably promotes increased leukocyte recruitment to the lungs. Subsequent large-scale lysis of these recruited immune cells by *S. aureus* cytolysins can thus be expected. The presently available data warrant further investigation of the roles of monocytes in the inflammation observed during coinfection. To date, monocytes have been less studied in this context compared to polymorphonuclear cells.

The influenza virus may potentiate the actions of *S. aureus* toxins and PAMPs actions in two ways. First, the influenza virus increases the inflammatory potential of some pro-inflammatory toxins. Thus, monocytes reinforce chemokine production, leading to recruitment of neutrophils and monocytes, and massive migration of macrophages to the lung [26,27]. Second, the virus increases the cytotoxic potential against these recruited cells. Influenza virus and *S. aureus* toxins have a synergistic pro-inflammatory impact on human monocytes and are linked to increased Hla cytotoxicity against influenza virus-exposed human monocytes. This combination of excessive inflammation and increased cytotoxicity contributes to more severe outcomes. Thus, severe pneumonia with worse disease

outcomes is associated with CA-MRSA, such as the USA300 strain, which presents increased PSM and Hla production and, more frequently, PVL production compared to methicillin-sensitive *S. aureus* strains(MSSA)[32,42–44]. Excessiveinflammatoryresponses after establishment of secondary bacterial infection represent another difficulty in the clinical management of disease, and is a likely reason for enhanced disease severity and mortality despite appropriate antibiotic treatment [45,46]. This suggests that immunomodulators or neutralizing antibodies may useful for controlling excessive inflammation and improving clinical outcome.

#### 4. Materials and Methods

### 4.1. S. aureus Virulence Factors

To obtain heat-killed *S. aureus* (HKSA), the LUG 960 strain (RN6390 delta *spa::kan*) was obtained from the French national reference center for staphylococci (*Centre national de référence des Staphylocoques*, Lyon, France) and heated to 100 °C for 1 h. Recombinant PVL was produced and purified by the *Centre national de référence des Staphylocoques*. Hla and protein A were obtained from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). PSM01 and PSM03 were synthesized by GeneCust (Dudelange, Luxembourg). We tested sublytic to lytic concentrations of the cytotoxins PVL, Hla, PSM01, and PSM03, as described in the literature [24,31,34]. The utilized concentrations of protein A, HKSA, and influenza virus were similar to those currently employed in vitro to induce inflammation in monocyte cell lines [9,22,31].

### 4.2. Influenza Virus

The human influenza virus A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34; H1N1; ATCC VR-1469) was propagated and titrated in Madin-Darby Canine Kidney cells (MDCK; ATCC, CCL34) as previously described [47]. Briefly, MDCK cells were maintained at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>, in Ultra-MDCK serum-free medium (Lonza, Levallois, France) supplemented with 2 mM L-glutamine, 200 IU/mL penicillin (Lonza, Levallois, France), and 200 IU/mL streptomycin (Lonza, Levallois, France). The A/PR/8/34 strain was propagated in MDCK cells at 34 °C in EMEM (Lonza, Levallois, France) supplemented with 1  $\mu$ g/mL trypsin (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). The supernatant was harvested, and the virus titer was assessed by endpoint titration in MDCK cells.

## 4.3. Culture of THP1, THP1-XBlue, and U937 Cells

THP1 cells (ATCC<sup>®</sup> TIB-202<sup>TM</sup>) were grown at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium (Eurobio, Courtaboeuf, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Life Technologies, Saint Aubin, France) and 50 µg/mL Pen-Strep (Invivogen, Toulouse, France). THP1-XBlue cells, which contain a secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene under the control of NF- $\kappa$ B and AP-1, were acquired from Invivogen and grown at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 100 µg/mL Normocin<sup>TM</sup>, and 50 µg/mL Pen-Strep. THP1-XBlue. U937 cells (ATCC<sup>®</sup> CRL-1593.2<sup>TM</sup>) were grown at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 50 µg/mL Pen-Strep.

## 4.4. Monocyte Isolation from Human Peripheral Blood

Blood samples were collected from healthy donors who gave their informed consent, with ethics committee approval (Etablissement Français du Sang, Lyon, France). Human monocytes were isolated with a purity of >95% using RosetteSep human monocyte enrichment cocktail (Stemcell technologies, Grenoble, France) following the manufacturer's protocol. Isolated monocytes were resuspended at a final concentration of  $0.5 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 50 µg/mL Pen-Strep.

## 4.5. Stimulation of Cell Lines

THP1-XBlue, U937, or THP1 cells were plated in 96-well plates ( $2 \times 10^5$  cells per well) in RPMI 1640 with 10% FBS. We used heat-killed *Listeria monocytogenes* (HKLM; MOI 100; Invivogen, Toulouse,

83 of 15

France), which activates the NF-κB/AP-1 pathway after binding to TLR2, as a positive control for the THP1-XBlue cell experiments, following the manufacturer's protocol. Cells were incubated for 1 h with influenza virus A/PR/8/34 (H1N1) at an MOI of 2. To investigate exposure to *S. aureus* virulence factors, toxins and PAMPs were added to the cell suspension in RPMI 1640 medium at the following concentrations: PVL (0.05, 0.5, 2.5, and 5  $\mu$ g/mL), protein A (0.1, 0.5, and 1  $\mu$ g/mL), Hla (0.01, 0.1, and 1  $\mu$ g/mL), HKSA (MOI 1, 10, 20, and 100), and PSM01 and PSM03 (1, 5, 10, and 25  $\mu$ g/mL). The cells were then incubated for 24 h at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>.

Freshly isolated human monocytes were stimulated as described above. Human monocytes were used to test only the conditions that showed potentially significant effects in the continuous cell lines.

### 4.6. SEAP Reporter Assays

We collected the supernatant of THP1-XBlue cells and quantified SEAP using QuantiBlue reagent according to the manufacturer's instructions (Invivogen, Toulouse, France). Absorbance at 650 nm was measured using an Asys UVM 340 microplate reader (Biochrom, Vindelle, France), and data were analyzed with DigiRead software (Biochrom, Vindelle, France). The optical density (OD) of the unexposed control group was subtracted from the OD of all samples.

#### 4.7. Analysis of Cytokine Secretion

 $We collected the supernatants of human monocytes, and quantified human IL-1\beta, IL-6, and TNF-a using commercial ELISA kits according to the manufacturer's protocols (Biosource, Nivelles, Belgium).$ 

#### 4.8. Flow Cytometry Analysis

To assess cytotoxicity, stimulated THP1 cells and human monocytes were stained with propidium iodide (PI; BD Biosciences, Le pont de Claix, France). Forward and side scatters (FSC and SSC, respectively) were used to exclude cells debris. Analyses were performed using a BD Accuri C6 (BD Biosciences, Le pont de Claix, France) and FlowJo Software (FlowJo, Ashland, OR, USA).

#### 4.9. LDH Assay

To evaluate the cytotoxicity of influenza virus and *S. aureus* virulence factors on human monocytes, we measured the LDH release into supernatants using the Dimension vista 1500 (Siemens, Saint Denis, France).

#### 4.10. Neutral Red Uptake by A549

A549 cells (ATCC<sup>®</sup> CCL-185<sup>TM</sup>) were cultured and maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), supplemented with 10% FBS and 100 U/mL pen-strep. To investigate the effects of monocyte supernatants on A549 cells, we plated A549 cells in 96-well tissue culture plates. Monocytes were stimulated as described above, and then pelleted. The supernatants were harvested and added to confluent epithelial cells. A549 cells were then incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The plates were then incubated for 45 min with medium containing 0.16% neutral red. Then the cells were washed, the dye was extracted using ethanol/citrate in each well, and the absorbance was read using an Asys UVM 340 (540 nm vs. 405 nm).

#### 4.11. Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Data were analyzed by one-way ANOVA and Bonferonni post-hoc test. All values are expressed as mean ( $\pm$ SD). A *p* value of <0.05 was considered significant.

Author Contributions: M.J., J.-S.C., O.D. and M.O. participated in designing experiments. C.B. and G.L. provided reagents and materials. M.J. performed the experiments. M.J., J.-S.C., M.O., B.L. and G.L. analyzed the data. M.J., J.-S.C. and M.O. wrote the paper. J.-S.C., M.O., B.L. and G.L. supervised the experiments.

Funding: This work has received support from the EU/EFPIA Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking

(DRIVE, grant no. 77736).

Acknowledgments: We thank Sylvie Fiorini and Nathalie Rivat for their technical assistance.

**Conflicts of Interest:** B.L. received a travel grant to attend meetings from GSK and Sanofi Pasteur. B.L. is a member of the scientific boards of the Global Influenza Initiative and GHISN. G.L. declares potential conflicts of interests with Pfizer and Becton Dickinson. O.D. reports grants from PFIZER during the conduct of the study. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results. All other authors declare no conflict of interest.

#### References

- 1. WHO
   Influenza
   (Seasonal).
   Available
   online:

   http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/ (accessed on 27 July 2016).
- 2. Kuiken, T.; Taubenberger, J.K. Pathology of human influenza revisited. *Vaccine* **2008**, *26*, D59–D66. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Muscedere, J.; Ofner, M.; Kumar, A.; Long, J.; Lamontagne, F.; Cook, D.; McGeer, A.; Chant, C.; Marshall, J.; Jouvet, P.; et al. The occurrence and impact of bacterial organisms complicating critical care illness associated with 2009 influenza A(H1N1) infection. *Chest* **2013**, *144*, 39–47. [CrossRef] [PubMed]
- 4. Finelli, L.; Fiore, A.; Dhara, R.; Brammer, L.; Shay, D.K.; Kamimoto, L.; Fry, A.; Hageman, J.; Gorwitz, R.; Bresee, J.; et al. Influenza-associated pediatric mortality in the United States: Increase of *Staphylococcus aureus* coinfection. *Pediatrics* **2008**, *122*, 805–811. [CrossRef] [PubMed]
- 5. McCullers, J.A. Do specific virus-bacteria pairings drive clinical outcomes of pneumonia? *Clin. Microbiol. Infect.* **2013**, *19*, 113–118. [CrossRef] [PubMed]
- Vandenesch, F.; Naimi, T.; Enright, M.C.; Lina, G.; Nimmo, G.R.; Heffernan, H.; Liassine, N.; Bes, M.; Greenland, T.; Reverdy, M.-E.; et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 2003, *9*, 978–984. [CrossRef] [PubMed]
- 7. Tang, D.; Kang, R.; Coyne, C.B.; Zeh, H.J.; Lotze, M.T. PAMPs and DAMPs: Signal os that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* **2012**, *249*, 158–175. [CrossRef] [PubMed]
- 8. Pietrocola, G.; Arciola, C.R.; Rindi, S.; Di Poto, A.; Missineo, A.; Montanaro, L.; Speziale, P. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Artif. Organs* **2011**, *34*, 799–810. [CrossRef] [PubMed]
- Gómez, M.I.; Lee, A.; Reddy, B.; Muir, A.; Soong, G.; Pitt, A.; Cheung, A.; Prince, A. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat. Med.* 2004, *10*, 842– 848. [CrossRef] [PubMed]
- Wilke, G.A.; Bubeck Wardenburg, J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 13473–13478. [CrossRef] [PubMed]
- Kretschmer, D.; Gleske, A.-K.; Rautenberg, M.; Wang, R.; Köberle, M.; Bohn, E.; Schöneberg, T.; Rabiet, M.-J.; Boulay, F.; Klebanoff, S.J.; et al. Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic *Staphylococcus aureus. Cell Host Microbe* 2010, *7*, 463–473. [CrossRef] [PubMed]
- 12. Ma, X.; Chang, W.; Zhang, C.; Zhou, X.; Yu, F. Staphylococcal Panton-Valentine Leukocidin Induces Pro-Inflammatory Cytokine Production and Nuclear Factor-Kappa B Activation in Neutrophils. *PLoS ONE* **2012**, 7, e34970. [CrossRef] [PubMed]
- Diep, B.A.; Le, V.T.M.; Badiou, C.; Le, H.N.; Pinheiro, M.G.; Duong, A.H.; Wang, X.; Dip, E.C.; Aguiar-Alves, F.; Basuino, L.; et al. IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA. *Sci. Transl. Med.* 2016, *8*, 357ra124. [CrossRef] [PubMed]
- Lee, N.; Wong, C.K.; Hui, D.S.C.; Lee, S.K.W.; Wong, R.Y.K.; Ngai, K.L.K.; Chan, M.C.W.; Chu, Y.J.; Ho, A.W.Y.; Lui, G.C.Y.; et al. Role of human Toll-like receptors in naturally occurring influenza A infections. *Influenza Other Respir. Viruses* 2013, 7, 666–675. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Nimmerjahn, F.; Dudziak, D.; Dirmeier, U.; Hobom, G.; Riedel, A.; Schlee, M.; Staudt, L.M.; Rosenwald, A.; Behrends, U.; Bornkamm, G.W.; et al. Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 2347–2356. [CrossRef] [PubMed]
- 16. Iverson, A.R.; Boyd, K.L.; McAuley, J.L.; Plano, L.R.; Hart, M.E.; McCullers, J.A. Influenza Virus Primes Mice for Pneumonia From *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. **2011**, 203, 880–888. [CrossRef] [PubMed]
- 17. Lee, M.-H.; Arrecubieta, C.; Martin, F.J.; Prince, A.; Borczuk, A.C.; Lowy, F.D. A postinfluenza model of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J. Infect. Dis.* **2010**, *201*, 508–515. [CrossRef] [PubMed]

- McAuley, J.L.; Hornung, F.; Boyd, K.L.; Smith, A.M.; McKeon, R.; Bennink, J.; Yewdell, J.W.; McCullers, J.A. Expression of the 1918 Influenza A Virus PB1-F2 Enhances the Pathogenesis of Viral and Secondary Bacterial Pneumonia. *Cell Host Microbe* 2007, *2*, 240–249. [CrossRef] [PubMed]
- Lin, K.L.; Suzuki, Y.; Nakano, H.; Ramsburg, E.; Gunn, M.D. CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. *J. Immunol. Baltim.* 2008, 180, 2562–2572. [CrossRef]
- 20. Coates, B.M.; Staricha, K.L.; Koch, C.M.; Cheng, Y.; Shumaker, D.K.; Budinger, G.R.S.; Perlman, H.; Misharin, A.V.; Ridge, K.M. Inflammatory Monocytes Drive Influenza A Virus-Mediated Lung Injury in Juvenile Mice. J. Immunol. Baltim. 2018, 200, 2391–2404. [CrossRef] [PubMed]
- 21. Damjanovic, D.; Small, C.-L.; Jeyananthan, M.; McCormick, S.; Xing, Z. Immunopathology in influenza virus infection: Uncoupling the friend from foe. *Clin. Immunol.* **2012**, *144*, 57–69. [CrossRef] [PubMed]
- 22. Holzinger, D.; Gieldon, L.; Mysore, V.; Nippe, N.; Taxman, D.J.; Duncan, J.A.; Broglie, P.M.; Marketon, K.; Austermann, J.; Vogl, T.; et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, *92*, 1069–1081. [CrossRef] [PubMed]
- Perret, M.; Badiou, C.; Lina, G.; Burbaud, S.; Benito, Y.; Bes, M.; Cottin, V.; Couzon, F.; Juruj, C.; Dauwalder, O.; et al. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell. Microbiol.* 2012, *14*, 1019–1036. [CrossRef] [PubMed]
- 24. Hoeve, M.A.; Nash, A.A.; Jackson, D.; Randall, R.E.; Dransfield, I. Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e29443. [CrossRef] [PubMed]
- 25. Dragneva, Y.; Anuradha, C.D.; Valeva, A.; Hoffmann, A.; Bhakdi, S.; Husmann, M. Subcytocidal Attack by Staphylococcal Alpha-Toxin Activates NF-κB and Induces Interleukin-8 Production. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 2630–2635. [CrossRef] [PubMed]
- Dessing, M.C.; van der Sluijs, K.F.; Florquin, S.; van der Poll, T. Monocyte chemoattractant protein 1 contributes to an adequate immune response in influenza pneumonia. *Clin. Immunol.* 2007, *125*, 328–336. [CrossRef] [PubMed]
- Wareing, M.D.; Lyon, A.B.; Lu, B.; Gerard, C.; Sarawar, S.R. Chemokine expression during the development and resolution of a pulmonary leukocyte response to influenza A virus infection in mice. *J. Leukoc. Biol.* 2004, *76*, 886–895. [CrossRef] [PubMed]
- 28. Niemann, S.; Ehrhardt, C.; Medina, E.; Warnking, K.; Tuchscherr, L.; Heitmann, V.; Ludwig, S.; Peters, G.; Löffler, B. Combined action of influenza virus and *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin provokes severe lung epithelium damage. *J. Infect. Dis.* **2012**, *206*, 1138–1148. [CrossRef] [PubMed]
- 29. Mairpady Shambat, S.; Chen, P.; Nguyen Hoang, A.T.; Bergsten, H.; Vandenesch, F.; Siemens, N.; Lina, G.; Monk, I.R.; Foster, T.J.; Arakere, G.; et al. Modelling staphylococcal pneumonia in a human 3D lung tissue model system delineates toxin-mediated pathology. *Dis. Model. Mech.* **2015**, *8*, 1413–1425. [CrossRef] [PubMed]
- 30. Bloes, D.A.; Haasbach, E.; Hartmayer, C.; Hertlein, T.; Klingel, K.; Kretschmer, D.; Planz, O.; Peschel, A. Phenol-Soluble Modulin Peptides Contribute to Influenza A Virus-Associated *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Infect. Immun.* 2017, 85. [CrossRef] [PubMed]
- 31. Badiou, C.; Dumitrescu, O.; George, N.; Forbes, A.R.N.; Drougka, E.; Chan, K.S.; Ramdani-Bouguessa, N.; Meugnier, H.; Bes, M.; Vandenesch, F.; et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin in clinical specimens by enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic tests. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 1384–1390. [CrossRef] [PubMed]
- 32. Wang, R.; Braughton, K.R.; Kretschmer, D.; Bach, T.-H.L.; Queck, S.Y.; Li, M.; Kennedy, A.D.; Dorward, D.W.; Klebanoff, S.J.; Peschel, A.; et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1510–1514. [CrossRef] [PubMed]
- 33. Mehlin, C.; Headley, C.M.; Klebanoff, S.J. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: Isolation and characterization. *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 907–918. [CrossRef] [PubMed]
- 34. Yu, K.O.A.; Randolph, A.G.; Agan, A.A.; Yip, W.-K.; Truemper, E.; Weiss, S.; Ackerman, K.; Schwarz, A.; Guiliani, J.; Hall, M.W.; et al. PALISI PICFlu Study Group *Staphylococcus aureus* a-toxin Response Distinguishes Respiratory Virus-MRSA Co-infection in Children. *J. Infect. Dis.* 2016, 214, 1638–1646. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Löffler, B.; Niemann, S.; Ehrhardt, C.; Horn, D.; Lanckohr, C.; Lina, G.; Ludwig, S.; Peters, G. Pathogenesis

of *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia: The role of PVL and an influenza coinfection. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2013**, *11*, 1041–1051. [CrossRef] [PubMed]

- 36. Craven, R.R.; Gao, X.; Allen, I.C.; Gris, D.; Bubeck Wardenburg, J.; McElvania-Tekippe, E.; Ting, J.P.; Duncan, J.A. *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7446. [CrossRef] [PubMed]
- 37. Pichereau, S.; Moran, J.J.M.; Hayney, M.S.; Shukla, S.K.; Sakoulas, G.; Rose, W.E. Concentration-dependent effects of antimicrobials on *Staphylococcus aureus* toxin-mediated cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 123–129. [CrossRef] [PubMed]
- Bauernfeind, F.; Bartok, E.; Rieger, A.; Franchi, L.; Núñez, G.; Hornung, V. Cutting edge: Reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol. Baltim.* 2011, 187, 613–617. [CrossRef] [PubMed]
- 39. Meduri, G.U.; Headley, S.; Kohler, G.; Stentz, F.; Tolley, E.; Umberger, R.; Leeper, K. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* **1995**, *107*, 1062–1073. [CrossRef] [PubMed]
- 40. Müller, S.; Wolf, A.J.; Iliev, I.D.; Berg, B.L.; Underhill, D.M.; Liu, G.Y. Poorly cross-linked peptidoglycan in MRSA due to mecA induction activates the inflammasome and exacerbates immunopathology. *Cell Host Microbe* 2015, *18*, 604–612. [CrossRef] [PubMed]
- 41. Shimada, T.; Park, B.G.; Wolf, A.J.; Brikos, C.; Goodridge, H.S.; Becker, C.A.; Reyes, C.N.; Miao, E.A.; Aderem, A.; Götz, F.; et al. *Staphylococcus aureus* evades the lysozyme-based digestion of peptidoglycan that links phagocytosis and macrophage IL-1β secretion. *Cell Host Microbe* 2010, *7*, 38–49. [CrossRef] [PubMed]
- 42. Watkins, R.R.; David, M.Z.; Salata, R.A. Current concepts on the virulence mechanisms of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus. J. Med. Microbiol.* **2012**, *61*, 1179–1193. [CrossRef] [PubMed]
- 43. Kobayashi, S.D.; DeLeo, F.R. An update on community-associated MRSA virulence. *Curr. Opin. Pharmacol.*2009, 9, 545–551. [CrossRef] [PubMed]
- 44. Monecke, S.; Coombs, G.; Shore, A.C.; Coleman, D.C.; Akpaka, P.; Borg, M.; Chow, H.; Ip, M.; Jatzwauk, L.; Jonas, D.; et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17936. [CrossRef] [PubMed]
- 45. McCullers, J.A.; English, B.K. Improving therapeutic strategies for secondary bacterial pneumonia following influenza. *Future Microbiol.* **2008**, *3*, 397–404. [CrossRef] [PubMed]
- 46. Karlström, Å.; Boyd, K.L.; English, B.K.; McCullers, J.A. Treatment with protein synthesis inhibitors improves outcomes from secondary bacterial pneumonia following influenza. *J. Infect. Dis.* **2009**, *199*, 311–319. [CrossRef] [PubMed]
- 47. Casalegno, J.-S.; Ferraris, O.; Escuret, V.; Bouscambert, M.; Bergeron, C.; Linès, L.; Excoffier, T.; Valette, M.; Frobert, E.; Pillet, S.; et al. Functional balance between the hemagglutinin and neuraminidase of influenza A(H1N1)pdm09 HA D222 variants. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104009. [CrossRef] [PubMed]

© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



L'objectif de ce travail était de tester si les résultats précédemment obtenus *in vitro* sur des lignées cellulaires continues et *ex vivo* sur des monocytes de témoins sains sont transposables à des monocytes isolés de patients grippés présentant des formes cliniques graves (patients hospitalisés en réanimation ou soins intensifs).

## **1** Introduction

Il est maintenant bien établi qu'une réponse immunitaire inadéquate dans le cadre d'une infection sévère joue un rôle considérable dans la gravité du tableau clinique et le pronostic du patient (360). La réaction inflammatoire de l'hôte, bien que primordiale dans la lutte contre le pathogène, peut être délétère en cas d'activation excessive au premier jour de l'infection. Ce phénomène est notamment observé lors des co-infections lorsque la synergie des facteurs de virulence viraux et bactériens accentue le versant pro-inflammatoire de la réponse immunitaire, augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et entraine un recrutement excessif de PNN et monocytes au niveau pulmonaire ce qui aggrave les lésions pulmonaires (5–8). Inversement dans les jours qui suivent l'infection virale une anergie de la réponse immunitaire favorise la surinfection secondaire ou diminue la clairance de l'infection pulmonaire (9,10).

Identifier les patients à risques en fonction de leur réponse immunitaire devrait permettre d'améliorer leur prise en charge par l'utilisation de traitements immunomodulateurs adaptés. Mais pour cela la validation d'un ou plusieurs marqueurs biologiques corrélés à la réponse immunitaire locale et générale dans la séquence de l'infection est nécessaire pour mieux comprendre l'évolution sévère d'une pathologie infectieuse. C'est le concept d'*immuno-monitoring*, qui a notamment été développé par l'équipe du Pr G. Monneret dans la pathologies du sepsis (11).

Cette partie du travail est une étude *in vivo* et *ex vivo* et repose sur des données obtenues à partir de patients lyonnais inclus dans la cohorte Antigrippe. Il s'agit d'une cohorte prospective et descriptive menée chez des patients présentant des grippes graves hospitalisés en réanimation ou soins intensifs financée par un Projet Hospitalier de Recherche Clinique inter-régional (PHRCi) Antigrippe. Mon travail s'inscrit dans la cadre d'une étude ancillaire, greffée sur le protocole clinique uniquement pour les patients de la réanimation de l'hôpital Edouard Herriot (HEH) des Hospices Civils de Lyon du Pr L. Argaud en collaboration avec le laboratoire d'immunologie d'HEH du Pr G. Monneret.

Les objectifs de ce travail sont :

- Etudier dans les cas de grippes sévères l'intérêt des marqueurs d'immunodépression déjà validés dans le choc septique (étude ancillaire).
- 2) Etudier *ex vivo* la réponse monocytaire des patients grippés à une exposition à différents facteurs de virulence de *S. aureus*. Nous voulons dans cette partie voir si les résultats obtenus *in vitro* sur des lignées cellulaires et des monocytes de témoins sains sont transposables à des leucocytes isolés de patients grippés. Nous avons également étudié le phénotype des leucocytes de ces patients ainsi que les perturbations fonctionnelles (migration et phagocytose) que l'infection grippale entraine sur leurs leucocytes (étude fonctionnelle nichée).

# 2 Matériels et méthodes

## 2.1 Population étudiée

Le PHRCi Antigrippe est un PHRC Inter-régional 2013, promu par les Hospices Civils de Lyon et coordonné par le Dr Jean-Sébastien Casalegno. L'objectif de ce protocole est de valider un marqueur prédictif dans une cohorte de patients hospitalisés en réanimation ou en soins continus adulte et pédiatrique pour détresse respiratoire sévère secondaire à l'infection grippale.

Les critères d'inclusion dans ce protocole sont les patients (enfants ou adultes sans limites d'âge) ayant donné leur accord qui sont admis dans un service de réanimation ou de surveillance continue d'un des centres participants à l'étude. Ces patients doivent présenter une atteinte respiratoire avec un diagnostic virologique de grippe confirmé par PCR ou par un test rapide de diagnostic de la grippe. Pour les patients inclus, les données suivantes ont été recueillies :

 données démographiques : âge, sexe, vaccination grippale saison en cours, comorbidité, obésité (IMC>30)

- données microbiologiques : pneumopathie bactérienne, sepsis

- sévérité clinique à l'admission : SDRA et sévérité du SDRA, score SOFA, IGS2, PaO2/FiO2 à l'admission
- prise en charge clinique : nécessité et type de support ventilatoire (ventilation non invasive, ventilation haut débit, ventilation invasive), oseltamivir

- évolution : décès dans le service, durée moyenne d'hospitalisation

Actuellement toutes les données n'ont pas pu être recueillies pour l'intégralité des patients admis. Le nombre de patients pour lesquels nous avons les données est indiqué pour chaque analyse.

207 patients ont été inclus pour un objectif de 200 dont 87 sur la réanimation adulte d'HEH. Au sein de ce centre nous avons conduit une étude ancillaire greffée sur le protocole clinique en partenariat avec le laboratoire d'immunologie d'HEH. Le but de cette étude ancillaire a été de tester des marqueurs d'immunosuppression observés dans le choc septique afin de décrire les parallèles entre le choc septique et les SDRA grippaux.

Parmi ces patients inclus dans l'étude ancillaire, certains ont été inclus dans une étude fonctionnelle. Le but de cette étude fonctionnelle était de déterminer l'état d'activation des cellules mononucléées et PNN des patients et de tester la réponse leucocytaire *ex vivo* à une exposition à différents facteurs de virulence de *S. aureus* (PVL, HIa, protéine A). Du fait des fortes contraintes de réalisation, seule une partie des patients inclus dans l'étude ancillaire a pu être caractérisée par des tests fonctionnels au laboratoire Virpath UCBL-1 de Laennec (Pr B. Lina) (Figure 22).

Un groupe témoin composé par cinq donneurs sains de l'établissement français du sang (EFS) de plus de 65 ans a été constitué afin de comparer les résultats dans l'étude fonctionnelle entre les patients du PHRC et une population contrôle.

Actuellement, un groupe contrôle pour l'étude ancillaire est en cours d'étude. En effet, l'absence de valeurs de référence pour le mHLA-DR dans la population des plus de 65 ans (majorité de notre recrutement) risquait de limiter notre capacité à interpréter des valeurs pathologiques. Une étude ancillaire bis est donc actuellement conduite pour définir les valeurs de référence dans cette population. L'objectif est de tester le mHLA-DR dans une population de personnes âgées de plus de 65 ans non hospitalisées prélevées au centre de prélèvement du Centre de Biologie et Pathologie Est des Hospices Civils de Lyon du 01/09/2018 au 31/01/2019.



Figure 22 : *Flow chart* de l'étude ancillaire et de l'étude nichée fonctionnelle.

Sur les 207 patients inclus dans le PHRCi (objectif 200) 39 ont participé à l'étude ancillaire et 9 ont pu être inclus dans l'étude fonctionnelle nichée.

## 2.2 Méthodologies et analyses réalisées

## 2.2.1 Etude ancillaire

Chez les patients inclus dans l'étude ancillaire, un tube EDTA a été prélevé à J1, J3, J5, J7 de l'admission dans le service et a été envoyé au laboratoire d'immunologie du Pr G. Monneret où un bilan a été réalisé afin d'étudier la variation des différentes populations leucocytaires au cours du temps chez ces patients.

Les marqueurs suivants ont été mesurés en cytométrie en flux :

- Sous-populations lymphocytaires T, B, NK
- Pourcentage de lymphocytes T régulateurs
- Mesure de l'expression monocytaire du HLA-DR (mHLA-DR)

Les points J1, J3, J5, J7 n'ont pas toujours pu être réalisés pour l'ensemble des patients du fait de la durée d'hospitalisation, de la difficulté de prélèvements, et de l'absence de réalisation hors heures ouvrables.

## 2.2.1.1 Sous-populations lymphocytaires T, B, NK

La détermination des sous-populations lymphocytaires T, B et NK a été mesurée grâce à l'analyse des prélèvements sur un système simple plateforme automatisé Aquios CL (Beckman coulter, Hialeah, FL, USA). Cette plateforme effectue l'incubation des prélèvements avec les anticorps monoclonaux à tester, la lyse des globules rouges et l'analyse des prélèvements par cytométrie en flux. Les résultats sont rendus en valeurs absolues (cellules/µl). Après homogénéisation, 43 µl de sang total EDTA sont incubés avec 13 µl du panel d'anticorps monoclonaux à tester pendant 15 min, puis les globules rouges sont lysés par ajout de 435 µl de réactif de lyse (Beckman coulter). Les prélèvements sont alors analysés par le cytomètre.

Les panels d'anticorps utilisés pour déterminer les sous-populations lymphocytaires sont :

- Lymphocytaires T CD4 et CD8 : panel AQUIOS Tetra1 (Beckman coulter) qui est composé par les anticorps CD45-Fluorescein Isothiocyanate (FITC)/CD4-Phycoerythrin (PE)/CD8-Phycoerythrin Texas Red-X (ECD)/CD3-Phycoerythrin-Cyanin 5 (PC5).
   Les lymphocytes T CD4 sont CD45+/CD3+/CD4+/CD8- et les lymphocytes T CD8 sont CD45+/CD3+/CD4-/CD8+.
- Lymphocytes B et NK : panel AQUIOS Tetra2 (Beckman coulter) qui est composé par les anticorps CD45 FITC/[CD56+CD16] PE/CD19 ECD/CD3 PC5.
   Les lymphocytes B sont CD45+/[CD56+CD16]-/CD19+/CD3- et les lymphocytes NK sont CD45+/[CD56+CD16]+/CD19-/CD3-.

## 2.2.1.2 Pourcentage de lymphocytes T régulateurs

Les prélèvements ont été incubés avec les anticorps et lysés sur la station de travail TQprep (Beckman coulter). Tous les anticorps utilisés proviennent de chez Beckman coulter. 100µl de sang total EDTA ont été incubés pendant 10 min avec 10µL d'anticorps anti-CD25 couplé au PE, 10 µL d'anticorps anti-CD127 couplé au Phycoerythrin-Cyanin 7 (PC7) et 5 µL d'anticorps anti-CD4 couplé au Pacific Blue (PB). 100 µL de billes flow count ont été ajoutés puis les prélèvements ont été analysés sur un cytomètre Navios (Beckman coulter). Les lymphocytes T rég expriment le CD4, le CD25 (fort) et le CD-127 (low).

#### 2.2.1.3 Mesure de l'expression du mHLA-DR

La mesure du mHLA-DR a été réalisée sur tube EDTA fraichement prélevé grâce au kit BD Quantibrite™ Anti–HLA-DR/Anti-Monocyte (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Le marquage leucocytaire a été réalisé selon les recommandations du fournisseur. 25 µl de sang total du patient ont été incubé avec 10 µl de réactif QuantiBRITE anti-HLA-DR PE/Anti-monocyte (CD14) peridinin chlorophyll-cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5) pendant 30 min à température ambiante dans le noir. Puis les globules rouges ont été lysés grâce au tampon de lyse Facs lysing solution BD : 250µL de solution de tampon 1X ont été ajoutés au sang total, puis les tubes ont été vortexés et incubés à température ambiante dans le noir pendant 15 min. Un lavage a été réalisé avec 3 ml de PBS puis le prélèvement a été centrifugé à 300g pendant 6 minutes à 10°C. Le culot a alors été remis en suspension dans 500 µL de PBS-paraformaldéhyde à 1%.

Les prélèvements ont ensuite été analysés sur un cytomètre Navios. Le niveau d'expression du mHLA-DR a été exprimé en nombre d'anticorps anti-HLA-DR fixés par cellule.

### 2.2.2 Etude fonctionnelle

Dans le cadre de l'étude fonctionnelle, les prélèvements ont été réalisés uniquement lors de l'admission (J0) du patient en réanimation après son inclusion au protocole antigrippe et à l'étude ancillaire. Il s'agissait de 2 tubes de sang hépariné et d'un tube de sang EDTA traités dans les heures suivant le prélèvement au laboratoire Virpath de la faculté de médecine Laennec. Les tests suivants ont été réalisés :

- Caractérisation des cellules mononucléées (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) et PNN
- Capacité de migration des monocytes et PNN
- Capacité de phagocytose des monocytes et PNN
- Etude de la réponse des PNN et cellules mononucléées à une exposition aux facteurs de virulence de *S. aureus*

Du fait de la complexité des analyses et de la nécessité de prélèvements supplémentaires, seuls 9 patients de l'étude ancillaire ont pu être inclus lors des saisons 2015-2016 et 2016-2017. Afin de comparer la réponse des PBMC et PNN de ces patients avec celle de témoins sains, nous avons inclus un deuxième groupe composé par 5 donneurs sains de l'EFS appariés en âge (patients > 65 ans).

#### 2.2.2.1 Caractérisation des sous-populations leucocytaires

La caractérisation des sous-populations de PNN et PBMC a été réalisée sur tube EDTA fraichement prélevé. Le marquage leucocytaire a été réalisé selon les recommandations du fournisseur (BD Biosciences). Après homogénéisation, 100 µl de sang total ont été répartis dans des eppendorfs. Puis dans chacun des tubes, 20µl de l'anticorps monoclonal de souris à tester ont été ajoutés. Les différents anticorps testés ont été :

- Des marqueurs d'immaturité et d'activation cellulaire : CD11b couplé au PE-Cy5, CD10 couplé au PE, CD62L couplé à l'allophycocyanin (APC)
- Des récepteurs de chimiokines : CXCR2 couplé au PE et CCR2 couplé à l'AF 647
- Un marqueur de mortalité cellulaire : iodure de propidium (IP)

Les globules rouges ont ensuite été lysés grâce au tampon de lyse pharmlyse (BD Biosciences). 2mL de solution de tampon 1X ont été ajoutés à chaque aliquot de sang total, puis les tubes ont été vortexés et incubés à température ambiante dans le noir pendant 15 min. Après une centrifugation à 200g pendant 5 minutes, le culot a été lavé avec 2ml de PBS 1X contenant 1% de sérum de veau fœtal (SVF) et 0.1% d'azide de sodium. Après une nouvelle centrifugation à 200g pendant 5 minutes, le culot a été resuspendu dans 0.5 ml de milieu RPMI 1640 (Gibco, Thermofisher, Dardilly, France) contenant 10% de SVF.

Les prélèvements ont ensuite été analysés sur un cytomètre BD Accuri C6 (BD Biosciences). Les populations leucocytaires ont été identifiées selon leur taille (canal FSC) et leur complexité (canal SSC) (Figure 23). L'expression des marqueurs cellulaires a été exprimée en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI).



Figure 23 : Fenêtrage des PBMC et PNN. Le ratio taille/complexité du noyau permet de différencier les différentes sous-populations leucocytaires.

### 2.2.2.2 Test de migration cellulaire

Le test de migration cellulaire Migratest (Glycotope, Heidelberg, Allemagne) permet de quantifier la capacité de migration des PNN par cytométrie en flux, selon le même principe que la technique de la chambre de Boyden. Les PNN sont incubés dans des plaques de culture cellulaire, dans un insert de culture cellulaire qui a des pores de 3µm. Ce test mesure le nombre de PNN qui ont migré à travers l'insert en fonction d'un gradient de concentration d'un peptide chemoattractant : le N-formyl-Methionine-Leucine-Phenylalanine (fMLP) (Figure 24).



Figure 24 : Principe du Migratest.

Afin de séparer les érythrocytes et la fraction de leucocytes-plasma, 1 mL de sang total homogénéisé prélevé sur tube hépariné a été décanté dans 1 mL de milieu de séparation pendant 40 min à température ambiante. Le test de migration a ensuite été effectué dans l'heure suivant l'isolement des leucocytes.

Pour chaque patient, nous avons réalisé un puits test contenant 350  $\mu$ L de fMLP et un puits témoin contenant 350  $\mu$ L de tampon d'incubation. Puis nous avons placé un insert de culture dans chaque puits et nous avons ajouté 100  $\mu$ L de plasma enrichi en leucocytes que nous avons incubé 30 minutes précisément à 37° au bain-marie sans agiter. Nous avons alors prélevé le contenu du puits témoin négatif et du puits test dans des tubes à hémolyse qui ont été placés dans la glace. Nous avons réalisé un tube « contrôle L-selectine » contenant 20  $\mu$ l de suspension cellulaire de l'insert du témoin négatif et 180  $\mu$ l de tampon d'incubation. 20  $\mu$ l de réactif contenant des anticorps monoclonaux anti-Lsélectine-FITC et des billes de comptage ont été ajoutés à chaque tube, puis nous les avons vortexés et incubés 10 minutes dans la glace dans le noir. 20  $\mu$ l de solution de marquage d'ADN vital ont ensuite été ajouté à chaque tube, puis nous les avons vortexés et incubés 5 minutes dans la glace dans le noir. La mesure au cytomètre a alors été réalisée dans les 120 minutes suivantes. En cytométrie, nous avons quantifié le nombre de PNN ayant migré à travers l'implant de culture cellulaire ainsi que l'état d'activation de ces cellules. Nous avons sélectionné dans une première région (R1) les leucocytes et les billes de comptage selon leur complexité et leur expression d'ADN vital (SSC/FL3). Dans cette région R1, nous avons réglé l'acquisition sur 2000 billes de comptage dans une région R2 et nous avons créé une fenêtre R3 contenant les PNN selon un diagramme SSC/FSC (Figure 25).





L'activation des PNN a été mesurée grâce à l'expression de la L-sélectine, qui diminue lors de l'activation des PNN. L'acquisition était réglée pour que 15% des cellules de l'échantillon « contrôle L-selectine » soient positives (Figure 26).



**Figure 26 : Mesure de l'expression de la L-sélectine.** A gauche le tube témoin et à droite le tube test. Les cellules activées sont situées dans la région M1.

#### 2.2.2.3 Test de phagocytose

Le test de phagocytose Phagotest (Glycotope) permet la quantification de la phagocytose des PNN et des monocytes prélevés sur sang hépariné. Ce test permet d'obtenir le pourcentage de monocytes et PNN qui ont phagocyté des *Escherichia coli* (*E. coli*) couplé au FITC.

Pour chaque patient, un tube témoin et un tube test ont été préparés. 100µl de sang total ont été incubés dans la glace pendant 10 min. 20 µl d'*E. coli*-FITC ont été ajoutés dans chacun des tubes puis nous les avons vortexés. Le tube témoin négatif a été incubé 10 min dans la glace et le tube test a été incubé dans un bain-marie à 37° fermé (pour garder une température précise) pendant 10 min. A la fin de l'incubation le tube test a été placé dans la glace pour arrêter la phagocytose. Nous avons ajouté 100 µl de solution quenching dans chaque tube que nous avons vortexé. Nous avons réalisé deux lavages successifs avec 3 ml de solution de lavage, puis nous avons centrifugé 5 min à 250g entre 2 et 8°C.

Afin de lyser les leucocytes, nous avons incubé les tubes avec 2 mL de solution de lyse 20 min à température ambiante, puis nous avons centrifugé 5 min à 250g entre 2 et 8°C et nous avons réalisé un nouveau lavage.

Nous avons ajouté 200 µl de solution de marquage de l'ADN dans chaque tube que nous avons incubé 10 min dans la glace à l'abri de la lumière.

La lecture de cytométrie a été réalisée dans l'heure suivant le marquage.

La fenêtre contenant les leucocytes a été déterminée grâce au marquage de l'ADN (rapport évènement/FL2). Nous avons réglé l'acquisition sur 10000-15000 leucocytes par échantillon (Figure 27).



#### Figure 27 : Stratégie de sélection des leucocytes.

Le marquage de l'ADN (FL2) permet de différencier les bactéries et les leucocytes.

Les populations de monocytes et de PNN ont été déterminées par le rapport FSC/SSC. Pour chaque sous-population (monocytes ou PNN), le nombre de leucocyte ayant phagocyté des *E.coli* a été quantifié par mesure du nombre de cellules positives dans le canal FL1 et le nombre de bactéries

ingérées par leucocyte a été quantifié par détermination de la moyenne de fluorescence dans le canal FL1 (Figure 28).



# Figure 28 : Exemple de la quantification des PNN ayant phagocyté des bactéries et quantification du nombre de bactéries phagocytées par PNN.

A gauche, le ratio SSC/FSC permet de sélectionner la sous-population des PNN. A droite, la population M2 permet de déterminer le nombre de leucocyte ayant phagocyté *E.coli* et le nombre de bactéries ingérées par leucocyte.

# 2.2.2.4 Etude de la réponse des PNN et des cellules mononucléées à une exposition aux facteurs de virulence de S. aureus

### 2.2.2.4.1 Isolement des PNN et des cellules mononucléées

A partir de sang total prélevé sur tube hépariné, nous avons isolé les cellules mononucléées (PBMC, qui contiennent les monocytes et les lymphocytes) et les PNN grâce à un ficoll. Pour chaque patient, nous avons réalisé deux ficoll. Dans un tube à fond conique nous avons déposé 3ml d'Histopaque®-1119 (Sigma-Aldrich®) et 3 ml d'Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich®). Par-dessus, 3 ml de sang total ont été délicatement déposés en évitant de mélanger les différentes fractions de réactifs. Les tubes ont ensuite été centrifugés 30 min à 700g avec un démarrage lent et un arrêt sans frein.

Après centrifugation, les PBMC forment un anneau cellulaire de densité 1,077 g/ml et les PNN forment un anneau cellulaire de densité 1,119 g/ml (Figure 29).



Figure 29 : Répartition des différentes fractions cellulaires après réalisation d'un Ficoll sur sang total, d'après la procédure du CNR des Staphylocoques.

Les PBMC et les PNN ont été prélevés dans deux tubes différents puis lavés deux fois dans du PBS à 4°C. Les culots cellulaires ont alors été suspendus à la concentration finale de 1,1.10<sup>6</sup> cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 avec 10% de SVF.

2.2.2.4.2 Exposition des PNN et cellules mononucléées aux facteurs de virulence de *S. aureus* 

Un tube témoin non exposé aux toxines a été conservé.

Nous avons testé trois facteurs de virulence de *S. aureus* : la PVL (LukS- LukF-PV recombinantes produites et purifiées par le Centre National de Référence des Staphylocoques, Lyon, France), la protéine A (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France) et l'Hla (Sigma-Aldrich).

Les suspensions cellulaires ont été diluées avec les facteurs de virulence à tester pour obtenir au final 10^6 cellules/ml incubées avec 0.05 µg/ml de PVL, 0.1µg/ml de protéine A et 0.1µg/ml d'Hla. Nous avons ensuite incubé les prélèvements pendant 4h à 37°C dans l'étuve à CO2.

Nous avons ensuite ajouté les anticorps monoclonaux de souris à tester en cytométrie dans les différents tubes.

Pour les tubes contenant les PBMC, nous avons ajouté 5 µl d'IP.

Pour les tubes contenant les PNN, nous avons ajouté 5 µl d'IP ou 20 µL de CD11b.

Ces tubes ont ensuite été analysés en cytométrie en flux où nous avons mesuré l'intensité de fluorescence des différents marqueurs.

## 2.2.3 Analyses statistiques

Le logiciel GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) a été utilisé pour réaliser les analyses statistiques.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les résultats entre deux groupes de patients.

Le test de Kruskal-Wallis avec un post-test de Dunn a été utilisé pour comparer les résultats de l'expression du mHLA-DR en fonction de la sévérité du SDRA et pour comparer les résultats de la réponse leucocytaire après exposition aux différents facteurs de virulence de *S. aureus*.

Une valeur p<0,05 a été considérée comme significative.

# 3 Résultats

## 3.1.1 Population incluse

38 patients ont été inclus dans l'étude ancillaire, dont 9 patients ont été aussi inclus dans l'étude fonctionnelle. Les caractéristiques démographiques et cliniques de ces patients sont présentées dans le tableau 3. Actuellement il y a des données manquantes pour certains patients, les résultats sont donc présentés en nombre de patients positifs pour le critère/nombre de patients pour lesquels nous avons les données.

Il s'agit de patients âgés (moyenne d'âge 75 ans), de sexe masculin dans 66% des cas et qui présentent pour la grande majorité des comorbidités. Concernant la présentation clinique, 37.8% des patients de l'étude ancillaire et 22.2% des patients de l'étude fonctionnelle ont présenté un SDRA à l'admission. Ces patients ont nécessité des soins lourds avec une ventilation mécanique pour 75.7% des patients de l'étude ancillaire et 55.6% des patients de l'étude fonctionnelle. Tous les patients inclus ont reçu de l'oseltamivir à l'admission. 21.6% des patients de l'étude ancillaire et 11% des patients de l'étude fonctionnelle sont décédés.

Les donneurs de l'EFS qui constituent le groupe témoin ont une moyenne d'âge de 65 ans et sont également majoritairement des hommes (80%).

	Etude ancillaire	Etude fonctionnelle	Témoin
	N=38	nichée	EFS
		N=9	N=5
Démographie			
Age (année)	75,3 ± 10,6	75,8 ± 1,1	65 ± 2,7
Sexe Masculin	25 (66%)	6 (67%)	4 (80%)
Vaccination grippale	8/21 (38%)	3/7 (43%)	ND
saison en cours			
Comorbidité	35/37 (95%)	8 (89%)	ND
Obésité (IMC>30)	6/32 (19%)	0 (0%)	ND
Résultat Microbiologique			
Pneumopathie	13/17	3/4	0
bactérienne			
Sepsis	7/37	2/9	0
Sévérité clinique à			
l'admission			
SDRA	14/37 (37.8%)	2/9 (22.2%)	0
SDRA Modéré	9/14	1/2	0
SDRA Sévère	5/14	1/2	0
SOFA à l'admission	5 [3;8] (n=33)	7 [6;9,5] (n=7)	NA
(médiane, EI)			
IGS2 (médiane, EI)	50 [37;57] (n=35)	50 [38;57] (n=9)	NA
PaO2/FiO2 à l'admission	187 (n=33)	210 (n=6)	NA
Support ventilatoire			
Ventilation	28/37 (75.7%)	5/9 (55.6%)	0
Ventilation Non Invasive	12/28	2/5	0
Ventilation Haut Débit	0/28	0/5	0
Ventilation Invasive	16/28	3/5	0
Autres Traitements			
Oseltamivir à l'admission	100%	100%	0
(% cohorte)			
Evolution			
Mortalité dans le service	8/37 (21,6%)	1 (11%)	0
Durée moyenne	12 ± 16	17 ± 16	0
d'hospitalisation (jours)			

#### Tableau 3: Description des patients inclus dans l'étude ancillaire et dans l'étude fonctionnelle.

Actuellement, il y a des données manquantes, les données sont donc présentées comme le nombre de patients qui présentent le critère/le nombre de patients pour lesquels nous avons les données. El= Ecart Interquartile. ND = non documenté. NA = Non applicable

18 patients contrôle ont été inclus ce jour (15/01/2019) dans l'étude ancillaire bis visant à déterminer les valeurs de référence du mHLA-Dr dans une population de plus 65 ans.

# 3.2 Résultats de l'étude ancillaire

Un bilan immunologique a été réalisé à J1, J3, J5 et J7 de l'admission dans le service. L'ensemble des points n'a pas toujours pu être réalisé pour chaque patient. A l'admission, les patients ont un bilan immunologique perturbé, caractéristique d'une immunosuppression.

## 3.2.1 Dosage du mHLA-DR à l'admission et statut SDRA

L'expression du mHLA-DR est diminuée dès l'admission des patients grippés en réanimation par rapport à une population contrôle appariée en âge (Figure 30). L'immunosénescence ne semble pas affecter la valeur de ce paramètre car le groupe contrôle est bien au-dessus des valeurs de référence (<20 000 Ac/cellule).

Si l'on considère le premier point disponible (J1 ou J3 si le point J1 n'est pas disponible) au regard du développement d'un tableau de SDRA dans les 7 premiers jours après l'admission en réanimation, on observe une tendance à la diminution de l'expression du m-HLADR en fonction de la sévérité du tableau (Figure 30). Ces éléments suggèrent que c'est bien la sévérité du SDRA et non l'infection par le virus influenza qui semble associé à la diminution de ce marqueur. Il existe cependant une grande hétérogénéité parmi les patients grippés admis en réanimation qui nécessitera une exploration plus détaillé de ces cas (sepsis, surinfections bactériennes...).

L'expression du mHLA-DR est significativement associée au statut concomitant de SDRA à J1 et J3. Elle n'est pas retrouvée significative à J5 et J7 probablement du fait d'un effectif faible (Figure 31).



#### Figure 30 : Expression du mHLA-DR en fonction du statut SDRA.

L'expression du mHLA-DR a été mesurée chez 37 patients admis en réanimation pour grippe sans SDRA, avec un SDRA modéré et un SDRA sévère comparé au groupe contrôle (étude ancillaire bis). Un test de Kruskal-Wallis et un post-test de Dunn ont été utilisés pour déterminer les différences statistiquement significatives, \*\*p<0,001.



**Figure 31 : Expression du mHLA-DR chez 37 patients admis en réanimation pour grippe avec ou sans SDRA.** Les données sont présentées par points J1, J3, J5, et J7 et analysées en fonction de la présence d'un SDRA au moment du prélèvement. Le niveau d'expression du mHLA-DR a été mesuré par cytométrie en flux et est exprimé en Anticorps/cellule. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les résultats des patients en SDRA avec les résultats des patients sans SDRA, \*p<0.05, \*\*p<0.001.

### 3.2.2 Autres marqueurs d'immunodépression et statut SDRA

Ces patients présentent également une lymphopénie portant à la fois sur les lymphocytes T et la souspopulation T CD4, sur les lymphocytes B entre J1 et J3 et sur les lymphocytes NK à J3. A J5 cette lymphopénie s'est corrigée pour toutes les sous-populations. En revanche la proportion de lymphocytes Trég reste dans les valeurs normales (Figure 32). Une diminution significative du nombre de lymphocytes TCD8 est également observée entre patients en SDRA et patients sans SDRA à J3, cependant le nombre de lymphocytes TCD8 reste dans les valeurs normales.

Aucune différence significative n'a été observée sur les marqueurs biologiques d'immunosuppression lorsque l'on compare les résultats des patients dont l'évolution clinique a été favorable aux résultats des patients décédés.



# Figure 32 : Cinétique des marqueurs biologiques d'immunodépression chez les patients de l'étude ancillaire en fonction de la présence d'un SDRA ou non.

Les patients ont été divisés en deux groupes en fonction de la présence ou non d'un SDRA. Les paramètres suivants ont été mesurés à J1 (n=8 patients en SDRA vs 19 patients sans SDRA), J3 (n=9 vs 14), J5 (n=4 vs 9) et J7 (n=6 vs 4) : LyT, LyB, LyNK, sous-populations LyT CD4, lyTCD8 et LyTreg. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les résultats entre les patients en SDRA et les patients sans SDRA, \*p<0.05.

## 3.3 Résultats de l'étude fonctionnelle nichée

Dans un premier temps nous avons caractérisé les phénotypes des PNN et PBMC des patients inclus et des témoins de l'EFS. A partir de prélèvements de sang total sur tube EDTA nous avons mesuré l'expression de marqueurs membranaires de différentes sous-populations leucocytaires présentes chez ces patients. Sur les PNN nous avons mesuré l'expression de CD10, CD62L, CD11b, CXCR2. Sur les PBMC nous avons mesuré l'expression du CD11b, CD62L, CCR2, CXCR2.

### 3.3.1 Profil d'activation des PBMC et PNN

Nous avons mesuré l'expression du CD11b et CD62L à la surface des PBMC et des PNN. Nous avons observé que les patients de réanimation forment un groupe à la distribution hétérogène par rapport aux témoins de l'EFS (Figure 33).

Concernant les PBMC, nous avons observé une activation de ces cellules chez les patients de réanimation : en effet la médiane du niveau d'expression du CD11b est significativement plus élevée chez les patients de réanimation par rapport aux témoins EFS. Il n'y a pas de différence significative entre patients de réanimation et témoins EFS pour l'expression du CD62L sur les PBMC (Figure 33). Concernant les PNN, la médiane du niveau d'expression du CD62L est significativement plus élevée chez les patients de réanimation par rapport aux témoins EFS. Il n'y a pas de différence significative entre les patients de réanimation par rapport aux témoins EFS. Il n'y a pas de différence significative entre l'expression du CD11b des patients de réanimation et les témoins EFS. Il n'y a pas de différence significative entre l'expression du CD11b des patients de réanimation et les témoins EFS (Figure 33).

Nous avons noté que certains patients de réanimation montrent des phénotypes particuliers, et notamment un patient (le patient 17NN) dont le niveau d'expression du CD11b et du CD62L est très élevé en comparaison aux autres patients ainsi qu'aux témoins. Pour l'instant l'analyse rapide des données cliniques de ce patient ne montre pas d'évolution défavorable.



**Figure 33 : Profil d'activation des PBMC et PNN des patients de réanimation et des témoins sains.** L'expression des marqueurs membranaires a été mesurée chez les patients de réanimation et chez les témoins sains de l'EFS. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les résultats des marqueurs membranaires entre ces deux groupes. \*p<0.05

## 3.3.2 Maturité des PNN

Afin d'estimer la maturité des PNN circulants, nous avons mesuré l'expression du CD10 à la surface des PNN. Aucune différence significative n'a été observée entre les patients et les témoins, indiquant que les PNN des patients ne sont pas plus immatures que ceux des témoins EFS (Figure 34).



Figure 34 : maturité des PNN.

#### 3.3.3 Capacité de migration des monocytes et PNN

Nous avons mesuré l'expression de récepteurs de chimiokines à la surface des monocytes (CCR2 et CXCR2) et des PNN (CXCR2). La dispersion de l'expression de ces récepteurs est importante sur ces deux types de cellules chez les patients de réanimation alors qu'elle est similaire entre les différents témoins de l'EFS (Figure 35). L'expression du CXCR2 est significativement plus élevée sur les PNN des patients.

Le test de migration transpuits des PNN après exposition à un facteur chemoattractant (fMLP) nous a permis d'observer la même dispersion entre les patients, ce qui est cohérent avec l'expression des récepteurs de chimiokines (Figure 35). De plus, même s'il n'y a pas de différence statistiquement significative, on observe une tendance à l'augmentation de la migration des PNN chez les patients par rapport aux témoins EFS. Ces résultats sont en faveur d'une augmentation de la capacité de migration des PNN des patients de réanimation par rapport aux témoins EFS. Après stimulation par le fMLP, les PNN des patients sont significativement moins activés que les PNN des témoins EFS.


**Figure 35 : Capacité de migration des monocytes et PNN des patients de réanimation et des témoins sains. A, B et C :** expression des récepteurs de chimiokines, **D** : migration transpuits des PNN selon un gradient de fMLP, **E** : activation des PNN après exposition au fMLP. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les résultats des marqueurs membranaires entre ces deux groupes. \*p<0.05

#### 3.3.4 Capacité de phagocytose des monocytes et PNN

Nous avons testé la capacité de phagocytose des PNN et monocytes. Ce test est basé sur l'ingestion d'*E. Coli* marqué à la FITC par les leucocytes du patient avec une révélation de la capacité de phagocytose de ces leucocytes par cytométrie en flux. La médiane du nombre de PNN et de monocytes qui ont phagocyté des bactéries n'est pas statistiquement différente. Nous avons cependant observé un pourcentage de monocytes qui ont phagocyté des bactéries plus bas chez certains patients de réanimation. Une fois encore, les patients de réanimation forment un groupe qui apparait plus hétérogène que les témoins EFS (Figure 36).

Une altération significative du nombre de bactéries phagocytées par PNN et par monocytes a été mise en évidence pour les patients de réanimation par rapport aux témoins EFS (Figure 36).





## 3.4 Etude de la réponse des PNN et PBMC à une exposition aux facteurs de virulence de *S. aureus*

Dans un deuxième temps nous avons testé la réponse des PNN et PBMC suite à l'exposition à trois facteurs de virulence de *S. aureus* que nous avions identifiés dans la première partie de cette thèse comme étant des activateurs de l'inflammation (protéine A) et de la cytotoxicité (PVL et Hla) sur les monocytes. Pour cela nous avons séparé les PNN des PBMC sur FicoII puis nous avons exposé ces leucocytes aux facteurs de virulence sélectionnés (0.05µg/ml de PVL, 0.1µg/ml d'Hla ou 0.1µg/ml de protéine A).

La mesure de la cytotoxicité a été réalisée par cytométrie en flux par mesure de l'incorporation d'IP. Nous avons observé que la concentration choisie de PVL est cytotoxique sur les PNN des témoins EFS et que la concentration d'Hla choisie est cytotoxique sur les PNN et les PBMC des témoins EFS. En revanche les PNN et PBMC des patients de réanimation sont résistants à ces concentrations de toxines (Figure 37).



### Figure 37 : Cytotoxicité des facteurs de virulence de *S. aureus* sur les PNN et PBMC des témoins EFS et des patients de réanimation.

Les PNN et les PBMC (10^6 cellules/ml) ont été incubés pendant 3h avec 0.05 µg/ml de PVL et 0.1 µg/ml d'Hla. L'incorporation d'IP a été mesurée afin de tester le % de mortalité cellulaire. Un test de Kruskal-Wallis et un post-test de Dunn ont été utilisés pour déterminer les différences statistiquement significatives. \*p<0.05, \*\*p<0.001

La mesure de l'expression du CD11b sur les PNN a permis de montrer une activation des PNN des témoins EFS après exposition à la PVL (Figure 38).



Figure 38 : Expression du CD11b par les PNN des témoins de l'EFS et des patients de réanimation après exposition aux facteurs de virulence de *S. aureus*.

Les PNN (10<sup>6</sup> cellules/ml) ont été incubés pendant 3h avec 0.05  $\mu$ g/ml de PVL, 0.1  $\mu$ g/ml de protéine A et 0.1  $\mu$ g/ml d'Hla. L'expression du CD11b a été mesurée afin de tester l'activation des PNN. Un test de Kruskall-Wallis et un post-test de Dunn ont été utilisés pour déterminer les différences statistiquement significatives. \*p<0.05.

### **4 Discussion et perspectives**

Des phénomènes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires peuvent apparaitre de façon simultanée chez les patients qui présentent une infection grippale sévère (200,361–365). La prédominance de l'un ou l'autre des versants dépend de nombreux facteurs dont la virulence de la souche de grippe, la présence ou non d'une co-infection, l'âge du patient ou l'existence de comorbidités (99,100,366,367).

Le but de notre étude a été d'étudier les versants phénotypique et fonctionnel de la réponse immunitaire chez des patients hospitalisés pour grippe grave et de comparer cette réponse à celle de témoins sains appariés en âge. La phase des inclusions de cette étude a été clôturée après l'épidémie grippale de l'hiver 2017-2018. Les données sont encore en cours de recueil ce qui explique que le nombre de données manguantes est important actuellement.

Nos résultats principaux montrent que les patients ont une altération à la fois phénotypique et fonctionnelle de leur réponse immunitaire. Ils présentent en effet les caractéristiques d'une immunosuppression systémique avec une diminution de l'expression du mHLA-DR, une lymphopénie et une altération de la phagocytose par les PNN et monocytes. Notre cohorte étant composée de patients âgés, l'immunosénescence associée à l'âge peut être un des facteurs de l'immunosuppression observée dans ces grippes graves (366).

Il est maintenant bien décrit que lors de la survenue d'un état inflammatoire intense, des mécanismes anti-inflammatoires se mettent en place rapidement afin de contrôler cette réponse inflammatoire inaugurale qui est responsable d'une immunodépression secondaire (360). La diminution de l'expression monocytaire du HLA-DR est actuellement le marqueur biologique le plus utilisé pour estimer l'altération de l'état immunitaire des patients de réanimation. Ce dosage est standardisé et peut donc être dosé en routine dans un laboratoire spécialisé en immunologie comme marqueur de suivi d'immunosuppression (368). Une chute rapide de l'expression du mHLA-DR est décrite dans diverses causes d'inflammations aigues sévères chez les patients de réanimation telles que le choc septique, les grands brûlés, les polytraumatismes ou la pancréatite aigüe (369–372). Dans ces pathologies, la diminution du mHLA-DR est corrélée au développement d'infections nosocomiales ou à la létalité (11). Ce marqueur d'immunodépression a donc été étudié dans les infections bactériennes graves telles que le sepsis mais n'a pas été étudié dans les infections virales graves. Notre étude montre pour la première fois une diminution de l'expression du mHLA-DR chez des patients infectés par des souches de virus influenza saisonniers hospitalisés en soins intensifs ou en réanimation. Une seule autre étude s'est déjà intéressée à ce marqueur d'immunosuppression dans l'infection par le virus influenza et portait sur des patients infectés par la souche de virus influenza aviaire A(H7N9) (147). Dans cette étude, une diminution du nombre de monocytes exprimant le HLA-DR était observée chez les patients avec une forme clinique d'infection sévère par rapport aux patients avec des infections modérées. Les valeurs de mHLA-DR que nous avons obtenues correspondent aux valeurs d'immunosupression (<20000 Ac/cellule) (373,374) et sont comparables à celles des patients de réanimation (375). Il est intéressant de noter une association significative entre la sévérité clinique du tableau respiratoire (présence ou absence de SDRA) et la diminution de l'expression du récepteur mHLA-DR. L'intérêt de ce marqueur dans ces tableaux respiratoires extrêmes sévère est probablement à explorer. Grace aux résultats du groupe contrôle âgé de plus de 60 ans nous savons maintenant que cette diminution d'expression du mHLA-DR n'est pas liée à la sénescence du système immunitaire.

Nous avons observé que l'expression du mHLA-DR reste diminuée dans notre cohorte jusqu'au dernier point de mesure (J7) et qu'elle a même une tendance à diminuer entre J5 et J7. De façon similaire, dans l'étude portant sur les patients infectés par le virus A(H7N9), l'altération de l'expression du mHLA-DR persistait durant le premier mois après l'infection avant de se normaliser et était associée à une baisse de la réponse lymphocytaire T (376). Cette cinétique est différente de celle du choc septique où le nadir du mHLA-DR est observé à J3-4 avant de remonter (369,375,377). Les patients de notre cohorte présentent également une altération de la réponse immunitaire adaptative. En effet nous avons observé une lymphopénie, portant sur les lymphocytes T CD4, les lymphocytes B et les lymphocytes NK. D'autres études ont déjà rapporté des lymphopénies dans des infections grippales sévères avec le virus pandémique H1N1 ou avec des virus aviaires (H7N9, H5N1) (378,200,379,380). La moyenne du dosage des sous-populations lymphocytaires effectué deux fois entre J0 et J10 de l'apparition de symptômes chez des patients infectés par le virus influenza H7N9 a montré que la lymphopénie portait sur les lymphocytes TCD8 alors que les autres sous-populations lymphocytaires étaient normales (CD4, B, NK). Entre J11 et J27, seul le nombre de cellules NK était diminué (147). L'origine de cette lymphopénie pourrait être liée à une augmentation de l'apoptose de ces cellules comme elle est observée dans le sepsis (381,382). Elle pourrait aussi être liée à l'infection des lymphocytes par le virus (383). Dans notre étude cette lymphopénie est observée entre J1 et J3 de l'admission en réanimation et est corrigée dès J5. La comparaison de nos résultats avec les résultats obtenus dans d'autres études chez des patients présentant des grippes graves est difficile. En effet peu d'études ont réalisé des dosages cinétiques. Dans une étude sur des patients avec une infection avec une souche H5N1, le nadir de la lymphopénie apparaissait plus tardivement que dans notre étude, soit au 8eme jour de l'admission du patient (384). La comparaison de nos résultats avec la cinétique d'évolution des lymphocytes chez d'autres patients de réanimation montre une normalisation plus rapide du taux de lymphocytes dans notre cohorte. En effet, les patients en choc septique ont une lymphopénie qui apparait précocement dès l'admission en réanimation mais qui peut persister plusieurs semaines (385–387). De même dans le contexte d'une immunosuppression post-opératoire, la lymphopénie est toujours présente à J5 (388). Dans ces différents modèles d'immunosuppression chez des patients de réanimation, l'immunodépression se corrige d'abord sur le versant de l'immunité innée avant de se corriger sur le versant adaptatif.

Les patients de notre cohorte sont donc plutôt en phase d'anergie du système immunitaire, propice à la survenue d'infections bactériennes secondaires. Nous avons montré dans la première partie de cette thèse que la co-exposition des monocytes au virus influenza et à des facteurs de virulence de *S. aureus* entraine une augmentation de l'inflammation et de la cytotoxicité. Nous avons voulu tester cette hypothèse dans notre cohorte de patients en comparant la réponse de leurs PNN et PBMC suite à l'exposition à des facteurs de virulence de *S. aureus* à la réponse de témoins EFS appariés en âge. Nous avons constaté que les patients de notre cohorte ont une altération fonctionnelle de leur réponse leucocytaire avec une diminution de leur capacité d'activation et de phagocytose. Nous avons également observé une diminution de la cytotoxicité des facteurs de virulence de *S. aureus* sur les PNN et PBMC des patients de réanimation en comparaison des témoins EFS.

De façon générale, une dispersion plus importante est observée pour les résultats des patients de réanimation en comparaison des témoins EFS, ce qui reflète leur hétérogénéité clinique. Certains patients identifiés sur les figures se démarquent des autres : leurs profils phénotypique et fonctionnel varient dans le même sens que ceux des autres patients mais avec une amplitude de variation plus importante. Nous n'avons cependant pas pu relier ces variations à une évolution clinique particulière.

L'altération de la phagocytose bactérienne par les macrophages et les PNN a déjà été observée dans des modèles d'infections murines suite à l'inhibition de la production de radicaux oxygénés libres ou de chimiokines et à la sécrétion d'IFN-y par les lymphocytes T (10,234,235). Au niveau des monocytes circulants, cette altération de la phagocytose pourrait être le reflet de la désactivation monocytaire mise en évidence par la chute du mHLA-DR. En effet, dans le sepsis, il est décrit que la diminution de l'expression du mHLA-DR s'accompagne d'altérations fonctionnelles des monocytes telles qu'une altération de la présentation antigénique aux lymphocytes T et une diminution de la production de cytokines (389–392).

La diminution de la sensibilité aux facteurs de virulence de S. aureus des PBMC et PNN des patients de notre cohorte en comparaison des témoins EFS est cohérente avec l'anergie de leur système immunitaire. De plus la survenue d'une virémie étant rarement observée dans les infections grippales, il est très probable que leurs leucocytes n'ait pas été directement exposés au virus influenza contrairement à notre étude in vitro. Le délai entre l'exposition au virus influenza et aux facteurs de virulence de S. aureus peut également participer à expliquer la différence entre la synergie proinflammatoire observée dans notre étude in vitro et l'anergie immunitaire observée dans notre cohorte de patients. En effet, dans notre étude in vitro les monocytes étaient exposés à la grippe, puis 1h après aux toxines bactériennes alors que dans notre cohorte de patients au minimum 4 jours se sont écoulés entre le début des signes cliniques et l'inclusion dans l'étude. Il a été montré que le délai entre l'infection virale et la surinfection bactérienne entraine des sévérités d'infection différentes. L'étude de dossiers de patients a montré que les infections concomitantes entre le virus influenza et S. aureus étaient plus sévères que les infections secondaires à S. aureus post-influenza lors de la pandémie de 1957 (195). L'importance du délai entre l'infection virale et bactérienne a aussi été montrée in vitro : dans un modèle de souris infectées par le virus influenza, une surinfection avec une souche de S. aureus entre J3 et J7 augmentait la létalité alors qu'à J14 et J21 elle n'avait plus de conséquence (6).

Par ailleurs, en raison de la faible quantité de sang disponible pour l'étude de la réponse immunitaire des patients de la cohorte nous avons travaillé sur des PBMC et pas sur des monocytes comme dans notre étude *in vitro*. Ceci peut expliquer l'absence de cytotoxicité de la PVL observée chez les patients

et les témoins car les lymphocytes, qui représentent la majorité des cellules dans la fraction leucocytaire des PBMC, ne possèdent pas le récepteur de la PVL. Ils sont donc résistants à l'action de cette toxine (294).

Notre étude possède plusieurs limites. Le faible nombre de patients inclus rend difficile la comparaison entre sous-groupes de patients (SDRA vs absence de SDRA, survie vs décès) et il serait intéressant de pouvoir l'augmenter. La quantité limitée de sang n'a pas permis de faire toutes les analyses sur tous les patients et rend les effectifs encore plus restreints. Enfin, l'exploitation des données cliniques une fois le recueil terminé pourrait permettre d'établir des corrélations entre les phénotypes que nous avons observés et la sévérité de l'infection.

En conclusion, cette étude montre que les patients hospitalisés en réanimation ou en soins continus pour grippe sévère ont une altération à la fois phénotypique et fonctionnelle de leur réponse immunitaire. L'anergie systémique de leur système immunitaire peut faciliter la survenue d'une infection bactérienne secondaire. L'altération de la capacité de phagocytose bactérienne par leurs PNN et monocytes pourrait alors permettre le développement d'une infection grave. Le suivi de l'état du statut immunitaire de ces patients pourrait être un outil intéressant afin de mettre en place des stratégies de traitements immunomodulateurs adaptés à chaque patient afin de limiter son risque de survenue d'infections bactériennes secondaires.

# C) Epidémiologie des co-infections VRS/bactéries dans les pneumopathies chez l'adulte

Chez l'adulte, une infection respiratoire virale est mise en évidence chez 53% des patients qui se présentent aux urgences avec des symptômes respiratoires aigus (393) et chez 23 à 28% des patients avec une pneumonie communautaire en France et dans le monde (394,395). Dans les unités de soins intensifs, ce taux monte à 30-36% des patients avec une pneumonie communautaire ou acquise à l'hôpital (319,343,396). Bien que le virus influenza soit le virus le plus fréquemment mis en évidence dans les pneumonies virales l'hiver, de nombreux autres virus sont aussi détectés tels que le rhinovirus, le virus respiratoire syncytial, le virus parainfluenza, les coronavirus, l'adénovirus et le métapneumovirus humain (394,395). Les co-infections virus-bactéries sont fréquemment observées dans les infections sévères et ont été décrites avec tous ces virus respiratoires (397–406).

Nous nous sommes intéressés dans ce travail aux co-infections VRS-bactéries dans les pneumonies chez l'adulte. La pathogénicité du VRS chez l'enfant est démontrée depuis longtemps mais son rôle chez l'adulte et notamment la personne âgée a été reconnu seulement récemment (318). Il infecte 3 à 10% des adultes chaque année dans le monde, menant dans la majorité des cas à des formes peu symptomatiques (320). Il n'est donc pas recherché de façon systématique en cas d'atteinte respiratoire chez un adulte (12,13). Cependant, chez les patients présentant des facteurs de risque (âge, pathologies respiratoires chroniques, immunodépression) il peut être responsable de formes graves. 5 à 15% des pneumonies communautaires, 10% des hospitalisations pour infection respiratoire aigüe, et une augmentation de la létalité durant le pic de circulation du VRS ont été observés dans le monde (12,13). Les co-infections bactériennes et les infections bactériennes secondaires font partie des complications les plus sévères rapportées dans cette population (321,343,344). Cependant suite au manque de documentation des infections à VRS chez l'adulte, peu de données épidémiologiques sont disponibles sur ces co-infections VRS-bactéries. La connaissance de cette épidémiologie est pourtant importante afin de permettre une bonne prise en charge de ces patients et de leur proposer une antibiothérapie probabiliste adaptée aux bactéries présentes dans les co-infections VRS-bactéries. L'objectif de notre étude a été de décrire l'épidémiologie des co-infections VRS-bactéries chez des patients adultes présentant une pneumonie et de déterminer les éventuels facteurs de gravité associés.

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (2019) 38:157–160 https://doi.org/10.1007/s10096-018-3407-3

#### **ORIGINAL ARTICLE**



## Microorganisms associated with respiratory syncytial virus pneumonia in the adult population

M. Jeannoël<sup>1,2</sup> · G. Lina<sup>3,4</sup> · J. P. Rasigade<sup>3,4</sup> · B. Lina<sup>1,2</sup> · F. Morfin<sup>1,2</sup> · Jean Sebastien Casalegno<sup>1,2,5</sup>

Received: 29 June 2018 / Accepted: 16 October 2018 / Published online: 23 October 2018 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

<u>Contexte</u>: L'épidémiologie des co-infections VRS/bactéries chez l'adulte dans le contexte d'une pneumonie est mal connue du fait du manque de documentation et de la reconnaissance récente du VRS comme virus capable d'engendrer des infections graves chez l'adulte.

<u>Objectifs</u> : Décrire l'épidémiologie des bactéries associées au VRS chez des adultes hospitalisés aux Hospices Civils de Lyon pour pneumonie.

<u>Conclusions :</u> Les patients infectés par le VRS qui développent une pneumonie sont des patients âgés (âge médian : 74 ans) qui présentent des comorbidités dans la majorité des cas. Les pneumonies chez les patients avec une co-infection VRS-bactérie ont un pronostic plus sévère qu'en cas d'infection isolée à VRS. Nous avons en effet observé une augmentation de la durée d'hospitalisation et de la fréquence d'admission en réanimation. Les bactéries les plus fréquemment isolées dans les co-infections VRS-bactéries sont *S. pneumoniae, H. influenzae, S. aureus, P.aeruginosa* et *M. catarrhalis.* L'épidémiologie des co-infections VRS-bactéries est comparable à celle des co-infections influenza-bactéries.

Cette étude a fait l'objet d'une présentation sous forme de poster en 2016 au cours de la 36e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) et d'une publication dans la revue EJCMID (reproduction ci-jointe)(407). **ORIGINAL ARTICLE** 



## Microorganisms associated with respiratory syncytial virus pneumonia in the adult population

M. Jeannoël<sup>1,2</sup> · G. Lina<sup>3,4</sup> · J. P. Rasigade<sup>3,4</sup> · B. Lina<sup>1,2</sup> · F. Morfin<sup>1,2</sup> · Jean Sebastien Casalegno<sup>1,2,5</sup>

Received: 29 June 2018 / Accepted: 16 October 2018 / Published online: 23 October 2018 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

#### Abstract

Respiratory syncytial virus (RSV) has been recognized as responsible for severe respiratory illness in adults, especially in the elderly. While pneumonia is commonly observed during RSV infection, the burden and epidemiology of bacterial superinfection is poorly understood. The aim of this study was to identify microorganisms associated with RSV-positive pneumonia in adults. A retrospective study was conducted during three consecutive winters (October to April 2013-2016) in the University Hospital of Lyon, France. During RSV circulation periods, a systematic RSV screening was performed by reverse-transcription PCR on all respiratory samples collected from adults. Records of RSV-positive patients were subsequently analyzed to identify radiologically confirmed pneumonia cases. Bacteria were identified by standard bacteriology cultures or urinary antigen screening and classified as potentially causative of pneumonia if quantification was above the specific threshold as defined by the European Manual of Clinical Microbiology. Overall, 14,792 adult respiratory samples were screened for RSV detection by PCR. In total, 292 had a positive RSV detection (2.0%) among which 89 presented with pneumonia including 27 bacterial superinfections (9.3%) with Streptococcus pneumonia, Haemophilus influenza, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, and Moraxella catarrhalis. Most patients were elderly (55.6%) and patients with comorbidities (77.8%). A more severe outcome was observed for RSV-bacteria-associated pneumonia compared with RSV pneumonia: length of stay was significantly longer (16 days vs 10 days) and ICU hospitalization more frequent (66.7% vs 21.0%) (p < 0.05). In conclusion, we did not observe major differences in the epidemiology of bacterial superinfections in RSV-positive pneumonia compared to reports on postinfluenza pneumonia.

Keywords RSV · Bacterial coinfection · Superinfection · Pneumonia · Adults

#### Introduction

Respiratory syncytial virus (RSV) is now recognized as an important cause of respiratory illness in adults, especially in the elderly [1]. Secondary bacterial pneumonia after or during an RSV infection is among the more severe complications reported in this population [2].

☑ Jean Sebastien Casalegno jean-sebastien.casalegno@chu-lyon.fr Few studies have described superinfection or coinfection with bacteria among adults with RSV-positive pneumonia in inpatient setting [3, 4]. Diagnostic testing for RSV is usually not routinely performed in this population. However burden and epidemiology of RSV-positive pneumonia in adults is important to assess in regards of the current antibiotic therapy recommendations [5].

<sup>3</sup> Laboratoire de Bactériologie, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord des Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Deringer

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord des Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Virpath, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, Lyon, France

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, Lyon, France

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Unité EMR 4610 Virologie et Pathologies Humaines (VirPath), Faculté de Médecine Lyon Est-Claude Bernard, 7 rue Guillaume Paradin, 69 372 Lyon Cedex 08, France

The aim of our study was to gain insights in the epidemiology of bacterial superinfections associated with RSV pneumonia in adults.

#### Materials and methods

#### **Patient selection**

We conducted a retrospective, monocenter, and observational study on three successive winter periods (October to April, 2013–2016). In the University Hospital of Lyon (Hospices Civils de Lyon, France), upper and lower respiratory tract samples from patients with respiratory symptoms are systematically screened for RSV and metapneumovirus (HMPV) using a reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). We included all adult patients ( $\geq$  18 years old) positive for RSV with radiologically confirmed pneumonia as diagnosed in the medical chart. Hospital-acquired pneumonia (HAP) was defined as radiologically confirmed pneumonia that manifests  $\geq$  48 h after the patient's admission to the hospital, and not present at the time of intubation.

#### **Data collection**

Data collected included laboratory results, demographics (age, sex), underlying conditions (cardiovascular disease, pulmonary disease, diabetes mellitus, and immunodeficiency), as well as clinical outcomes (length of stay, acute respiratory distress syndrome (ARDS), intensive care unit (ICU) admission, in-hospital death).

#### **Biological samples and laboratory testing**

For virus detection, clinical specimens comprised nasopharyngeal swabs, endotracheal aspirates, and broncho-alveolar lavages. Respiratory specimens were extracted using Easymag (Biomerieux, Marcy L'étoile, France). RSV detection was performed using a RT-PCR (ABI 7500; Thermofisher, Illkirch, France), or duplex RT-PCR detecting RSV and HMPV (R-gene detection kit, bioMérieux-Argene, France) as previously described [6].

For bacteria detection, pathogens were classified as potentially causative of pneumonia if identified in pleural fluid or blood, or if identified within a sputum specimen, endotracheal aspirate, and broncho-alveolar lavage with good-quality criteria and if quantification was above the appropriate EMCM decision threshold. Semi-quantitative bacterial culture process and interpretation was performed following the European Manual of Clinical Microbiology (EMCM) guidelines [7]. MALDI-TOF (Vitek-MS) was used for species identification.

#### Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Univariate analysis was used to compare RSVbacteria-associated pneumonia and RSV-positive pneumonia. Quantitative variables (age and length of stay) were expressed as median and interquartile range (IQR). Difference between the age groups was assessed by Student's *t* test. Difference between lengths of stay was assessed by non-parametric Mann-Whitney test. Qualitative variables were expressed as number and percentage. A Fisher's exact test was used for univariate comparisons. A *p* value < 0.05 was considered significant.

#### Results

#### Characteristics of the patients with RSV-positive sample

During the study period, viral RT-PCR was performed on 14,792 respiratory samples collected from adult patients. Influenza was detected in 1441 patients (9.7% of all respiratory samples), rhinovirus in 438 patients (3.0% of all respiratory samples), RSV in 292 patients (2.0% of all respiratory samples), and HMPV in 114 patients (0.8%). The median age of patients tested positive for RSV was 68 years (interquartile range 54 to 82), with a sex ratio of 1 (51.9% were men). Among RSV-positive patients, 95.5% of case records were retrieved (n = 279/292). Primary discharge diagnoses in patients without respiratory symptoms were as follows: 10.0% (n = 28/279) of systematic sampling without acute respiratory infection in immunosuppressed patients, 6.5% (n = 18/279) of acute heart failure, 2.5% (n = 7/279) of sepsis, and 1.4% (n =4/279) of neurological disorders. 79.6% (n = 222/279) patients presented with respiratory disorders, including 19.4% (n = 54/279) of respiratory failure, 15.8% (n = 44/279) of acute respiratory infection, 12.5% (n = 35/279) of acute respiratory distress syndrome, and 31.9% (n = 89/279) radiologically confirmed pneumonia.

#### Characteristics of patients with an RSV-positive sample and a radiologically confirmed pneumonia

Among these 89 pneumonia, 27 cases were associated with bacteria classified as potentially causative (RSV-bacteria-associated pneumonia) and 62 cases had no bacterial documentation (RSV-positive pneumonia). Among these 62 RSVpositive pneumonia, 5 cases were associated with another virus (2 RSV and influenza coinfections, 1 RSV and picornavirus coinfection, 1 RSV and bocavirus coinfection, and 1 RSV and CMV coinfection). Among the 27 RSV-bacteria associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia (HAP) was observed mostly in adults  $\geq 65$  years old (n = 8/10) whereas community-acquired pneumonia (CAP) occurred mostly in 18 to 64-year-old adults (n = 10/17).

Most of the patients presenting a pneumonia were elderly (median age 74 years (interquartile range 58 to 85) and had underlying conditions (77.8%) (Table 1). Only 11.1% were resident of nursing homes. Demographic characteristics did not differ between patients with an RSV-bacteria-associated pneumonia and patients with an RSV-positive pneumonia.

# Management and outcome of patients with an RSV-positive sample and a radiologically confirmed pneumonia

Among these 89 pneumonia, 31 patients received an empiric antibiotic treatment and 3 immunosuppressed patients received an antiviral treatment: 1 patient received ribavirin, 1

 Table 1
 Demography, characteristics, and outcome of the 89 patients

 with an RSV-positive sample and a radiologically confirmed pneumonia

	RSV-bact associated pneumon	eria- 1 ia	RSV-posi pneumoni	tive ia	p value
	<i>n</i> = 27	%	<i>n</i> = 62	%	
Age, median (IQR)	70 (56; 82)		76 (59; 85)		ns
18-64	12	44.4	21	33.9	
$\geq 65$	15	55.6	41	66.1	
Sex					ns
male	14	51.9	34	54.8	
female	13	48.1	28	45.2	
Living situation					
Independent	24	88.9	53	85.5	ns
In nursing facility	3	11.1	9	14.5	ns
Chronic illnesses					
Cardiovascular disease	11	40.7	32	51.6	ns
Pulmonary disease	13	48.1	18	29.0	ns
Diabetes mellitus	6	22.2	10	16.1	ns
Immunodeficiency	10	37.0	28	45.2	ns
No chronic illness	6	22.2	5	8.1	ns
Clinical severity and outcom	nes				
Length of stay, median (IQR)*	16 (10; 23)		10 (6; 19)		<i>p</i> < 0.05
ARDS	10	37.0	12	19.4	ns
ICU admission	18	66.7	13	21.0	p < 0.01
In-hospital death	7	25.9	11	17.7	ns

IQR interquartile range, ns non-signficant

\*A Mann-Whitney test was used to verify statistical significance for quantitative variable with a non-normal distribution. p < 0.05 was considered significant

159

patient received polyvalent immunoglobulins, and 1 patient received ribavirin and polyvalent immunoglobulins.

In total, 22 patients presented an ARDS, 31 patients were admitted to ICUs and in-hospital mortality occurred in 18 adults of which all were  $\geq 65$  years old (n = 14/18) or immunosuppressed (n = 4/18). RSV and bacteria coinfection was statistically associated with a more severe outcome than RSV-positive pneumonia as length of stay was significantly longer (16 days vs 10 days) and ICU hospitalization more frequent (66.7% vs 21.0%) (p < 0.05). However no significant difference was observed regarding in-hospital mortality (Table 1).

#### Epidemiology of RSV-bacteria co-detection

Among the 27 cases of RSV-positive pneumonia with superinfection, the most frequent bacteria were Streptococcus pneumoniae, Enterobacteriaceae (Klebsiella pneumonia, Enterobacter cloacae, Citrobacter koseri), Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenza, Staphylococcus aureus, and Moraxella catarrhalis. In two patients, more than one bacterial pathogen was detected. In patients hospitalized for CAP, the most frequent bacteria were S. pneumoniae, H. influenzae, and S. aureus whereas in HAP the most frequent bacteria were P. aeruginosa and Enterobacteriacae (Table 2).

#### Discussion

In this study, detection rates of the screened viruses were consistent with previous reports describing the epidemiology of respiratory viruses in hospitalized adults [8–10]. RSV detection in our study was low (2.0%) compare to rates of RSV detection reported in previous studies ranging from 7% of hospitalized adult patients to 10% of hospitalization for acute respiratory illness in an elderly population [11–13]. It is probably due to the systematic testing strategy associated to a

Table 2 Bacteria associated with RSV in CAP and HAP

	Total $(n = 27)$	$\operatorname{CAP}\left(n=17\right)$	HAP $(n = 10)$
Streptococcus pneumoniae	9	8	1
Enterobacteriaceae	5	2	3
Pseudomonas aeruginosa	4	1	3
Haemophilus influenza	4	4	0
Staphylococcus aureus	4	2	2
Moraxella catarrhalis	3	2	1

Species distribution of pathogenic bacteria involved in RSV-positive pneumonia (CAP) and hospital-acquired pneumonia (HAP)

sampling bias toward influenza-like illness. Those symptoms are indeed poorly predictive of an RSV infection [14].

Among RSV infected patients, 31.9% presented a radiologically confirmed pneumonia and 9.7% had an RSV-bacteriadocumented pneumonia. Despite the large number of RSV testing among the adult population, we identified only a few RSV radiologically confirmed pneumonia. Although this is a low prevalence, it is in agreement with the current literature in which 9 to 39% of RSV-bacteria co-infections were reported [3]. In our study, a higher prevalence was noted in the elderly (15/27), immunosuppressed, and patients with comorbidities (21/27). As it has been previously described, we observed that RSV-bacteria-associated pneumonia have a more severe outcome than RSV-positive pneumonia [15].

Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa were the most frequently detected pathogens in HAP and did not differ from the pathogens usually responsible for HAP in ICU [16]. S. pneumonia and H. influenza were the most frequently detected pathogens in CAP. In a previous study in adults with CAP, S. pneumonia and H. influenza were also mainly reported in RSV-bacteria coinfections [4]. We did not observed major differences to influenza-bacterial coinfections [17]. Those results suggest that there is no main difference between the microbiological epidemiology of RSV-bacterial coinfections and influenza-bacterial coinfections. This observation needs to be confirmed by other studies. Further research should focus on estimating the RSV CAP burden in adult as well as understanding the underlying mechanisms of copathogenesis.

#### **Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

Informed consent For this type of study formal consent is not required.

#### References

- Kwon YS, Park SH, Kim MA, Kim HJ, Park JS, Lee MY, Lee CW, Dauti S, Choi WI (2017) Risk of mortality associated with respiratory syncytial virus and influenza infection in adults. BMC Infect Dis 17:785
- Voiriot G, Visseaux B, Cohen J, Nguyen LB, Neuville M, Morbieu C, Burdet C, Radjou A, Lescure FX, Smonig R, Armand-Lefevre L, Mourvillier B, Yazdanpanah Y, Soubirou JF, Ruckly S, Houhou-Fidouh N, Timsit JF (2016) Viral-bacterial coinfection affects the

presentation and alters the prognosis of severe community-acquired pneumonia. Crit Care 20:375

- Falsey AR (2005) Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. Exp Lung Res 31(Suppl 1):77
- Jennings LC, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Laing RT, Werno AM, Young SA, Chambers ST, Murdoch DR (2008) Incidence and characteristics of viral community-acquired pneumonia in adults. Thorax 63:42–48
- Musher DM, Thomer AR (2014) Community-acquired pneumonia. N Engl J Med 371:1619–1628
- Gaymard A, Bouscambert-Duchamp M, Pichon M, Frobert E, Vallee J, Lina B, Casalegno JS, Morfin F (2018) Genetic characterization of respiratory syncytial virus highlights a new BA genotype and emergence of the ON1 genotype in Lyon, France, between 2010 and 2014. J Clin Virol 102:12–18
- Cornaglia G, Courcol R, Hermann J (2012) European manual of clinical microbiology. Basel: European Society for Clinical Microbiology and Infections Diseases : Société française de microbiologie
- Datta S, Walsh EE, Peterson DR, Falsey AR (2017) Can analysis of routine viral testing provide accurate estimates of respiratory syncytial virus disease burden in adults? J Infect Dis 215:1706–1710
- Visseaux B, Burdet C, Voiriot G, Lescure FX, Chougar T, Brugiere O, Crestani B, Casalino E, Charpentier C, Descamps D, Timsit JF, Yazdanpanah Y, Houhou-Fidouh N (2017) Prevalence of respiratory viruses among adults, by season, age, respiratory tract region and type of medical unit in Paris, France, from 2011 to 2016. PLoS One 12:e0180888
- Mayer LM, Kahlert C, Rassouli F, Vernazza P, Albrich WC (2017) Impact of viral multiplex real-time PCR on management of respiratory tract infection: a retrospective cohort study. Pneumonia (Nathan) 9:4
- Malosh RE, Martin ET, Callear AP, Petrie JG, Lauring AS, Lamerato L, Fry AM, Ferdinands J, Flannery B, Monto AS (2017) Respiratory syncytial virus hospitalization in middle-aged and older adults. J Clin Virol 96:37–43
- Widmer K, Zhu Y, Williams JV, Griffin MR, Edwards KM, Talbot HK (2012) Rates of hospitalizations for respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and influenza virus in older adults. J Infect Dis 206:56–62
- Walsh EE (2011) Respiratory syncytial virus infection in adults. Semin Respir Crit Care Med 32:423–432
- Loubet P, Lenzi N, Valette M, Foulongne V, Krivine A, Houhou N, Lagathu G, Rogez S, Alain S, Duval X, Galtier F, Postil D, Tattevin P, Vanhems P, Carrat F, Lina B, Launay O, FLUVAC Study Group (2017) Clinical characteristics and outcome of respiratory syncytial virus infection among adults hospitalized with influenza-like illness in France. Clin Microbiol Infect 23:253–259
- Jung HS, Kang BJ, Ra SW, Seo KW, Jegal Y, Jun JB et al (2017) Elucidation of bacterial pneumonia-causing pathogens in patients with respiratory viral infection. Tuberc Respir Dis (Seoul) 80(4): 358–367
- Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, Brissaud O, Dauger S, Gibot S, Hraiech S, Jung B, Kipnis E, Launey Y, Luyt CE, Margetis D, Michel F, Mokart D, Montravers P, Monsel A, Nseir S, Pugin J, Roquilly A, Velly L, Zahar JR, Bruyere R, Chanques G (2017) Hospital-acquired pneumonia in ICU. Anaesth Crit Care Pain Med 37:83–98
- McCullers JA (2014) The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. Nat Rev Microbiol 12:252–262

Le virus influenza peut être responsable d'infection respiratoire sévère et chaque année il entraine 250 000 à 500 000 décès dans le monde. Parmi les complications les plus graves on trouve les pneumonies virales et les pneumonies bactériennes post-influenza. Lors des épidémies saisonnières de grippe, environ 40% des co-infections influenza/bactérie nécessitent une hospitalisation et sont responsables d'un quart des décès (218,219). S. aureus est l'une des bactéries les plus fréquemment retrouvée dans ce contexte (3). L'efficacité des traitements dans ces infections graves est modérée ce qui souligne l'importance de progresser dans la compréhension de la physiopathologie de ces infections graves (4). Une réponse immunitaire inadéquate (soit excessive, soit trop faible) à l'infection pulmonaire joue un rôle considérable dans la gravité du tableau clinique et le pronostic du patient. En cas de co-infection, la synergie des facteurs de virulence viraux et bactériens peut accentuer le versant pro-inflammatoire de la réponse immunitaire et être responsable d'une activation massive qui aggrave les lésions pulmonaires (5–8). A l'opposé, l'anergie du système immunitaire, notamment dans les jours qui suivent l'infection virale, peut limiter la clairance virale ou favoriser le développement de surinfections bactériennes secondaires (9,10). Il apparait donc que l'étude de cette réponse immunitaire est nécessaire pour comprendre l'évolution d'infections grippales bénignes vers des formes sévères. La translation du concept d'immunomonitoring, validé dans d'autres pathologies telles que le sepsis, aux patients présentant des signes de gravité pourrait permettre de différencier les patients en fonction de leur réponse immunitaire et d'améliorer ainsi leur prise en charge par l'utilisation de traitements immunomodulateurs adaptés (11). Bien que le virus influenza soit le virus le plus fréquemment isolé dans les infections respiratoires sévères, d'autres virus respiratoires peuvent être responsables d'infections graves chez l'adulte. Le VRS est actuellement reconnu comme agent étiologique de pneumonies dans la population adulte âgée (12,13). Cependant comme cette reconnaissance est récente, il n'est pas recherché systématiquement dans les infections respiratoires de l'adulte et son épidémiologie ainsi que celle des bactéries qui lui sont associées en cas de pneumonie sont actuellement mal connues.

Dans la première partie de ce travail nous avons cherché à améliorer notre compréhension de la physiopathologie des co-infections grippe/*Staphylococcus aureus*. *S. aureus* est en effet l'une des bactéries les plus fréquemment isolée lors des co-infections grippe/bactérie. D'après les données obtenues au moyen de modèles expérimentaux *in vivo* de pneumonies bactériennes post-influenza,

l'infiltration massive de cellules myéloïdes, dont les monocytes, entraine une augmentation de la réponse inflammatoire et la destruction des cellules épithéliales (6,7,57). La plupart de ces études ont été menées sur des modèles animaux et malgré la convergence d'activation vers la voie NF-kB, peu de données sont disponibles sur l'interaction entre les toxines de *S. aureus* et le virus influenza au niveau cellulaire. Dans notre étude nous avons, dans un premier temps cherché *in vitro* les interactions entre les facteurs de virulence de *S. aureus* et influenza sur des lignées monocytaires continues, puis nous avons testé dans un deuxième temps les associations avec un effet significatif dans un modèle *ex vivo* de monocytes humains.

Nos résultats montrent que le choix du modèle cellulaire engendre des résultats différents dans des conditions expérimentales similaires et qu'il est important de valider les résultats obtenus in vitro sur des lignées cellulaires continues dans des modèles ex vivo plus pertinents physiologiquement. La susceptibilité cellulaire est en effet différente entre les lignées cellulaires et les monocytes humains. La synergie pro-inflammatoire observée entre influenza et les facteurs de virulence de S. aureus dans les cellules THP1-XBlue a été retrouvée dans des monocytes humains seulement entre influenza, HKSA et la protéine A. Concernant la cytotoxicité, la sensibilité des cellules THP1 est inférieure à celle des cellules U937 qui est elle-même inférieure à celle des monocytes humains. Une synergie cytotoxique entre influenza et Hla a été observée seulement sur les monocytes humains. Nos données montrent donc que le virus influenza potentialise l'action des facteurs de virulence de *S. aureus* de deux façons. D'abord influenza augmente l'inflammation produite par l'exposition aux toxines de S. aureus et renforce la production de cytokines responsable d'un afflux massif de leucocytes au niveau pulmonaire. Ensuite le virus augmente le potentiel cytotoxique de certaines toxines sur ces nouvelles cellules émigrées au niveau pulmonaire. Il serait intéressant de vérifier si nos résultats obtenus sur des monocytes se vérifient sur des macrophages. L'impact d'une co-exposition au virus influenza et à des souches bactériennes sur des cellules monocytaires serait également intéressant. En effet certaines souches de S. aureus, telles que le clone USA 300 qui produit de plus grandes quantités de PSMs et Hla et produit plus souvent de la PVL que les souches sensibles à la méticilline, sont souvent responsables de présentations cliniques plus sévères (252,408–410). Il serait donc intéressant de tester leur activité au niveau cellulaire. L'utilisation d'autres souches d'influenza A et notamment de souches circulantes H1N1 ou H3N2 pourrait également être intéressante.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons voulu valider ces résultats obtenus *in vitro* dans une cohorte de patients hospitalisés en soins continus ou en réanimation pour grippe sévère. Notre objectif était également d'étudier les versants phénotypique et fonctionnel de la réponse immunitaire chez ces patients et de les comparer à ceux de témoins sains appariés en âge.

Nos résultats principaux montrent que les patients inclus dans notre cohorte présentent une anergie du système immunitaire avec une altération à la fois phénotypique et fonctionnelle de leur réponse immunitaire. Ils présentent en effet les caractéristiques d'une immunosuppression systémique avec une diminution de l'expression du mHLA-DR, une lymphopénie et une altération de la phagocytose par les PNN et monocytes. Nous avons montré pour la première fois que l'expression du mHLA-DR est abaissée chez des patients hospitalisés pour une infection avec une souche saisonnière de virus influenza. Cette anergie du système immunitaire est bien décrite chez les patients en sepsis où elle est corrélée à la survenue d'infections nosocomiales et au décès du patient. En cas de survenue d'une infection bactérienne secondaire, nous pouvons supposer que les patients de notre cohorte risquent de présenter une altération fonctionnelle de leur réponse immunitaire. En effet nous avons constaté que les patients inclus ont une diminution de leur capacité d'activation leucocytaire et de phagocytose bactérienne. Nous avons également observé une diminution de la cytotoxicité des facteurs de virulence de *S. aureus* sur les PNN et PBMC des patients de réanimation en comparaison des témoins sains.

Ces résultats sont intéressants bien que préliminaires. L'obtention de l'ensemble des données des patients inclus permettra grâce à l'augmentation du nombre de patients dans chaque sous-groupe de comparer les profils phénotypiques et fonctionnels des patients en fonction de leurs caractéristiques cliniques et microbiologiques (comorbidités, souche virale, surinfection bactérienne...). Le suivi de l'état du statut immunitaire de ces patients pourrait être un outil intéressant afin de mettre en place des stratégies de traitements immunomodulateurs adaptés à chaque patient pour limiter son risque de survenue d'infections bactériennes secondaires.

Enfin, comme les pneumopathies bactériennes secondaires aux infections respiratoires virales ne sont pas limitées au virus influenza, nous nous sommes intéressés aux co-infections VRS-bactéries chez l'adulte. Le VRS a en effet été récemment reconnu comme responsable d'infections respiratoires graves chez l'adulte présentant des facteurs de risque (âge, pathologies respiratoires chroniques, immunodépression) (12,13). De plus, les co-infections bactériennes et les infections bactériennes secondaires font partie des complications les plus sévères rapportées dans cette population (321,343,344). Cependant suite au manque de documentation des infections à VRS chez l'adulte, peu de données épidémiologiques sont disponibles sur les co-infections bactéries-VRS. Nous avons donc mené une étude préliminaire dont le but était d'obtenir une première approche de l'épidémiologie des co-infections VRS-bactéries chez les patients adultes hospitalisés à Lyon pour une pneumonie.

Parmi les patients infectés par le VRS qui présentaient une pneumonie confirmée radiologiquement, environ un tiers avaient une co-infection bactérienne documentée. Les bactéries isolées étaient, par ordre de fréquence, *S. pneumoniae, H. influenzae, S. aureus, P. aeruginosa* et *M. catarrhalis*. Ce premier résultat suggère déjà qu'il n'existe pas de différence majeure entre l'épidémiologie microbiologique des co-infections VRS-bactérie et celle des co-infections influenza-bactérie. Cette connaissance de l'épidémiologie est importante afin d'adapter la prise en charge des patients. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin d'obtenir de plus grandes cohortes de patients et donc un reflet plus exhaustif de cette épidémiologie.

Les pneumonies liées à une co-infection virus/bactéries sont des infections graves qui peuvent engendrer le pronostic vital. Nous avons montré que le virus influenza potentialise l'inflammation et la cytotoxicité engendrée par des facteurs de virulence de *S. aureus* dans des monocytes isolés de témoins sains. Cependant l'étude du système immunitaire de patients hospitalisés pour grippe grave, a montré qu'au lieu d'être dans un état d'activation massive, il était en phase d'anergie et possédait une altération de la réponse immunitaire fonctionnelle en cas d'exposition à des facteurs de virulence de *S. aureus*. L'immunomonitoring de ces patients au pronostic sévère, qui permet la détermination de l'état pro- ou anti-inflammatoire dans lequel se trouve le patient pourrait participer à l'amélioration de la prise en charge de ces patients en permettant l'utilisation de traitements immunomodulateurs adaptés à la situation clinique de chaque patient.

### **BIBLIOGRAPHIE**

- 1. Short KR, Kroeze EJBV, Fouchier RAM, Kuiken T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. Lancet Infect Dis. janv 2014;14(1):57-69.
- 2. Matthay MA, Zemans RL. The Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathogenesis and Treatment. Annu Rev Pathol. 28 févr 2011;6:147.
- 3. Klein EY, Monteforte B, Gupta A, Jiang W, May L, Hsieh Y-H, et al. The frequency of influenza and bacterial coinfection: a systematic review and meta-analysis. Influenza Other Respir Viruses. sept 2016;10(5):394.
- 4. Máca J, Jor O, Holub M, Sklienka P, Burša F, Burda M, et al. Past and Present ARDS Mortality Rates: A Systematic Review. Respir Care. janv 2017;62(1):113-22.
- 5. Damjanovic D, Small C-L, Jeyananthan M, McCormick S, Xing Z. Immunopathology in influenza virus infection: Uncoupling the friend from foe. Clin Immunol. juill 2012;144(1):57-69.
- 6. Iverson AR, Boyd KL, McAuley JL, Plano LR, Hart ME, McCullers JA. Influenza Virus Primes Mice for Pneumonia From Staphylococcus aureus. J Infect Dis. 15 mars 2011;203(6):880-8.
- 7. Lee M-H, Arrecubieta C, Martin FJ, Prince A, Borczuk AC, Lowy FD. A postinfluenza model of Staphylococcus aureus pneumonia. J Infect Dis. 15 févr 2010;201(4):508-15.
- 8. Lin KL, Suzuki Y, Nakano H, Ramsburg E, Gunn MD. CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. J Immunol Baltim Md 1950. 15 févr 2008;180(4):2562-72.
- 9. Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebien M, et al. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. J Exp Med. 18 févr 2008;205(2):323-9.
- 10. Sun K, Metzger DW. Influenza infection suppresses NADPH oxidase-dependent phagocytic bacterial clearance and enhances susceptibility to secondary methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. J Immunol Baltim Md 1950. 1 avr 2014;192(7):3301-7.
- 11. Venet F, Lukaszewicz A-C, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. Curr Opin Immunol. août 2013;25(4):477-83.
- 12. Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. Semin Respir Crit Care Med. août 2011;32(4):423-32.
- 13. Murata Y, Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in adults. Antivir Ther. 2007;12(4 Pt B):659-70.
- 14. Gouarin S, Vabret A, Dina J, Petitjean J, Brouard J, Cuvillon-Nimal D, et al. Study of influenza C virus infection in France. J Med Virol. août 2008;80(8):1441-6.
- 15. Su S, Fu X, Li G, Kerlin F, Veit M. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. Virulence. 17 nov 2017;8(8):1580-91.

- 16. Chan JF-W, To KK-W, Tse H, Jin D-Y, Yuen K-Y. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. Trends Microbiol. oct 2013;21(10):544-55.
- 17. Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP, Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. Virology. mars 1990;175(1):59-68.
- 18. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. Nat Rev Dis Primer. 28 juin 2018;4(1):3.
- 19. Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Kühl A, Pöhlmann S. Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. Rev Med Virol. sept 2010;20(5):298-310.
- 20. Galloway SE, Reed ML, Russell CJ, Steinhauer DA. Influenza HA subtypes demonstrate divergent phenotypes for cleavage activation and pH of fusion: implications for host range and adaptation. PLoS Pathog. févr 2013;9(2):e1003151.
- 21. Garten W, Bosch FX, Linder D, Rott R, Klenk HD. Proteolytic activation of the influenza virus hemagglutinin: The structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage. Virology. déc 1981;115(2):361-74.
- 22. Suguitan AL, Matsuoka Y, Lau Y-F, Santos CP, Vogel L, Cheng LI, et al. The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals. J Virol. mars 2012;86(5):2706-14.
- 23. Kobayashi Y, Horimoto T, Kawaoka Y, Alexander DJ, Itakura C. Pathological studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza viruses. Avian Pathol J WVPA. juin 1996;25(2):285-304.
- 24. Schrauwen EJA, Herfst S, Leijten LM, van Run P, Bestebroer TM, Linster M, et al. The Multibasic Cleavage Site in H5N1 Virus Is Critical for Systemic Spread along the Olfactory and Hematogenous Routes in Ferrets. J Virol. avr 2012;86(7):3975-84.
- 25. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. Science. 7 sept 2001;293(5536):1840-2.
- 26. Rimmelzwaan GF, Kuiken T, van Amerongen G, Bestebroer TM, Fouchier RA, Osterhaus AD. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. J Virol. juill 2001;75(14):6687-91.
- 27. Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. Virus Res. août 1993;29(2):155-65.
- 28. Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC, et al. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. J Mol Biol. 3 févr 2006;355(5):1143-55.
- 29. Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, Gambaryan A, Klimov A, Castrucci MR, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. J Virol. sept 2000;74(18):8502-12.

- 30. Gambaryan A, Yamnikova S, Lvov D, Tuzikov A, Chinarev A, Pazynina G, et al. Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. Virology. 10 avr 2005;334(2):276-83.
- 31. Vines A, Wells K, Matrosovich M, Castrucci MR, Ito T, Kawaoka Y. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. J Virol. sept 1998;72(9):7626-31.
- 32. Naeve CW, Hinshaw VS, Webster RG. Mutations in the hemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus. J Virol. août 1984;51(2):567-9.
- Wan H, Perez DR. Amino Acid 226 in the Hemagglutinin of H9N2 Influenza Viruses Determines Cell Tropism and Replication in Human Airway Epithelial Cells. J Virol. mai 2007;81(10):5181-91.
- 34. Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. Virology. 15 nov 1994;205(1):17-23.
- 35. Rogers GN, D'Souza BL. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. Virology. nov 1989;173(1):317-22.
- 36. Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. Glycosylation site alteration in the evolution of influenza A (H1N1) viruses. PloS One. 2011;6(7):e22844.
- 37. Sun X, Jayaraman A, Maniprasad P, Raman R, Houser KV, Pappas C, et al. N-linked glycosylation of the hemagglutinin protein influences virulence and antigenicity of the 1918 pandemic and seasonal H1N1 influenza A viruses. J Virol. août 2013;87(15):8756-66.
- Yang H, Carney PJ, Chang JC, Guo Z, Villanueva JM, Stevens J. Structure and receptor binding preferences of recombinant human A(H3N2) virus hemagglutinins. Virology. mars 2015;477:18-31.
- 39. Ward CW, Murray JM, Roxburgh CM, Jackson DC. Chemical and antigenic characterization of the carbohydrate side chains of an Asian (N2) influenza virus neuraminidase. Virology. 15 avr 1983;126(1):370-5.
- 40. P M Colman JNV. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. Nature. 1983;303(5912):41-4.
- 41. Burmeister WP, Ruigrok RW, Cusack S. The 2.2 A resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. EMBO J. janv 1992;11(1):49-56.
- 42. Wagner R, Matrosovich M, Klenk H-D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. Rev Med Virol. juin 2002;12(3):159-66.
- 43. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H-D. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. J Virol. nov 2004;78(22):12665-7.
- Carlson CM, Turpin EA, Moser LA, O'Brien KB, Cline TD, Jones JC, et al. Transforming growth factor-β: activation by neuraminidase and role in highly pathogenic H5N1 influenza pathogenesis. PLoS Pathog. 7 oct 2010;6(10):e1001136.

- 45. Marcelin G, Sandbulte MR, Webby RJ. Contribution of antibody production against neuraminidase to the protection afforded by influenza vaccines. Rev Med Virol. juill 2012;22(4):267-79.
- 46. Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. Virology. oct 1974;61(2):397-410.
- 47. Hussain M, Galvin HD, Haw TY, Nutsford AN, Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. Infect Drug Resist. 20 avr 2017;10:121-34.
- 48. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van-der-Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivirresistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. Emerg Infect Dis. avr 2009;15(4):552-60.
- 49. Hurt AC, Ernest J, Deng Y-M, Iannello P, Besselaar TG, Birch C, et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. Antiviral Res. juill 2009;83(1):90-3.
- 50. Hurt AC, Besselaar TG, Daniels RS, Ermetal B, Fry A, Gubareva L, et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014-2015. Antiviral Res. 2016;132:178-85.
- 51. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. Nat Med. déc 2001;7(12):1306-12.
- 52. Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, Otera H, Kawabata S, Mihara K, et al. Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. Nat Commun. 20 août 2014;5:4713.
- 53. Zamarin D, García-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. PLoS Pathog. sept 2005;1(1):e4.
- 54. Varga ZT, Grant A, Manicassamy B, Palese P. Influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon by binding to MAVS and decreasing mitochondrial membrane potential. J Virol. août 2012;86(16):8359-66.
- 55. McAuley JL, Tate MD, MacKenzie-Kludas CJ, Pinar A, Zeng W, Stutz A, et al. Activation of the NLRP3 Inflammasome by IAV Virulence Protein PB1-F2 Contributes to Severe Pathophysiology and Disease. PLoS Pathog. 30 mai 2013;9(5):e1003392.
- 56. Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. J Virol. août 2006;80(16):7976-83.
- 57. McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith AM, McKeon R, Bennink J, et al. Expression of the 1918 Influenza A Virus PB1-F2 Enhances the Pathogenesis of Viral and Secondary Bacterial Pneumonia. Cell Host Microbe. 11 oct 2007;2(4):240-9.
- 58. Hsu AC-Y. Influenza Virus: A Master Tactician in Innate Immune Evasion and Novel Therapeutic Interventions. Front Immunol. 2018;9:743.
- 59. Privalsky ML, Penhoet EE. The structure and synthesis of influenza virus phosphoproteins. J Biol Chem. 10 juin 1981;256(11):5368-76.

- 60. Hatada E, Fukuda R. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. J Gen Virol. déc 1992;73 (Pt 12):3325-9.
- Chien C, Xu Y, Xiao R, Aramini JM, Sahasrabudhe PV, Krug RM, et al. Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. Biochemistry. 24 févr 2004;43(7):1950-62.
- 62. Qian XY, Chien CY, Lu Y, Montelione GT, Krug RM. An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure. RNA N Y N. nov 1995;1(9):948-56.
- 63. Mibayashi M, Martínez-Sobrido L, Loo Y-M, Cárdenas WB, Gale M, García-Sastre A. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. J Virol. janv 2007;81(2):514-24.
- 64. Talon J, Horvath CM, Polley R, Basler CF, Muster T, Palese P, et al. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. J Virol. sept 2000;74(17):7989-96.
- 65. Zhu Q, Yang H, Chen W, Cao W, Zhong G, Jiao P, et al. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to the attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. J Virol. janv 2008;82(1):220-8.
- 66. Hsu AC-Y, Barr I, Hansbro PM, Wark PA. Human Influenza Is More Effective than Avian Influenza at Antiviral Suppression in Airway Cells. Am J Respir Cell Mol Biol. juin 2011;44(6):906-13.
- 67. Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters K-A, Wills NM, Xiao Y-L, et al. An overlapping proteincoding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. Science. 13 juill 2012;337(6091):199-204.
- 68. Khaperskyy DA, Schmaling S, Larkins-Ford J, McCormick C, Gaglia MM. Selective Degradation of Host RNA Polymerase II Transcripts by Influenza A Virus PA-X Host Shutoff Protein. PLoS Pathog. févr 2016;12(2):e1005427.
- 69. Hu J, Ma C, Liu X. PA-X: a key regulator of influenza A virus pathogenicity and host immune responses. Med Microbiol Immunol (Berl). 4 juill 2018;
- 70. Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. Nat Rev Microbiol. août 2011;9(8):590-603.
- 71. Deom CM, Schulze IT. Oligosaccharide composition of an influenza virus hemagglutinin with host-determined binding properties. J Biol Chem. 25 nov 1985;260(27):14771-4.
- 72. Bouvier NM, Palese P. THE BIOLOGY OF INFLUENZA VIRUSES. Vaccine. 12 sept 2008;26(Suppl 4):D49-53.
- 73. Yoon S-W, Webby RJ, Webster RG. Evolution and ecology of influenza A viruses. Curr Top Microbiol Immunol. 2014;385:359-75.
- 74. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Global patterns of influenza a virus in wild birds. Science. 21 avr 2006;312(5772):384-8.

- Smith DJ, Lapedes AS, de Jong JC, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. Science. 16 juill 2004;305(5682):371-6.
- 76. Chen R, Holmes EC. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. J Mol Evol. juin 2008;66(6):655-63.
- 77. Bedford T, Riley S, Barr IG, Broor S, Chadha M, Cox NJ, et al. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. Nature. 9 juill 2015;523(7559):217-20.
- 78. Vijaykrishna D, Holmes EC, Joseph U, Fourment M, Su YCF, Halpin R, et al. The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses. eLife. 16 janv 2015;4:e05055.
- 79. Koel BF, Burke DF, Bestebroer TM, van der Vliet S, Zondag GCM, Vervaet G, et al. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. Science. 22 nov 2013;342(6161):976-9.
- 80. Koel BF, van der Vliet S, Burke DF, Bestebroer TM, Bharoto EE, Yasa IWW, et al. Antigenic variation of clade 2.1 H5N1 virus is determined by a few amino acid substitutions immediately adjacent to the receptor binding site. mBio. 10 juin 2014;5(3):e01070-01014.
- 81. Abente EJ, Santos J, Lewis NS, Gauger PC, Stratton J, Skepner E, et al. The Molecular Determinants of Antibody Recognition and Antigenic Drift in the H3 Hemagglutinin of Swine Influenza A Virus. J Virol. 15 2016;90(18):8266-80.
- 82. Lewis NS, Russell CA, Langat P, Anderson TK, Berger K, Bielejec F, et al. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. eLife. 15 avr 2016;5:e12217.
- Lewis NS, Daly JM, Russell CA, Horton DL, Skepner E, Bryant NA, et al. Antigenic and genetic evolution of equine influenza A (H3N8) virus from 1968 to 2007. J Virol. déc 2011;85(23):12742-9.
- 84. van de Sandt CE, Kreijtz JHCM, Rimmelzwaan GF. Evasion of Influenza A Viruses from Innate and Adaptive Immune Responses. Viruses. 3 sept 2012;4(9):1438-76.
- 85. Villa M, Lässig M. Fitness cost of reassortment in human influenza. PLoS Pathog. nov 2017;13(11):e1006685.
- 86. Yu H, Alonso WJ, Feng L, Tan Y, Shu Y, Yang W, et al. Characterization of regional influenza seasonality patterns in China and implications for vaccination strategies: spatio-temporal modeling of surveillance data. PLoS Med. nov 2013;10(11):e1001552.
- 87. Réseau Sentinelles > France > Publications [Internet]. [cité 19 nov 2018]. Disponible sur: https://www.sentiweb.fr/france/fr/?page=bilan
- 88. Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. Complications of viral influenza. Am J Med. avr 2008;121(4):258-64.
- 89. Yajima T, Knowlton KU. Viral myocarditis: from the perspective of the virus. Circulation. 19 mai 2009;119(19):2615-24.

- 90. Landaverde JM, Danovaro-Holliday MC, Trumbo SP, Pacis-Tirso CL, Ruiz-Matus C. Guillain-Barré syndrome in children aged <15 years in Latin America and the Caribbean: baseline rates in the context of the influenza A (H1N1) pandemic. J Infect Dis. mars 2010;201(5):746-50.
- 91. Lee N, Wong CK, Chan PKS, Lindegardh N, White NJ, Hayden FG, et al. Acute encephalopathy associated with influenza A infection in adults. Emerg Infect Dis. janv 2010;16(1):139-42.
- 92. Ayala E, Kagawa FT, Wehner JH, Tam J, Upadhyay D. Rhabdomyolysis associated with 2009 influenza A(H1N1). JAMA. 4 nov 2009;302(17):1863-4.
- 93. Cohen SA, Chui KKH, Naumova EN. Influenza vaccination in young children reduces influenzaassociated hospitalizations in older adults, 2002-2006. J Am Geriatr Soc. févr 2011;59(2):327-32.
- 94. Carrat F, Valleron AJ. Influenza mortality among the elderly in France, 1980-90: how many deaths may have been avoided through vaccination? J Epidemiol Community Health. août 1995;49(4):419-25.
- 95. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, Cox NJ, et al. Influenzaassociated hospitalizations in the United States. JAMA. 15 sept 2004;292(11):1333-40.
- 96. Walsh EE, Cox C, Falsey AR. Clinical features of influenza A virus infection in older hospitalized persons. J Am Geriatr Soc. sept 2002;50(9):1498-503.
- 97. Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. N Engl J Med. 12 nov 2009;361(20):1935-44.
- 98. Saunders-Hastings PR, Krewski D. Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. Pathog Basel Switz. 6 déc 2016;5(4).
- 99. Loo Y-M, Gale M. Influenza: fatal immunity and the 1918 virus. Nature. 18 janv 2007;445(7125):267-8.
- Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. Nature. 18 janv 2007;445(7125):319-23.
- 101. Trifonov V, Khiabanian H, Rabadan R. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. N Engl J Med. 9 juill 2009;361(2):115-9.
- 102. Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. Virus Res. 10 mai 2002;85(2):199-210.
- 103. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng P-Y, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. Lancet Infect Dis. sept 2012;12(9):687-95.
- 104. Simonsen L, Spreeuwenberg P, Lustig R, Taylor RJ, Fleming DM, Kroneman M, et al. Global mortality estimates for the 2009 Influenza Pandemic from the GLaMOR project: a modeling study. PLoS Med. nov 2013;10(11):e1001558.
- 105. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. Immunity. 26 mars 2010;32(3):305-15.

- 106. Pang IK, Iwasaki A. Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus. Trends Immunol. janv 2011;32(1):34-41.
- 107. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. Recognition of singlestranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci U S A. 13 avr 2004;101(15):5598-603.
- 108. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. J Biol Chem. 18 févr 2005;280(7):5571-80.
- Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. Cell. 18 avr 2008;133(2):235-49.
- 110. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. Nat Rev Immunol. mai 2014;14(5):315-28.
- 111. Pulendran B, Maddur MS. Innate immune sensing and response to influenza. Curr Top Microbiol Immunol. 2015;386:23-71.
- 112. Chow KT, Gale M, Loo Y-M. RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity. Annu Rev Immunol. 26 avr 2018;36:667-94.
- 113. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity. 27 mai 2011;34(5):637-50.
- 114. Kanneganti T-D, Body-Malapel M, Amer A, Park J-H, Whitfield J, Franchi L, et al. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. J Biol Chem. 1 déc 2006;281(48):36560-8.
- 115. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature. 18 oct 2001;413(6857):732-8.
- 116. Chaouat A, Savale L, Chouaid C, Tu L, Sztrymf B, Canuet M, et al. Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension. Chest. sept 2009;136(3):678-87.
- 117. Yoo J-K, Kim TS, Hufford MM, Braciale TJ. Viral infection of the lung: host response and sequelae. J Allergy Clin Immunol. déc 2013;132(6):1263-76; quiz 1277.
- 118. Katze MG, He Y, Gale M. Viruses and interferon: a fight for supremacy. Nat Rev Immunol. sept 2002;2(9):675-87.
- 119. La Gruta NL, Kedzierska K, Stambas J, Doherty PC. A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection. Immunol Cell Biol. mars 2007;85(2):85-92.
- 120. Ada GL, Jones PD. The immune response to influenza infection. Curr Top Microbiol Immunol. 1986;128:1-54.
- 121. Davidson S, Crotta S, McCabe TM, Wack A. Pathogenic potential of interferon  $\alpha\beta$  in acute influenza infection. Nat Commun. 21 mai 2014;5:3864.

- 122. Cole SL, Ho L-P. Contribution of innate immune cells to pathogenesis of severe influenza virus infection. Clin Sci Lond Engl 1979. 1 févr 2017;131(4):269-83.
- 123. Tsou C-L, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. J Clin Invest. avr 2007;117(4):902-9.
- 124. Parihar A, Eubank TD, Doseff AI. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. J Innate Immun. 2010;2(3):204-15.
- 125. Voudoukis E, Pappas A, Panoutsopoulos A, Xynos K, Rozi F, Giannakopoulou K, et al. Novel influenza A (H1N1) infection vs. common influenza-like illness: a prospective study. Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res. avr 2011;17(4):CR185-188.
- 126. Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogiannis M, Antonopoulou A, Baziaka F, Koutoukas P, Savva A, et al. Effect of the novel influenza A (H1N1) virus in the human immune system. PloS One. 23 déc 2009;4(12):e8393.
- 127. Oshansky CM, Gartland AJ, Wong S-S, Jeevan T, Wang D, Roddam PL, et al. Mucosal immune responses predict clinical outcomes during influenza infection independently of age and viral load. Am J Respir Crit Care Med. 15 févr 2014;189(4):449-62.
- 128. Herold S, von Wulffen W, Steinmueller M, Pleschka S, Kuziel WA, Mack M, et al. Alveolar epithelial cells direct monocyte transepithelial migration upon influenza virus infection: impact of chemokines and adhesion molecules. J Immunol Baltim Md 1950. 1 août 2006;177(3):1817-24.
- 129. Valberg P, Blanchard J. Pulmonary macrophage physiology: origin, motility, endocytosis. In: Comparative biology of the lung. CRC Press. Boca Raton, FL: Parent RA; 1992. p. 681-724.
- 130. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. Science. 10 juin 2011;332(6035):1284-8.
- 131. Fesq H, Bacher M, Nain M, Gemsa D. Programmed cell death (apoptosis) in human monocytes infected by influenza A virus. Immunobiology. févr 1994;190(1-2):175-82.
- 132. Hofmann P, Sprenger H, Kaufmann A, Bender A, Hasse C, Nain M, et al. Susceptibility of mononuclear phagocytes to influenza A virus infection and possible role in the antiviral response. J Leukoc Biol. 4 janv 1997;61(4):408-14.
- 133. McGill J, Heusel JW, Legge KL. Innate immune control and regulation of influenza virus infections. J Leukoc Biol. oct 2009;86(4):803-12.
- 134. Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, Lyonga D, Vekaria S, Edwards L, et al. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. Nat Immunol. sept 2008;9(9):1074-83.
- 135. Hinder F, Schmidt A, Gong JH, Bender A, Sprenger H, Nain M, et al. Influenza A virus infects macrophages and stimulates release of tumor necrosis factor-alpha. Pathobiol J Immunopathol Mol Cell Biol. 1991;59(4):227-31.

- 136. Kaufmann A, Salentin R, Meyer RG, Bussfeld D, Pauligk C, Fesq H, et al. Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system. Immunobiology. déc 2001;204(5):603-13.
- 137. Kim HM, Lee Y-W, Lee K-J, Kim HS, Cho SW, van Rooijen N, et al. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. J Virol. mai 2008;82(9):4265-74.
- Huber VC, Lynch JM, Bucher DJ, Le J, Metzger DW. Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections. J Immunol Baltim Md 1950. 15 juin 2001;166(12):7381-8.
- 139. Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. Clin Microbiol Rev. janv 2011;24(1):210-29.
- 140. Sprenger H, Meyer RG, Kaufmann A, Bussfeld D, Rischkowsky E, Gemsa D. Selective induction of monocyte and not neutrophil-attracting chemokines after influenza A virus infection. J Exp Med. 1 sept 1996;184(3):1191-6.
- 141. Perrone LA, Plowden JK, García-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM. H5N1 and 1918 Pandemic Influenza Virus Infection Results in Early and Excessive Infiltration of Macrophages and Neutrophils in the Lungs of Mice. PLoS Pathog [Internet]. août 2008 [cité 11 août 2016];4(8). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2483250/
- 142. Cheung CY, Poon LLM, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? Lancet Lond Engl. 7 déc 2002;360(9348):1831-7.
- 143. Lin S-J, Lo M, Kuo R-L, Shih S-R, Ojcius DM, Lu J, et al. The pathological effects of CCR2+ inflammatory monocytes are amplified by an IFNAR1-triggered chemokine feedback loop in highly pathogenic influenza infection. J Biomed Sci. 18 nov 2014;21:99.
- 144. Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, et al. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. Science. 15 sept 1995;269(5230):1583-5.
- 145. Schwarz KB. Oxidative stress during viral infection: a review. Free Radic Biol Med. 1996;21(5):641-9.
- 146. Julkunen I, Melén K, Nyqvist M, Pirhonen J, Sareneva T, Matikainen S. Inflammatory responses in influenza A virus infection. Vaccine. 8 déc 2000;19 Suppl 1:S32-37.
- 147. Diao H, Cui G, Wei Y, Chen J, Zuo J, Cao H, et al. Severe H7N9 infection is associated with decreased antigen-presenting capacity of CD14+ cells. PloS One. 2014;9(3):e92823.
- 148. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. J Exp Med. 1 juill 2013;210(7):1283-99.
- 149. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. PLoS Pathog. mars 2015;11(3):e1004651.

- 150. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat Rev Immunol. mars 2013;13(3):159-75.
- 151. Ichikawa A, Kuba K, Morita M, Chida S, Tezuka H, Hara H, et al. CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin. Am J Respir Crit Care Med. 1 janv 2013;187(1):65-77.
- 152. Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. Int J Hematol. déc 2000;72(4):391-8.
- 153. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? Blood. 17 oct 2013;122(16):2784-94.
- 154. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, et al. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med. déc 1997;156(6):1969-77.
- 155. Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. Immunol Cell Biol. févr 2011;89(2):216-24.
- 156. Ge MQ, Ho AWS, Tang Y, Wong KHS, Chua BYL, Gasser S, et al. NK cells regulate CD8+ T cell priming and dendritic cell migration during influenza A infection by IFN-γ and perforindependent mechanisms. J Immunol Baltim Md 1950. 1 sept 2012;189(5):2099-109.
- 157. Verbist KC, Rose DL, Cole CJ, Field MB, Klonowski KD. IL-15 participates in the respiratory innate immune response to influenza virus infection. PloS One. 2012;7(5):e37539.
- 158. Hwang I, Scott JM, Kakarla T, Duriancik DM, Choi S, Cho C, et al. Activation mechanisms of natural killer cells during influenza virus infection. PloS One. 2012;7(12):e51858.
- 159. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol. mai 2008;9(5):503-10.
- 160. Stein-Streilein J, Bennett M, Mann D, Kumar V. Natural killer cells in mouse lung: surface phenotype, target preference, and response to local influenza virus infection. J Immunol Baltim Md 1950. déc 1983;131(6):2699-704.
- 161. Culley FJ. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. Immunology. oct 2009;128(2):151-63.
- 162. Zhou G, Juang SWW, Kane KP. NK cells exacerbate the pathology of influenza virus infection in mice. Eur J Immunol. avr 2013;43(4):929-38.
- Guo H, Kumar P, Moran TM, Garcia-Sastre A, Zhou Y, Malarkannan S. The functional impairment of natural killer cells during influenza virus infection. Immunol Cell Biol. déc 2009;87(8):579-89.
- 164. Denney L, Aitken C, Li CK-F, Wilson-Davies E, Kok WL, Clelland C, et al. Reduction of natural killer but not effector CD8 T lymphocytes in three consecutive cases of severe/lethal H1N1/09 influenza A virus infection. PloS One. 18 mai 2010;5(5):e10675.
- 165. Guo X, Chen Y, Li X, Kong H, Yang S, Ye B, et al. Dynamic variations in the peripheral blood lymphocyte subgroups of patients with 2009 pandemic H1N1 swine-origin influenza A virus infection. Virol J. 10 mai 2011;8:215.

- 166. Heltzer ML, Coffin SE, Maurer K, Bagashev A, Zhang Z, Orange JS, et al. Immune dysregulation in severe influenza. J Leukoc Biol. juin 2009;85(6):1036-43.
- 167. Gottschalk C, Mettke E, Kurts C. The Role of Invariant Natural Killer T Cells in Dendritic Cell Licensing, Cross-Priming, and Memory CD8(+) T Cell Generation. Front Immunol. 2015;6:379.
- 168. Juno JA, Keynan Y, Fowke KR. Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. PLoS Pathog. 2012;8(8):e1002838.
- 169. Ho L-P, Denney L, Luhn K, Teoh D, Clelland C, McMichael AJ. Activation of invariant NKT cells enhances the innate immune response and improves the disease course in influenza A virus infection. Eur J Immunol. juill 2008;38(7):1913-22.
- 170. Kok WL, Denney L, Benam K, Cole S, Clelland C, McMichael AJ, et al. Pivotal Advance: Invariant NKT cells reduce accumulation of inflammatory monocytes in the lungs and decrease immunepathology during severe influenza A virus infection. J Leukoc Biol. mars 2012;91(3):357-68.
- 171. Neyt K, Lambrecht BN. The role of lung dendritic cell subsets in immunity to respiratory viruses. Immunol Rev. sept 2013;255(1):57-67.
- 172. Braciale TJ, Sun J, Kim TS. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. Nat Rev Immunol. 9 mars 2012;12(4):295-305.
- Smit JJ, Rudd BD, Lukacs NW. Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. J Exp Med. 15 mai 2006;203(5):1153-9.
- 174. Teijaro JR. The role of cytokine responses during influenza virus pathogenesis and potential therapeutic options. Curr Top Microbiol Immunol. 2015;386:3-22.
- 175. Herati RS, Reuter MA, Dolfi DV, Mansfield KD, Aung H, Badwan OZ, et al. Circulating CXCR5+PD-1+ response predicts influenza vaccine antibody responses in young adults but not elderly adults. J Immunol Baltim Md 1950. 1 oct 2014;193(7):3528-37.
- 176. Baccam P, Beauchemin C, Macken CA, Hayden FG, Perelson AS. Kinetics of influenza A virus infection in humans. J Virol. août 2006;80(15):7590-9.
- 177. Spiekermann GM, Finn PW, Ward ES, Dumont J, Dickinson BL, Blumberg RS, et al. Receptormediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. J Exp Med. 5 août 2002;196(3):303-10.
- 178. Renegar KB, Small PA, Boykins LG, Wright PF. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. J Immunol Baltim Md 1950. 1 août 2004;173(3):1978-86.
- Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. N Engl J Med. 12 nov 2009;361(20):1945-52.
- 180. Ekiert DC, Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies. Curr Opin Virol. avr 2012;2(2):134-41.

- 181. Sui J, Hwang WC, Perez S, Wei G, Aird D, Chen L, et al. Structural and Functional Bases for Broad-Spectrum Neutralization of Avian and Human Influenza A Viruses. Nat Struct Mol Biol. mars 2009;16(3):265-73.
- 182. Johansson BE, Bucher DJ, Kilbourne ED. Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection. J Virol. mars 1989;63(3):1239-46.
- 183. Hashimoto G, Wright PF, Karzon DT. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against influenza virus-infected cells. J Infect Dis. nov 1983;148(5):785-94.
- 184. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. Nat Rev Microbiol. janv 2018;16(1):47-60.
- 185. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. Immunol Rev. nov 2010;238(1):247-62.
- 186. Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. Science. 11 avr 2003;300(5617):339-42.
- 187. Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. Nature. 26 nov 2009;462(7272):510-3.
- 188. Topham DJ, Tripp RA, Doherty PC. CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fasdependent processes. J Immunol Baltim Md 1950. 1 déc 1997;159(11):5197-200.
- 189. La Gruta NL, Turner SJ, Doherty PC. Hierarchies in cytokine expression profiles for acute and resolving influenza virus-specific CD8+ T cell responses: correlation of cytokine profile and TCR avidity. J Immunol Baltim Md 1950. 1 mai 2004;172(9):5553-60.
- 190. Doherty PC, Topham DJ, Tripp RA, Cardin RD, Brooks JW, Stevenson PG. Effector CD4+ and CD8+ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. Immunol Rev. oct 1997;159:105-17.
- 191. Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez JF, Rello J. Personalized medicine in severe influenza. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. juin 2016;35(6):893-7.
- 192. Moskophidis D, Kioussis D. Contribution of virus-specific CD8+ cytotoxic T cells to virus clearance or pathologic manifestations of influenza virus infection in a T cell receptor transgenic mouse model. J Exp Med. 20 juill 1998;188(2):223-32.
- 193. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. Nat Rev Immunol. févr 2011;11(2):119-30.
- Surls J, Nazarov-Stoica C, Kehl M, Casares S, Brumeanu T-D. Differential effect of CD4+Foxp3+ T-regulatory cells on the B and T helper cell responses to influenza virus vaccination. Vaccine. 21 oct 2010;28(45):7319-30.
- Louria DB, Blumenfeld HL, Ellis JT, Kilbourne ED, Rogers DE. Studies on influenza in the pandemic of 1957-1958. II. Pulmonary complications of influenza. J Clin Invest. janv 1959;38(1 Part 2):213-65.

- 196. Peiris JSM, Cheung CY, Leung CYH, Nicholls JM. Innate immune responses to influenza A H5N1: friend or foe? Trends Immunol. déc 2009;30(12):574-84.
- 197. Shen Y, Lu H, Qi T, Gu Y, Xiang M, Lu S, et al. Fatal cases of human infection with avian influenza A (H7N9) virus in Shanghai, China in 2013. Biosci Trends. févr 2015;9(1):73-8.
- 198. Murata Y, Walsh EE, Falsey AR. Pulmonary complications of interpandemic influenza A in hospitalized adults. J Infect Dis. 1 avr 2007;195(7):1029-37.
- 199. Morens DM, Fauci AS. The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century. J Infect Dis. 1 avr 2007;195(7):1018-28.
- 200. To KKW, Hung IFN, Li IWS, Lee K-L, Koo C-K, Yan W-W, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 mars 2010;50(6):850-9.
- 201. Ramsey C, Kumar A. H1N1: viral pneumonia as a cause of acute respiratory distress syndrome. Curr Opin Crit Care. févr 2011;17(1):64-71.
- ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. JAMA. 20 juin 2012;307(23):2526-33.
- 203. Mauad T, Hajjar LA, Callegari GD, da Silva LFF, Schout D, Galas FRBG, et al. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. Am J Respir Crit Care Med. 1 janv 2010;181(1):72-9.
- 204. Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. Annu Rev Pathol. 2008;3:499-522.
- 205. Walsh JJ, Dietlein LF, Low FN, Burch GE, Mogabgab WJ. Bronchotracheal response in human influenza. Type A, Asian strain, as studied by light and electron microscopic examination of bronchoscopic biopsies. Arch Intern Med. sept 1961;108:376-88.
- 206. Bruder D, Srikiatkhachorn A, Enelow RI. Cellular immunity and lung injury in respiratory virus infection. Viral Immunol. 2006;19(2):147-55.
- 207. Kuiken T, Taubenberger JK. Pathology of human influenza revisited. Vaccine. 12 sept 2008;26 Suppl 4:D59-66.
- 208. Dawson TC, Beck MA, Kuziel WA, Henderson F, Maeda N. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. Am J Pathol. juin 2000;156(6):1951-9.
- 209. de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJD, Chau TNB, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. Nat Med. oct 2006;12(10):1203-7.
- 210. Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. N Engl J Med. 29 sept 2005;353(13):1374-85.
- 211. Buttenschoen K, Kornmann M, Berger D, Leder G, Beger HG, Vasilescu C. Endotoxemia and endotoxin tolerance in patients with ARDS. Langenbecks Arch Surg. juill 2008;393(4):473-8.

- 212. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. J Infect Dis. 1 oct 2008;198(7):962-70.
- 213. Metersky ML, Masterton RG, Lode H, File TM, Babinchak T. Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza. Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis. mai 2012;16(5):e321-331.
- 214. Domínguez-Cherit G, Lapinsky SE, Macias AE, Pinto R, Espinosa-Perez L, de la Torre A, et al. Critically III patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. JAMA. 4 nov 2009;302(17):1880-7.
- 215. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) United States, May-August 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2 oct 2009;58(38):1071-4.
- 216. Haus-Cheymol R, Nicand E, Buisson Y, Berger F, Decam C, Spiegel A, et al. [Effectiveness of triennial anti-influenza vaccination in French military during the 2003-2004 influenza season]. Rev Dépidémiologie Santé Publique. oct 2007;55(5):339-45.
- 217. Upshur RE, Goel V. Measuring the impact of influenza on the hospital admission rates of the elderly in Ontario: a five-year admission rate analysis, 1988-1993. Can J Public Health Rev Can Santé Publique. avr 2000;91(2):144-7.
- 218. Falsey AR, Becker KL, Swinburne AJ, Nylen ES, Formica MA, Hennessey PA, et al. Bacterial Complications of Respiratory Tract Viral Illness: A Comprehensive Evaluation. J Infect Dis. 8 janv 2013;208(3):432-41.
- 219. McCullers JA. Insights into the Interaction between Influenza Virus and Pneumococcus. Clin Microbiol Rev. juill 2006;19(3):571-82.
- 220. Treanor J. Influenza Virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed, Vol. 162. Philadelphia, Churchill Livingstone 2005; 2060 –2085. In.
- 221. Levandowski RA, Gerrity TR, Garrard CS. Modifications of lung clearance mechanisms by acute influenza A infection. J Lab Clin Med. oct 1985;106(4):428-32.
- 222. Loosli CG, Stinson SF, Ryan DP, Hertweck MS, Hardy JD, Serebrin R. The destruction of type 2 pneumocytes by airborne influenza PR8-A virus; its effect on surfactant and lecithin content of the pneumonic lesions of mice. Chest. févr 1975;67(2 Suppl):7S-14S.
- 223. McCullers JA. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. Nat Rev Microbiol. avr 2014;12(4):252-62.
- 224. McCullers JA. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. Nat Rev Microbiol. avr 2014;12(4):252-62.
- 225. McCullers JA, Bartmess KC. Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and Streptococcus pneumoniae. J Infect Dis. 15 mars 2003;187(6):1000-9.
- 226. Cundell DR, Tuomanen EI. Receptor specificity of adherence of Streptococcus pneumoniae to human type-II pneumocytes and vascular endothelial cells in vitro. Microb Pathog. déc 1994;17(6):361-74.

- 227. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. Trends Cell Biol. nov 2005;15(11):599-607.
- 228. Plotkowski MC, Puchelle E, Beck G, Jacquot J, Hannoun C. Adherence of type I Streptococcus pneumoniae to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. Am Rev Respir Dis. nov 1986;134(5):1040-4.
- 229. Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. Trends Microbiol. déc 1998;6(12):484-8.
- 230. McCullers JA, Tuomanen EI. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. Front Biosci J Virtual Libr. 1 août 2001;6:D877-889.
- 231. Herzog H, Staub H, Richterich R. Gas-analytical studies in severe pneumonia; observations during the 1957 influenza epidemic. Lancet Lond Engl. 21 mars 1959;1(7073):593-7.
- 232. Ghoneim HE, Thomas PG, McCullers JA. Depletion of Alveolar Macrophages during Influenza Infection Facilitates Bacterial Superinfections. J Immunol. 8 janv 2013;191(3):1250-9.
- 233. Small C-L, Shaler CR, McCormick S, Jeyanathan M, Damjanovic D, Brown EG, et al. Influenza infection leads to increased susceptibility to subsequent bacterial superinfection by impairing NK cell responses in the lung. J Immunol Baltim Md 1950. 15 févr 2010;184(4):2048-56.
- 234. Shahangian A, Chow EK, Tian X, Kang JR, Ghaffari A, Liu SY, et al. Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. J Clin Invest. juill 2009;119(7):1910-20.
- 235. Hang DTT, Choi E-J, Song J-Y, Kim S, Kwak J, Shin Y-K. Differential effect of prior influenza infection on alveolar macrophage phagocytosis of Staphylococcus aureus and Escherichia coli: involvement of interferon-gamma production. Microbiol Immunol. 2011;55(11):751-9.
- 236. Metzger DW, Sun K. Immune Dysfunction and Bacterial Coinfections following Influenza. J Immunol. 9 janv 2013;191(5):2047-52.
- 237. McNamee LA, Harmsen AG. Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophilindependent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary Streptococcus pneumoniae infection. Infect Immun. déc 2006;74(12):6707-21.
- 238. van der Sluijs KF, van Elden LJR, Nijhuis M, Schuurman R, Pater JM, Florquin S, et al. IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. J Immunol Baltim Md 1950. 15 juin 2004;172(12):7603-9.
- 239. Goulding J, Godlee A, Vekaria S, Hilty M, Snelgrove R, Hussell T. Lowering the threshold of lung innate immune cell activation alters susceptibility to secondary bacterial superinfection. J Infect Dis. 1 oct 2011;204(7):1086-94.
- 240. Robertson L, Caley JP, Moore J. Importance of Staphylococcus aureus in pneumonia in the 1957 epidemic of influenza A. Lancet Lond Engl. 2 août 1958;2(7040):233-6.
- 241. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Communityacquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis. août 2003;9(8):978-84.

- 242. Finelli L, Fiore A, Dhara R, Brammer L, Shay DK, Kamimoto L, et al. Influenza-associated pediatric mortality in the United States: increase of Staphylococcus aureus coinfection. Pediatrics. oct 2008;122(4):805-11.
- 243. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. juill 1997;10(3):505-20.
- 244. van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, et al. Reclassification of Staphylococcus aureus Nasal Carriage Types. J Infect Dis. 15 juin 2009;199(12):1820-6.
- 245. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest. 1 mai 2003;111(9):1265-73.
- 246. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. J Clin Pathol. juill 1961;14:385-93.
- 247. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of Infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. Clin Infect Dis. 15 mai 2001;32(s2):S114-32.
- 248. Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Adem PV, Lee JC, Husain AN, Clasen J, et al. Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus pulsotypes USA300 and USA400 in a rat model of pneumonia. J Infect Dis. 15 août 2008;198(4):561-70.
- 249. Li M, Diep BA, Villaruz AE, Braughton KR, Jiang X, DeLeo FR, et al. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Proc Natl Acad Sci U S A. 7 avr 2009;106(14):5883-8.
- 250. da Silva MCA, Zahm J-M, Gras D, Bajolet O, Abely M, Hinnrasky J, et al. Dynamic interaction between airway epithelial cells and Staphylococcus aureus. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. sept 2004;287(3):L543-551.
- 251. Burlak C, Hammer CH, Robinson M-A, Whitney AR, McGavin MJ, Kreiswirth BN, et al. Global analysis of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. Cell Microbiol. mai 2007;9(5):1172-90.
- 252. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach T-HL, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. Nat Med. déc 2007;13(12):1510-4.
- 253. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin—Producing Staphylococcus aureus in Primary Skin Infections and Pneumonia. Clin Infect Dis. 11 janv 1999;29(5):1128-32.
- 254. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillinresistant S. aureus infections among patients in the emergency department. N Engl J Med. 17 août 2006;355(7):666-74.

- 255. O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ. Staphylococcus aureus clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. Cell Microbiol. nov 2002;4(11):759-70.
- 256. Clarke SR, Foster SJ. Surface adhesins of Staphylococcus aureus. Adv Microb Physiol. 2006;51:187-224.
- 257. Peterson PK, Verhoef J, Sabath LD, Quie PG. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. Infect Immun. mars 1977;15(3):760-4.
- 258. Kim HK, Kim H-Y, Schneewind O, Missiakas D. Identifying protective antigens of Staphylococcus aureus, a pathogen that suppresses host immune responses. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. oct 2011;25(10):3605-12.
- 259. Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, et al. Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. Nat Med. août 2004;10(8):842-8.
- 260. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol. sept 2003;3(9):745-56.
- 261. Tufano MA, Cipollaro de l'Ero G, Ianniello R, Galdiero M, Galdiero F. Protein A and other surface components of Staphylococcus aureus stimulate production of IL-1 alpha, IL-4, IL-6, TNF and IFN-gamma. Eur Cytokine Netw. déc 1991;2(5):361-6.
- 262. Gómez MI, O'Seaghdha M, Magargee M, Foster TJ, Prince AS. Staphylococcus aureus protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. J Biol Chem. 21 juill 2006;281(29):20190-6.
- 263. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. Nat Rev Microbiol. janv 2014;12(1):49-62.
- 264. Bubeck Wardenburg J, Patel RJ, Schneewind O. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of Staphylococcus aureus pneumonia. Infect Immun. févr 2007;75(2):1040-4.
- 265. Kim HK, Cheng AG, Kim H-Y, Missiakas DM, Schneewind O. Nontoxigenic protein A vaccine for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in mice. J Exp Med. 30 août 2010;207(9):1863-70.
- 266. DuMont AL, Torres VJ. Cell targeting by the Staphylococcus aureus pore-forming toxins: it's not just about lipids. Trends Microbiol. janv 2014;22(1):21-7.
- 267. Schlievert PM, Strandberg KL, Lin Y-C, Peterson ML, Leung DYM. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive Staphylococcus aureus, and its relevance to atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. janv 2010;125(1):39-49.
- 268. Vandenesch F, Lina G, Henry T. Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:12.
- 269. Alonzo F, Torres VJ. The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of Staphylococcus aureus. Microbiol Mol Biol Rev. 6 janv 2014;78(2):199-230.
- 270. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, et al. Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS Pathog. 8 janv 2010;6(1):e1000715.
- 271. Nygaard TK, Pallister KB, Zurek OW, Voyich JM. The impact of α-toxin on host cell plasma membrane permeability and cytokine expression during human blood infection by CA-MRSA USA300. J Leukoc Biol. nov 2013;94(5):971-9.
- 272. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. Staphylococcus aureus α-toxin: nearly a century of intrigue. Toxins. juin 2013;5(6):1140-66.
- Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in Staphylococcus aureus alpha-hemolysin-mediated cellular injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 27 juill 2010;107(30):13473-8.
- 274. Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. Science. 13 déc 1996;274(5294):1859-66.
- 275. Hildebrand A, Pohl M, Bhakdi S. Staphylococcus aureus alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells. J Biol Chem. 15 sept 1991;266(26):17195-200.
- 276. Rose F, Dahlem G, Guthmann B, Grimminger F, Maus U, Hänze J, et al. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by S. aureus α-toxin. Am J Physiol -Lung Cell Mol Physiol. 1 févr 2002;282(2):L207-14.
- 277. Dragneva Y, Anuradha CD, Valeva A, Hoffmann A, Bhakdi S, Husmann M. Subcytocidal Attack by Staphylococcal Alpha-Toxin Activates NF-κB and Induces Interleukin-8 Production. Infect Immun. 4 janv 2001;69(4):2630-5.
- 278. Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Bubeck Wardenburg J, McElvania-Tekippe E, et al. Staphylococcus aureus alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. PloS One. 2009;4(10):e7446.
- 279. Bubeck Wardenburg J, Bae T, Otto M, Deleo FR, Schneewind O. Poring over pores: alphahemolysin and Panton-Valentine leukocidin in Staphylococcus aureus pneumonia. Nat Med. déc 2007;13(12):1405-6.
- 280. Bartlett AH, Foster TJ, Hayashida A, Park PW. Alpha-toxin facilitates the generation of CXC chemokine gradients and stimulates neutrophil homing in Staphylococcus aureus pneumonia. J Infect Dis. 15 nov 2008;198(10):1529-35.
- 281. Mehlin C, Headley CM, Klebanoff SJ. An inflammatory polypeptide complex from Staphylococcus epidermidis: isolation and characterization. J Exp Med. 15 mars 1999;189(6):907-18.
- 282. Periasamy S, Chatterjee SS, Cheung GYC, Otto M. Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for? Commun Integr Biol. 1 mai 2012;5(3):275-7.

- 283. Fu H, Karlsson J, Bylund J, Movitz C, Karlsson A, Dahlgren C. Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. J Leukoc Biol. 2 janv 2006;79(2):247-56.
- 284. Kretschmer D, Gleske A-K, Rautenberg M, Wang R, Köberle M, Bohn E, et al. Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic Staphylococcus aureus. Cell Host Microbe. 25 juin 2010;7(6):463-73.
- 285. Schreiner J, Kretschmer D, Klenk J, Otto M, Bühring H-J, Stevanovic S, et al. Staphylococcus aureus phenol-soluble modulin peptides modulate dendritic cell functions and increase in vitro priming of regulatory T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 1 avr 2013;190(7):3417-26.
- 286. Cheung GYC, Duong AC, Otto M. Direct and synergistic hemolysis caused by Staphylococcus phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. Microbes Infect. avr 2012;14(4):380-6.
- 287. Surewaard BGJ, de Haas CJC, Vervoort F, Rigby KM, DeLeo FR, Otto M, et al. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. Cell Microbiol. août 2013;15(8):1427-37.
- 288. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. Nat Rev Microbiol. oct 2013;11(10):667-73.
- 289. Bloes DA, Haasbach E, Hartmayer C, Hertlein T, Klingel K, Kretschmer D, et al. Phenol-Soluble Modulin Peptides Contribute to Influenza A Virus-Associated Staphylococcus aureus Pneumonia. Infect Immun. 2017;85(12).
- 290. Kaneko J, Kimura T, Kawakami Y, Tomita T, Kamio Y. Panton-valentine leukocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-treated Staphylococcus aureus V8 (ATCC 49775). Biosci Biotechnol Biochem. nov 1997;61(11):1960-2.
- 291. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, et al. The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. Cell Host Microbe. 15 mai 2013;13(5):584-94.
- 292. Colin DA, Mazurier I, Sire S, Finck-Barbançon V. Interaction of the two components of leukocidin from Staphylococcus aureus with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. Infect Immun. août 1994;62(8):3184-8.
- 293. Gauduchon V, Werner S, Prévost G, Monteil H, Colin DA. Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. Infect Immun. avr 2001;69(4):2390-5.
- 294. Dumont AL, Nygaard TK, Watkins RL, Smith A, Kozhaya L, Kreiswirth BN, et al. Characterization of a new cytotoxin that contributes to Staphylococcus aureus pathogenesis. Mol Microbiol. févr 2011;79(3):814-25.
- 295. König B, Prévost G, Piémont Y, König W. Effects of Staphylococcus aureus leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. J Infect Dis. mars 1995;171(3):607-13.
- 296. Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 23 mars 2010;107(12):5587-92.

- 297. Graves SF, Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Sturdevant DE, Rasmussen DL, et al. Sublytic concentrations of Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin alter human PMN gene expression and enhance bactericidal capacity. J Leukoc Biol. août 2012;92(2):361-74.
- 298. Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, et al. Cross-talk between Staphylococcus aureus leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. Cell Microbiol. juill 2012;14(7):1019-36.
- 299. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. janv 2013;13(1):43-54.
- 300. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, et al. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet Lond Engl. 2 mars 2002;359(9308):753-9.
- 301. Sicot N, Khanafer N, Meyssonnier V, Dumitrescu O, Tristan A, Bes M, et al. Methicillin resistance is not a predictor of severity in community-acquired Staphylococcus aureus necrotizing pneumonia--results of a prospective observational study. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. mars 2013;19(3):E142-148.
- 302. Löffler B, Niemann S, Ehrhardt C, Horn D, Lanckohr C, Lina G, et al. Pathogenesis of Staphylococcus aureus necrotizing pneumonia: the role of PVL and an influenza coinfection. Expert Rev Anti Infect Ther. 1 oct 2013;11(10):1041-51.
- 303. Gillet Y, Vanhems P, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Floret D, et al. Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by Staphylococcus aureus containing Panton-Valentine leukocidin. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 août 2007;45(3):315-21.
- 304. Rima B, Collins P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb RA, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. J Gen Virol. déc 2017;98(12):2912-3.
- 305. Rey-Jurado E, Kalergis AM. Immunological Features of Respiratory Syncytial Virus-Caused Pneumonia-Implications for Vaccine Design. Int J Mol Sci. 4 mars 2017;18(3).
- 306. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. Clin Rev Allergy Immunol. déc 2013;45(3):331-79.
- 307. Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. J Gen Virol. oct 1985;66 (Pt 10):2111-24.
- 308. Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. Rev Med Virol. avr 2001;11(2):103-16.
- 309. Jha A, Jarvis H, Fraser C, Openshaw PJ. Respiratory Syncytial Virus. In: Hui DS, Rossi GA, Johnston SL, éditeurs. SARS, MERS and other Viral Lung Infections [Internet]. Sheffield UK: European Respiratory Society; 2016 [cité 2 nov 2018]. (Wellcome Trust–Funded Monographs and Book Chapters). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442240/

- 310. Schweitzer JW, Justice NA. Respiratory Syncytial Virus Infection (RSV). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 [cité 2 nov 2018]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459215/
- 311. Thorburn K, Kerr S, Taylor N, van Saene HKF. RSV outbreak in a paediatric intensive care unit. J Hosp Infect. juill 2004;57(3):194-201.
- 312. Bont L. Nosocomial RSV infection control and outbreak management. Paediatr Respir Rev. juin 2009;10 Suppl 1:16-7.
- 313. Sorvillo FJ, Huie SF, Strassburg MA, Butsumyo A, Shandera WX, Fannin SL. An outbreak of respiratory syncytial virus pneumonia in a nursing home for the elderly. J Infect. nov 1984;9(3):252-6.
- 314. Hart RJ. An outbreak of respiratory syncytial virus infection in an old people's home. J Infect. mai 1984;8(3):259-61.
- 315. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. Lancet Lond Engl. 1 mai 2010;375(9725):1545-55.
- 316. Widjaja I, Wicht O, Luytjes W, Leenhouts K, Rottier PJM, van Kuppeveld FJM, et al. Characterization of Epitope-Specific Anti-Respiratory Syncytial Virus (Anti-RSV) Antibody Responses after Natural Infection and after Vaccination with Formalin-Inactivated RSV. J Virol. 01 2016;90(13):5965-77.
- 317. Varga SM, Braciale TJ. The adaptive immune response to respiratory syncytial virus. Curr Top Microbiol Immunol. 2013;372:155-71.
- 318. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. N Engl J Med. 28 avr 2005;352(17):1749-59.
- 319. Loubet P, Voiriot G, Houhou-Fidouh N, Neuville M, Bouadma L, Lescure F-X, et al. Impact of respiratory viruses in hospital-acquired pneumonia in the intensive care unit: A single-center retrospective study. J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol. 2017;91:52-7.
- 320. Cesario TC. Viruses associated with pneumonia in adults. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. juill 2012;55(1):107-13.
- 321. Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. Clin Microbiol Rev. juill 2000;13(3):371-84.
- 322. Malosh RE, Martin ET, Callear AP, Petrie JG, Lauring AS, Lamerato L, et al. Respiratory syncytial virus hospitalization in middle-aged and older adults. J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol. 7 sept 2017;96:37-43.
- 323. Widmer K, Zhu Y, Williams JV, Griffin MR, Edwards KM, Talbot HK. Rates of hospitalizations for respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and influenza virus in older adults. J Infect Dis. 1 juill 2012;206(1):56-62.
- 324. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. JAMA. 8 janv 2003;289(2):179-86.

- 325. Fleming DM, Taylor RJ, Lustig RL, Schuck-Paim C, Haguinet F, Webb DJ, et al. Modelling estimates of the burden of Respiratory Syncytial virus infection in adults and the elderly in the United Kingdom. BMC Infect Dis. 23 oct 2015;15:443.
- 326. Schanzer DL, Langley JM, Tam TWS. Role of influenza and other respiratory viruses in admissions of adults to Canadian hospitals. Influenza Other Respir Viruses. janv 2008;2(1):1-8.
- 327. van Asten L, van den Wijngaard C, van Pelt W, van de Kassteele J, Meijer A, van der Hoek W, et al. Mortality attributable to 9 common infections: significant effect of influenza A, respiratory syncytial virus, influenza B, norovirus, and parainfluenza in elderly persons. J Infect Dis. 1 sept 2012;206(5):628-39.
- 328. Widmer K, Griffin MR, Zhu Y, Williams JV, Talbot HK. Respiratory syncytial virus- and human metapneumovirus-associated emergency department and hospital burden in adults. Influenza Other Respir Viruses. mai 2014;8(3):347-52.
- 329. Neuzil KM, Maynard C, Griffin MR, Heagerty P. Winter respiratory viruses and health care use: a population-based study in the northwest United States. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 juill 2003;37(2):201-7.
- 330. Johnson JE, Gonzales RA, Olson SJ, Wright PF, Graham BS. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. janv 2007;20(1):108-19.
- 331. Persson BD, Jaffe AB, Fearns R, Danahay H. Respiratory syncytial virus can infect basal cells and alter human airway epithelial differentiation. PloS One. 2014;9(7):e102368.
- 332. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. Am J Dis Child 1960. juin 1986;140(6):543-6.
- 333. Hall CB, Geiman JM, Biggar R, Kotok DI, Hogan PM, Douglas GR. Respiratory syncytial virus infections within families. N Engl J Med. 19 févr 1976;294(8):414-9.
- Henderson FW, Collier AM, Clyde WA, Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. N Engl J Med. 8 mars 1979;300(10):530-4.
- 335. Graham BS. Vaccine development for respiratory syncytial virus. Curr Opin Virol. 2017;23:107-12.
- 336. Hall CB, Long CE, Schnabel KC. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 sept 2001;33(6):792-6.
- 337. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. N Engl J Med. 28 avr 2005;352(17):1749-59.
- 338. Dowell SF, Anderson LJ, Gary HE, Erdman DD, Plouffe JF, File TM, et al. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. J Infect Dis. sept 1996;174(3):456-62.
- 339. Branche AR, Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in older adults: an underrecognized problem. Drugs Aging. avr 2015;32(4):261-9.

- 340. Lee N, Lui GCY, Wong KT, Li TCM, Tse ECM, Chan JYC, et al. High morbidity and mortality in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. oct 2013;57(8):1069-77.
- 341. Lee N, Chan MCW, Lui GCY, Li R, Wong RYK, Yung IMH, et al. High Viral Load and Respiratory Failure in Adults Hospitalized for Respiratory Syncytial Virus Infections. J Infect Dis. 15 oct 2015;212(8):1237-40.
- 342. Walsh EE, Peterson DR, Falsey AR. Is clinical recognition of respiratory syncytial virus infection in hospitalized elderly and high-risk adults possible? J Infect Dis. 1 avr 2007;195(7):1046-51.
- 343. Voiriot G, Visseaux B, Cohen J, Nguyen LBL, Neuville M, Morbieu C, et al. Viral-bacterial coinfection affects the presentation and alters the prognosis of severe community-acquired pneumonia. Crit Care Lond Engl. 25 oct 2016;20(1):375.
- 344. Jennings LC, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Laing RTR, Werno AM, et al. Incidence and characteristics of viral community-acquired pneumonia in adults. Thorax. janv 2008;63(1):42-8.
- 345. Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in adults. Semin Respir Crit Care Med. avr 2007;28(2):171-81.
- 346. Volling C, Hassan K, Mazzulli T, Green K, Al-Den A, Hunter P, et al. Respiratory syncytial virus infection-associated hospitalization in adults: a retrospective cohort study. BMC Infect Dis. 13 déc 2014;14:665.
- 347. Rodriguez WJ, Hall CB, Welliver R, Simoes EA, Ryan ME, Stutman H, et al. Efficacy and safety of aerosolized ribavirin in young children hospitalized with influenza: a double-blind, multicenter, placebo-controlled trial. J Pediatr. juill 1994;125(1):129-35.
- 348. Boeckh M, Berrey MM, Bowden RA, Crawford SW, Balsley J, Corey L. Phase 1 evaluation of the respiratory syncytial virus-specific monoclonal antibody palivizumab in recipients of hematopoietic stem cell transplants. J Infect Dis. 1 août 2001;184(3):350-4.
- 349. Karron RA, Buchholz UJ, Collins PL. Live-attenuated respiratory syncytial virus vaccines. Curr Top Microbiol Immunol. 2013;372:259-84.
- 350. Ghazaly M, Nadel S. Overview of prevention and management of acute bronchiolitis due to respiratory syncytial virus. Expert Rev Anti Infect Ther. 1 nov 2018;
- 351. McCullers JA. Do specific virus-bacteria pairings drive clinical outcomes of pneumonia? Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. févr 2013;19(2):113-8.
- 352. Hoeve MA, Nash AA, Jackson D, Randall RE, Dransfield I. Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation. PloS One. 2012;7(1):e29443.
- 353. Holzinger D, Gieldon L, Mysore V, Nippe N, Taxman DJ, Duncan JA, et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. J Leukoc Biol. nov 2012;92(5):1069-81.

- 354. Lee N, Wong CK, Hui DSC, Lee SKW, Wong RYK, Ngai KLK, et al. Role of human Toll-like receptors in naturally occurring influenza A infections. Influenza Other Respir Viruses. 1 sept 2013;7(5):666-75.
- 355. Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, Hobom G, Riedel A, Schlee M, et al. Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection. J Gen Virol. août 2004;85(Pt 8):2347-56.
- 356. Pietrocola G, Arciola CR, Rindi S, Di Poto A, Missineo A, Montanaro L, et al. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against Staphylococcus aureus. Int J Artif Organs. sept 2011;34(9):799-810.
- 357. Ma X, Chang W, Zhang C, Zhou X, Yu F. Staphylococcal Panton-Valentine Leukocidin Induces Pro-Inflammatory Cytokine Production and Nuclear Factor-Kappa B Activation in Neutrophils. PLoS ONE. 18 avr 2012;7(4):e34970.
- 358. Diep BA, Le VTM, Badiou C, Le HN, Pinheiro MG, Duong AH, et al. IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA. Sci Transl Med. 21 sept 2016;8(357):357ra124-357ra124.
- 359. Jeannoel M, Casalegno J-S, Ottmann M, Badiou C, Dumitrescu O, Lina B, et al. Synergistic Effects of Influenza and Staphylococcus aureus Toxins on Inflammation Activation and Cytotoxicity in Human Monocytic Cell Lines. Toxins. 11 juill 2018;10(7).
- 360. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. Nat Rev Immunol. déc 2013;13(12):862-74.
- 361. Wu W, Shi Y, Gao H, Liang W, Sheng J, Li L. Immune derangement occurs in patients with H7N9 avian influenza. Crit Care. 2014;18(2):R43.
- 362. Hall MW, Geyer SM, Guo C-Y, Panoskaltsis-Mortari A, Jouvet P, Ferdinands J, et al. Innate Immune Function and Mortality in Critically III Children With Influenza: A Multicenter Study. Crit Care Med. janv 2013;41(1):224-36.
- 363. Bermejo-Martin JF, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramírez P, et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. Crit Care Lond Engl. 2009;13(6):R201.
- 364. Bermejo-Martin JF, Martin-Loeches I, Rello J, Antón A, Almansa R, Xu L, et al. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. Crit Care Lond Engl. 2010;14(5):R167.
- 365. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. Nature. 20 août 2009;460(7258):1021-5.
- 366. Reber AJ, Chirkova T, Kim JH, Cao W, Biber R, Shay DK, et al. Immunosenescence and Challenges of Vaccination against Influenza in the Aging Population. Aging Dis. févr 2012;3(1):68-90.
- Bahadoran A, Lee SH, Wang SM, Manikam R, Rajarajeswaran J, Raju CS, et al. Immune Responses to Influenza Virus and Its Correlation to Age and Inherited Factors. Front Microbiol. 2016;7:1841.

- 368. Demaret J, Walencik A, Jacob M-C, Timsit J-F, Venet F, Lepape A, et al. Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. Cytometry B Clin Cytom. févr 2013;84(1):59-62.
- 369. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard A-L, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. Intensive Care Med. août 2006;32(8):1175-83.
- 370. Flohé S, Lendemans S, Schade F-U, Kreuzfelder E, Waydhas C. Influence of surgical intervention in the immune response of severely injured patients. Intensive Care Med. janv 2004;30(1):96-102.
- 371. Richter A, Nebe T, Wendl K, Schuster K, Klaebisch G, Quintel M, et al. HLA-DR expression in acute pancreatitis. Eur J Surg Acta Chir. oct 1999;165(10):947-51.
- 372. Venet F, Tissot S, Debard A-L, Faudot C, Crampé C, Pachot A, et al. Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. Crit Care Med. août 2007;35(8):1910-7.
- 373. Döcke W-D, Höflich C, Davis KA, Röttgers K, Meisel C, Kiefer P, et al. Monitoring Temporary Immunodepression by Flow Cytometric Measurement of Monocytic HLA-DR Expression: A Multicenter Standardized Study. Clin Chem. 1 déc 2005;51(12):2341-7.
- Venet F, Cour M, Demaret J, Monneret G, Argaud L. Decreased Monocyte HLA-DR Expression in Patients After Non-Shockable out-of-Hospital Cardiac Arrest. Shock Augusta Ga. 2016;46(1):33-6.
- 375. Lukaszewicz A-C, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, et al. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. Crit Care Med. oct 2009;37(10):2746-52.
- 376. Chen J, Cui G, Lu C, Ding Y, Gao H, Zhu Y, et al. Severe Infection With Avian Influenza A Virus is Associated With Delayed Immune Recovery in Survivors. Medicine (Baltimore). févr 2016;95(5):e2606.
- 377. Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, Kalfarentzos F, Gogos CA. Cytokine Production and Monocyte HLA-DR Expression as Predictors of Outcome for Patients with Community-Acquired Severe Infections. Clin Diagn Lab Immunol. janv 2004;11(1):161-7.
- 378. Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quiñones-Falconi F, Bautista E, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. N Engl J Med. 13 août 2009;361(7):680-9.
- 379. Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen van VC, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. N Engl J Med. 18 mars 2004;350(12):1179-88.
- 380. Gao H-N, Lu H-Z, Cao B, Du B, Shang H, Gan J-H, et al. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection. N Engl J Med. 13 juin 2013;368(24):2277-85.
- 381. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. J Immunol Baltim Md 1950. 1 juin 2001;166(11):6952-63.

- 382. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. Crit Care Med. juill 1999;27(7):1230-51.
- 383. Gu J, Xie Z, Gao Z, Liu J, Korteweg C, Ye J, et al. H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study. Lancet Lond Engl. 29 sept 2007;370(9593):1137-45.
- 384. Yu H, Gao Z, Feng Z, Shu Y, Xiang N, Zhou L, et al. Clinical Characteristics of 26 Human Cases of Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Virus Infection in China. PLoS ONE [Internet]. 21 août 2008 [cité 18 nov 2018];3(8). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2515635/
- 385. Venet F, Davin F, Guignant C, Larue A, Cazalis M-A, Darbon R, et al. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. Shock Augusta Ga. oct 2010;34(4):358-63.
- 386. Inoue S, Suzuki-Utsunomiya K, Okada Y, Taira T, Iida Y, Miura N, et al. Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. Crit Care Med. mars 2013;41(3):810-9.
- 387. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. Shock Augusta Ga. nov 2014;42(5):383-91.
- 388. Lachmann G, von Haefen C, Kurth J, Yuerek F, Spies C. Innate immunity recovers earlier than acquired immunity during severe postoperative immunosuppression. Int J Med Sci. 1 janv 2018;15(1):1-9.
- 389. Lachmann G, Kurth J, von Haefen C, Yuerek F, Wernecke K-D, Spies C. In vivo application of Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor enhances postoperative qualitative monocytic function. Int J Med Sci. 2017;14(4):367-75.
- 390. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring Immune Dysfunctions in the Septic Patient: A New Skin for the Old Ceremony. Mol Med. 2008;14(1-2):64-78.
- 391. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. Crit Care Lond Engl. 2006;10(5):233.
- 392. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M. Determining the degree of immunodysregulation in sepsis. Contrib Nephrol. 2007;156:101-11.
- 393. Yu X, Lu R, Wang Z, Zhu N, Wang W, Julian D, et al. Etiology and clinical characterization of respiratory virus infections in adult patients attending an emergency department in Beijing. PloS One. 2012;7(2):e32174.
- 394. Das D, Le Floch H, Houhou N, Epelboin L, Hausfater P, Khalil A, et al. Viruses detected by systematic multiplex polymerase chain reaction in adults with suspected community-acquired pneumonia attending emergency departments in France. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. juin 2015;21(6):608.e1-8.
- 395. Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. N Engl J Med. 30 juill 2015;373(5):415-27.

- 396. Choi S-H, Hong S-B, Ko G-B, Lee Y, Park HJ, Park S-Y, et al. Viral infection in patients with severe pneumonia requiring intensive care unit admission. Am J Respir Crit Care Med. 15 août 2012;186(4):325-32.
- 397. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, Rollins NK, Duffy LB, Ziegler T, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. Pediatrics. avr 2004;113(4):701-7.
- 398. Berkley JA, Munywoki P, Ngama M, Kazungu S, Abwao J, Bett A, et al. Viral etiology of severe pneumonia among Kenyan infants and children. JAMA. 26 mai 2010;303(20):2051-7.
- 399. Olsen SJ, Thamthitiwat S, Chantra S, Chittaganpitch M, Fry AM, Simmerman JM, et al. Incidence of respiratory pathogens in persons hospitalized with pneumonia in two provinces in Thailand. Epidemiol Infect. déc 2010;138(12):1811-22.
- 400. Hammitt LL, Kazungu S, Morpeth SC, Gibson DG, Mvera B, Brent AJ, et al. A preliminary study of pneumonia etiology among hospitalized children in Kenya. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. avr 2012;54 Suppl 2:S190-199.
- 401. Chen C-J, Lin P-Y, Tsai M-H, Huang C-G, Tsao K-C, Wong K-S, et al. Etiology of communityacquired pneumonia in hospitalized children in northern Taiwan. Pediatr Infect Dis J. nov 2012;31(11):e196-201.
- 402. Techasaensiri B, Techasaensiri C, Mejías A, McCracken GH, Ramilo O. Viral coinfections in children with invasive pneumococcal disease. Pediatr Infect Dis J. juin 2010;29(6):519-23.
- 403. Peltola V, Heikkinen T, Ruuskanen O, Jartti T, Hovi T, Kilpi T, et al. Temporal association between rhinovirus circulation in the community and invasive pneumococcal disease in children. Pediatr Infect Dis J. juin 2011;30(6):456-61.
- 404. Choi S-H, Hong S-B, Kim T, Kim S-H, Huh JW, Do K-H, et al. Clinical and molecular characterization of rhinoviruses A, B, and C in adult patients with pneumonia. J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol. févr 2015;63:70-5.
- 405. Kukavica-Ibrulj I, Hamelin M-E, Prince GA, Gagnon C, Bergeron Y, Bergeron MG, et al. Infection with human metapneumovirus predisposes mice to severe pneumococcal pneumonia. J Virol. févr 2009;83(3):1341-9.
- 406. Michaels RH, Myerowitz RL. Viral enhancement of nasal colonization with Haemophilus influenzae type b in the infant rat. Pediatr Res. juin 1983;17(6):472-3.
- 407. Jeannoël M, Lina G, Rasigade JP, Lina B, Morfin F, Casalegno JS. Microorganisms associated with respiratory syncytial virus pneumonia in the adult population. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. janv 2019;38(1):157-60.
- 408. Watkins RR, David MZ, Salata RA. Current concepts on the virulence mechanisms of meticillinresistant Staphylococcus aureus. J Med Microbiol. sept 2012;61(Pt 9):1179-93.
- 409. Kobayashi SD, DeLeo FR. An update on community-associated MRSA virulence. Curr Opin Pharmacol. oct 2009;9(5):545-51.

410. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. PloS One. 2011;6(4):e17936.