



HAL
open science

Impact du microbiote intestinal sur les surinfections bactériennes post-grippales

Valentin Sencio

► **To cite this version:**

Valentin Sencio. Impact du microbiote intestinal sur les surinfections bactériennes post-grippales. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2020. Français. NNT : 2020LILUS030 . tel-03349638

HAL Id: tel-03349638

<https://theses.hal.science/tel-03349638v1>

Submitted on 20 Sep 2021

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

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

Université de Lille
Ecole Doctorale Biologie Santé



THESE

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

Présentée et soutenue par

Valentin SENCIO

Le 20 mars 2020

Impact du microbiote intestinal sur les surinfections bactériennes post-grippales

Devant le jury composé de :

M. le Professeur **Benoit FOLIGNE**

Mme le Docteur **Florence NIEDERGANG**

M. le Docteur **Harry SOKOL**

Mme le Docteur **Stéphanie FERREIRA**

M. le Docteur Ronan **LE GOFFIC**

M. le Docteur **François TROTTEIN**

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Centre d'infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille,
INSERM U1019, CNRSUMR8204, Université de Lille
Equipe « I2M »

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, le Professeur **Benoit Foligne** pour avoir accepté de présider ce jury de thèse, les Docteurs **Florence Niedergang** et **Harry Sokol** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et les Docteurs **Stéphanie Ferreira** et **Ronan Le Goffic** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse aussi mes remerciements au Docteur **Muriel Thomas** et, de nouveau, au Professeur **Benoit Foligne** pour avoir accepté d'être les membres de mon CST. Merci pour toutes vos remarques qui ont fortement contribué à l'avancement de ce projet

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Docteur **François Trottein**, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail. Vous m'avez accueilli dans l'équipe pendant mon Master 2 et vous m'avez donné votre confiance pour poursuivre ce travail durant cette thèse. Après de nombreuses heures de réunion, un nombre incalculable d'expériences et (beaucoup) de patience, on a enfin réussi à publier cet article ! Je pense avoir franchi un cap dans le monde de la recherche, passant du petit étudiant à qui on donne une liste de choses à faire, au futur docteur capable de proposer ses propres idées et de justifier ses choix et je dois dire que c'est en grande partie grâce à vous. Merci également de m'avoir donné votre confiance pour initier ou participer à de nombreux projets de recherche au sein du laboratoire.

Je tiens à remercier le Docteur **Christelle Faveuw** pour son aide et toutes ces discussions que l'on a eues qui ont permis de faire avancer ce projet. Merci de m'avoir donné la possibilité de travailler sur ton projet et j'espère dans le futur en avoir une nouvelle fois l'occasion. Un merci également aux Docteurs **Isabelle Wolowczuk** et **Christophe Paget** pour toutes ces discussions que l'on a eues et qui ont permis de faire grandement avancer ce projet

Un immense merci à **Daphnée**, mon binôme de choc. Merci pour toute ton aide et toutes ces discussions que l'on a eu pendant ces 4 ans, surtout pendant nos nombreuses préparations FACS. Cela a été un plaisir de travailler avec toi.

Muito obrigado a **Marina** por toda a sua ajuda neste projeto. Obrigado também por todas essas discussões e risadas que compartilhamos. Espero que aconteça o que acontecer em nossa vida, manteremos contato!

Merci également à **Adeline**, pour ces deux ans que l'on a passés à travailler ensemble. Merci pour tout ce que j'ai appris à tes cotés et toutes les discussions que l'on a pues avoir pendant et en dehors du travail.

Merci à **Lucie** et **Thibault** pour leur travail sur ce projet. Votre aide technique nous a permis de mener au mieux ce projet et de nous faire gagner énormément de temps.

Je tiens à remercier l'équipe des Docteurs **Jean-Claude Sirard** et **Christophe Carnoy** et celle des Docteur **Muriel Pichavant** et **Philippe Gosset** pour avoir créé une bonne ambiance de travail dans laquelle j'ai pu m'épanouir durant ces 4 années.

Merci à **Karine**, reine des commandes et femme de l'ombre. Tu nous fais gagner un temps fou dans nos recherches et je sais que tu t'es souvent arrachée les cheveux sur mes commandes ! Merci d'avoir fait de moi l'expert des envois de colis.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont partagé mon bureau durant ces 4 ans et qui m'ont surtout supporté. Un merci particulier à **Gaëlle**, pour tous nos fous rires, nos discussions pas toujours scientifiques et tes conseils. Merci à **Laura**, on a commencé cette aventure en même temps, ponctuée par des horoscopes un peu violents ! Merci également à **Olivia**, pour nos batailles de majeurs et toutes nos discussions autour d'une petite bière. Et enfin, merci aux autres personnes ayant partagé ce bureau : Manu, Mélanie, Nathan, Xing, Claudine, Johanna, Laurye, Delphine etc..

Un immense merci à ceux qui me soutiennent depuis le début, **mes parents**. Vous n'avez jamais douté de mes choix, même si il faut être un peu fou pour faire une thèse. Même si je suis loin de vous, votre soutien a été l'une de mes principales forces pour réussir dans la vie. Merci également à ma petite sœur, **Lisa**, pour tout ton soutien. Je ne t'obligerai pas à m'appeler docteur ne t'inquiète pas. Un grand merci également à ma famille du nord, **Manuella, Stéphanie et Manuel**. Vous y êtes pour beaucoup dans ma venue à Lille et je ne vous remercierai jamais assez pour toute votre gentillesse et je ne l'oublierai jamais.

Et enfin, un immense merci à **Anaëlle**. Je me souviens encore du stress que l'on avait le jour des résultats des bourses de thèse pour savoir si j'allais rester à Lille. Tu m'as toujours soutenu tout au long de cette thèse. Sans le savoir tu m'as permis de passer au travers de périodes de stress et de doute. Tu connaissais mes ambitions et tu ne m'as jamais reproché les réveils aux aurores et les nombreux weekends de travail. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ça.

RESUME

Le virus influenza A (IAV) est responsable d'épidémies de gripes chaque année, et de pandémies tous les 10 à 15 ans. Des infections bactériennes graves (infections à pneumocoques) peuvent survenir suite à l'infection grippale et contribuent à la morbidité et à la mortalité excessive de la grippe. L'infection par IAV réduit l'immunité antibactérienne, favorisant le développement local des bactéries et leur dissémination. Il a été démontré que le microbiote intestinal a un impact sur les réponses immunitaires de l'hôte. La déplétion (traitement antibiotique) ou l'absence (souris sans germe) de microbiote augmente la susceptibilité aux infections par IAV et *Streptococcus pneumoniae*. Nous avons émis l'hypothèse que la perturbation de la composition et de la fonction du microbiote intestinal au cours de l'infection par IAV pourrait influencer les surinfections bactériennes pulmonaires.

Une analyse métagénomique réalisée au cours de l'infection grippale montre une altération transitoire du microbiote intestinal et une perturbation de son activité de fermentation (acides gras à chaîne courte, AGCC). Des expériences de transfert de flore fécale ont montré que les souris reconstituées avec un microbiote altéré (souris grippées) sont plus sensibles à l'infection bactérienne par rapport aux souris reconstituées avec un microbiote sain. La restauration du défaut de production des AGCC (par apport exogène) chez les souris colonisées et au cours de l'infection grippale réduit la susceptibilité aux (sur)infections bactériennes. C'est principalement l'acétate, AGCC majoritaire dans l'intestin et le sang, qui entraîne ces effets bénéfiques sur le contrôle de la charge bactérienne en condition de surinfection. Suite au traitement, les macrophages alvéolaires présentent une capacité plus importante à tuer les bactéries permettant de diminuer la charge bactérienne dans le poumon et diminuer le risque de mortalité au cours de la surinfection. La déplétion d'un des récepteurs de l'acétate, le récepteur couplé à la protéine G 43 (GPR43), inhibe son effet bénéfique. L'utilisation d'agonistes du récepteur GPR43 (mimant l'effet des AGCC) au cours de l'infection grippale réduit également la susceptibilité aux surinfections bactériennes.

Ces résultats constituent une avancée majeure dans la lutte contre les surinfections bactériennes et laissent entrevoir des applications thérapeutiques. Notamment par le biais de traitement riche en fibres (source indirect d'AGCC) ou à base de probiotiques producteurs d'AGCC.

Table des matières :

REMERCIEMENTS.....	2
RESUME	4
GLOSSAIRE – LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
INTRODUCTION	9
Chapitre 1 : Le virus Influenza A	10
I/ Généralités sur le virus de la grippe.....	10
1 - Structure du virus Influenza A.....	10
2 - Cycle de réplication du virus	12
3 - Mécanismes d'évolution du virus de la grippe	15
a – Dérive antigénique.....	15
b – Cassure antigénique	15
II/ Généralité sur l'infection grippale	16
1 - Symptômes	16
2 - Populations à risque.....	16
3 - Epidémiologie	18
a – Epidémies grippales	18
b – Pandémies grippales.....	18
4 - Vaccination et traitements	19
III/ La réponse immunitaire contre le virus de la grippe	20
1 - Reconnaissance du virus de l'influenza par le système immunitaire	20
a – Reconnaissance par les Toll-Like Receptors.....	21
a/1 - TLR3 (iwasaki et pillai 2014).....	21
a/2 - TLR7 (iwasaki et pillai 2014).....	22
b – Reconnaissance par les Retinoic acid Induced Gene-1	22
c – Reconnaissance par les Nod-Like Receptors	22
d – Le complexe cGAS/STING	24
2 - Réponse des IFN-stimulated genes lors de l'infection virale	24
3 - La réponse immunitaire innée	25
a – Les cellules épithéliales respiratoires	26
b – Les macrophages alvéolaires	26
c – Les cellules dendritiques	27
d – Les neutrophiles.....	27
e - Les cellules Natural Killer (NK)	28
f - Les cellules T Natural Killer invariantes	28
4 - La réponse immunitaire adaptative spécifique.....	29
a – La réponse lymphocytes T spécifiques.....	29
b – La réponse lymphocytes B spécifiques	29
Chapitre 2 : <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
I/ Généralité sur <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
1 - Epidémiologie	31
2 - Les traitements	32
II/ Structure et facteurs de virulence du pneumocoque	32
1 - La capsule polysaccharidique.....	33
2- La paroi bactérienne	33

3 - Les protéines bactériennes	34
a - La pneumolysine	34
b - La protéine de surface PspA	35
c - L'adhésine CbpA ou PspC.....	35
d - Les neuraminidases	36
e - L'autolysine LytA.....	36
III/ La réponse immunitaire contre <i>S. pneumoniae</i>	36
1 - Reconnaissance de <i>S. pneumoniae</i> par le système immunitaire	36
a – Reconnaissance par les Toll-Like Receptors.....	36
a/1 - TLR2	37
a/2 TLR4.....	37
b - Reconnaissance par les Nod-Like Receptors	38
c- Reconnaissance par les Récepteurs C-type lectin.....	39
d - Le rôle du complément.....	39
2 - La réponse immunitaire innée	39
a – Cellules épithéliales pulmonaires	39
b – Macrophages alvéolaires	40
c – Neutrophiles.....	40
3 - La réponse immunitaire adaptative spécifique.....	41
a – La réponse lymphocytes T spécifiques.....	41
b – La réponse lymphocytes B spécifiques	42
IV/ Les surinfections bactériennes post-grippales par <i>S. pneumoniae</i>	42
1 - Altération de l'épithélium respiratoire	43
2 - Altération de la réponse immunitaire antibactérienne	46
a – Macrophages alvéolaires	46
b – Neutrophiles	47
c – Altération de la réponse cytokinique	48
Chapitre 3 – Le microbiote intestinal	51
I/ Généralité sur le microbiote intestinal	51
1 - Mise en place et variation du microbiote intestinal au cours de la vie	52
2 - Facteurs influençant le microbiote intestinal	53
3 - Méthodes d'étude du microbiote.....	54
II/ Les acides gras à chaîne courte.....	54
1 – Généralité.....	55
2 - La production des acides gras à chaîne courte	56
3 - Les récepteurs et transporteurs des acides gras à chaîne courte.....	56
a – Les récepteurs.....	56
a/1 - Structure et activation du récepteur	57
a/2 – Voie de signalisation pro et anti-inflammatoire des GPR	58
B – Les transporteurs.....	60
3 - Modulation de l'acétylation des histones.....	60
III/ Les différents rôles du microbiote intestinal et des acides gras à chaîne courte	61
1 - Impact du microbiote sur l'intégrité intestinale	61
a – Les AGCC : sources énergétiques des cellules épithéliales	61
b – Les AGCC : renforcement de la perméabilité intestinale.....	62
2 - Impact du microbiote intestinal sur l'immunité intestinale	63
a – Education et induction de l'immunité intestinale.....	63
a/1 – Stimulation des récepteurs	64
a/2 – Les lymphocytes T régulateurs.....	65

b – Contrôle de la charge bactérienne intestinale.....	67
b/1 – Synthèse d’immunoglobulines A	67
b/2 – Synthèse de peptides antimicrobiens.....	68
b/3 – Sécrétion de mucus.....	68
c – Effet du microbiote intestinal sur les cellules de l’immunité innée.....	69
c/1 : Les neutrophiles	69
c/2 – Les macrophages.....	70
c/3 – Les cellules dendritiques	70
IV/ L’axe poumon-intestin et les maladies respiratoires.....	71
1 - Microbiote pulmonaire	71
2 - Impact des pathologies respiratoires sur l’intégrité intestinale	72
3 - Effet du microbiote intestinal sur l’immunité pulmonaire	73
a – Asthme et maladies allergiques des voies respiratoires.....	73
b – Les infections respiratoires bactériennes	74
c – Les infections respiratoires virales – cas du virus de la grippe	75
c/1 – Impact du virus de la grippe sur le microbiote intestinal.....	75
c/2 – Impact du microbiote intestinal sur l’infection grippale	76
OBJECTIFS DE L’ETUDE	79
RESULTATS	84
La perturbation du microbiote intestinal au cours de la grippe contribue aux surinfections par pneumocoque via l’altération de la production des acides gras à chaîne courte.....	85
Résumé	85
Introduction	86
Résultats.....	88
Matériels et méthodes.....	105
Figures supplémentaires.....	114
Tableau.....	122
DISCUSSION	127
BIBLIOGRAPHIE.....	141
ANNEXES	178
Annexe I – Publications, brevets et communications scientifiques.....	179

GLOSSAIRE – LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique	M1/M2 : protéine de matrice
AGCC : acide gras à chaîne courte	MAPK : mitogen-activated protein kinases
AM : macrophage alvéolaire	MARCO : MAcrophage Receptor with COLlagenous structure
AMP : peptides antimicrobiens	MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin
ARN : acide ribonucléique	MPO : myéloperoxydase
ARNc : ARN complémentaire	MYD88 : protéine adaptatrice de la réponse primaire de différenciation myéloïde 88
ARNdb / sb : ARN double ou simple brin	NA : Neuraminidase
ARNm : ARN messager	NanA/B : neuraminidase bactérienne
ARNr : ARN ribosomique	NF-κB : nuclear factor-κB
ARNv : ARN viral	NK : cellules Natural Killer
BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive	NLR : NOD-like receptor
CCL : Chemokine Ligand	NO : oxyde nitrique
cGAS/STING : Cyclic GMP-AMP synthase / stimulator of interferon genes	NOD : Nucleotide Oligomerization Domain
CPAg : Cellule présentatrice d'antigènes	NP : nucléoprotéine
CTL : lymphocytes T cytotoxiques	NS1/NS2 : protéine non structurale
DC : cellule dendritique cDC : D conventionnelle pDC : DC plasmacytoïdes	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
FFAR : Free Fatty Acid Receptors	OTU : unité taxonomique opérationnelle
GDP/GTP : guanosine diphosphate ou triphosphate	PA : protéine acide
GPR : récepteur couplé à la protéine G	PAMPS : motifs moléculaires associés aux pathogènes
GRK : GPR kinase	PB1/PB2 : protéine basique
HA : Hémagglutinine	PCoA : Principal Coordinate Analysis
HAT : histone acétyl-transférase	PCR : polymérase chain reaction
HDAC : histones désacétylases	PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
IAV : virus Influenza A	RIG-I : Retinoic acid-Inducible Gene I
IDO : indoleamine-2,3-dioxygénase	RLLR : RIG-I-like receptors
IFN : interféron	ROS : espèces réactives de l'oxygène
IFNAR : récepteur pour l'interféron de type I	RSV : virus respiratoire syncytial
Ig : immunoglobuline	Sp : <i>Streptococcus pneumoniae</i>
IL : interleukine	TLR : Toll-like Receptors
iNKT : cellules T natural killer invariants	TNF : Tumor necrosis factor alpha
IRF : IFN-regulatory factor	Treg : lymphocyte T régulateur
ISG : gène stimulé par l'interféron	Th : lymphocyte T helper
KC : keratinocyte-derived chemokine	vRNP : ribonucléoprotéique viral
LB / LT : lymphocyte B ou T	
LPS : lipopolysaccharides	

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Le virus Influenza A

Le virus Influenza A (IAV), plus communément appelé virus de la grippe, est un virus à tropisme respiratoire. Il est responsable chaque année d'une morbidité et d'une mortalité importantes. Selon le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ces épidémies, dites « saisonnières », sont responsables de 3 à 5 millions de cas sévères et de 290 000 à 650 000 décès dans le monde (Coates et al., 2015). De façon plus rare, le virus grippal peut aussi être à l'origine de pandémies. Ces dernières sont dues à l'apparition de nouveaux sous-types de virus résultant d'un réassortiment génétique. Le virus possède alors des caractéristiques nouvelles par rapport aux virus habituels circulants lui permettant de contourner le système immunitaire. La pathologie associée peut être plus importante qu'une grippe saisonnière classique. La grippe espagnole de 1918-1919 a été particulièrement meurtrière, provoquant entre 30 et 50 millions de décès dans le monde (Biggerstaff et al., 2014; Taubenberger and Morens, 2006).

I/ Généralités sur le virus de la grippe

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Cette famille est constituée de virus enveloppés dont le génome est constitué de brins d'ARN segmentés à polarité négative. Les virus influenza sont classés selon 4 types : A, B, C et D (Hause et al., 2014). Les virus de type A et B contiennent 8 segments d'ARN viral simple brin (ARNv) codant pour 17 protéines virales. Les virus de type C et D contiennent 7 segments d'ARNv (McGeoch et al., 1976).

1 - Structure du virus Influenza A

Sur le plan morphologique, le virus de la grippe est une sphère possédant un diamètre d'environ 100 nm (Badham and Rossman, 2016). Le virus possède une bicouche lipidique dont la composition dépend des lipides présents à la surface des cellules infectées (Harris et al., 2006). Trois protéines de surface sont ancrées au niveau de la bicouche lipidique : l'hémagglutinine (HA), protéine majeure de l'enveloppe virale, la neuraminidase (NA) et la protéine de matrice 2 (M2) (Gamblin and Skehel, 2010). L'enveloppe virale est soutenue par la protéine de matrice 1 (M1) qui assure la rigidité. Elle intervient également dans l'assemblage et le bourgeonnement de la particule virale (Harris et al., 2006) (Figure 1).

L'HA et la NA jouent un rôle essentiel puisqu'elles assurent l'entrée du virus dans les cellules et la libération des virions nouvellement formés et initialement attachés à la surface de la cellule infectée (Gamblin and Skehel, 2010). Ces deux glycoprotéines permettent la classification des virus de la grippe en différents sous-types puisqu'elles constituent les déterminants antigéniques majeurs du virus. A ce jour, 16 sous-types de l'HA (H1-16) et 9 de la NA (N1-9) ont été découverts dans des IAV isolés d'oiseaux aquatiques (Yoon et al., 2014). Deux sous-types supplémentaires pour l'HA (H17 et H18) et la NA (N10 et N11) ont récemment été identifiés chez les chauves-souris (Tong et al., 2013).

La protéine M2 est un canal ionique enchâssé dans l'enveloppe, permettant de réguler le pH interne du virus par le transport d'ions H⁺. Cette protéine participe activement à la réplication virale en jouant un rôle important dans (i) la libération des ARNv au sein de la cellule infectée (Stauffer et al., 2014), (ii) l'assemblage (Iwatsuki-Horimoto et al., 2006) et (iii) le bourgeonnement du virus (Chen et al., 2008; McCown and Pekosz, 2006).

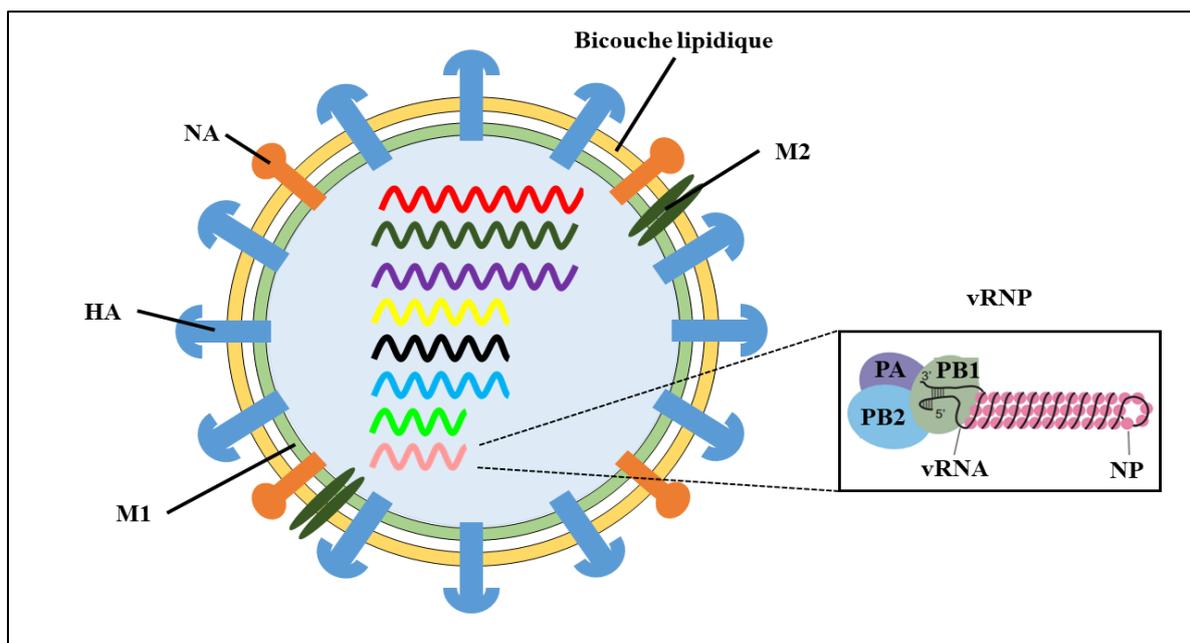


Figure 1 : Structure du virus de l'Influenza A (inspirée de (Dou et al., 2018))

L'enveloppe virale comporte huit segments d'ARNv. Ces derniers sont encapsidés par plusieurs copies de la nucléoprotéine (NP) et un complexe de la polymérase virale qui se fixe aux deux extrémités des molécules d'ARN, formant une molécule d'ARN circulaire non covalente. La polymérase virale est composée de trois protéines : la protéine acide (PA) et les deux protéines basiques (PB1 et PB2). Elles interviennent dans le contrôle de la transcription

et la réplication de l'ARN viral (Arranz et al., 2012). L'ensemble forme une particule ribonucléoprotéique virale (vRNP) (Figure 1).

Au cours de la réplication du virus, deux autres protéines sont exprimées mais ne sont pas incorporées dans le virion mature. La protéine non structurale 1 (NS1) est une protéine multifonctionnelle jouant un rôle majeur dans l'évasion du système immunitaire de l'hôte. NS2 (ou NEP) assure le transport des vRNP nouvellement formées du noyau vers le cytoplasme.

2 - Cycle de réplication du virus

La réplication du virus de la grippe se réalise au sein d'une cellule de l'hôte. La fixation du virus à la cellule hôte se fait via la reconnaissance, par l'HA, d'un récepteur spécifique: l'acide α -sialique (N-acétyl-neuraminique) (Figure 2, étape i). L'une des deux sous-unités de l'HA (HA1) interagit avec l'acide α -sialique présent sur la partie terminale des glycoprotéines ou des glycolipides (Gamblin and Skehel, 2010; Weis et al., 1988). La conformation de la liaison entre l'acide sialique et le galactose joue un rôle essentiel dans la reconnaissance du récepteur par l'HA. En effet, l'HA des IAV humains reconnaît préférentiellement les acides sialiques reliés au galactose en α -2,6 (Gambaryan et al., 1997) alors que l'HA des IAV aviaires reconnaît préférentiellement la liaison en α -2,3 (Nobusawa et al., 1991). Cette préférence a une incidence sur l'infection grippale puisque les liaisons α -2,6 se trouvent sur les cellules épithéliales bronchiques des voies respiratoires supérieures et les liaisons α -2,3 sur celles des voies respiratoires inférieures (Russell et al., 2008).

L'association HA-acide sialique induit une endocytose de la particule virale (Figure 2, étape ii). Cette endocytose peut être dépendante de la clathrine (Roy et al., 2000; Rust et al., 2004) ou s'effectuer par macropinocytose (Sieczkarski and Whittaker, 2002; de Vries et al., 2011). Une fois internalisé, le virus est acheminé vers l'endosome où le pH (<5) active le canal ionique M2 (Pinto and Lamb, 2006) (Figure 2, étape iii). L'acidification de la particule virale a plusieurs conséquences, notamment en provoquant un changement de configuration de l'HA (Bullough et al., 1994) et en séparant le vRNP de la protéine M1 (Bui et al., 1996). La sous-unité HA2 de l'HA forme une structure amphiphile dans la membrane de l'endosome favorisant la fusion des membranes de l'endosome et de la particule virale, permettant la libération des vRNP dans le cytosol (Figure 2, étape iv).

Les vRNP sont ensuite acheminées vers le noyau cellulaire; ce transport dépend fortement de la machinerie de la cellule hôte. Il est médié par le complexe de transport importine α – importine β (Martin and Helenius, 1991) (Figure 2, étape v). Il a été démontré qu'une heure est suffisante au virus pour entrer dans la cellule et délivrer son matériel génétique au niveau du noyau. L'entrée et la fusion se produisant assez rapidement (~ 10 min), c'est l'importation nucléaire qui nécessite la majeure partie du temps (Dou et al., 2017).

Les étapes de transcription et de réplication ont lieu dans le noyau. Le virus de la grippe est le seul virus ARN, avec les Bornavirus, dont les étapes de transcription et de réplication sont nucléaires. En effet, les virus à ARN sont connus pour effectuer ces étapes dans le cytoplasme. Contrairement aux virus à ADN, qui les effectuent dans le noyau. Au sein du noyau, les ARNv associés à leur polymérase servent de matrice pour la formation d'un ARN complémentaire (ARNc) à polarité positive (Figure 2, étape vi) ou sont transcrits en ARN messagers (ARNm) grâce à l'association de la polymérase virale et de l'ARN polymérase II de l'hôte (Figure 2, étape vii). Les ARNm sont exportés dans le cytoplasme afin d'induire la traduction en protéine grâce à la machinerie de la cellule hôte (York and Fodor, 2013) (Figure 2, étape viii). Les protéines nouvellement synthétisées par les ribosomes cytoplasmiques reviennent dans le noyau et aident à la transcription et à la réplication de l'ARNv. En effet, les différentes sous-unités de la polymérase virale (PB1, PB2, PA) et la NP se fixent sur l'ARNc permettant ainsi la synthèse d'un ARN à polarité négative (Figure 2, étape ix et x). Ce dernier s'associe à un nouveau complexe de la polymérase virale. Les vRNP néoformés s'associent aux protéines virales M1 et NS2 afin de faciliter le recrutement de CRM1 (Chromosomal Maintenance 1 ou Exportin 1) (Huang et al., 2013) (Figure 2, étape xi). Cette dernière est la principale protéine d'exportation chez les mammifères facilitant le transport des ARNv à travers la membrane nucléaire jusqu'au cytoplasme (Nguyen et al., 2012) (Figure 2, étape xi). Les vRNP, une fois dans le cytoplasme, sont acheminés vers la surface de la cellule hôte. Pour cela, la protéine PB2 s'associe à Rab11 (Ras-related protein 11) (Amorim et al., 2011) (Figure 2, étape xiii). Cette dernière est un régulateur clé du trafic membranaire intracellulaire.

Une fois les protéines virales et les vRNP synthétisées, ceux-ci se retrouvent au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte afin de pouvoir induire le bourgeonnement et la libération des virions (Figure 2, étape xiv). Pour cela, les protéines virales de l'enveloppe (NA, HA et M2) s'insèrent dans la membrane induisant un remaniement lipidique de cette dernière. Ceci explique pourquoi l'enveloppe virale contient également des protéines

membranaires de l'hôte (Hutchinson et al., 2014). Sur la face interne de la membrane cytoplasmique, la protéine M1 vient former la matrice du futur virus (Noton et al., 2007). L'expression de HA et NA suffit pour induire le bourgeonnement mais l'efficacité et l'uniformité du bourgeonnement dépendent de la présence de M1 (Chen et al., 2007). Pour favoriser la formation de bourgeons, le virus doit d'abord induire une courbure significative de la membrane, puis resserrer les deux membranes opposées de l'enveloppe virale afin de faciliter la scission de la membrane. Une fois le bourgeonnement terminé, la nouvelle particule virale est liée à la cellule par la liaison entre HA et l'acide sialique (Figure 2, étape xv). Leur libération dépend fortement de l'activité sialidase de la NA. En effet, NA facilite la libération virale en catalysant l'hydrolyse de la liaison glycosidique qui lie la HA à l'acide sialique. Ceci facilite la libération du virus pendant le bourgeonnement (Webster and Laver, 1967) (Figure 2, étape xvi).

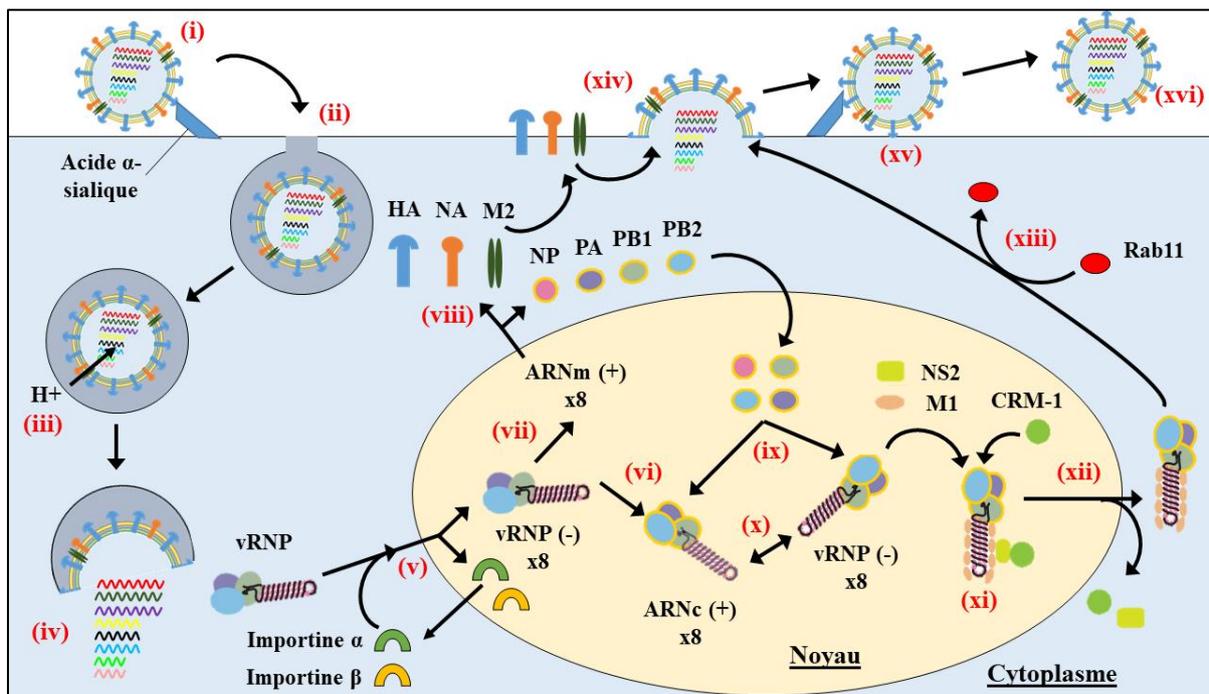


Figure 2 : Cycle du virus de la grippe. La fixation de l'IAV à l'acide α -sialique (i) entraîne l'endocytose du virus (ii). Le canal ionique M2 est activé et entraîne l'acidification du virus (iii) facilitant la fusion de ce dernier avec l'endosome afin de libérer les vRNP (iv). Les vRNP rejoignent le noyau via les importines α et β (v). Dans le noyau, les ARNv servent de matrice pour la formation d'ARNc + (vi) ou sont transcrits en ARNm (vii). Les ARNm sont exportés dans le cytoplasme et traduits en protéines (viii). Les protéines nouvellement synthétisées reviennent dans le noyau et aident à la transcription et à la réplication de l'ARNv (ix et x). Les vRNP néoformées s'associent aux protéines virales M1 et NS2 afin de faciliter le recrutement de CRM1 (xi) permettant le transport des ARNv à travers la membrane nucléaire jusqu'au cytoplasme (xi). Les vRNP, une fois dans le cytoplasme, sont acheminées vers la surface de la cellule hôte via l'association avec Rab11 (xiii). Les protéines virales et les vRNP synthétisées se retrouvent au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte afin de pouvoir induire le bourgeonnement et la libération des virions (xiv, xv et xvi). (Figure inspirée de (Dou et al., 2018))

3 - Mécanismes d'évolution du virus de la grippe

Le virus de la grippe est capable d'évoluer constamment afin d'échapper à la pression du système immunitaire de l'hôte. Cette évolution se fait majoritairement sur les deux antigènes de surface (HA et NA) par deux procédés : la dérive antigénique ou la cassure antigénique (Shao et al., 2017). Ces deux types de mutation ont des conséquences plus ou moins importantes sur la virulence de la nouvelle souche formée.

a – Dérive antigénique

Afin d'échapper aux anticorps neutralisants produits en réponse aux épidémies annuelles, de nouvelles souches apparaissent résultant d'une mutation ponctuelle aussi appelée « dérive antigénique » (Carrat and Flahault, 2007). Ces mutations sont principalement dues à des erreurs dans la copie du génome par la polymérase virale au niveau des séquences codantes pour les épitopes de l'HA ou de la NA (Wilson and Cox, 1990). Ces virus mutés sont alors sélectionnés et permettent une réinfection de l'hôte (Bedford et al., 2014). En résumé, les virus issus de ce type de mutation sont responsables des épidémies de grippe annuelles. Cette capacité de mutation est prise en compte dans la formulation des vaccins contre la grippe, dont la composition est renouvelée tous les ans.

b – Cassure antigénique

La cassure antigénique est plus complexe puisqu'elle nécessite la présence de deux souches virales différentes au sein d'une même cellule infectée. Elle se fait le plus souvent entre un IAV humain et un IAV aviaire chez le porc. Ce dernier possède les récepteurs à la fois pour les IAV aviaires et les IAV humains. Il est alors considéré comme un hôte intermédiaire. Cette cassure antigénique est due à un échange d'ARNv entraînant un remplacement complet d'un ou plusieurs gènes d'une souche virale par un gène équivalent de l'autre souche virale (Lowen, 2017). Il y a alors génération d'une nouvelle souche d'IAV qui peut potentiellement être à l'origine de pandémies grippales (Vergara-Alert et al., 2014). Ce réassortiment entre deux virus est dû à la segmentation du génome permettant plus facilement l'échange des séquences codantes. En effet, à partir d'une co-infection avec deux IAV, portant chacun huit segments, 256 (2^8) génotypes différents peuvent être créés. Ainsi, l'échange de gènes par réassortiment génère une diversité virale importante. Cette diversité facilite l'évolution rapide du virus et son échappement vis-à-vis de la réponse immunitaire de l'hôte et l'acquisition de résistances aux médicaments antiviraux (Steel and Lowen, 2014). Les trois pandémies majeures du XX^{ème} siècle (1918, 1957 et 1968) et celle de 2009 sont dues à un

réassortiment entre un virus aviaire et un virus humain (Dawood et al., 2009; Worobey et al., 2014).

II/ Généralité sur l'infection grippale

1 - Symptômes

L'infection par le virus IAV se caractérise par une infection des cellules du tractus respiratoire. Comme expliqué précédemment, les IAV humains ont une préférence pour la partie supérieure du tractus respiratoire tandis que les IAV aviaires ont une préférence pour la partie inférieure (Bradley et al., 2011). Le virus se transmet majoritairement de personne à personne via les sécrétions respiratoires provoquées par les éternuements ou la toux. Il peut également être transmis via des objets contaminés, expliquant ainsi pourquoi les transports en commun ou encore les écoles sont des lieux propices à l'infection. La période d'incubation du virus est de 1 à 3 jours. Suite à cette période, les symptômes apparaissent, caractérisés notamment par une forte fièvre accompagnée d'une toux, de céphalées, de douleurs musculaires et articulaires et d'une fatigue générale (Shao et al., 2017). On estime que ces symptômes durent entre 3 et 7 jours. De plus, au cours de l'infection, des symptômes intestinaux (vomissements et diarrhées) peuvent apparaître.

En général, la grippe peut être considérée comme une infection virale bénigne, puisqu'une majorité des patients guérissent dans les 7 à 14 jours suivant les premiers symptômes. Pourtant, cette infection peut s'accompagner de complications pouvant conduire au décès des patients les plus fragiles. La principale complication est la surinfection bactérienne. Ces surinfections sont majoritairement induites par trois bactéries : *Streptococcus pneumoniae* (Sp), *Haemophilus influenza* et *Staphylococcus aureus* (Collins, 1932; Morris et al., 2017; Smith and McCullers, 2014).

2 - Populations à risque

Plusieurs populations présentent un risque accru pour le développement de complication suite à l'infection grippale. L'âge est un facteur important. Si on représente sur un graphique le taux de mortalité au cours d'une épidémie grippale en fonction de l'âge de la population, on obtient une courbe en « U », mettant en avant un risque plus élevé de mortalité chez les enfants (0 à 5 ans) et les personnes âgées (75 ans et plus) (Short et al., 2018).

Chez les personnes âgées, le risque accru s'explique en partie par un affaiblissement du système immunitaire. Certaines maladies chroniques participent à la susceptibilité (Cox

and Subbarao, 2000). En effet, des études réalisées chez l'homme et la souris montrent une diminution de la réponse T et B, ainsi qu'une diminution de la production de l'interleukine 2 (IL-2) au cours de la grippe chez les personnes âgées (Bender et al., 1991; Effros and Walford, 1983). De plus, il a été démontré que la vaccination chez les personnes de plus de 65 ans est 20% moins efficace comparée au reste de la population (Nakaya et al., 2015). Cette perte d'efficacité est liée à une réponse B moins efficace (production d'anticorps moins spécifiques) (Frasca and Blomberg, 2009). De plus, les traitements médicamenteux chroniques diminuent l'effet de la vaccination contre le virus de la grippe (Agarwal et al., 2018).

En ce qui concerne les enfants, il a été montré que les épidémies grippales touchent environ 40% d'entre eux aux Etats-Unis et environ 90 millions dans le monde (Coates et al., 2015). Parmi eux, 20 millions développent des infections des voies respiratoires inférieures et un million présentent un pronostic vital engagé (Nair et al., 2011). Cette susceptibilité accrue à l'infection est liée à l'immaturité du système immunitaire (Prendergast et al., 2012). De plus, chez les nourrissons de moins de 6 mois, les sécrétions produites par les cellules épithéliales pulmonaires en réponse à l'infection peuvent obstruer les voies respiratoires et entraîner une détresse respiratoire. Ces observations ont également été faites dans un modèle murin, puisque les souris juvéniles présentent une mortalité accrue et une augmentation des lésions pulmonaires au cours de l'infection grippale, par rapport à des souris adultes (Sun et al., 2011).

Le surpoids est aussi un facteur important de susceptibilité accrue à l'infection grippale. On estime que les personnes ayant un indice de masse corporelle supérieure à 40, considéré comme de l'obésité morbide, présente plus de risques de développer des complications au cours de la grippe (Honce and Schultz-Cherry, 2019). Ce phénomène a également été décrit chez la souris soumise à un régime riche en graisse ou dans un modèle de souris génétiquement obèses. Ces deux modèles entraînent une augmentation (i) de la mortalité, (ii) des dommages pulmonaires et (iii) de la réponse inflammatoire comparé à des souris minces (Karlsson et al., 2010; Milner and Beck, 2012; Milner et al., 2015). En plus d'être plus susceptibles aux complications lors de l'infection grippale, les personnes en surpoids présentent la particularité d'avoir une durée d'excrétion du virus plus longue. En effet, les personnes obèses sécrètes du virus pendant 5.23 jours après infection contre 3.68 jours pour une personne non obèse, soit 40% de plus (Maier et al., 2018).

Les personnes atteintes de maladies chroniques que ce soit au niveau du poumon (BPCO, asthme, etc...) ou au sein d'autres organes (diabète, désordres métabolique, anémie, troubles du foie ou de la rate etc...) ainsi que les personnes immunodéprimées (SIDA) présentent également un risque plus élevé de développer des complications post-grippales (Keilman, 2019). En lien avec les modifications du système immunitaire pendant la grossesse, les femmes enceintes risquent davantage de développer des complications grippales graves. Le risque persiste jusqu'à 2 semaines après l'accouchement (Carlson et al., 2009).

3 - Epidémiologie

a – Epidémies grippales

On estime que chaque année, les épidémies de grippe entraînent entre 3 et 5 millions de cas graves et entre 290 000 et 650 000 décès (Coates et al., 2015). Ces épidémies ont une forte incidence chez les populations à risque citées précédemment. L'évolution rapide du virus grâce à la dérive antigénique lui permet de pouvoir contourner la réponse anticorps préexistante. Ceci, combiné à la haute transmissibilité du virus, conduit à une importante morbidité et mortalité. Ces épidémies se déroulent au cours de périodes prévisibles et sont dues en partie à la chute des températures (Deyle et al., 2016; Lowen et al., 2007). Les épidémies de grippe saisonnière touchent l'hémisphère nord entre octobre et avril et l'hémisphère sud entre avril et octobre.

En plus d'être un problème de santé public majeur, les épidémies de grippe ont un impact économique très important. Rien qu'aux Etats-Unis, 90 milliards de dollars sont dépensés chaque année pour faire face à ces épidémies (Molinari et al., 2007). De plus, entraînant un arrêt de travail (souvent > 7 jours), l'épidémie saisonnière peut désorganiser la vie économique et sociale.

b – Pandémies grippales

L'émergence de nouveaux sous-types de virus, due au mécanisme de cassure antigénique, est responsable des pandémies grippales. En l'absence de toute immunité face à ce nouveau virus, la pandémie a une vitesse de propagation plus importante qu'une épidémie saisonnière classique (Potter and Jennings, 2011). Elles se produisent à des intervalles imprévisibles et peuvent toucher d'autres sous-groupes de la population, tels que les jeunes adultes en bonne santé (Byrd-Leotis et al., 2017).

Au cours des 100 dernières années, quatre pandémies de grippe ont vu le jour. La grippe espagnole H1N1 de 1918 (Mills et al., 2004), la grippe asiatique H2N2 de 1957, la grippe H3N2 de Hong Kong de 1968 et la Grippe porcine H1N1 de 2009 (Shao et al., 2017). Parmi elles, la grippe espagnole a été la plus meurtrière. On estime qu'un tiers de la population mondiale a été touché et que 30 à 50 millions de personnes sont décédées entre 1918 et 1919 (Biggerstaff et al., 2014; Taubenberger and Morens, 2006). Ces pandémies sont associées à une morbidité et une mortalité particulièrement élevées, possiblement dues à une atteinte des voies respiratoires inférieures et à l'augmentation de la susceptibilité aux infections bactériennes secondaires (Morens et al., 2008).

4 - Vaccination et traitements

L'un des meilleurs moyens de protection contre l'infection par le virus de la grippe est la vaccination. Cette dernière peut s'effectuer dès l'âge de 6 mois et est recommandée aux personnes classées à risque par l'OMS (Keilman, 2019). Le vaccin doit être renouvelé chaque année afin de faire face aux modifications génétiques constantes des virus grippaux, expliquant pourquoi la formule vaccinale change d'une année sur l'autre. Cette dernière est élaborée avec les souches qui ont circulé majoritairement durant l'hiver précédent et qui sont les plus susceptibles d'être présentes lors de l'hiver suivant (Das et al., 2010).

L'hygiène est un facteur important influençant la transmission du virus. Comme expliqué précédemment, les sécrétions respiratoires sont à l'origine de la transmission et des mesures d'hygiène simples peuvent prévenir le risque de contamination, comme par exemple : se couvrir la bouche ou le nez à chaque toux ou éternuement, se moucher dans des mouchoirs en papier à usage unique ou se laver les mains régulièrement.

Des traitements curatifs peuvent être utilisés pendant l'infection grippale. Les patients guérissant le plus souvent de manière spontanée lors de la grippe, les traitements sont plus focalisés sur les conséquences des principaux symptômes. Par exemple, des médicaments contre la fièvre, les douleurs ou la toux et une hydratation correcte sont le plus souvent prescrits. Cependant, un traitement antiviral peut être prescrit en début d'infection afin de limiter la propagation du virus et diminuer la durée et l'intensité des symptômes. Il est principalement constitué d'inhibiteurs de la neuraminidase à savoir, l'oséltamivir (Kim et al., 1997) et la zanamivir (von Itzstein et al., 1993). Ces médicaments sont des inhibiteurs de la NA et permettent de limiter la libération de nouveau virions. Le traitement antiviral peut également cibler le canal ionique M2 via l'utilisation de l'amantadine et de la rimantadine,

empêchant la libération des vRNP restant alors accrochées à la protéine M1. Cependant, de nombreuses souches de l'IAV ont développé une résistance à l'amantadine et/ou à l'oséltamivir, soulignant la nécessité de développer de nouveaux médicaments antiviraux et expliquant pourquoi la recherche dans ce domaine est très active (Moscona, 2005).

III/ La réponse immunitaire contre le virus de la grippe

L'infection par le virus de la grippe touche dans un premier temps les cellules épithéliales pulmonaires. Le virus déclenche rapidement, suite à l'activation de récepteurs, une réponse immunitaire réquisitionnant plusieurs types de cellules immunitaires (Damjanovic et al., 2012). Cette réponse immunitaire innée, à caractère inflammatoire, permet d'induire une réponse antivirale afin de (i) limiter la pathogenèse virale, (ii) développer la réponse immunitaire adaptative pour faciliter la clairance virale et (iii) d'induire la réparation des voies respiratoires endommagées. Cependant, contrairement aux infections saisonnières où la réponse inflammatoire est minimale et contribue à l'élimination du virus, elle peut être délétère lors d'infections par des virus plus pathogènes puisqu'elle entraîne une réponse hyper inflammatoire, pouvant contribuer à des taux de mortalité élevés (Kobasa et al., 2007; Short et al., 2014).

1 - Reconnaissance du virus de l'influenza par le système immunitaire

La réponse immunitaire contre le virus de la grippe commence par la reconnaissance du virus par le système immunitaire. Des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs - pathogen-associated molecular patterns) sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs - pattern recognition receptor) afin d'initier la réponse immunitaire innée. La stimulation des PRRs par les PAMPs est à l'origine d'une cascade d'activation moléculaire conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, à l'expression de molécules de co-stimulation et à la maturation de certaines cellules immunitaires. L'IAV est reconnu par plusieurs classes de PRRs : les Toll-like Receptors (TLR), les Nucleotide Oligomerization Domain (NOD)-like receptor (NLR), les Retinoic acid-Inducible Gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs) et le complexe cGAS/STING (Cyclic GMP-AMP synthase / stimulator of interferon genes). Ces quatre types de récepteurs coopèrent pour une reconnaissance précoce du virus et déclenchent la réponse immunitaire innée (Thomas et al., 2009).

a – Reconnaissance par les Toll-Like Receptors

Les TLR peuvent détecter l'agent pathogène aussi bien au niveau de la membrane cellulaire, via les TLR1, 2, 4, 5 et 6 qui reconnaissent les PAMPs dérivés de bactéries, de champignons et de protozoaires, qu'à l'intérieur des endosomes ou lysosomes via les TLR3, 7, 8 et 9 qui reconnaissent préférentiellement les acides nucléiques dérivés de divers virus (Kawai and Akira, 2010). Trois TLR sont impliqués dans la reconnaissance de l'ARN au cours de l'infection par l'IAV. Le TLR3 reconnaît l'ARN double brin (ARNdb) (Guillot et al., 2005) et les TLR7 et TLR8 reconnaissent l'ARN simple brin (ARNsb ou ARNv) (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). Contrairement à l'homme, le TLR8 murin n'est pas capable de reconnaître aussi bien l'ARNsb que l'ARNdb expliquant ainsi le peu d'information sur son rôle dans la reconnaissance du virus (Alexopoulou et al., 2012) (Figure 3).

a/1 - TLR3 (iwasaki et pillai 2014)

Le TLR3 est présent dans de nombreux types cellulaires comme les cellules épithéliales pulmonaires (Guillot et al., 2005; Le Goffic et al., 2007), les macrophages alvéolaires (AM) ou encore les cellules dendritiques (DC) conventionnelles (cDC) (Edwards et al., 2003). Le TLR3 reconnaît l'ARNdb au niveau de l'endosome (Alexopoulou et al., 2012). Le virus de la grippe n'est pas capable de générer un ARNdb dû notamment à l'effet de l'hélicase cellulaire UAP56 (Wisskirchen et al., 2011). La formation de cet ARNdb se fait donc au sein des cellules en voie de mort et qui sont phagocytées (Schulz et al., 2005). L'activation du TLR3 induit au niveau des cellules épithéliales pulmonaires une production de cytokines pro-inflammatoires et des interférons (IFN) de type I, via la voie nuclear factor- κ B (NF- κ B), et des IFN de type III, via la voie IFN-regulatory factor (IRF) 3 (Le Goffic et al., 2007).

L'activation massive de ce TLR peut entraîner une forte pathologie lors d'infection par des IAV hautement pathogènes (Guillot et al., 2005; Le Goffic et al., 2007). En effet, il a été montré que des souris déficientes pour le TLR3 survivent plus longtemps que les souris conventionnelles après une infection mortelle par le virus de la grippe, malgré des charges virales plus élevées dans les poumons (Le Goffic et al., 2007). De façon contrastée, l'absence du TLR3 entraîne une diminution de l'expression des chimiokines dans les poumons et réduit l'infiltration des leucocytes et des lymphocytes T CD8⁺ (Heer et al., 2007). Ce récepteur est donc indispensable pour la génération de l'immunité antivirale.

a/2 - TLR7 (iwasaki et pillai 2014)

Le TLR7 est exprimé par les DC au niveau de l'endosome où il reconnaît l'ARNsb (Lund et al., 2004). Le TLR7 est un récepteur de l'immunité innée primordial pour déclencher la réponse inflammatoire cytokinique. Cette dernière se fait grâce au recrutement de la molécule adaptatrice MyD88 qui induit l'activation des facteurs de transcription NF- κ B (Kondo et al., 2012) et IRF7, responsables respectivement de la stimulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des IFN de type I (Alexopoulou et al., 2012). L'utilisation de souris transgéniques MyD88 $-/-$ a permis de mettre en évidence le rôle de l'activation du TLR7 lors d'une infection virale. En effet, ces souris sont plus susceptibles à l'infection par l'IAV par rapport à des souris «sauvages» exprimant le TLR7 (Seo et al., 2010). De plus, certaines études ont montré un rôle primordial du TLR7 dans la mise en place de la réponse anticorps lors d'infections avec des doses sublétales du virus de la grippe (Heer et al., 2007; Jeisy-Scott et al., 2012).

En résumé, ces TLR jouent des rôles distincts lors de l'infection par le virus de la grippe. Le TLR3 reconnaît les cellules infectées et induit une réponse antivirale efficace. Par ailleurs, il induit un effet néfaste en participant au recrutement de cellules inflammatoires à l'origine des lésions pulmonaires. Le TLR7 favorise la réponse IFN pour bloquer la réplication virale et favoriser la réponse anticorps.

b – Reconnaissance par les Retinoic acid Induced Gene-1

RIG-1 est un récepteur essentiel pour la détection virale puisqu'il permet de détecter la présence d'ARNsb mais également d'ARNsb contenant le 5'-triphosphate produit au cours de la réplication virale (Loo et al., 2008; Pichlmair et al., 2006). RIG-1 est présent au sein des cellules épithéliales, des macrophages alvéolaires et des cDC. La reconnaissance de l'ARN viral par RIG-1 permet à ce dernier de recruter la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS) (Jiang et al., 2011). La signalisation MAVS aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires et à la production d'IFN type I (Kato et al., 2005) (Figure 3).

c – Reconnaissance par les Nod-Like Receptors

NLRP3 forme, avec l'adaptateur ASC et la caspase 1, l'inflammasome permettant, lorsque celui-ci est activé, le clivage et la sécrétion de pro-IL-1 β et de pro-IL-18 en IL-1 β et IL-18. Ce récepteur est exprimé dans de nombreux types cellulaires comme les DC, macrophages, neutrophiles, monocytes et les cellules épithéliales pulmonaires (Guarda et al.,

2011). Deux signaux sont nécessaires pour induire le clivage de ces deux cytokines. Le premier provient de la reconnaissance des PAMPs par les TLRs ou les RLRs comme décrit ci-dessus. L'activation de ces récepteurs entraîne la production de NLRP3, mais également de pro-IL-1 β et de pro-IL-18 (Martinon et al., 2009). Le deuxième signal provient, le plus souvent, des dommages que subit la cellule hôte entraînant la formation de l'inflammasome et le clivage de la pro-caspase 1 permettant ainsi son activation. Ce deuxième signal peut également être induit par des stimuli viraux comme par exemple le flux de proton induit par le canal ionique M2 du virus (Ichinohe et al., 2010). Les produits de l'inflammasome NLRP3, IL-1 β et IL-18, activent les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, et contribuent au développement des réponses T auxiliaires (T helper) de type 1 et 17 (Th1 et Th17) (Chung et al., 2009; Dinarello, 2009) (Figure 3).

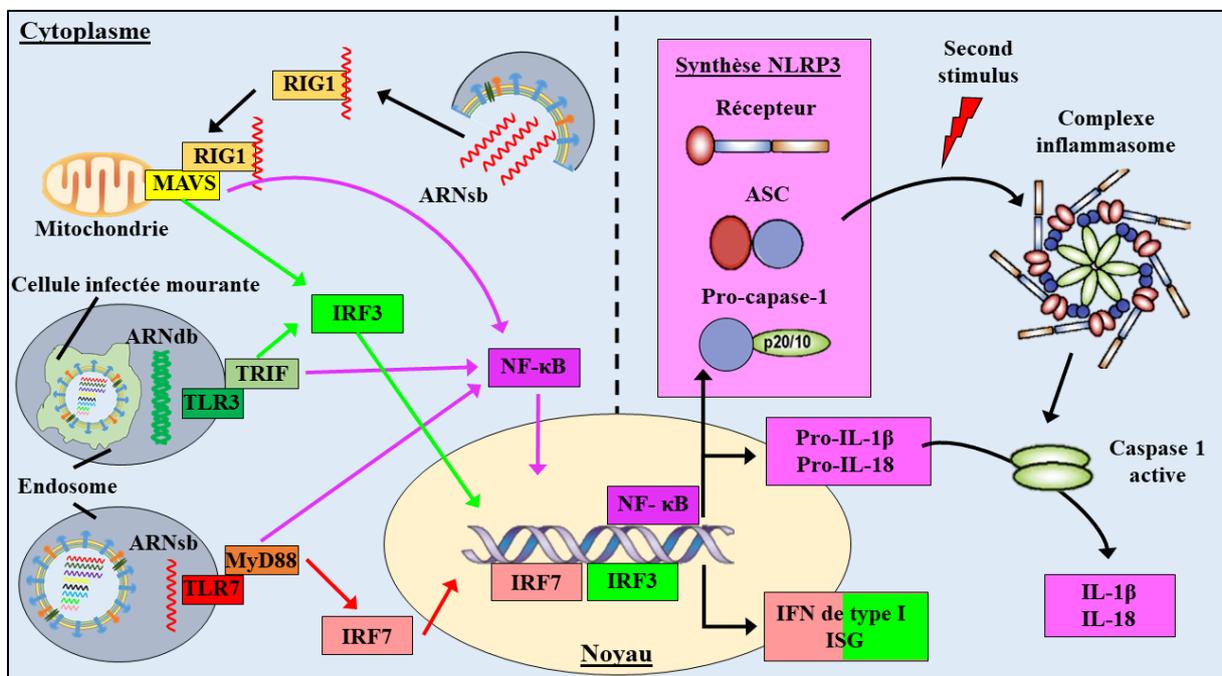


Figure 3 – Reconnaissance de l'IAV par le système immunitaire. Les récepteurs TLR3, TLR7 et RIG1 vont reconnaître l'ARNsb (TLR7 et RIG1) et l'ARNdb (TLR3) afin d'induire l'activation de plusieurs voies de signalisation (IRF3, IRF7 et NF- κ B) permettant la synthèse d'IFN de type I et d'ISG. La voie NF- κ B permet la synthèse de pro-IL- β et pro-IL-18 ainsi que la synthèse des différents composants de NLRP3. Suite à un second stimulus, NLRP3 va former l'inflammasome afin d'activer la caspase 1. Cette dernière permet la libération d'IL-1 β et d'IL-18 actifs. (Figure inspirée de (Iwasaki and Pillai, 2014; Sarvestani and McAuley, 2017))

Plusieurs études se sont intéressées au rôle clé de NLRP3 et plus globalement de l'inflammasome lors de l'infection virale. Il a notamment été montré que NLRP3 est essentiel dans le recrutement des leucocytes dans les poumons suite à l'infection grippale (Thomas et al., 2009). De plus, des souris déficientes pour NLRP3, la caspase-1 ou pour le récepteur de l'IL-1 β , présentent une nécrose pulmonaire accrue et une diminution des fonctions

respiratoires entraînant une mortalité accrue par rapport aux souris contrôles (Thomas et al., 2009).

d – Le complexe cGAS/STING

cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) s'active en présence d'ADN cytosolique double brin d'origine virale ou microbienne (Sun et al., 2013). L'interaction entre ces deux composants entraîne la production de cGAMP (cyclic GMP-AMP) par le cGAS à partir d'ATP et de GTP. cGAMP se fixe sur le récepteur STING (stimulator of interferon genes) présent sur la membrane du réticulum endoplasmique. Celle-ci induit un changement de conformation de STING permettant le recrutement et l'activation des kinases TBK1 (TANK-binding kinase 1) et IKK (inhibitor of nuclear factor κ kinase). Celles-ci phosphorylent respectivement le facteur de transcription IRF3 (interferon regulatory factor 3) et I κ B, le répresseur de NF- κ B. La phosphorylation d'IRF3 et la libération de NF- κ B permet leur translocation dans le noyau et l'induction de gènes codant les IFN de type I et des cytokines inflammatoires. Ce complexe cGAS/STING joue un rôle dans l'établissement d'une réponse immunitaire contre les pathogènes (Chen et al., 2016; Sun et al., 2013).

Concernant les virus à ARN, et plus particulièrement le virus de la grippe, une étude récente menée par Holm et son équipe montre que STING joue un rôle majeur dans la production d'IFN de type I (Holm et al., 2016). La mise en place de cette réponse se fait suite à la fusion membranaire du virus de la grippe. La délétion de STING entraîne une réduction de la production d'interféron et une altération du contrôle du virus de la grippe (Franz et al., 2018; Holm et al., 2016).

2 - Réponse des IFN-stimulated genes lors de l'infection virale

La reconnaissance du virus grippal par les PRRs induit l'activation et la translocation au niveau du noyau de plusieurs facteurs de transcription (NF- κ B, IRF3, et IRF7). Ces derniers permettent d'initier la transcription de gènes codant pour les IFN et les cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6, IL-1 β , etc.). La production d'IFN permet d'induire la transcription de centaines de gènes stimulés par l'interféron (ISG). Les ISG exercent de nombreuses fonctions effectrices antivirales, dont beaucoup ne sont pas encore complètement décrites. De manière générale, les ISGs ciblent différentes étapes dans le cycle de réplication du virus afin de réduire à terme la charge virale.

Le premier ISG à avoir été identifié dans la lutte contre l'IAV est le gène de résistance au myxovirus1 (MX1 chez la souris, et MXB chez l'homme) (Staheli et al., 1986). Les protéines MX interagissent avec la NP virale bloquant ainsi la transcription et la réplication virales (von der Malsburg et al., 2011).

Les IFN-inducible transmembrane protein (IFITM) sont des ISG limitant la réplication d'un très grand nombre de virus, comme celui de la grippe (Brass et al., 2009). L'IFITM3 bloque l'entrée du virus dans la cellule en affectant la fusion de l'enveloppe virale avec l'endosome (Feeley et al., 2011). IFITM3 est exprimé par les cellules épithéliales respiratoires, les macrophages et les cellules endothéliales. Les souris déficientes en IFITM3 sont plus susceptibles à l'infection par le virus de la grippe (Bailey et al., 2012; Everitt et al., 2012). De plus, ces souris développent un œdème grave et un épanchement pleural hémorragique (Everitt et al., 2012), suggérant que l'IFITM3 pourrait jouer un rôle dans la limitation des dommages causés à l'hôte, en plus de la diminution de la charge virale.

L'oligoadenylate synthetase (OAS) est un ISG permettant, avec l'aide d'une ribonucléase (RNase L), de dégrader l'ARN viral afin de stopper la réplication. OAS au sein du cytoplasme interagit avec l'ARNdb entraînant un changement de conformation de l'ISG afin d'activer la RNase L et ainsi induire la dégradation du matériel génétique viral. Il a été montré que des souris déficientes en RNase L souffrent d'une sensibilité accrue à l'infection par le virus de la grippe (Silverman, 2007).

3 - La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense contre l'infection virale. Elle présente l'avantage d'être rapide mais est aspécifique. Au cours de l'infection grippale, les cellules épithéliales des voies respiratoires sont les premières à déclencher la réponse immune innée via une cascade faisant intervenir différents partenaires de l'immunité (Damjanovic et al., 2012). Plusieurs cellules du système immunitaire innée (cellules épithéliales, macrophages alvéolaires, DC) rentrent ensuite en jeu et participent à la mise en place de l'inflammation pulmonaire aiguë. Celle-ci est caractérisée par la production de cytokines et d'interférons et le recrutement de neutrophiles, de cellules Natural Killer (NK) et de cellules T natural killer invariants (iNKT). L'induction d'une réponse antivirale et pro-inflammatoire équilibrée est cruciale pour contrôler la réplication virale et activer la réponse immunitaire optimale face au virus de la grippe.

a – Les cellules épithéliales respiratoires

Les cellules épithéliales pulmonaires sont les premières cellules infectées par le virus de la grippe. La stimulation des différents PAMPs au sein de ces cellules induit l'expression de nombreuses cytokines et chimiokines inflammatoires, telles que IL-1 β , IL-6, Tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-8, les IFN de type I et III, CCL2 (Chemokine Ligand), CCL3 et CXCL10 (Perrone et al., 2008). Au cours du stade précoce de l'infection par l'IAV, CCL2 attire les macrophages via le récepteur CCR2 et les active (Dawson et al., 2000; Loo et al., 2008). De plus le TNF- α et l'IL-1 β permettent la migration de cellules immunitaires innées, telles que les macrophages, les DC et les NK vers le site de l'infection (Julkunen et al., 2001). Ces cellules produisent des molécules antivirales et chimiotactiques qui initient la réponse immunitaire par le recrutement rapide de cellules effectrices innées.

En plus d'être à l'origine de la réponse innée, les cellules épithéliales respiratoires expriment de manière constitutive des mucines à leur surface, notamment MUC5AC, MUC5B et MUC1, qui jouent un rôle important dans la limitation de l'infection par le virus de la grippe (Ehre et al., 2012; McAuley et al., 2017; Roy et al., 2014). Ces glycoprotéines riches en acide sialique interagissent avec les récepteurs viraux et empêchent la liaison du virus aux cellules cibles (McAuley et al., 2017).

La réplication virale au sein des cellules épithéliales pulmonaires entraîne la mort de ces dernières par apoptose (Mori et al., 1995) ; ceci pouvant avoir comme conséquence la formation d'œdèmes alvéolaires et l'induction d'une insuffisance respiratoire (Sanders et al., 2011).

b – Les macrophages alvéolaires

Les AM constituent la première ligne de défense au sein du poumon. Leur mission est double au cours de l'infection grippale puisqu'ils (i) produisent des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α et l'IL-6, nécessaires au déclenchement des réponses cellulaires et humorales anti-IAV (Becker et al., 1991; van Riel et al., 2011), et (ii) phagocytent les cellules infectées limitant ainsi la propagation virale (Hashimoto et al., 2007; Kim et al., 2008). L'infection grippale s'accompagne d'une chute du nombre d'AM chez la souris (Ghoneim et al., 2013), ceci favorise la propagation du virus mais également l'augmentation de la susceptibilité aux surinfections bactériennes.

L'utilisation de liposome contenant du clodronate visant à dépléter les AM durant l'infection grippale entraîne une augmentation des titres viraux et de la mortalité chez la souris (Tate et al., 2010). Des résultats similaires ont été décrits chez des souris CD169-DTR (déplétion des AM via l'utilisation de toxine diphtérique) infectées par une dose sub létale d'IAV (Purnama et al., 2014).

Les AM n'échappent pas à l'équilibre fragile que constitue la réponse immune dans un contexte d'infection grippale. Il a été montré qu'une infection par une souche pandémique provoque la libération importante de TNF- α par les AM, ceci ayant un effet délétère sur le tissu pulmonaire (Belisle et al., 2010).

c – Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont spécialisées dans la présentation des antigènes (CPAg) aux lymphocytes, permettant de relier les réponses immunitaires innées et adaptatives. En condition non infectieuse, ces cellules sont situées entre l'épithélium respiratoire et la membrane basale (Holt et al., 2008). Leurs dendrites se situant le plus souvent au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales pulmonaires permettent la reconnaissance des agents pathogènes. Les DC sont composées de plusieurs populations au niveau du poumon. Les DC conventionnelles (cDC) après avoir acquis les Ag viraux par phagocytose des cellules épithéliales (Albert et al., 1998), migrent du poumon vers les ganglions lymphatiques périphériques afin de présenter les Ag dérivés de l'IAV aux lymphocytes T (LT) (GeurtsvanKessel et al., 2008). Ces cellules sont cruciales dans l'induction de la réponse immunitaire adaptative protectrice (voir partie réponse immunitaire spécifique). Les DC plasmacytoïdes (pDC) mobilisées sur le site au cours de l'infection, produisent fortement l'IFN- α après activation du TLR7 (Diebold et al., 2004). Des études ont montré que les DC jouent un rôle important au cours de la grippe puisque leur déplétion induit une augmentation de la charge virale pulmonaire et participe à la mortalité (McGill et al., 2009).

d – Les neutrophiles

En tant que cellules phagocytaires, les neutrophiles peuvent absorber les cellules apoptotiques infectées par le virus de la grippe. Lors de l'infection grippale, les neutrophiles sont rapidement recrutés sur le site de l'infection en réponse aux différents stimuli inflammatoires. Ils jouent un rôle important dans le contrôle de la réplication et de la propagation du virus (Fujisawa, 2001).

Bien qu'un appauvrissement des neutrophiles puisse conduire à une inflammation pulmonaire exacerbée et à une perte de la fonction respiratoire, due à un retard dans la clairance virale (Tate et al., 2008), le recrutement excessif de neutrophiles peut entraîner des effets délétères dans le poumon. Dans ce processus la libération massive de *neutrophil extracellular traps* (NET) conduit à la mort des cellules épithéliales pulmonaires, aggravant ainsi les lésions pulmonaires (Narasaraju et al., 2011).

e - Les cellules Natural Killer (NK)

Les NK sont des cellules cytotoxiques et effectrices de l'immunité innée qui constituent un moyen de défense essentiel contre les cellules infectées par les virus et contre les cellules tumorales. Au sein du poumon, un grand nombre de cellules NK sont présentes en conditions non-infectieuses (Grégoire et al., 2007). On observe, durant les premiers jours de l'infection par le virus de la grippe, un recrutement des cellules NK au niveau du tissu pulmonaire (Stein-Streilein et al., 1983). Lors de l'infection, ces cellules sont activées et sécrètent de l'IFN- γ , des perforines et des granzymes. Ces effecteurs participent à l'élimination des cellules cibles et renforcent la réponse ultérieure des lymphocytes T CD8⁺ (Hwang et al., 2012).

La lyse cellulaire est médiée par l'interaction entre les récepteurs le récepteur NKp44 (NCR-1 chez la souris) et l'HA présente sur les cellules infectées (Mendelson et al., 2010). Il a été démontré que les souris dépourvues du récepteur NCR-1, présentent une morbidité et une mortalité accrues après infection grippale (Gazit et al., 2006). La déplétion des NK entraîne la même issue défavorable suggérant un rôle protecteur de ces cellules lors d'une infection grippale (Liu et al., 2004). Dans des conditions d'infection avec un virus hautement pathogène, les cellules NK participent à la pathogénèse. En effet, la déplétion de ces cellules dans ce modèle réduit la mortalité et la pathologie (Zhou et al., 2013).

f - Les cellules T Natural Killer invariantes

Les NKT sont des lymphocytes T innés qui expriment certains récepteurs des cellules NK et des lymphocytes T conventionnels. Ces cellules reconnaissent des antigènes lipidiques présentés par la molécule CD1d. Suite à cette reconnaissance, les cellules NKT expriment de façon massive une kyrielle de cytokines immuno-activatrices ou immuno-modulatrices. La majorité des cellules NKT, les cellules NKT de type I ou invariantes (iNKT), expriment une chaîne invariante de TCR α . En tant que cellules immunitaires innées, les cellules NKT peuvent être activées pendant l'inflammation et l'infection virale. Chez la souris, notre

laboratoire a montré que les iNKT jouent un rôle important au cours de la grippe. En effet, ces cellules réduisent la charge virale et la pathologie au cours de l'infection (Paget et al., 2011). En produisant l'IL-22 au cours des phases précoces de l'infection, les cellules iNKT semblent jouer un rôle protecteur sur les épithéliums pulmonaires, limitant ainsi la pathologie (Ivanov et al., 2009, 2013). Les iNKT contribuent aussi au développement de la réponse adaptative. En effet, les souris déficientes en iNKT (*Ja18^{-/-}*) développent une réponse T CD8⁺ spécifique de l'IAV amoindrie (Paget et al., 2011). Dans ce processus, il est possible de les iNKT puissent contrôler la migration des cDC vers les ganglions.

4 - La réponse immunitaire adaptative spécifique

L'immunité adaptative est principalement induite par les DC. L'activation des lymphocytes T (T CD4⁺ et CD8⁺) empêche la dissémination du virus dans l'organisme en participant à la formation des anticorps spécifiques par les lymphocytes B (LB) (CD4⁺) et en tuant les cellules infectées (CD8⁺).

a – La réponse lymphocytes T spécifiques

Les cellules T CD8⁺ se différencient, suite à la stimulation par les DC, en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et ciblent les cellules infectées grâce à la production de granzymes et de perforines. Ces deux molécules permettent d'induire l'apoptose des cellules infectées. Les CTL produisent également plusieurs cytokines dont l'IFN- γ , TNF α et l'IL-10 (La Gruta et al., 2004; Sun et al., 2009). L'altération de la réponse T CD8⁺ chez la souris, entraîne une mortalité plus élevée et une perte du contrôle de la charge virale (Bender et al., 1992).

Les cellules T CD4⁺ constituent un autre type important de cellules immunitaires impliquées dans l'immunité adaptative contre l'infection par l'IAV. Suite à la stimulation par les DC, les cellules T CD4⁺ se différencient en cellules Th1 et expriment l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2 (Szabo et al., 2000). Leur rôle, en tant que cellules auxiliaires (helper) dans la formation des anticorps spécifiques est essentiel.

b – La réponse lymphocytes B spécifiques

Les lymphocytes B sont indispensables pour amorcer la défense contre l'infection grippale et joue un rôle prépondérant dans la réduction de la morbidité et de la mortalité au cours de l'infection grippale.

Les lymphocytes B participent à l'induction de la réponse immunitaire via la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) M (Baumgarth et al., 1999; Choi and Baumgarth, 2008). Ces IgM, générées dans la moelle osseuse et la rate par les cellules B-1, se lient à plusieurs souches de virus de la grippe (Baumgarth et al., 1999; Choi and Baumgarth, 2008; Choi et al., 2012) et réduisent la charge virale et le taux de mortalité suite à l'infection par le virus de la grippe (Nguyen et al., 2017). Ces IgM représentent un puissant activateur du complément (Shulman et al., 1987). Ils interagissent également avec leur récepteur, le Fc μ R, exprimé sur les DC, les macrophages et les cellules B (Sörman et al., 2014; Wang et al., 2016). La déplétion de Fc μ R à la surface des lymphocytes B induit une diminution de la production d'IgG spécifiques du virus de la grippe, réduisant la clairance du virus (Nguyen et al., 2017). En effet, les IgG sécrétées lors de l'infection bloque l'entrée du virus dans la cellule en bloquant l'interaction entre le virus et son récepteur (Seibert et al., 2013). La production précoce d'IgM en réponse à la grippe participe à la réponse anticorps spécifique et est un catalyseur potentiel pour amorcer l'immunité innée et adaptative.

Plusieurs études portant sur l'infection par le virus de la grippe chez la souris ont démontré une synergie entre les lymphocytes B avec les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ pour optimiser la protection contre le virus. Comme pour les lymphocytes T CD8 (Bender et al., 1992), la déplétion des lymphocytes B retarde la clairance du virus (Kopf et al., 2002). De plus, plusieurs études ont montré le rôle important des lymphocytes B dans les réponses des cellules T CD8⁺ et CD4⁺. En effet, l'absence de cellules T CD8⁺ et de cellules B ou de cellules T CD4⁺ et de cellules B (Mozdzanowska et al., 2000), induit une dissémination virale incontrôlée et une augmentation de la mortalité. Concernant les lymphocytes T CD4⁺, il a été montré que l'absence de cellules B chez les souris infectées par la grippe est associée à une réduction de la prolifération systémique des cellules T CD4⁺ et à une polarisation réduite des cellules Th1 dans les poumons, entraînant ainsi une diminution de la clairance virale (Kopf et al., 2002). Ceci s'explique par la capacité des cellules B à produire de nombreuses cytokines, comme l'IFN- γ , l'IL-6 et le TNF- α , toutes les trois capables de promouvoir la réponse Th1 par les lymphocytes T CD4⁺ (Barr et al., 2010).

Chapitre 2 : *Streptococcus pneumoniae*

I/ Généralité sur *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, également appelé pneumocoque, est une bactérie Gram positive à l'origine de pathologies mortelles. Cette bactérie encapsulée, pouvant survivre dans des conditions aérobies et anaérobies (Bridy-Pappas et al., 2005), présente 97 sérotypes différents (Geno et al., 2015) caractérisés par la structure de leur capsule polysaccharide (Henrichsen, 1995). *S. pneumoniae* colonise les voies respiratoires supérieures et provoque plusieurs pathologies comme des pneumonies, méningites, bactériémies, otites et sinusites. L'infection à pneumocoque est une cause majeure de mortalité infantile dans les pays en voie de développement. En effet, elle est responsable chaque année d'environ 25% des décès chez les enfants de moins de 5 ans et plus de 1,2 million de décès de nourrissons (Berkley et al., 2005; van der Poll and Opal, 2009). L'OMS met en alerte le fait qu'un enfant décède d'une pneumonie toutes les 20 secondes.

1 - Epidémiologie

S. pneumoniae se transmet par le contact avec une personne infectée à travers les gouttelettes d'aérosol contenant les bactéries (Steel et al., 2013). La bactérie colonise alors les voies respiratoires supérieures, en particulier le nasopharynx (Bogaert et al., 2004), et est capable de s'implanter de manière asymptomatique pendant plusieurs semaines jusqu'à plusieurs mois (Sleeman et al., 2006). La période de cette phase d'incubation asymptomatique, appelée aussi « portage », dépend du sérotype de la bactérie (Kadioglu et al., 2008). Ce phénomène est plus fréquent chez les enfants puisqu'on estime entre 20 et 50%, le nombre d'enfants infectés de manière asymptomatique par *S. pneumoniae*, contre 5 à 20% chez les adultes (Korona-Glowniak and Malm, 2012).

Si la bactérie n'est pas éliminée par le système immunitaire durant cette période d'incubation asymptomatique, elle migre vers les voies respiratoires inférieures où elle peut provoquer de graves pneumonies (van der Poll and Opal, 2009). Les personnes atteintes de pneumonie présentent généralement un rythme cardiaque élevé, un essoufflement, une toux fréquente et une forte fièvre (Wunderink and Waterer, 2014). L'infection peut alors se propager hors du système respiratoire afin d'atteindre d'autres tissus et induire des otites et méningites. Si l'infection bactérienne n'est pas contrôlée, celle-ci peut se retrouver dans le sang et induire une bactériémie; diminuant alors drastiquement les chances de survie. *S.*

pneumoniae a des taux d'incidence plus élevés chez les enfants de moins de deux ans, les personnes immunodéprimées et les personnes âgées (Brooks and Mias, 2018). Par ailleurs, une première infection par un virus, comme celui de la grippe ou encore le virus respiratoire syncytial (RSV), augmente la susceptibilité aux infections par *S. pneumoniae*. Cet effet de co-infection lors d'une primo-infection grippale augmente alors les taux de morbidité et de mortalité (Davis et al., 2012; Klein et al., 2016). L'exemple le plus parlant est celui de la pandémie grippale de 1918 où il a été montré que la majorité des décès étaient dues à des surinfections bactériennes et non à la seule infection par le virus de la grippe (Brundage and Shanks, 2008; Chien et al., 2009; Klein et al., 2016).

2 - Les traitements

La vaccination et l'utilisation d'antibiotiques sont les deux principaux moyens de prévention des infections à pneumocoque. Il existe à l'heure actuelle deux vaccins inactivés protégeant contre *S. pneumoniae* (Butler, 1993). Le vaccin polysaccharidique PneumovaxC23 (PPSV23) est un vaccin polyvalent puisqu'il contient les polysaccharides de 23 sérotypes de *S. pneumoniae* (Butler, 1993). Il est systématiquement administré aux personnes âgées (> 65 ans) bien que son efficacité soit comprise entre 50 et 70% (Bonten et al., 2015; Moberley et al., 2013). Due à la faible efficacité et immunogénicité du PPSV23 chez les nourrissons et les jeunes enfants (van den Biggelaar et al., 2011; Bonten et al., 2015), un vaccin conjugué contre le pneumocoque (PCV13), ou Prevenar®13, a été mis au point. Ce dernier entraîne la protection contre 13 sérotypes de *S. pneumoniae* (van den Biggelaar et al., 2011).

Plusieurs antibiotiques sont utilisés dans la lutte contre les infections par *S. pneumoniae*. Cependant, leur utilisation massive a entraîné l'apparition de résistance (Kim et al., 2016; Tan and Tatsumura, 2015). Les souches de pneumocoques résistantes à la pénicilline ont été répertoriées pour la première fois dans les années 1970 (van der Poll and Opal, 2009). Actuellement, les souches résistantes à la pénicilline se sont répandues dans le monde entier, le pneumocoque étant également résistant à d'autres types d'antibiotiques dont l'érythromycine, la tétracycline et le chloramphénicol (Kim et al., 2016).

II/ Structure et facteurs de virulence du pneumocoque

S. pneumoniae possède une multitude de facteurs de virulence jouant des rôles clés dans la pathogénicité (Jedrzejewski, 2001) (Figure 4). Ces derniers permettent par exemple de favoriser l'adhérence aux cellules hôtes et l'invasion des cellules épithéliales, mais également de contrer la réponse du système immunitaire (Kadioglu et al., 2008). L'analyse des facteurs

de virulence est un élément vital puisqu'il permet de comprendre la différence de pathogénicité entre deux sérotypes et d'identifier les points d'intervention possibles pour le traitement ou la vaccination.

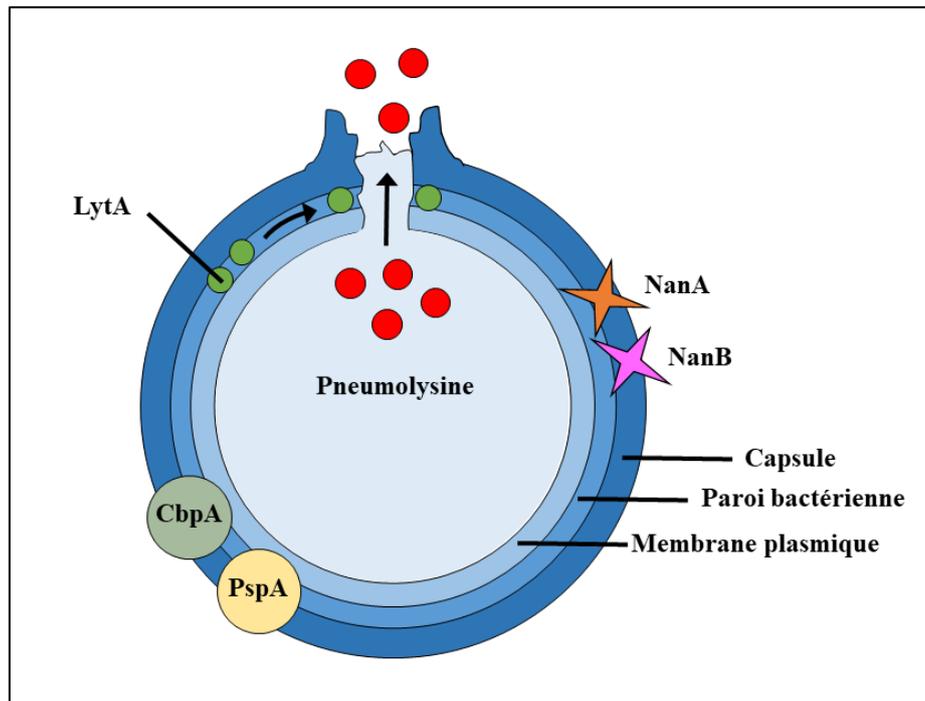


Figure 4 : Facteurs de virulence exprimés par *Streptococcus pneumoniae*. (Figure inspirée de (Kadioglu et al., 2008))

1 - La capsule polysaccharidique

La capsule polysaccharidique, élément de la structure le plus externe de la bactérie, est à la base de la classification des différents sérotypes de *S. pneumoniae*. À l'exception du sérotype 3, la capsule est fixée de manière covalente à la surface externe du peptidoglycane de la paroi cellulaire (Sørensen et al., 1990). C'est un facteur de virulence clé, puisqu'elle (i) inhibe la phagocytose par les cellules immunitaires innées, (ii) empêche la reconnaissance de la bactérie par les récepteurs de l'hôte et les facteurs du complément et (iii) inhibe également l'action des neutrophiles (Abeyta et al., 2003; Hyams et al., 2010; Rabes et al., 2016; Wartha et al., 2007). De plus, la capsule polysaccharidique (iv) empêche l'élimination mécanique par le mucus (Nelson et al., 2007), (v) peut limiter l'autolyse et également (vi) réduire l'exposition aux antibiotiques (van der Poll and Opal, 2009).

2- La paroi bactérienne

S. pneumoniae, comme toutes les bactéries Gram +, possède une paroi cellulaire épaisse jouant un rôle clé dans la pathogénicité de l'infection bactérienne. Elle est composée

de trois structures associées : le peptidoglycane, l'acide teichoïque et l'acide lipoteichoïque. Les acides teichoïques sont liés de manière covalente au peptidoglycane, tandis que les acides lipoteichoïques sont liés de manière non covalente à la membrane cytoplasmique avec un ancrage lipidique.

Ces trois structures sont des PAMPS pouvant provoquer une réponse inflammatoire chez l'hôte. En effet, l'injection *in vivo* du peptidoglycane et d'acide teichoïque induit une inflammation et l'apparition de nombreux symptômes de pneumonie, d'otite moyenne et de méningite (Tomasz and Saukkonen, 1989). Ces composés sont reconnus par le TLR2 ; récepteur présent à la surface des cellules épithéliales, endothéliales, des monocytes et des macrophages (Weber et al., 2003). L'activation du TLR2 entraîne la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α (Spellerberg et al., 1996). De plus, les composés de la paroi bactérienne peuvent interagir avec la voie du complément, conduisant également à la mise en place d'une réponse inflammatoire (Ren et al., 2004).

3 - Les protéines bactériennes

S. pneumoniae possède une grande variété de protéines exposées à sa surface (Bergmann, 2006). Ces dernières jouent un rôle clé dans la pathogénicité expliquant ainsi l'attention qui leur est prêtée dans la recherche d'antigène pour de futurs vaccins. Ces protéines permettent à la bactérie d'échapper au système immunitaire, d'entraîner une réponse inflammatoire ou de faciliter l'adhésion et la colonisation au début de l'infection.

a - La pneumolysine

La pneumolysine, est le facteur de virulence le plus étudié chez *S. pneumoniae*. Cette protéine de 53 kDa présente dans le cytoplasme des bactéries Gram + (Hirst et al., 2004; Keller et al., 2016) est libérée suite à l'autolyse de la bactérie (Berry et al., 1989a). Elle induit la lyse des cellules de l'hôte via la formation de pores au niveau de la membrane cellulaire (Hirst et al., 2004). Des expériences *in vivo* avec des souches bactériennes déficientes en pneumolysine ont montré une réduction de la virulence de la bactérie se traduisant par une réduction des dommages au niveau de la membrane pulmonaire et une réduction de l'inflammation (Berry et al., 1989b; Canvin et al., 1995).

En plus de provoquer la lyse cellulaire, la pneumolysine joue un rôle dans la formation de biofilms (Shak et al., 2013) et peut interférer avec le système immunitaire de l'hôte (Hotomi et al., 2016; Keller et al., 2016). En effet, elle induit une réponse pro-inflammatoire

et la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROS) et d'autres médiateurs (Marriott et al., 2008). Ces effets sont potentiellement médiés par la capacité de la pneumolysine à interagir avec le TLR4. Des souris déficientes pour ce récepteur sont plus facilement colonisées par *S. pneumoniae* (Malley et al., 2003).

b - La protéine de surface PspA

La protéine de surface du pneumocoque A (PspA) est caractérisée par sa capacité à bloquer la liaison de la bactérie au complément (Tu et al., 1999). En effet, elle interférerait avec la déposition du C3b, un facteur du complément qui s'associe aux antigènes bactériens, à la surface cellulaire du pneumocoque et inhibe ainsi l'opsonisation médiée par le complément (Tu et al., 1999).

De plus, PspA peut se lier à la lactoferrine (Hammerschmidt et al., 1999). Cette glycoprotéine séquestre le fer et bloque l'activité des enzymes bactériennes dépendantes de cet élément. La liaison de PspA à la lactoferrine protège la bactérie de son activité bactéricide (Hammerschmidt et al., 1999; Shaper et al., 2004). Les bactéries dépourvues de PspA ou traitées avec un anticorps anti-PspA sont plus sensibles à l'activité bactéricide de la lactoferrine (Shaper et al., 2004).

En plus de cette capacité à contourner les mécanismes de défense, PspA est nécessaire à l'adhésion aux cellules épithéliales lors de l'infection. En effet, les mutations de PspA entraînent une diminution de l'adhésion aux cellules, une virulence réduite et une sensibilité accrue au stress oxydatif (Ogunniyi et al., 2000).

c - L'adhésine CbpA ou PspC

La protéine de surface du pneumocoque C (PspC), ou Choline-binding protein A (CbpA), est une protéine présentant une homologie de séquence très importante avec PspA, lui donnant des fonctions similaires comme l'inhibition de la voie du complément (Rosenow et al., 1997). PspC n'est cependant pas capable de se lier à la lactoferrine (Hakansson et al., 2001). Cette protéine facilite la colonisation de *S. pneumoniae* dans le nasopharynx, puisque la déplétion de PspC entraîne une réduction de la colonisation des cellules épithéliales (Rosenow et al., 1997). En effet, PspC joue le rôle d'adhésine en interagissant directement avec le récepteur polymérique d'immunoglobuline qui transporte les IgA sécrétoires (Hammerschmidt et al., 1999).

d - Les neuraminidases

S. pneumoniae possède un point commun avec le virus de la grippe, celui d'avoir une neuraminidase capable de faciliter l'adhésion aux cellules épithéliales pulmonaire et ainsi faciliter la colonisation du système respiratoire (Kharat and Tomasz, 2003; Scanlon et al., 1989). Comme pour la NA virale, les deux neuraminidases bactériennes, à savoir NanA et NanB, jouent un rôle de sialidase en clivant les résidus d'acide sialique terminaux des glycoprotéines, des glycolipides et des oligosaccharides à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Kadioglu et al., 2008). Le clivage de l'acide sialique, entraîne la libération de potentiels récepteurs pour la bactérie induisant ainsi la progression de la pathologie. Des expériences utilisant des mutants déficients en neuraminidase (NanA et/ou NanB) ont montré une diminution de la prolifération de la bactérie dans les voies respiratoires et la circulation sanguine (Manco et al., 2006).

e - L'autolysine LytA

L'amidase lytique (LytA) est une enzyme impliquée dans l'autolyse des bactéries. Cette autolyse, se faisant via la dégradation du peptidoglycane (Kadioglu et al., 2004), permet la libération de pneumolysine, d'acide teichoïque et d'autres composants (Steel et al., 2013). Ces derniers induisent la dégradation de la paroi cellulaire et la mise en place d'une réponse inflammatoire (Shockman et al., 1996; Tomasz, 1974). Les mutants de *S. pneumoniae* dépourvus de LytA ont montré une virulence réduite dans un modèle murin (Berry et al., 1989b; Canvin et al., 1995).

III/ La réponse immunitaire contre *S. pneumoniae*

Même si les facteurs de virulence cités ci-dessus aident la bactérie à contourner la réponse immunitaire de l'hôte, le système immunitaire reconnaît assez rapidement le pathogène et induit une réponse immune visant à éliminer la bactérie et limiter sa propagation.

1 - Reconnaissance de *S. pneumoniae* par le système immunitaire

Comme pour le virus de la grippe, l'épithélium respiratoire assure, en plus de son rôle de barrière mécanique, la reconnaissance de *S. pneumoniae* via l'utilisation de plusieurs PRR (Figure 5).

a – Reconnaissance par les Toll-Like Receptors

Plusieurs composants du pneumocoque interagissent avec des TLR afin d'initier la réponse immune via la production de cytokines. Deux TLR, TLR 2 et 4, sont principalement

activés lors d'une infection par ce pathogène. Le premier reconnaît l'acide lipoteichoïque et le peptidoglycane (Schmeck et al., 2006) tandis que le deuxième reconnaît la pneumolysine (Malley et al., 2003). D'autres TLR sont également stimulés dans une moindre mesure, comme le TLR9 qui détecte l'ADN de *S. pneumoniae* (Albiger et al., 2007).

La reconnaissance par ces différents TLR implique une cascade de signalisation démarrant par MYD88 et aboutissant par la translocation de NF- κ B dans le noyau afin d'induire la transcription de nombreux gènes, y compris des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL6) et des molécules de signalisation utilisées par les cellules immunitaires sentinelles pour communiquer avec les tissus environnants. Des souris déficientes pour MyD88 présentent une mortalité plus élevée et un défaut de production de cytokines (Khan et al., 2005). La même incidence a été démontrée chez l'homme, puisqu'un défaut de signalisation via MyD88 entraîne une augmentation de la sévérité de l'infection par *S. pneumoniae* (Bernuth et al., 2008).

a/1 - TLR2

L'implication du TLR2 dans la reconnaissance des bactéries Gram + par les composants de la paroi cellulaire et de la membrane, tels que le peptidoglycane et l'acide lipoteichoïque, est bien connue. L'importance du TLR2 dans l'induction de la réponse inflammatoire à *S. pneumoniae* a été démontrée par l'utilisation de souris TLR2 déficientes. Ces dernières présentent une diminution de la clairance bactérienne et une diminution de la production de certaines cytokines et chimiokines dont l'IL-1 β , l'IL-6 et le KC (homologue de CXCL8 chez la souris) (van Rossum et al., 2005) (Figure 5).

a/2 TLR4

La stimulation du TLR4 est plus connue dans un modèle de bactéries Gram - via le lipopolysaccharide des parois cellulaires. Pourtant, la pneumolysine produite par *S. pneumoniae* est capable de stimuler ce TLR et d'induire la production de cytokines (IL-6, IL-1 β , KC) et le recrutement de neutrophiles (Malley et al., 2003) (Figure 5). La délétion du TLR4 induit une augmentation de la susceptibilité et de la mortalité lors d'une infection par le pneumocoque, par rapport aux souris contrôles (Malley et al., 2003). Ceci serait principalement due à une augmentation de l'apoptose des cellules des voies respiratoires supérieures chez les souris *Tlr4*^{-/-} au début de la colonisation (Branger et al., 2004; Malley et al., 2003; Srivastava et al., 2005).

b - Reconnaissance par les Nod-Like Receptors

Plusieurs NLR sont impliqués dans la reconnaissance de *S. pneumoniae* et sont nécessaires pour engendrer la réponse immunitaire innée. NOD2 est exprimé principalement par les cellules épithéliales et les leucocytes (Opitz et al., 2004; Sorbara and Philpott, 2011). Il reconnaît le muramyldipeptide, principal constituant du peptidoglycane, libéré au cours de la phagocytose des bactéries (Davis et al., 2011). L'activation de NOD2 induit l'activation de NF- κ B et la transcription de cytokines pro-inflammatoires (Parker and Prince, 2011) ainsi que la production de CCL2 (MCP-1 chez la souris), conduisant au recrutement de macrophages dans les voies respiratoires supérieures. (Figure 5)

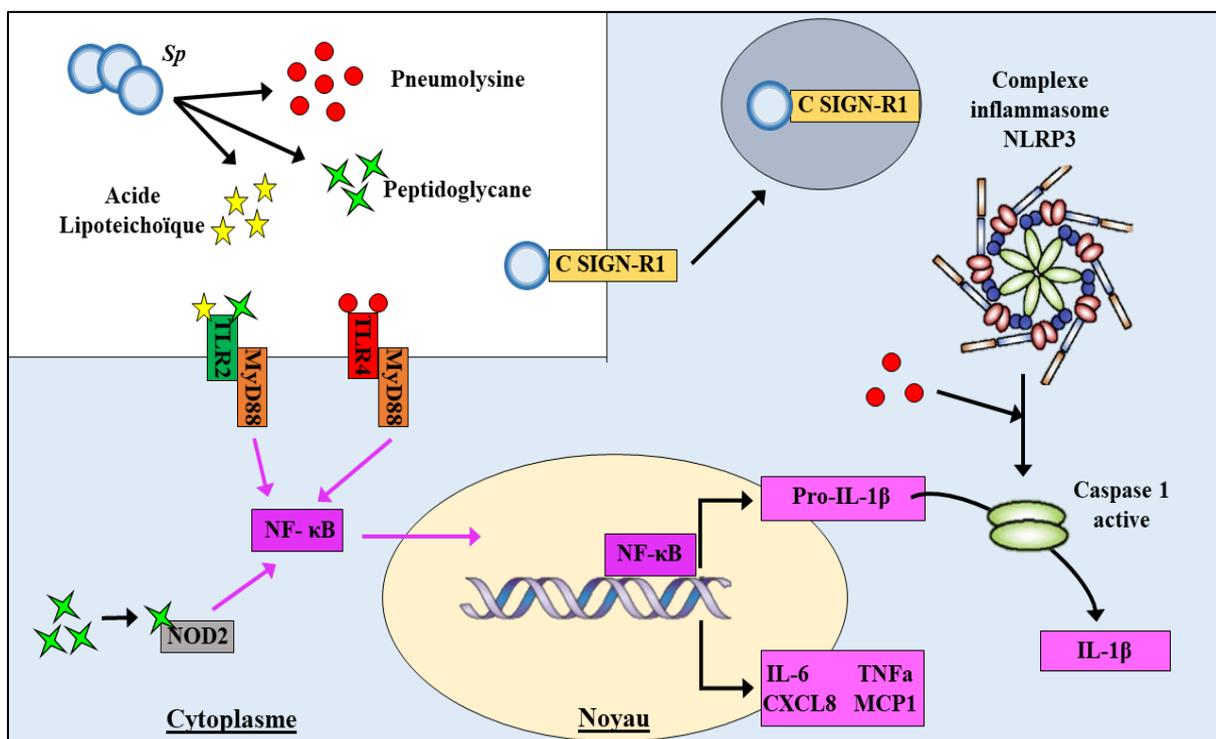


Figure 5 – Reconnaissance de *S. pneumoniae* par le système immunitaire. L'activation des différents récepteurs du système immunitaire induit l'activation de la voie NF- κ B permettant la production de plusieurs cytokines dont la pro-IL1 β . Le TLR2 reconnaît le peptidoglycane et l'acide lipoteichoïque, le TLR4 et NOD2 reconnaissent la pneumolysine. C SIGN-R1 induit la phagocytose de la bactérie. La pneumolysine interagit avec NLRP3 et permet l'activation de la caspase 1 et la libération d'IL-1 β . (Figure inspirée de (Koppe et al., 2012))

NLRP3 reconnaît la pneumolysine et induit le clivage de la pro-IL-1 β et la pro-IL-18. Il a été montré que l'infection par une bactérie dépourvue de pneumolysine induit une libération réduite d'IL-1 β alors que le taux d'expression en ARNm pour cette cytokine reste inchangé (Koppe et al., 2012). De plus, des souris NLRP3^{-/-} sont plus sensibles à l'infection par pneumocoque (diminution de la clairance bactérienne) (McNeela et al., 2010).

c- Reconnaissance par les Récepteurs C-type lectin

Le récepteur C SIGN-R1 est exprimé à la surface des macrophages et reconnaît certains motifs polysaccharidiques de la capsule bactérienne (Kang et al., 2004). L'activation de SIGN-R1 favorise l'induction de la phagocytose chez les macrophages. L'utilisation de souris dépourvues pour ce récepteur a montré une diminution de la phagocytose induisant une augmentation de la charge bactérienne (Koppel et al., 2005) (Figure 5).

d - Le rôle du complément

Le complément représente un ensemble de protéines présentes dans le sérum et participant à l'établissement de la réponse innée et acquise. Son importance dans la lutte contre l'infection par *S. pneumoniae* est connue depuis plus de 100 ans (Wright et al., 1989). Le complément permet, en outre, d'améliorer la reconnaissance de l'antigène par les anticorps et augmente l'activité des cellules phagocytaires. La liaison et l'activation des composants du complément, à la surface d'une bactérie, entraînent une opsonophagocytose et l'induction d'une inflammation. Le complément peut être activé selon 3 voies : la voie classique, la voie alternative et la voie de la lectine. Un des composants clé des trois voies est la molécule C3. Son rôle crucial dans le contrôle de l'infection par *S. pneumoniae* a été mis en évidence chez des souris C3^{-/-}. Ces dernières présentent une survie réduite lors d'une infection par le pneumocoque (Kerr et al., 2005).

2 - La réponse immunitaire innée

La réponse immune innée face à l'infection par *S. pneumoniae* est primordiale afin de limiter la propagation de la bactérie vers d'autres organes ou le sang. Elle met en jeu essentiellement les cellules épithéliales pulmonaires, les macrophages alvéolaires et les neutrophiles.

a – Cellules épithéliales pulmonaires

Les cellules épithéliales pulmonaires jouent plusieurs rôles essentiels dans le contrôle de la charge bactérienne. Ces cellules participent à l'initiation de la réponse immune grâce à présence de nombreux PRR à leur surface. L'activation de ces différents PRR entraîne la production de cytokines et de chimiokines capables de recruter les cellules immunitaires (Whitsett and Alenqhat, 2015).

Les cellules épithéliales sont également capables de tuer directement la bactérie via la production de plusieurs composants comme (i) la lactoferrine, qui séquestre le fer libre

nécessaire à la croissance bactérienne et oxyde les membranes des cellules bactériennes; (ii) le lysozyme, qui décompose le peptidoglycane dans les parois des cellules bactériennes; et (iii) une large gamme de peptides antimicrobiens (AMP) (par exemple, les défensines et la cathélicidine) qui forment des pores à la surface des cellules bactériennes, lysant ainsi les agents pathogènes envahissants (André et al., 2015; Whitsett and Alenghat, 2015).

b – Macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires jouent un rôle clé dans la lutte contre les infections bactériennes respiratoires (Kash et al., 2011). Les personnes possédant une altération des fonctions des macrophages alvéolaires, à cause par exemple, de la fumée de cigarette, d'une infection virale, de la consommation de corticoïdes ou d'alcool, présentent une plus forte susceptibilité aux infections par *S. pneumoniae* (Ghoneim et al., 2013; Mogensen et al., 2008; Phipps et al., 2010).

Les macrophages alvéolaires expriment un ensemble de PRR capables d'induire la phagocytose et la production de cytokines pro-inflammatoires. On retrouve à leur surface les récepteurs Fc pour les immunoglobulines, les récepteurs pour la molécule C3 du complément, les récepteur SIGN-R et MARCO (MAcrophage Receptor with COllagenous structure) facilitant la phagocytose et les TLR2 et 4. Grâce aux récepteurs phagocytaires, les macrophages alvéolaires peuvent internaliser les bactéries et des modèles murins suggèrent qu'ils peuvent éliminer rapidement une faible concentration de *S. pneumoniae* dans le poumon (Dorrington et al., 2013).

Lorsque que la charge bactérienne est trop importante, les macrophages alvéolaires sont dépassés et initient une réponse inflammatoire par la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IL-1 β) et de chimiokines (Marriott et al., 2012). Ces dernières permettent le recrutement des neutrophiles afin de prendre la suite dans la clairance de la bactérie. De plus, les macrophages alvéolaires s'épuisent rapidement au cours de l'infection expliquant pourquoi le recrutement des monocytes permet de limiter l'infection (Taut et al., 2008).

c – Neutrophiles

Les neutrophiles ont un rôle bénéfique et délétère au cours de l'infection par *S. pneumoniae*. Ils sont recrutés sur le site de l'infection pour jouer un rôle crucial dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes. La phagocytose de *S. pneumoniae* dépend

fortement de la reconnaissance de la bactérie par des protéines du système du complément ou par un anticorps spécifique (Brown et al., 2002). Leur recrutement se fait principalement par chimiotaxie, via la sécrétion de CCL2 par les cellules épithéliales pulmonaires et les macrophages.

Une trop forte activation des neutrophiles peut jouer un rôle délétère au cours de l'infection. En effet, la libération, par ces cellules, de protéases granulaires et d'espèces réactives de l'oxygène sont probablement responsables des dégradations de la barrière épithéliale pulmonaire induisant une augmentation du syndrome de détresse respiratoire aigu (Zysk et al., 2000). Selon certaines études réalisées chez la souris, une neutropénie, c'est-à-dire une absence de neutrophiles, réduirait la bactériémie et prolongerait la survie (Marks et al., 2007). Par ailleurs, ces cellules sont nécessaires dans le contrôle précoce de l'infection bactérienne puisque la déplétion des neutrophiles avant infection par *S. pneumoniae* est délétère, alors qu'une déplétion 12h après l'infection bactérienne augmente la survie (Bou Ghanem et al., 2015). Ces expériences montrent ainsi le rôle paradoxal de ces cellules, indispensable pour la clairance bactérienne mais également délétère due à leur forte activité inflammatoire.

3 - La réponse immunitaire adaptative spécifique

Bien que le système immunitaire inné permette de rapidement limiter la prolifération des bactéries, la résolution de l'infection par *S. pneumoniae* requiert une réponse adaptative efficace. Comme pour l'infection par influenza, les CPAg et plus particulièrement les DC migrent vers les organes lymphoïdes secondaires et initient la réponse adaptative via la présentation des Ag bactériens.

a – La réponse lymphocytes T spécifiques

La stimulation des lymphocytes T CD4⁺ par les CPAg et les molécules costimulatrices induit la différenciation en cellules Th1, Th2 et Th17 nécessaire à la lutte contre *S. pneumoniae*. Les cellules auxiliaires Th1 stimulent une réponse immunitaire à médiation cellulaire en produisant des cytokines telles que l'IFN- γ , qui activent et recrutent d'autres cellules immunitaires telles que les macrophages (Romagnani, 1999). Les cellules auxiliaires Th2 libèrent de l'IL-4 et facilitent la mise en place d'une réponse immunitaire humorale en interagissant avec les cellules B et en contribuant à la production d'anticorps (Romagnani, 1999). Les cellules Th17 sécrètent les cytokines IL-17A, IL-17F et IL-22. Ces cytokines sont importantes pour l'immunité des muqueuses. L'IL-17 est nécessaire pour recruter et activer les

macrophages, les monocytes et les neutrophiles sur les sites d'infection et favorise l'élimination de *S. pneumoniae* (Heo et al., 2017). Par exemple, en réponse à l'IL-17, l'épithélium bronchique produit la chimiokine CXCL8, entraînant un recrutement de neutrophiles sur le site de l'infection, et la production de β -défensines ayant une activité antimicrobienne directe. L'IL-22 joue un rôle dans l'homéostasie des muqueuses, notamment au niveau de la barrière épithéliale, et peut aussi avoir des effets antibactériens, en induisant la production de peptides antimicrobiens.

Bien que la fonction des lymphocytes T CD4⁺ dans l'immunité adaptative soit bien établie, ils sembleraient également contribuer à la résistance précoce à l'infection à pneumocoque indépendamment de leur rôle dans les réponses adaptatives spécifiques de l'antigène. L'infection intranasale de souris dont le CMHII est délété, induisant donc une diminution significative du taux de lymphocytes T CD4⁺, a révélé un rôle clé de ces cellules dans la réponse précoce à l'infection par pneumocoque. Ces souris présentent une susceptibilité accrue à l'infection, due à une augmentation du nombre de bactéries dans les poumons et le sang (Kadioglu et al., 2004).

Bien que les cellules T CD8⁺ soient généralement associées aux réponses face aux organismes intracellulaires, certaines études montrent qu'elles pourraient jouer un rôle dans la réponse adaptative à *S. pneumoniae*. L'utilisation de souris déficientes en lymphocyte T CD8⁺ (Weber et al., 2011) ou de souris déficientes en TAP, protéine nécessaire à la fonction de ces cellules (Gadola et al., 2000), ont montré une incidence accrue de l'infection par pneumocoque chez ces souris.

b – La réponse lymphocytes B spécifiques

L'infection par *S. pneumoniae* induit la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B. Ces anticorps sont spécifiques de la capsule ou des protéines de surface de la bactérie (McCool and Weiser, 2004). Ils facilitent l'opsonisation de la bactérie, directement en se fixant aux récepteurs au fragment Fc (FcR) des phagocytes. Les anticorps sont produits lors de primo-colonisation ou suite à la vaccination, montrant l'importance de la réponse humorale dans le contrôle de la prolifération du pneumocoque (Black et al., 2000; Briles et al., 2003).

IV/ Les surinfections bactériennes post-grippales par *S. pneumoniae*

La surinfection bactérienne est l'une des complications majeures que l'on peut observer au cours d'une infection grippale. Ces surinfections sont essentiellement causées par trois pathogènes : *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*. Elles contribuent à l'augmentation de la morbidité et de la mortalité observées au cours de la grippe (Gupta et al., 2008). Environ 75% des personnes développant une pneumonie au cours de la grippe présentent une co-infection (Zambon, 2001). Les jeunes enfants et les personnes âgées présentent un risque accru de développer une surinfection bactérienne au cours de l'infection grippale (Grijalva et al., 2014; Shrestha et al., 2013).

Ce phénomène de surinfection bactérienne a une plus forte incidence lors des pandémies grippales. Au cours des 100 dernières années, quatre pandémies majeures ont été recensées. La grippe espagnole de 1918-1919 a entraîné la mort de plus de 50 millions de personnes (Chien et al., 2009). Il a été estimé que 5% d'entre elles sont mortes précocement au cours de l'infection grippale alors que la majorité des décès sont survenus entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour après l'infection (Klugman et al., 2009). Entre 10 et 15% des patients seraient morts de détresse respiratoire aiguë contre 85-90% qui auraient succombé à une bronchopneumonie aiguë avec présence de bactéries pathogènes, majoritairement *S. pneumoniae* (Chien et al., 2009; Klugman et al., 2009; Morens and Fauci, 2007). Les progrès de la médecine, notamment via l'utilisation d'antibiotiques et de vaccins contre le virus de la grippe, ont permis de réduire l'incidence du phénomène de surinfection bactérienne lors des pandémies de 1957 et 1968. Pour autant, 44% des décès lors de la pandémie de 1957 ont été dus à une surinfection par *S. aureus* (Trotter et al., 1959). Lors de la pandémie de 1968, c'est de nouveau *S. pneumoniae* qui a été identifié comme le principal pathogène responsable des surinfections bactériennes (Lindsay, 1970). La dernière pandémie grippale date de 2009 et a entraîné la mort d'environ 200 000 personnes. Lors de cette pandémie, *S. aureus* et *S. pneumoniae* ont été impliqués dans 25 à 50% des cas d'infections graves aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte (Shieh et al., 2010).

L'infection par le virus de la grippe a des conséquences néfastes pour l'organisme, augmentant ainsi le risque de surinfection bactérienne. Deux mécanismes majeurs sont impliqués : les lésions au niveau de l'épithélium respiratoire et l'altération de la réponse immunitaire antibactérienne.

1 - Altération de l'épithélium respiratoire

Bien qu'il joue un rôle de barrière physique empêchant l'adhérence des bactéries pathogènes à la matrice extracellulaire et leur pénétration et éventuellement leur dissémination dans le sang, l'épithélium respiratoire subit de nombreux dégâts lors de l'infection grippale facilitant ainsi les surinfections bactériennes.

Dans un premier temps, l'infection par le virus de la grippe augmente l'adhésion des bactéries pathogènes via l'exposition de récepteurs, qui en conditions physiologiques normales sont inaccessibles (McCullers and Bartmess, 2003). La neuraminidase, présente sur l'enveloppe du virus de la grippe, est responsable de l'activité de la sialidase, nécessaire pour la libération de nouveaux virions suite à leur bourgeonnement à la surface de la cellule hôte. Le clivage de l'acide sialique au niveau des glycoprotéines présentes à la surface des cellules épithéliales pulmonaires, facilite l'attachement des bactéries (McCullers, 2001). L'utilisation d'oséltamivir, un inhibiteur de la neuraminidase, diminue la prolifération de la bactérie et donc le risque de surinfection bactérienne (McCullers, 2004).

La production de cytokines inflammatoire suite à la l'infection par le virus de la grippe entraîne une augmentation de l'expression du récepteur du facteur d'activation des plaquettes (PAFR) à la surface de cellules épithéliales. Ce récepteur est utilisé par *S. pneumoniae* pour envahir les cellules de l'épithélium respiratoire (Cundell et al., 1995). L'implication de ce récepteur dans les surinfections bactériennes est très discutée. Il a été montré que des souris déficientes en PAFR présentent une réduction de la charge bactérienne pulmonaire et systémique et une augmentation de leur survie lors de surinfections bactériennes post-grippales (van der Sluijs et al., 2006). Par ailleurs, une étude visant à bloquer ce récepteur pendant la grippe, par traitement anticorps, n'a montré aucun effet sur la susceptibilité aux surinfections bactériennes (McCullers and Rehg, 2002). Cet effet n'est pas propre à la grippe, puisqu'il a été prouvé que l'infection par le RSV ou encore par le Papilloma virus augmente l'adhésion de *S. pneumoniae* et de *H. influenzae* aux cellules épithéliales respiratoires primaires et aux lignées cellulaires immortalisées (Avadhanula et al., 2006).

La réponse immunitaire antivirale est également responsable de l'altération de la barrière épithéliale respiratoire. Une étude récente a montré que l'infiltration de monocytes inflammatoires dans le poumon au cours de la grippe participe à l'altération de la barrière épithéliale (Ellis et al., 2015). En effet, les souris dépourvues en CCR2 (récepteur nécessaire au recrutement des monocytes) sont plus résistantes à la surinfection bactérienne post-grippale. Il semble que l'expression du récepteur TRAIL (tumor-necrosis-factor related

apoptosis inducing ligand) par les monocytes inflammatoires soit importante dans les dommages causés à l'épithélium pulmonaire. Ce récepteur induit l'apoptose des cellules épithéliales et donc une rupture de la barrière naturelle aux bactéries opportunistes. Un traitement visant à inhiber TRAIL au cours de la grippe permet une réduction de la charge bactérienne lors d'une surinfection par *S. pneumoniae* (Ellis et al., 2015).

Certaines études se sont plus particulièrement penchées sur l'effet de l'infection virale sur la régulation de l'expression de certaines protéines nécessaires au maintien de l'intégrité de l'épithélium respiratoire. Les gènes impliqués dans la réparation tissulaires (Mdk, Adamts2, Timp4, Slpi, Mmp2, Mmp9, Vegfc, Itgb7) et les gènes impliqués dans la réponse au stress dans les tissus pulmonaires (Gcnt2, Hif3a, Stra13, Hmox1 et Aifm1) voient leur expression diminuée au cours de l'infection virales mais également lors d'une surinfection par *S. pneumoniae* (Jamieson et al., 2013). Une étude menée par Kash et son équipe a montré une corrélation entre le défaut de réparation de l'épithélium respiratoire et la mortalité engendrée par la surinfection bactérienne (Kash et al., 2011). En plus d'impacter la réponse visant à réparer les dommages tissulaires, l'infection grippale entraîne l'altération de l'expression des protéines de la jonction serrée (Claudin-4) participant à l'altération de la barrière épithéliale pulmonaire (Short et al., 2016).

Bien que l'épithélium respiratoire subisse les conséquences de la réponse immunitaire mise en place contre l'infection grippale, certaines cellules immunitaires semblent avoir un effet protecteur sur l'épithélium respiratoire. Les cellules T non conventionnelles jouent un rôle naturel dans le maintien de l'intégrité épithéliale et dans les processus de réparation tissulaire (Fan and Rudensky, 2016). Des études récentes, effectuées en partie dans notre laboratoire, ont montré un effet bénéfique de ces cellules dans l'homéostasie tissulaire et les fonctions de la barrière pulmonaire pendant la grippe. Les cellules NKT et les cellules T $\gamma\delta$ produisent la cytokine IL-22 (via IL-1 β et IL-23) au cours des premiers stades de l'infection par l'IAV (Ivanov et al., 2013; Paget et al., 2012). Bien que l'IL-22 n'affecte pas la charge virale pendant la grippe, elle réduit les dommages épithéliaux induits par l'IAV (Barthelemy et al., 2018; Guo and Topham, 2010; Ivanov et al., 2013; Kumar et al., 2013; Paget et al., 2012; Pociask et al., 2013). Les mécanismes par lesquels l'IL-22 empêche le dysfonctionnement de la barrière épithéliale lors d'une infection grippale pourraient inclure un effet inhibiteur sur le recrutement des monocytes inflammatoires et un effet direct sur l'expression des gènes impliqués dans les fonctions de barrière (Barthelemy et al., 2018). L'interleukine-22 pourrait également participer à la régénération épithéliale des voies

respiratoires et à la réparation de la barrière (Kumar et al., 2013; Pociask et al., 2013). L'IL-22, grâce à son effet sur les fonctions de barrière, diminue la susceptibilité aux surinfections bactériennes (Barthelemy et al., 2018; Ivanov et al., 2013). Ces résultats ouvrent des perspectives thérapeutiques intéressantes. Ainsi, une supplémentation exogène d'IL-22 au cours de la grippe, ou de composés capables d'en contrôler l'activité (par exemple un antagoniste de l'IL-22 binding protein), pourrait être bénéfique (Abood et al., 2019; Barthelemy et al., 2018).

2 - Altération de la réponse immunitaire antibactérienne

L'infection par le virus de la grippe induit une altération numérique et/ou fonctionnelle de certaines cellules myéloïdes qui sont capables, en temps normal, de contrôler l'infection bactérienne. Les macrophages alvéolaires et les neutrophiles sont les principales cellules impactées par le virus de la grippe et expliquent en partie l'augmentation de la susceptibilité aux surinfections bactériennes post-grippales (Ghoneim et al., 2013; McNamee and Harmsen, 2006). De plus, l'infection par le virus de la grippe s'accompagne d'une sécrétion abondante de cytokines pro-inflammatoires, participant à cette augmentation de la susceptibilité.

a – Macrophages alvéolaires

L'infection par le virus de la grippe réduit le nombre de macrophages alvéolaires et leur fonctionnement par le biais de mécanismes directs et indirects: en diminuant leur chimiotactisme (Kleinerman et al., 1976), en supprimant leurs fonctions et en favorisant leur apoptose (Ghoneim et al., 2013).

L'infection par IAV induit la suppression et la destruction des macrophages alvéolaires au cours des 7 premiers jours de l'infection (Ghoneim et al., 2013). Cette chute du nombre de macrophages alvéolaires entraîne la prolifération et la différenciation de monocytes dérivées du sang en macrophages. Cependant, on estime que cette phase de recrutement cellulaire prend environ deux semaines, expliquant ainsi la création d'une fenêtre de susceptibilité aux surinfections bactériennes. Il a été montré que le pic de susceptibilité aux surinfections bactériennes, soit 7 jours après infection par le virus de la grippe, correspond au moment où le nombre de macrophages alvéolaires est au plus bas dans le poumon (Zhang et al., 2009). En effet, 7 jours après infection, 90% des macrophages alvéolaires sont déplétés dans le poumon (Ghoneim et al., 2013).

En plus de réduire leur nombre, le virus de la grippe altère certaines fonctions propres aux macrophages alvéolaires contribuant ainsi à l'augmentation de la susceptibilité aux surinfections bactériennes. Il a été montré que l'infection grippale atténuait l'expression de MARCO à la surface des macrophages alvéolaires (Sun and Metzger, 2014). Ce récepteur est capable de reconnaître les bactéries et d'induire leur phagocytose par le macrophage. Il semblerait que cette réduction de l'expression de MARCO soit médiée par la forte production d'IFN- γ au cours de l'infection grippale (Sun and Metzger, 2014). La production de ROS par les macrophages alvéolaires est également réduite au cours de l'infection grippale (Sun and Metzger, 2008).

De plus, l'infection grippale induit une désensibilisation des TLR à la surface des macrophages alvéolaires pouvant durer entre 2 et 6 semaines (Didierlaurent et al., 2008). Cette désensibilisation participe également à la réduction de la capacité des macrophages alvéolaires à phagocyter. Elle induit également une réduction de l'expression de cytokines et de chimiokines nécessaires à la mise en place de la réponse immunitaire et au recrutement de certains types cellulaires (Didierlaurent et al., 2008). Par exemple, on observe une réduction de la production de chimiokines responsables du recrutement et de l'activation des neutrophiles au cours d'une surinfection bactérienne, à savoir CXCL1 (ou KC) et CXCL2 (ou MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2)) (Shahangian et al., 2009). La production de certains AMP (REG3 β , S100A8 and S100A9) est également atténuée 6 jours après infection par le virus de la grippe, induisant un défaut de clairance bactérienne et l'augmentation de la susceptibilité aux surinfections (Robinson et al., 2014).

b – Neutrophiles

L'infection par le virus de la grippe induit un fort recrutement de neutrophiles 7 jours après infection (McNamee and Harmsen, 2006). Bien qu'ils soient nécessaires à la réponse antibactérienne, les neutrophiles contribuent à l'exacerbation de la susceptibilité aux surinfections bactériennes dans un contexte de primo infection grippale. En effet, la forte infiltration des neutrophiles au cours de la grippe participe aux dommages observés au niveau de l'épithélium respiratoire (Narasaraju et al., 2011). Par ailleurs, ce nombre important de neutrophiles dans le poumon 7 jours après infection ne participe pas à la lutte contre les surinfections bactériennes. En effet, il a été montré que la déplétion des neutrophiles 7 jours après infection, via un anticorps anti-Ly6G, n'avait aucun effet sur le contrôle de la charge bactérienne (Damjanovic et al., 2013). Au contraire, cette même déplétion réalisée 3 jours après infection grippale est délétère, montrant ainsi un rôle essentiel des neutrophiles lors

d'une surinfection précoce mais pas tardive. Ceci s'explique par une altération des fonctions de ces cellules avec notamment la baisse de leur activité phagocytaire et de la production de myéloperoxydase (MPO) (McNamee and Harmsen, 2006). De plus, une apoptose accrue et une réduction de la survie chez les neutrophiles co-infectés avec le virus de la grippe et *S. pneumoniae* ont été observées (Engelich et al., 2001).

Bien qu'ils soient présents en grand nombre dans le poumon 7 jours après infection, on observe une réduction du recrutement de neutrophiles après surinfection. Cette altération du recrutement de neutrophiles s'explique par la diminution de la production des chimiokines CXCL1 et CXCL2 par les macrophages alvéolaires (Shahangian et al., 2009).

c – Altération de la réponse cytokinique

L'infection par le virus de la grippe entraîne la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire dérégulée dans le poumon. Cette forte production de cytokines et de chimiokines, 7 jours après infection, favorise les lésions des tissus et peut nuire à la réponse innée nécessaire à l'élimination des bactéries pathogènes, notamment *S. pneumoniae*. En effet, des études ont montré que la forte production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-1 β , au sein de poumon humains et murins suite à une infection grippale, participe au fort recrutement de cellules inflammatoires, aux lésions de l'épithélium respiratoire et à la formation d'œdème pulmonaire (Speshock et al., 2007).

Bien que la réponse impliquant l'interféron de type I soit nécessaire au contrôle de la charge virale, plusieurs études réalisées à l'aide de souris présentant une déficience au niveau de leur récepteur pour l'interféron de type I (IFNAR^{-/-}) ont permis de mettre en lumière le rôle délétère de cette réponse dans un contexte de surinfection bactérienne. En effet, les souris IFNAR^{-/-} sont moins susceptibles aux surinfections par pneumocoque que les souris conventionnelles, 7 jours après infection grippale (Nakamura et al., 2011; Shahangian et al., 2009). L'IFN de type I a une influence sur la production des chimiokines CXCL1 et CXCL2 par les macrophages alvéolaires altérant ainsi le recrutement des neutrophiles et rendant impossible la résolution efficace de la surinfection à *S. pneumoniae* (Shahangian et al., 2009). Les souris IFNAR^{-/-} présentent une augmentation du recrutement de neutrophiles, de l'activité de la MPO et de la clairance du pneumocoque. En plus d'influencer la réponse innée, dans ce contexte de surinfection, la réponse IFN de type I agit sur la réponse adaptative. En effet, il a été montré que la forte production de ces interférons au cours de la grippe, diminue la production d'IL23 et IL-1 β , cytokines nécessaires pour induire la réponse médiée par les

lymphocytes Th17 (Kudva et al., 2011; Robinson et al., 2013); cette réponse étant nécessaire pour contrôler les infections bactériennes pulmonaires.

L'altération de la réponse cytokinique au cours de la grippe passe aussi par une forte sécrétion de cytokines anti-inflammatoires participant également à l'augmentation de la susceptibilité aux surinfections bactériennes (McNamee and Harmsen, 2006). Au cours de l'infection par IAV, l'IL-10 est fortement produite par différentes cellules immunitaires aussi bien de l'immunité innée que adaptative, à savoir : les cellules T CD4⁺ et CD8⁺, les cellules NK et les monocytes inflammatoires (Barthelemy et al., 2017; Sun et al., 2009). L'IL-10 a été identifiée comme un médiateur majeur de la suppression de la défense antibactérienne par l'hôte au cours de la grippe, puisqu'elle inhibe les fonctions des macrophages alvéolaires et des neutrophiles (van der Sluijs et al., 2006). En effet, la neutralisation de cette cytokine, avec un traitement anticorps, augmente le recrutement de neutrophiles dans le poumon, diminue la susceptibilité aux surinfections bactériennes et augmente la survie (Barthelemy et al., 2017; Peñaloza et al., 2015; van der Sluijs et al., 2004). Le laboratoire a notamment montré que l'IL-10 inhibe la synthèse d'IFN- γ par les cellules iNKT dans un contexte de surinfection bactérienne. Dans ce processus, l'IL-10 altère l'expression de l'IL-12 par les DC dérivées des monocytes. La neutralisation de l'IL-10, par un traitement à base d'anticorps, restaure l'activité des cellules iNKT et augmente la résistance face aux surinfections (Barthelemy et al., 2017). L'utilisation de souris déficiente en IL-10 confirme ce résultat dans un contexte d'infection secondaire par *S. aureus* (Robinson et al., 2015). L'IL-27, fortement produite au cours de la grippe, serait à l'origine de la production d'IL-10. La surinfection de souris IL-27R^{-/-} entraîne une diminution d'IL-10 dans le poumon et améliore la clearance bactérienne (Robinson et al., 2015).

La primo infection par le virus de la grippe entraîne une inhibition de l'activation des cellules Th17 et T $\gamma\delta$, en contexte de surinfection bactérienne (Kudva et al., 2011; Lee et al., 2015). Le défaut d'activation de ces deux types cellulaires entraîne une diminution de la production d'IL17 et d'IL-22, cytokines connues pour favoriser la clairance des bactéries grâce au recrutement de phagocytes et à l'induction de la sécrétion d'AMP (Robinson et al., 2014). L'IL-27 est également impliquée dans le défaut de production de ces cytokines puisque qu'elle est connue pour inhiber l'activation des cellules Th17 (Murugaiyan et al., 2009). L'inactivation de ce récepteur induit une expression plus importante de l'IL-17 et de l'IFN- γ (Robinson et al., 2015). Au laboratoire, l'utilisation de souris déficiente en IL-22 a permis de mettre en lumière l'importance de cette cytokine. En effet, ces souris ont une charge

bactérienne et un taux de mortalité augmentés lors d'une surinfection bactérienne (Ivanov et al., 2013). De plus, le laboratoire a montré que des traitements locaux en IL-22 diminuent la dissémination de la bactérie en agissant directement sur l'intégrité de la barrière pulmonaire (Barthelemy et al., 2018).

Chapitre 3 – Le microbiote intestinal

I/ Généralité sur le microbiote intestinal

Le « microbiote », également appelé microbiome, représente l'ensemble des micro-organismes vivant dans un écosystème donné. Ces communautés complexes sont présentes chez tous les vertébrés et sont capables de coloniser plusieurs organes et tissus comme par exemple, l'intestin, la peau, les poumons, le vagin etc...

Le microbiote intestinal est considéré comme un organe à part entière ; qualifié même de second cerveau. En effet, ce microbiote est représenté par 10^{14} bactéries, soit dix fois plus que le nombre de cellules présentes au sein d'un corps humain. De plus, le génome de cet ensemble de bactéries représente à lui seul 3 millions de gènes, soit 150 fois plus que le génome humain (Nicholson et al., 2012). Bien que certaines ne soient pas encore identifiées, due à l'impossibilité de les cultiver, 1000 espèces bactériennes ont été identifiées au total et environ 160 espèces sont communes à tous les individus (Rajilić-Stojanović and de Vos, 2014). Pour autant, on estime que chaque individu possède un microbiote intestinal qui lui est propre. Ces bactéries sont réparties dans deux phyla majeurs, les Firmicutes et les Bactéroïdètes mais d'autres phyla sont également présents au niveau de l'intestin comme les Protéobactéria, Verrumicroba, Actinobactéria, Fusobactéries et Cyanobactéries (Huttenhower et al., 2012). Depuis l'estomac et ses 10^1 bactéries par gramme, la densité et la diversité bactérienne augmentent tout au long du tractus gastro-intestinal : 10^4 au niveau du jéjunum, 10^7 dans l'iléon et entre 10^{12} et 10^{14} dans le colon (Sekirov et al., 2010).

L'hôte et les communautés bactériennes composant le microbiote intestinal sont dans une relation de mutualisme symbiotique. Les bactéries bénéficient d'un microenvironnement stable et riche en nutriments et sont tolérées par le système immunitaire intestinal. En contrepartie, de par son nombre important de bactéries et leur large génome, le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la biologie de l'hôte. Ces bactéries participent au métabolisme de polysaccharides non digestibles par l'hôte et à la production de vitamines essentielles (Krajmalnik-Brown et al., 2012). Ces métabolites sont nécessaires au développement et à la différenciation de l'épithélium intestinal et du système immunitaire de l'hôte. Le microbiote intestinal confère également une protection contre l'invasion d'agents pathogènes opportunistes (Smith et al., 2007).

1 - Mise en place et variation du microbiote intestinal au cours de la vie

La mise en place du microbiote intestinal commence dès la naissance. Le tractus digestif du nourrisson est dépourvu de bactérie et sa colonisation commence dès l'accouchement après contact avec la flore vaginale et fécale pour un accouchement par voie naturelle ou avec la flore cutanée pour un accouchement par césarienne (Mändar and Mikelsaar, 1996). Cette colonisation est rendue possible grâce à l'absence de mécanisme immunitaire au sein du tractus digestif du nourrisson. Cet environnement particulièrement permissif permet la colonisation de 10^{11} bactéries/gramme rapidement après la naissance. Cette première étape clé dans la mise en place du microbiote intestinal peut déjà conditionner l'être humain à de futures pathologies. Il a été montré, par exemple, que les personnes nées par césarienne présentent des prédispositions à développer de l'asthme allergique par rapport à des personnes nées par voie naturelle (Arrieta et al., 2018). Ceci s'explique par la faible diversité du microbiote cutané de la mère lors de l'accouchement comparée au microbiote intestinal.

Au cours des premiers mois, les bactéries présentes dans le lait maternel, à savoir *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, colonisent le tractus intestinal (Solís et al., 2010). Par la suite, les communautés microbiennes sont très variables et relativement instables par rapport au microbiote adulte, qui présente une complexité et une diversité phylogénétique beaucoup plus grandes (Koenig et al., 2011). La stabilisation du microbiote intestinal se fait entre 2 et 4 ans. Il est alors capable de métaboliser les polysaccharides non digérés (Palmer et al., 2007). Bien que le microbiote intestinal reste stable tout au long de la vie, des modifications apparaissent chez les personnes âgées et les femmes enceintes (Koren et al., 2012) (Figure 6).

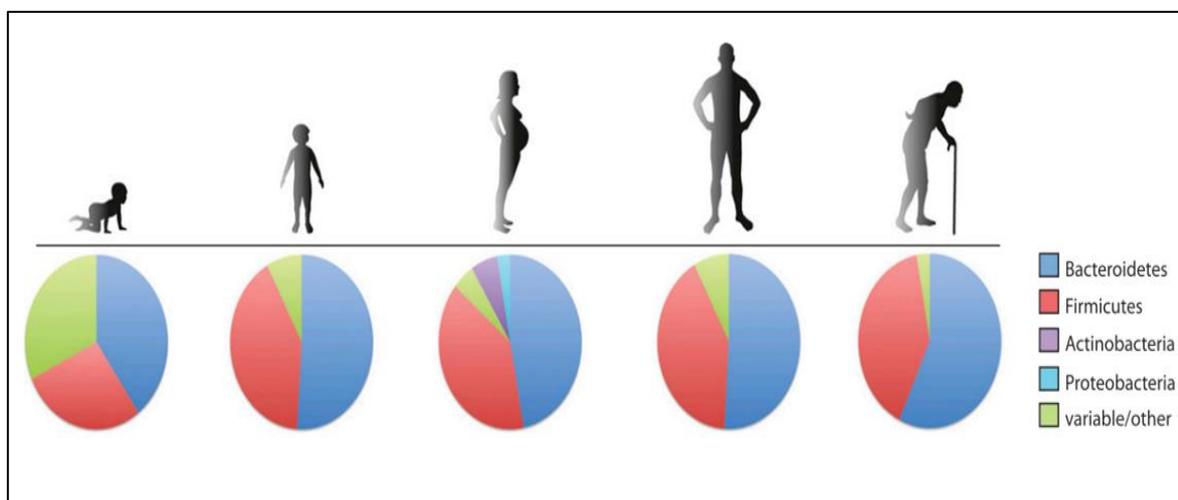


Figure 6 – Evolution du microbiote intestinal au cours de la vie. (Figure de (Kostic et al., 2013))

2 - Facteurs influençant le microbiote intestinal

Chez l'homme, plusieurs facteurs environnementaux tels que le régime alimentaire, le traitement antibiotique, l'âge et le stress peuvent modifier la composition du microbiote intestinal (Turnbaugh et al., 2007; Xu and Knight, 2015). Cette modification se caractérise généralement par une diminution de l'abondance d'espèces bactériennes bénéfiques s'accompagnant généralement d'une prolifération d'agents pathogènes (Hakansson and Molin, 2011). En effet, les communautés bactériennes commensales intestinales jouent un rôle important dans la défense de l'hôte en colonisant la lumière intestinale et sont en concurrence avec d'autres organismes potentiellement pathogènes pour l'hôte (Hooper and Gordon, 2001; Smith et al., 2007). Cette perturbation de la composition et de la fonction du microbiote intestinal, appelée dysbiose, perturbe l'homéostasie tissulaire et immunitaire et est associée à diverses maladies inflammatoires au niveau du tractus gastro-intestinal mais également dans d'autres organes tels que le cerveau, les poumons etc... (Shreiner et al., 2015). Par exemple, la dysbiose du microbiote intestinal a été identifiée comme un facteur favorisant certaines pathologies comme l'obésité, les maladies inflammatoires de l'intestin, le cancer, les troubles atopiques, l'asthme allergique et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Noverr et al., 2005; Rapozo et al., 2017; Rooks and Garrett, 2016; Rutten et al., 2014).

L'alimentation, de par son rôle déterminant dans la formation et la modification du microbiote intestinal, apparaît à l'heure actuelle comme une solution thérapeutique pour certaines pathologies intestinales liées à la modification du microbiote intestinal (Donovan, 2017). Une étude comparative, entre le régime alimentaire africain et européen, a révélé des différences au niveau de la composition du microbiote intestinal chez l'enfant. En effet, le régime africain, riche en fibre et pauvre en protéine animale et en graisse, favorise l'expansion de la bactérie *Prevotella* connue pour sa capacité de fermentation des fibres et son activité anti-inflammatoire. Le régime « occidentale », riches en protéine et en graisse, entraîne la prolifération des bactéries appartenant au phylum des Bactéroidetes (Chen et al., 2017; Filippo et al., 2010).

L'exposition à des antibiotiques, notamment durant l'enfance, peut avoir des conséquences sur l'immunité de l'hôte aussi bien à court qu'à long terme. En effet, une étude a montré qu'une forte exposition aux antibiotiques durant l'enfance augmentait le risque de

développer de l'asthme allergique (Arrieta et al., 2015; Noverr et al., 2005; Russell et al., 2015).

3 - Méthodes d'étude du microbiote

L'intérêt pour le microbiote intestinal n'a fait que grandir au cours de ces 15 dernières années grâce notamment aux nouveaux outils de métagénomique surpassant les limites des anciennes techniques de culture. Deux méthodes sont aujourd'hui couramment utilisées afin de séquencer, de manière ciblée ou de façon intégrale, le génome du microbiote intestinal.

La plus utilisée et la plus accessible est la métagénomique ciblée qui vise à amplifier, par PCR (polymerase chain reaction), le gène ou la région du gène codant pour l'ARN ribosomique (ARNr) 16s. Cet ARNr 16s, composé de régions très conservées et de régions variables, est propre à chaque bactérie et permet de retracer la phylogénie du microbiote intestinal. Chaque bactérie identifiée est regroupée par unité taxonomique opérationnelle (OTU). Un OTU représente un regroupement d'individus d'une même espèce dont les séquences d'ARNr 16S présentent une similitude de plus de 97%. Cette approche a permis notamment de montrer la complexité et la diversité du microbiote intestinal et les différences de composition tout au long du tractus digestif mais également entre différents organes (Costello et al., 2009).

La métagénomique globale, également appelé « Shotgun », est beaucoup plus complexe que la métagénomique ciblée puisqu'elle vise à séquencer directement l'ensemble de l'ADN de l'échantillon. Cette approche permet d'accéder à l'ensemble des gènes présents dans l'échantillon et donc d'accéder aux fonctions du microbiome. Cette méthode permet notamment d'analyser en détail l'impact du microbiote ou l'impact d'une dysbiose sur, par exemple, les voies métaboliques nécessaires à la synthèse de vitamines, métabolites bactériens etc... (Mitra et al., 2013).

II/ Les acides gras à chaîne courte

Le microbiote intestinal et les bactéries qui le composent dépendent principalement des fibres alimentaires non digérées. Les conversions microbiennes de ces fibres en monosaccharides dans l'intestin impliquent un certain nombre de réactions induites par le répertoire enzymatique de certaines bactéries spécifiques du microbiote intestinal. Ceci induit la production par la bactérie de métabolites ayant des effets bénéfiques pour l'hôte. Les principaux métabolites bactériens produits au niveau de l'intestin sont les acides gras à chaîne

courte (AGCC). Le microbiote intestinal ne produit pas seulement des AGCC, il est également responsable de la production d'autres métabolites microbiens intestinaux tels que la méthylamine, à partir de choline alimentaire, et d'indoles provenant du métabolisme d'acides aminés aromatiques comme le tryptophane (Bäckhed et al., 2004).

1 – Généralité

Les AGCC sont des acides carboxyliques caractérisés par une queue aliphatique pouvant comporter entre deux et six carbones. Bien que les AGCC puissent être produits naturellement par les voies métaboliques de l'hôte, en particulier dans le foie, le principal site de production est le côlon via des bactéries spécifiques. Les souris exemptes de germes (souris axéniques ou Germ-Free), ne produisent pas d'AGCC (Høverstad and Midtvedt, 1986). Ils existent trois principaux AGCC : l'acétate (comportant 2 carbones), le propionate (3 carbones) et le butyrate (4 carbones) (Figure 7). Ils sont principalement libérés dans le côlon proximal avec des concentrations comprises entre 70–140 mM, alors que leurs concentrations sont plus basses dans le côlon distal (20–70 mM) et dans l'iléon distal (20–40 mM) (Topping and Clifton, 2001; Wong et al., 2006). Parmi ces trois AGCC, c'est l'acétate qui est majoritaire (60%), puis le propionate (25%) et enfin le butyrate (15%) (Cummings, 1981; Tazoe et al., 2008). Dans le sang et les tissus périphériques, les taux de ces métabolites sont d'environ 80 μM pour l'acétate et moins de 3 μM pour les deux autres. Cette différence de concentration entre ces trois AGCC s'explique, en partie, par leurs différents rôles. Le butyrate est la source d'énergie principale des cellules intestinales leur fournissant au moins 60 à 70% de leurs besoins énergétiques essentiels à leur prolifération et à leur différenciation (Suzuki et al., 2008), tandis que 50% du propionate est métabolisé dans le foie où il participe à la néoglucogénèse (Cummings et al., 1987; Roy et al., 2006).

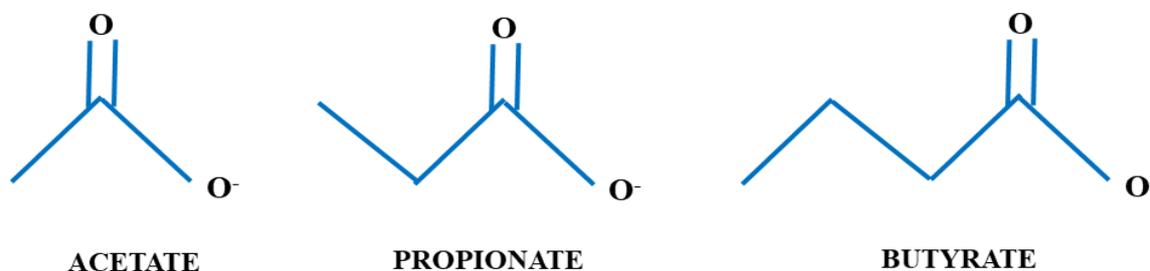


Figure 7 – Structure des trois acides gras à chaîne courte majeurs.

L'importance des taux d'AGCC dans l'intestin et dans les tissus périphérique est illustrée par leurs fonctions pléiotropes chez la souris, qui vont du maintien et du renforcement de l'intégrité intestino-épithéliale à l'atténuation de l'inflammation, dans

l'intestin mais également dans d'autres organes comme les voies respiratoires (Fukuda et al., 2011; Trompette et al., 2014).

2 - La production des acides gras à chaîne courte

Les polysaccharides non digestibles par l'hôte sont les principaux substrats menant à la production d'AGCC. Dans des conditions saines, les polysaccharides similaires à l'amidon sont complètement digérés dans l'intestin grêle pour donner du glucose. Les polysaccharides non digérés ou partiellement digérés dans l'intestin grêle peuvent subir un processus de fermentation par une bactérie anaérobie spécifique du côlon, ce qui conduit à la libération d'AGCC en plus des gaz et de la chaleur. Cette fermentation spécifique se déroule principalement dans le caecum et le colon (Macfarlane and Macfarlane, 2003).

Le pyruvate est la molécule biologique majeure au centre de la production des différents AGCC. L'acétate est produit par les bactéries intestinales à partir du pyruvate soit via l'acétyl-CoA ou soit via la voie de Wood-Ljungdahl (Ragsdale and Pierce, 2008). Le propionate, quant à lui, est le fruit de la conversion du succinate en méthylmalonyl-CoA via la voie du succinate. Le propionate peut également être synthétisé à partir du lactate par la voie de l'acrylate (Hetzl et al., 2003) mais également à partir de sucres de type désoxyhexose (tels que le fucose et le rhamnose) par la voie de propanediol (Scott et al., 2006). Le butyrate est formé par la réduction de deux molécules d'acétyl-CoA en butyryl-CoA, qui peut être converti en butyrate via la voie dite classique, par la phosphotransbutyrylase et la butyrate kinase (Louis et al., 2004).

Lorsque les fibres fermentables sont rares, les microbes passent à des sources de croissance moins favorables sur le plan énergétique, telles que les acides aminés provenant de protéines alimentaires ou de graisses alimentaires (Cummings and Macfarlane, 1991; Wall et al., 2009). Ceci entraîne une diminution de l'activité de fermentation du microbiote et une diminution de production d'AGCC (Russell et al., 2011). Certaines bactéries, comme *Akkermansia muciniphila*, peuvent également produire des AGCC via la dégradation des mucines (Derrien et al., 2004).

3 - Les récepteurs et transporteurs des acides gras à chaîne courte

a – Les récepteurs

Trois récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des AGCC. Ces récepteurs couplés à la protéine G (GPR), sont capables de reconnaître des acides gras, à chaînes courtes

ou longues, mais également d'autres dérivés lipidiques. Trois GPR sont impliqués dans la reconnaissance des AGCC, à savoir GPR41 (également appelé Free Fatty Acid Receptors 3 ou FFAR3), GPR43 (ou FFR2) et GPR190A (Brown et al., 2003; Le Poul et al., 2003; Nilsson et al., 2003). GPR43 est capable de reconnaître les trois AGCC majeurs même si il présente une plus forte affinité pour l'acétate (acétate > propionate > butyrate) contrairement au GPR41 qui présente une plus forte affinité pour le propionate (propionate > butyrate > acétate) (Le Poul et al., 2003). Le GPR109a, quant à lui, ne reconnaît que le butyrate et la vitamine B3 (ou niacine).

Exprimés au niveau des cellules épithéliales, ces récepteurs sont impliqués dans le métabolisme. Ils jouent aussi un rôle dans l'immunité grâce à leur présence sur un nombre important de cellules du système immunitaire aussi bien innée qu'adaptatif. En effet, les neutrophiles (GPR41, GPR43, GPR109A), les monocytes et macrophages (GPR41, GPR43, GPR109A), les cellules dendritiques (GPR41, GPR109A), les éosinophiles (GPR43) ou encore les cellules T et B et les Treg (GPR43) expriment ces récepteurs (Brown et al., 2003; Le Poul et al., 2003; Singh et al., 2014a; Smith et al., 2013).

a/1 - Structure et activation du récepteur

Les GPR sont composés de 7 domaines transmembranaires associés à trois sous-unité : $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$ (Rosenbaum et al., 2009). Chez l'homme, on retrouve quatre sous-unités alpha différente ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{11/12}$) induisant chacune des voies de signalisation différentes (Rosenbaum et al., 2009). Plusieurs sous-unité $G\alpha$ peuvent être présentes sur un même récepteur. L'activation du GPR, par son ligand endogène spécifique ou son agoniste pharmacologique, induit un changement de conformation des domaines transmembranaires permettant le transfert d'un phosphate au niveau du guanosine diphosphate (GDP) présent sur la sous-unité $G\alpha$. La synthèse d'un guanosine triphosphate (GTP) à partir du GDP entraîne la libération des différentes sous-unités du récepteur afin d'activer plusieurs voies de signalisation (Oldham and Hamm, 2008) (Figure 8).

Afin de prévenir une activation trop importante des GPR, des protéines appelées RGS (regulators of G-protein signaling), sont capables de réguler cette activation via l'hydrolyse du GTP néoformé au niveau de la sous-unité $G\alpha$. La GPR kinase (GRK) participe également à la régulation de l'activation du GPR. Cette kinase induit une phosphorylation du récepteur induisant le recrutement de la β -arrestine, protéine cytosolique qui va induire l'endocytose du récepteur (Chai et al., 2013). Cette endocytose permet de séparer les AGCC des GPR afin de

stopper leur activation (Figure 8). Pour autant, l'endocytose du GPR par la β -arrestine peut également avoir un effet anti-inflammatoire.

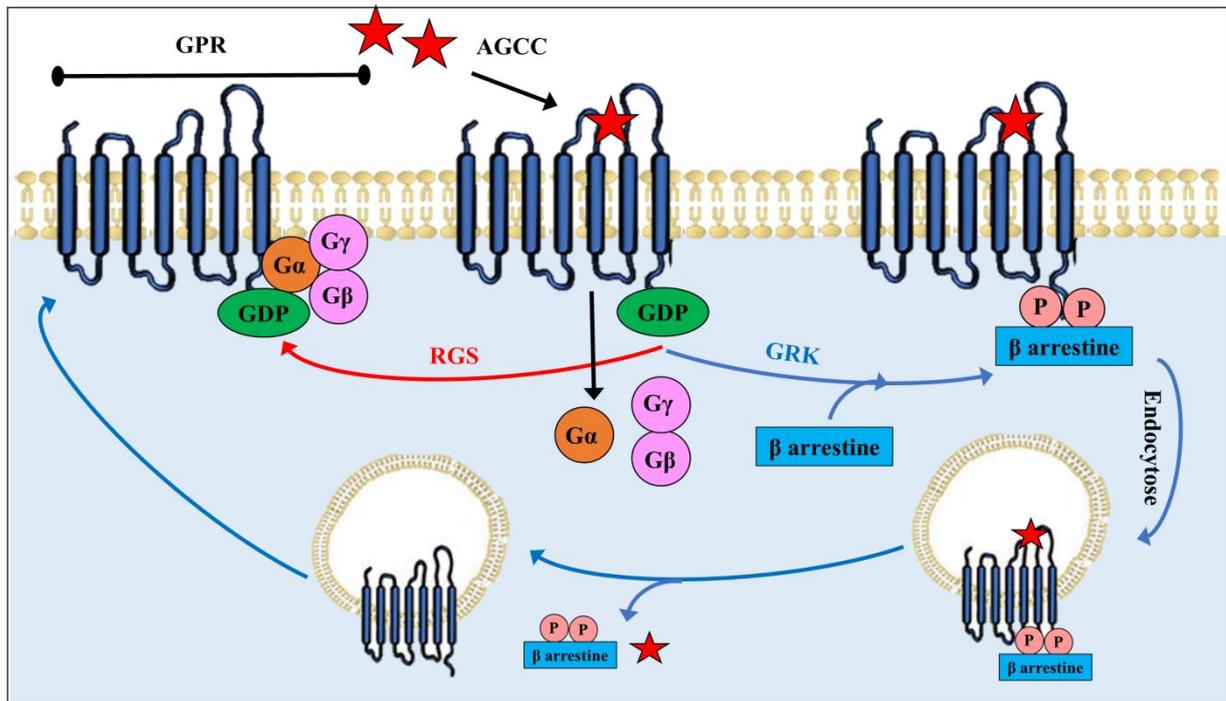


Figure 8 : Activation des GPR. Le GPR est composé de 7 domaines transmembranaires associés à trois sous-unité : $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. Ces sous-unités sont libérées suite au changement de conformation du GDP en GTP, changement pouvant être régulé par le RGS. L'activation trop importante du GPR peut entraîner l'activation de GRK permettant le recrutement de la β -arrestine. Cette dernière induit l'endocytose du récepteur et la séparation de son ligand. (Figure inspirée de (Priyadarshini et al., 2018))

a/2 – Voie de signalisation pro et anti-inflammatoire des GPR

Les sous-unités $G\alpha$ activées peuvent se lier et réguler l'activité de plusieurs molécules effectrices, générant une cascade de signalisation aboutissant à des réponses cellulaires spécifiques. Il a été montré que l'activation des GPR était associée à l'activation des voies de signalisation des mitogen-activated protein kinases (MAPK), de NF- κ B, de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et de la rapamycine (mTOR) (Seljeset and Siehler, 2012). Les voies MAPK et NF- κ B ont surtout des conséquences sur la mise en place de réponse inflammatoire tandis que les autres voies régulent la croissance et la prolifération cellulaire.

La sous-unité $G\alpha_{i/o}$, seule sous-unité exprimée par les trois récepteurs (Martin et al., 2009), joue un rôle majeur dans l'activation de la voie MAPK uniquement lors de l'activation de GPR41 et GPR43. L'activation de cette voie, via la phosphorylation des kinases ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) et de p38 MAPK, est impliquée dans la régulation de multiples fonctions cellulaires. La voie de signalisation ERK est un important régulateur de la prolifération cellulaire, alors que JNK et p38MAPK sont

associées à des processus inflammatoires. L'activation de GPR41 et GPR43 entraîne la phosphorylation et l'activation des kinases ERK1, ERK2 et p38 (Seljeset and Siehler, 2012). Ces dernières induisent la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, CXCL1 et CXCL2. La délétion des récepteurs GPR41 ou GPR43 chez la souris induit une diminution de la production d'IL-6 et retarde l'expression d'INF- γ et des chimiokines CXCL1 et CXCL2 (Kim et al., 2013) (Figure 9).

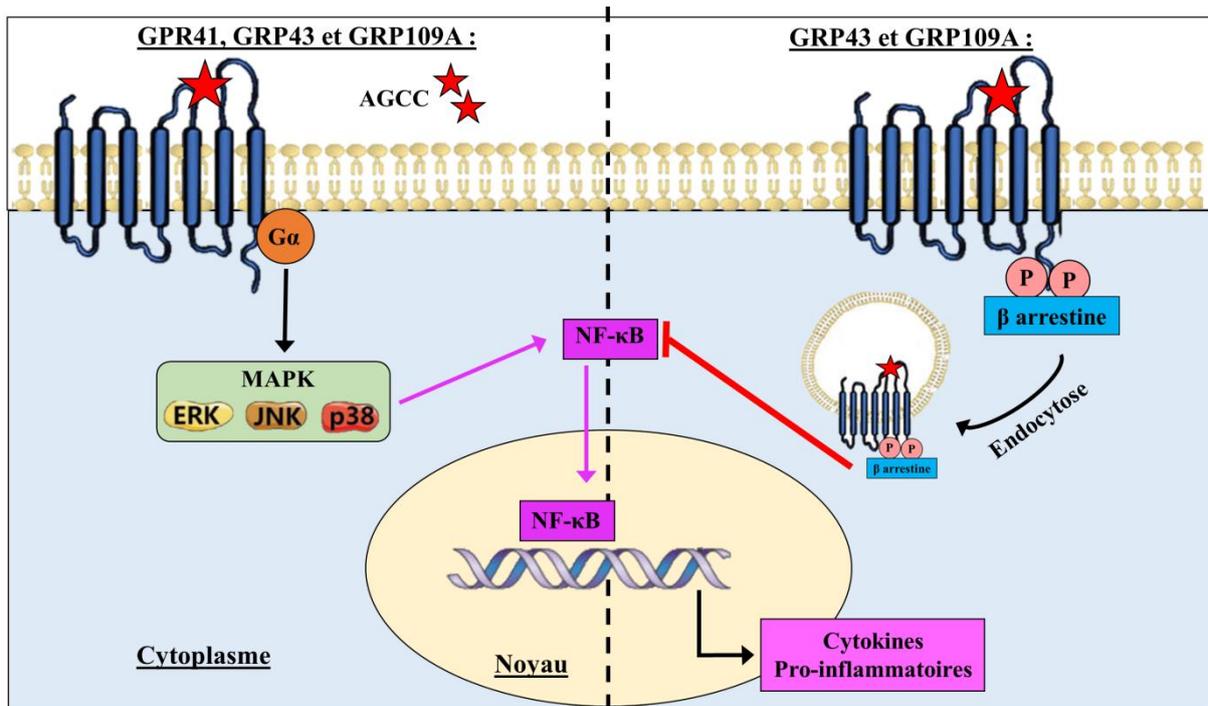


Figure 9 : Signalisation des GPR. La sous unité $G\alpha$ entraîne l'activation de la voie MAPK et induit la transcription de cytokines pro-inflammatoires via la voie NF- κ B. L'endocytose par la β -arrestine des GPR43 et GPR109A inhibe la transcription de ces cytokines en inhibant directement NF- κ B. (Figure inspirée de (Li et al., 2018; Priyadarshini et al., 2018))

Alors que l'activation des GPR41 et GPR43 semble jouer un rôle dans la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire, il a été montré que l'activation de GPR43 et de GPR109A avait un effet anti-inflammatoire notamment via l'inhibition de la voie NF- κ B (Figure 9). Parmi les gènes régulés par NF- κ B, on retrouve notamment des cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-5, IL-8, IL-12, IL-18), des chimiokines (MIP-1, MIP-2, MCP-1), et des enzymes (iNOS, COX-2) (Baeuerle and Baichwal, 1997). L'inhibition de la voie NF- κ B par les GPR nécessite l'aide de GRK et de la β -arrestine (Chai et al., 2013). L'endocytose du GPR, suite à la fixation de la β -arrestine est capable d'inhiber la voie NF- κ B. En effet, l'activation du GPR43 induit une inhibition de la production d'IL-6 et d'IL-1 β , production restaurée lors de l'inactivation de la β -arrestine (Gao et al., 2004) (Figure 9).

B – Les transporteurs

Le passage de la majorité des AGCC à travers la muqueuse implique un transport actif véhiculé par deux principaux transporteurs: le transporteur monocarboxylate 1 (MCT-1) et le transporteur monocarboxylate couplé au sodium 1 (SMCT-1). MCT-1 et SMCT-1 sont tous deux fortement exprimés sur les colonocytes et également le long du tractus gastro-intestinal, de l'intestin grêle au caecum (Iwanaga et al., 2006). De plus, MCT-1 est également fortement exprimé sur les lymphocytes, suggérant un rôle important des AGCC sur ces cellules (Halestrap and Wilson, 2012). Les AGCC, principalement l'acétate et le propionate, sont également capables de passer la barrière intestinale par diffusion passive afin de se retrouver dans la veine porte.

3 - Modulation de l'acétylation des histones

La modulation de l'acétylation des histones est un mécanisme clé dans la régulation de la réponse biologique et immunitaire par les AGCC.

L'ADN est compacté sous la forme d'une chromatine dont l'élément structurel de base est le nucléosome. Ce dernier est constitué de 8 histones autour duquel 147 paires de bases d'ADN sont enroulées. La modulation des histones est primordiale pour induire la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. L'acétylation de lysine sur les histones présentes dans le nucléosome, par l'histone acétyl-transférase (HAT), augmente l'accessibilité à la machinerie transcriptionnelle et ainsi l'expression de certains gènes (MacDonald and Howe, 2009). L'expression des gènes est également régulée par les histones désacétylases (HDAC) qui vont permettre d'inhiber ou de stopper la transcription au niveau du nucléosome (Kim and Bae, 2011).

Les AGCC et plus particulièrement le butyrate, jouent un rôle d'inhibiteur de l'activité des HDAC induisant une hyper-acétylation des histones (Johnstone, 2002). Cette dernière modifie donc l'accessibilité des facteurs de transcription à des gènes spécifiques, provoquant ainsi des altérations de l'expression des gènes induites par les AGCC. Bien que le mécanisme exact expliquant l'inhibition des HDAC par les AGCC ne soit pas connu, ces derniers pourraient agir directement sur les HDAC en entrant dans les cellules via des transporteurs ou indirectement par l'activation des GPR. En effet, il a été montré que le transporteur SMCT-1 est nécessaire pour induire le blocage du développement des cellules dendritiques murines induit par le butyrate et le propionate (Singh et al., 2014b).

Cette inhibition d'HDAC par les AGCC joue un rôle dans la mise en place de la réponse anti-inflammatoire. Il a été montré *in vitro* que la stimulation de macrophages humains avec 1 mM d'acétate réduisait significativement l'activité HDAC induisant une diminution de la production de cytokines inflammatoires tels que ; IL-6, IL-8 et TNF- α (Kendrick et al., 2010). Le butyrate et le propionate jouent également un rôle anti-inflammatoire en réduisant la production de TNF- α chez des cellules mononuclées du sang périphérique humain stimulées avec du LPS (Usami et al., 2008).

III/ Les différents rôles du microbiote intestinal et des acides gras à chaîne courte

L'intestin et le microbiote forment un système écologique comprenant de nombreux composants cellulaires et moléculaires permettant de maintenir une réponse immunitaire adéquate, rapide et efficace tout en respectant l'intégrité morphologique et fonctionnelle de l'intestin. Le microbiote intestinal contribue fortement au maintien de l'intégrité de la paroi intestinale tout en participant à la modulation et à la maturation de la réponse immunitaire contre les pathogènes.

1 - Impact du microbiote sur l'intégrité intestinale

L'intégrité de l'intestin est un facteur essentiel dans le maintien de l'homéostasie des muqueuses et sa perturbation a été directement mise en cause dans certaines pathologies. Cette intégrité est assurée par la séparation efficace entre le contenu luminal intestinal et l'hôte due en partie à une barrière épithéliale efficace et à la mise en place de réponses antibactériennes. La perturbation de cette intégrité de l'intestin a été incriminée dans diverses maladies intestinales telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les maladies cœliaques, le syndrome du côlon irritable et le cancer colorectal (Votoloni et al., 2012). Le microbiote intestinal et plus particulièrement les AGCC qu'il produit, jouent un rôle bénéfique dans le maintien de l'intégrité intestinale et sont bénéfiques dans certaines pathologies.

a – Les AGCC : sources énergétiques des cellules épithéliales

Comme expliqué précédemment, les AGCC et plus particulièrement le butyrate, représentent 60 à 70% des besoins énergétiques des colonocytes. Le butyrate joue un rôle essentiel dans la prolifération et la différenciation de ces cellules (Suzuki et al., 2008). L'utilisation de souris Germ-Free a permis de mettre en évidence l'importance des AGCC dans l'intégrité de la paroi intestinale. En effet, ces souris, déficientes en bactéries et donc en

AGCC, présentent une diminution de l'expression de certaines enzymes clés impliquées dans le métabolisme des acides gras dans les mitochondries (Tazoe et al., 2008). Ces colonocytes présentent un déficit au niveau de la respiration mitochondriale pouvant conduire à l'autophagie et à la perturbation de l'intégrité intestinale. Le traitement de ces souris avec du butyrate permet de restaurer l'activité mitochondriale des colonocytes (Donohoe et al., 2011).

Alors que le butyrate participe à la croissance de colonocytes sains, il est capable d'avoir une action antitumorale en inhibant la croissance des colonocytes cancéreux (Comalada et al., 2006; Vinolo et al., 2011). En bref, un changement de métabolisme au sein des cellules cancéreuses, passant d'un métabolisme oxydatif à une glycolyse, entraîne la formation d'acide lactique. Ce dernier, entrave la métabolisation du butyrate, entraînant son accumulation dans les cellules, favorisant ainsi l'inhibition des HDAC et donc l'arrêt de la croissance cellulaire (Vinolo et al., 2011). La concentration en butyrate au sein d'une cellule cancéreuse est trois fois supérieure à la concentration standard mesurée sur un colonocyte « sain » (Donohoe et al., 2012). Pour autant, l'expression de GPR41 est nettement réduite ou totalement absente dans les tissus d'adénocarcinome colorectal par rapport au tissu normal du côlon chez l'homme (Sivaprakasam et al., 2016; Tang et al., 2011). La restauration de l'expression de ce récepteur au sein de lignées cellulaires cancéreuses du côlon induit l'apoptose et inhibe la prolifération cellulaire (Tang et al., 2011).

b – Les AGCC : renforcement de la perméabilité intestinale

En plus de participer à la prolifération et à la différenciation des cellules épithéliales dans le colon, le butyrate joue un rôle clé dans l'intégrité de la barrière épithéliale intestinal via la régulation de l'expression des protéines de jonctions serrées (Ohata et al., 2005). En effet, le butyrate augmente l'expression de la claudine-1, de Zonula Occludens-1 (ZO-1) (Wang et al., 2012). *In vitro*, la supplémentation du butyrate sur une monocouche de cellules Caco-2 améliore la résistance trans-épithéliale (Tolhurst et al., 2012). L'utilisation de 2,4,6-trinitrobenzène sulfonic acid (TNBS), afin d'induire des dommages au niveau de l'épithélium intestinal, a montré une réduction de la perméabilité intestinale chez des souris GPR41^{-/-} ou GPR43^{-/-} comparé à des souris contrôles (Wang et al., 2015).

Le contrôle de la perméabilité intestinale est un élément clé dans certaines pathologies puisque une perméabilité accrue est associée à la translocation de bactéries et / ou de leurs composants de la paroi cellulaire, ce qui déclenche une cascade inflammatoire (Cani et al., 2008). Il a d'ailleurs été montré qu'une augmentation de la perméabilité intestinale avait des

conséquences en dehors de l'intestin avec notamment des conséquences sur les allergies alimentaires et l'asthme (Hijazi et al., 2004; Perrier and Corthésy, 2011).

2 - Impact du microbiote intestinal sur l'immunité intestinale

Le système immunitaire intestinal fait face à un défi unique par rapport aux autres organes, car il doit continuellement faire face à une charge bactérienne imposante. De plus, il doit être capable de distinguer les bactéries pathogènes de celles qui résident naturellement dans l'intestin. Une tolérance inappropriée aux agents pathogènes peut faciliter l'infection alors qu'une réaction immunitaire contre le microbiote commensal, inoffensif, serait à la base de certaines pathologies, comme les MICI (Maloy and Powrie, 2011).

Pour éviter cela, l'une des fonctions clés du microbiote intestinal est de participer à l'éducation du système immunitaire intestinale et à la stimulation de certaines cellules immunitaires. Les AGCC et leurs récepteurs sont fortement impliqués dans ces phénomènes puisque la diminution de l'expression des GPR a été associée à l'apparition de troubles intestinaux comme les MICI (Kim et al., 2013; Macia et al., 2015).

a – Education et induction de l'immunité intestinale

Au cours des dernières années, le domaine de l'immunologie a été révolutionné par la compréhension croissante du rôle fondamental du microbiote dans l'induction, l'éducation et la fonction du système immunitaire des mammifères. Des études réalisées à partir de souris Germ-Free ou de souris traitées aux antibiotiques ont permis de mettre en avant le concept de symbiose, entre l'hôte et le microbe intestinal, et l'importance de ce dernier dans l'homéostasie tissulaire locale et systémique (Gensollen et al., 2016). Il a été montré que la simple reconstitution du microbiome intestinal chez des souris Germ-Free était suffisante pour rétablir l'immunité au sein des muqueuses intestinales (Ekmekci et al., 2017).

La tolérance de la flore bactérienne résidente est un élément clé du fonctionnement des cellules immunitaires au niveau de l'intestin. Elle s'explique par la capacité du microbiote intestinal à promouvoir et à calibrer aussi bien l'immunité innée qu'adaptative (Molloy et al., 2012). En effet, la muqueuse intestinale est constamment exposée à une charge antigénique importante, à laquelle la flore bactérienne résidente contribue de manière prédominante. Pour autant, l'éducation du système immunitaire empêche la mise en place d'une réponse inadéquate contre ces bactéries commensales pouvant être nuisible aussi bien pour l'hôte que pour le microbiote intestinal. Cette tolérance du système immunitaire par rapport au

microbiote intestinal repose essentiellement sur l'activation de certains récepteurs et la stimulation de cellules régulatrices par les bactéries.

a/1 – Stimulation des récepteurs

Afin de permettre au système immunitaire de faire la différence entre les bactéries commensales et les bactéries pathogènes, le microbiote intestinal joue un rôle prépondérant dans la maturation du système immunitaire notamment via la stimulation de certains récepteurs présents sur les cellules immunitaires (Nakanishi et al., 2015; Thaïss et al., 2016). En effet, les bactéries pathogènes et commensales interagissent avec le système immunitaire de l'hôte par le biais de ligands conservés (Sansonetti and Di Santo, 2007).

Un nombre important de ces ligands, ou PAMPS, activent les récepteurs de la famille des TLR (Sansonetti and Di Santo, 2007). Ces récepteurs sont largement présents au niveau de la membrane des cellules épithéliales et lymphoïdes de l'intestin. Par exemple, le TLR-4 est essentiel pour la reconnaissance des lipopolysaccharides, TLR-5 pour la reconnaissance de la flagelline bactérienne et TLR-9 pour la reconnaissance des sites CpG situé au niveau de l'ADN (Lee et al., 2006; Rakoff-Nahoum et al., 2004). L'activité des TLR diminue au cours des premières semaines de vie, permettant potentiellement le développement d'un microbiote intestinal stable. De plus, l'activation du TLR par des antigènes appartenant au microbiote intestinal sain induit l'inhibition des réactions inflammatoires et est donc essentiel au maintien de l'homéostasie intestinale (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Par ailleurs, la stimulation des TLR par des PAMPs provenant de bactéries pathogènes entraîne la mise en place de la réponse immunitaire entraînant la transcription, via l'activation de NF- κ B, de cytokines, chimiokines et autres effecteurs de la réponse immunitaire humorale (Belkaid and Hand, 2014).

Les NLR jouent également un rôle dans la mise en place de la réponse inflammatoire. NOD1 et NOD2 sont exprimés par les cellules de Paneth de l'épithélium intestinal ainsi que dans de nombreux types de cellules immunitaires (Biswas et al., 2012; Caruso et al., 2014). Ils reconnaissent le peptidoglycane présent à la surface des bactéries entraînant, comme les TLR, la mise en place d'une réponse immunitaire NF- κ B dépendante (Inohara et al., 2001). Il a par ailleurs été montré que l'absence de l'expression de NOD2, chez la souris, était à l'origine de la mise en place d'une dysbiose du microbiote intestinal (Petnicki-Ocwieja et al., 2009).

En plus de jouer un rôle dans l'éducation du système immunitaire, la stimulation de ces récepteurs joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale. En effet, des études réalisées sur des souris déficientes en TLR4, TLR5 ou TLR9 ont montré une susceptibilité accrue au développement de colite induite par un traitement au DSS (Lee et al., 2006; Rakoff-Nahoum et al., 2004).

a/2 – Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) représentent une sous-population de lymphocytes T CD4+. Ils sont l'une des pièces centrales dans la mise en place de la tolérance immunologique notamment face au microbiote intestinal, en régulant la prolifération d'autres lymphocytes T effecteurs grâce notamment à la synthèse d'IL-10 (Izcue et al., 2006). Les cellules Treg sont définies par le facteur de transcription Foxp3, indispensable à la fonction et au développement des cellules Treg (Josefowicz et al., 2012). Chez l'homme, les patients ayant un déficit en cellules Treg présentent des diarrhées et parfois des colites en plus d'autres manifestations auto-immunes (Josefowicz et al., 2012). Des observations similaires ont été faites chez des personnes présentant un défaut, au niveau de la synthèse d'IL-10 ou au niveau de son récepteur (Engelhardt et al., 2013; Franke et al., 2008). Ainsi, la tolérance des lymphocytes Treg vis-à-vis du microbiote intestinal est cruciale pour le maintien de l'homéostasie immunitaire et la prévention des MICI.

Le microbiote intestinal a une influence directe sur les Treg au niveau de l'intestin. En effet, les souris Germ-Free présentent une réduction de la fréquence de ces cellules comparées aux souris conventionnelles (Geuking et al., 2011). Pour autant, ce processus ne nécessite pas de microbiote complexe, puisque la recolonisation avec certaines bactéries est capable d'induire la prolifération des Treg (Geuking et al., 2011). La complexité du microbiote intestinale impacte directement le répertoire du TCR présent à la surface des Treg. En effet, l'usage d'antibiotiques induit une diminution de ce répertoire (Cebula et al., 2013) montrant ainsi l'importance du microbiote intestinal dans l'éducation des Treg.

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'activation des lymphocytes T naïfs en lymphocyte Treg producteurs d'IL-10. La production de TGF- β , facteur important dans la génération de cellules Treg (Chen et al., 2003), peut être induite par les cellules épithéliales suite à la stimulation par certaines bactéries telle que les *Clostridium* (Atarashi et al., 2013). L'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) peut être produite par les DC et les cellules épithéliales intestinales en réponse aux bactéries intestinales pour favoriser la différenciation des cellules

Treg (Munn and Mellor, 2013) (Figure 10). Le polysaccharide A (PSA), issu des vésicules de la membrane externe de certaines bactéries, a également été associé à la différenciation des Treg via l'activation du TLR2 présent à la surface des cellules dendritiques (Chu et al., 2016) (Figure 10).

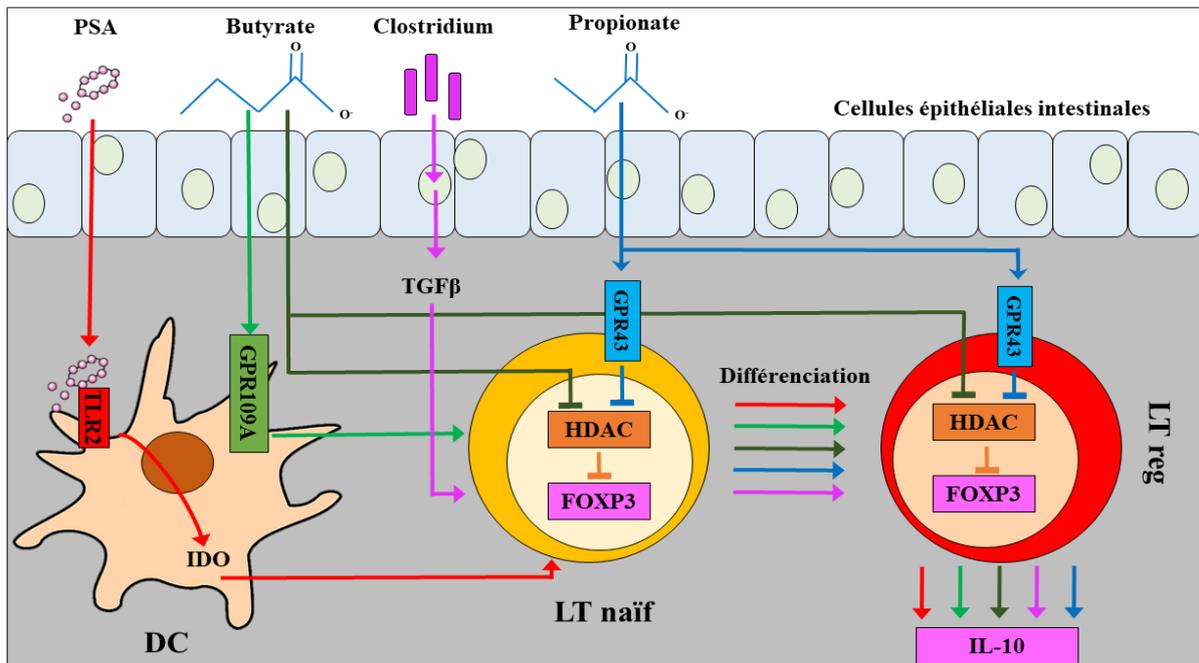


Figure 10 : Effet des AGCC sur la différenciation et l'activation des LTreg. Plusieurs stimuli bactériens vont entraîner la différenciation des LT naïf en LTreg producteur d'IL-10. PSA reconnue par le TLR2 à la surface des DC entraîne la production d'IDO. En réponse à une stimulation par Clostridium, les cellules épithéliales intestinales produisent le TGFβ. IDO et TGFβ sont capables d'induire la différenciation des LT naïfs. Le butyrate va stimuler le GPR109A présent sur les DC ou directement inhiber l'activité de l'HDAC sur les LT naïfs et les LT reg. Cette inhibition de l'HDAC est également induite chez ces deux types cellulaires par le propionate suite à la stimulation du GPR43. L'inhibition de l'HDAC augmente la transcription de FOXP3 nécessaire à la différenciation en LTreg et à la production d'IL-10. (Figure inspirée de (Hoeppli et al., 2015; Russler-Germain et al., 2017))

Les AGCC et leurs récepteurs jouent également un rôle majeur dans l'expansion et l'activation des lymphocytes Treg. Il a été montré qu'un traitement à base d'AGCC était suffisant pour induire la prolifération de ces cellules chez des souris Germ-Free (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013; Smith et al., 2013). De plus, GPR43 semblerait jouer un rôle majeur dans l'expansion de ces cellules puisque les souris déficientes pour ce récepteur ont moins de Treg, produisent moins d'IL-10 et présentent une inflammation intestinale (Smith et al., 2013; Tan et al., 2016). Pour autant, parmi les trois principaux AGCC, le butyrate s'est révélé être le plus puissant inducteur des Treg au niveau de l'intestin (Furusawa et al., 2013). L'une des principales hypothèses, expliquant l'effet des AGCC sur la prolifération et

l'activation des Treg, implique l'inhibition de l'HDAC par ces métabolites. En effet, le butyrate et le propionate inhibe l'HDAC, provoquant une augmentation de l'acétylation de l'histone au niveau du site de transcription de Foxp3, augmentant ainsi son expression (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013; Park et al., 2015) (Figure 10). Il a été prouvé que l'effet du propionate sur la différenciation et l'activation des Treg était GPR43 dépendante (Smith et al., 2013) alors que l'effet du butyrate n'est pas GPR109 dépendante (Arpaia et al., 2013). Enfin, une hypothèse suggère l'implication des DC CD103+ comme intermédiaire. Ces cellules seraient activer via le GPR43 afin de produire certaines cytokines induisant la différenciation des Treg (Tan et al., 2016).

b – Contrôle de la charge bactérienne intestinale

L'une des fonctions importantes du système immunitaire est le contrôle de notre relation avec nos différents microbiotes. Ainsi, la concentration en cellules immunitaires est plus importante dans des sites colonisés par des bactéries commensales tels que la peau, le poumon ou le tractus gastro-intestinal. De plus, le microbiote sain vise à protéger sa propre niche écologique de potentiels pathogènes par l'intermédiaire de l'immunité de l'hôte. Une stratégie centrale, utilisée par l'hôte pour maintenir sa relation homéostatique avec le microbiote, consiste à minimiser le contact entre les microorganismes et la surface des cellules épithéliales, limitant ainsi l'inflammation des tissus et la translocation microbienne. Dans le tractus gastro-intestinal, qui abrite la plus grande densité de bactéries commensales, cette ségrégation est réalisée par l'action combinée des cellules épithéliales, du mucus, des IgA, des peptides antimicrobiens et des cellules immunitaires (Hooper and Macpherson, 2010).

b/1 – Synthèse d'immunoglobulines A

Chez les mammifères, environ 70% de la production totale d'IgA dans le corps est induite par le microbiote intestinal (Macpherson et al., 2000). De plus, la production quotidienne d'IgA dans la lumière intestinale est supérieure à la production quotidienne totale d'IgG (Gill et al., 2006). Ces immunoglobulines sont le fruit de la stimulation des cellules dendritiques par des bactéries ayant réussi à passer la barrière intestinale. Ces cellules, situées au niveau des plaques de Peyer et dans la lamina propia, phagocytent les bactéries et présentent les peptides microbiens aux lymphocytes T et B au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques (Macpherson and Uhr, 2004; Rescigno et al., 2001). Les

lymphocytes B se différencient alors en plasmocytes et produisent des IgA spécifiques à la bactérie phagocytée au niveau de la lamina propria (Johansson and Kelsall, 2005).

Il a été montré que l'acétate peut influencer la sécrétion d'IgA (Wu et al., 2017) via son interaction avec le GPR43. En effet, les souris GPR43^{-/-} produisent moins d'IgA que les souris conventionnelles et un traitement en acétate augmente le taux de sécrétion en IgA seulement chez les souris conventionnelles. D'après l'équipe de Wu, l'acétate active le GPR43 présent sur les DC, ce qui induit l'expression de l'Aldh1/2 (aldehyde dehydrogenase), une enzyme nécessaire au métabolisme de la vitamine A en acide rétinol. Ce dernier est nécessaire à la production d'IgA par les plasmocytes (Wu et al., 2017).

b/2 – Synthèse de peptides antimicrobiens

En plus des IgA, le microbiote intestinal peut également réguler la production d'AMP. Ces molécules sont principalement produites par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales intestinales et permettent aussi bien de contrôler la localisation du microbiote que sa composition. Parmi ces AMP on retrouve, les défensines (α et β), les lectines de type C (REG3 β et REG3 γ), les ribonucléases (par exemple, l'angiopoïétine 4 (ANG4)), la cathélicidine (LL-37) et les protéines S100. Alors que les α -défensines sont capables de pénétrer dans la lumière intestinale et impacter la composition du microbiote intestinal (Salzman et al., 2010), d'autres AMP, comme RegIII γ limitent la pénétration des bactéries présentes à la surface des cellules épithéliales et participent donc au maintien de la ségrégation entre le microbiote et les cellules épithéliales de l'hôte sans pour autant modifier la composition du microbiote (Vaishnava et al., 2011).

Certains AMP, telles que les α -défensines et les β -défensines, sont exprimées de manière constitutive, tandis que d'autres, telles que ANG4 et REG3 β , sont induites à la suite d'une stimulation microbienne via les TLR (Cash et al., 2006; Hooper et al., 2003) ou via par exemple les AGCC (Schauber et al., 2003). Il a notamment été montré que le butyrate augmente l'expression de peptides antimicrobiens (LL-37) par les cellules épithéliales de l'intestin chez le lapin et l'homme (Raqib et al., 2006).

b/3 – Sécrétion de mucus

La sécrétion de mucus est la première ligne de défense chez les mammifères. Le mucus sépare l'épithélium de l'environnement luminal, ce qui contribue à l'intégrité de l'intestin en limitant l'accès physique des bactéries à l'épithélium, limitant ainsi les risques

d'infection et d'inflammation (Tolhurst et al., 2012). Une altération dans la sécrétion de mucus a été associée à certaines pathologies dont les MICI (Swidsinski et al., 2009).

La sécrétion de mucus est médiée par les cellules caliciformes, qui sont des cellules épithéliales spécialisées produisant la mucine, une glycoprotéine hautement glycosylée qui polymérise pour former le mucus. Ce gel macromoléculaire de 150 μm d'épaisseur adhère à la surface apicale des cellules épithéliales, fournissant ainsi une barrière physique qui sépare l'épithélium des bactéries présentes au niveau de la lumière intestinale (Pelaseyed et al., 2014). Le mucus de l'estomac et du côlon est particulièrement épais et se compose de deux couches: une couche compacte interne (50 / 200 μm), empêchant la pénétration physique des bactéries et une couche externe (70–150 μm) composée principalement de glycanes (Cucchiara et al., 2009). Cette couche de mucus est principalement composée des mucines MUC2, MUC5A/B et MUC6 (Tolhurst et al., 2012).

Les bactéries jouent un rôle majeur dans la production de mucus. En effet, les souris Germ-Free possèdent moins de cellules caliciformes et une couche de mucus plus mince comparées à des souris conventionnelles (Petersson et al., 2011). Une stimulation avec des produits bactériens tels que le LPS et le peptidoglycane suffit pour induire la production de mucus chez ces souris Germ-Free (Petersson et al., 2011). Bien que les mécanismes n'aient pas encore été identifiés, les AGCC jouent également un rôle dans la production de mucus. La supplémentation en butyrate et en propionate sur une lignée de cellules caliciformes induit une augmentation de la transcription et de la sécrétion de MUC2 (Burger-van Paassen et al., 2009; Gaudier et al., 2004; Willemsen et al., 2003).

c – Effet du microbiote intestinal sur les cellules de l'immunité innée

c/1 : Les neutrophiles

Le GPR43 est fortement exprimé à la surface des neutrophiles et semble être crucial pour réguler la migration de ces cellules dans des cas de maladies inflammatoires aiguës et chroniques (Nilsson et al., 2003). En effet, l'activation du GPR43 par les cellules épithéliales intestinales induit la synthèse de CXCL1 et CXCL2, deux chimiokines responsables de la migration des neutrophiles (Vinolo et al., 2009, 2011). Pourtant, certaines études *in vitro* semblent indiquer que la seule présence d'AGCC est suffisante pour induire la migration des neutrophiles par un phénomène de chimiotaxie (Kamp et al., 2016; Vinolo et al., 2011). Si les AGCC induisent le recrutement des neutrophiles, ils participent également à leur régulation. En effet, des modèles de colites aiguës ou chroniques ont montré que la déficience en GPR43,

chez la souris, entraîne la mise en place d'une réponse inflammatoire non contrôlée caractérisée principalement par une augmentation de l'infiltration des neutrophiles et de leur l'activité (augmentation myéloperoxydase (MPO)) et une augmentation des dommages épithéliaux (Maslowski et al., 2009).

En plus de contrôler leur recrutement, les AGCC influencent l'activité des neutrophiles. Par exemple, un traitement à base de butyrate et de propionate diminue la production de TNF- α (Vinolo et al., 2011) mais favorise la production de ROS (Maslowski et al., 2009). D'autres fonctions des neutrophiles, comme leur capacité à phagocyter les microorganismes, la production d'oxyde nitrique (NO) et leur survie semblent être contrôlées par les AGCC (Rodrigues et al., 2016).

c/2 – Les macrophages

Bien que les bactéries soient en grande partie confinées dans la lumière intestinale, certaines bactéries peuvent pénétrer la barrière épithéliale. Les macrophages présents au niveau de la lamina propria sont chargés de phagocyter et d'éliminer ces bactéries (Kelsall, 2008). Ces cellules expriment le GPR41, GRP43 et GPR109A.

Le butyrate a été décrit comme ayant un effet anti-inflammatoire sur les macrophages en diminuant notamment la production de TNF- α , MCP-1 (ou CCL2) et d'IL-6 via l'activation du GPR41 (Ohira et al., 2013). Par ailleurs, le GPR109A semble jouer un rôle dans l'immunité pro-inflammatoire puisque son expression est augmentée suite à la stimulation avec de l'IFN- γ (Schaub et al., 2001). L'absence de microbiote impact également la réponse de ces cellules puisque la stimulation des bactéries commensales contribue à la production d'IL-1 β (Franchi et al., 2012). Pour autant, la production en NO semble inhiber chez les macrophages stimulés par le propionate, cet effet est associé à l'inhibition de l'activation de NF- κ B (Usami et al., 2008).

c/3 – Les cellules dendritiques

Comme expliqué précédemment, les DC sont des cellules clés dans la mise en place de la sécrétion d'IgA puisqu'elles induisent, suite à la phagocytose d'un pathogène, la différenciation des cellules B en plasmocytes. Il a été montré que la présence de GRP43 à la surface des DC favorise la production d'IgA au niveau de l'intestin (Wu et al., 2017).

Ces cellules, comme dans le poumon, jouent leur rôle de CPAg et établissent le lien entre immunité innée et immunité adaptative. Il a été montré que les AGCC jouaient un rôle dans ce phénomène. En effet, une étude a montré qu'un traitement en butyrate induisait un retard dans la maturation des DC humaines, caractérisé par une inhibition de la formation des dendrites et une diminution de l'expression de marqueurs de surface tels que les molécules CD80, CD83, CD1a et le MHC de classe II. Ceci impacte directement la capacité de ces cellules à stimuler les lymphocytes T (Liu et al., 2012). Par ailleurs, cette même étude montre un changement dans le type de réponse induit par les DC puisque le butyrate diminue la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12p40 et IFN- γ) et augmente la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10). Cet effet modulateur du butyrate a été montré chez des souris déficientes pour le récepteur GPR109A. Ces souris présentent un profil pro-inflammatoire avec plus de cellules T CD4⁺ productrices d'IL-17 et moins de cellules produisant de l'IL-10 (Singh et al., 2014a).

IV/ L'axe poumon-intestin et les maladies respiratoires

1 - Microbiote pulmonaire

Le poumon, et plus particulièrement, les voies respiratoires inférieures, ont longtemps été considérés comme un organe stérile. Ceci était principalement dû à la difficulté de cultiver les bactéries pulmonaires et de collecter des échantillons de façon non invasive. Par ailleurs, le poumon est une zone extrême pour le développement de bactéries notamment à cause de la présence d'oxygène, de la température et de la pénurie en nutriment. Au cours de ces 10 dernières années, les progrès en métagénomique ont permis de mettre en lumière la présence d'un microbiote au sein du tractus respiratoire.

Le microbiote intestinal et pulmonaire sont similaires au niveau des phyla qui les composent (Mahowald et al., 2009). Les Bacteroidetes, Firmicutes et Proteobacteria représentent la majorité des phyla bactériens au sein de ces deux organes. C'est au niveau de la composition en espèces bactériennes que ces deux microbiotes se différencient. Par exemple, *Faecalibacterium prausnitzii* et *Bacteroides thetaiotaomicron* sont présents dans le tractus intestinal et non pulmonaire (Lopez-Siles et al., 2012; Mahowald et al., 2009), et les espèces bactériennes des genres *Haemophilus*, *Pseudomonas* et *Streptococcus* sont fréquemment retrouvées dans les voies respiratoires et non dans l'intestin (Charlson et al., 2011; Morris et al., 2013). Les poumons présentent des similitudes avec la cavité buccale au niveau de la composition de leur microbiote (Bassis et al., 2015; Morris et al., 2013).

En ce qui concerne les AGCC, peu de données sont connues concernant leur présence au sein du tractus respiratoire. Le poumon n'est pas un espace propice à la production d'AGCC, principalement en raison de l'absence de substrats. Pourtant, les AGCC ont été identifiés comme bénéfiques dans certaines pathologies pulmonaires. Une diffusion des AGCC dans les poumons depuis l'intestin pourrait expliquer les effets bénéfiques des AGCC dans le poumon (Trompette et al., 2014).

Comme pour le microbiote intestinal, le microbiote pulmonaire peut subir des perturbations directement corrélées à certaines pathologies. Une dysbiose de ce microbiote a notamment été décrite dans des cas de BPCO, d'asthme et de fibrose pulmonaire (Hilty et al., 2010; Pragman et al., 2012; Willner et al., 2012). Le microbiote pulmonaire, comme son homologue intestinal, joue donc un rôle dans certaines pathologies respiratoires.

2 - Impact des pathologies respiratoires sur l'intégrité intestinale

Au cours de ces dernières années, des études ont montré que les pathologies pulmonaires avaient des conséquences sur l'intestin, et inversement, mettant en avant le lien entre ces deux organes. Les maladies respiratoires chroniques, telles que l'asthme allergique et la BPCO, sont couramment associées à la présence de MICI et du syndrome de l'intestin irritable (Roussos et al., 2003; Rutten et al., 2014). A titre d'exemple, les personnes souffrant de BPCO présentent un risque 2 à 3 fois plus élevé de développer une MICI (Keely et al., 2012). De plus, 50% des patients atteints de MICI et 30% de SII sont susceptibles de développer une pathologie pulmonaire (inflammation et/ou altération des fonctions pulmonaires) (Keely et al., 2012; Yazar et al., 2001). Les personnes asthmatiques présentent des altérations fonctionnelles et structurelles de la muqueuse intestinale, et les patients atteints de BPCO ont généralement une perméabilité intestinale accrue (Rutten et al., 2014). Dans le cas de la BPCO, il a été montré que la fumée de cigarette, facteur majeur du développement de cette maladie, avait un impact sur le microbiote intestinal. Chez les fumeurs « sains », cet impact se caractérise par une augmentation de l'abondance des bactéries du genre *Prevotella* et une diminution du ratio Firmicutes / Bacteroidetes (Benjamin et al., 2012). Ces changements ont notamment été associés avec une inflammation intestinale pouvant dériver en MICI (Schwab et al., 2014).

3 - Effet du microbiote intestinal sur l'immunité pulmonaire

Au cours de ces dernières années, plusieurs études se sont penchées sur l'impact que pouvait avoir le microbiote intestinal dans les pathologies respiratoires. L'utilisation de modèle Germ-Free ou de traitements aux antibiotiques a permis de mettre en avant le rôle protecteur de ce microbiote dans l'allergie et les infections pulmonaires, qu'elles soient virales ou bactériennes (Chen et al., 2011; Ichinohe et al., 2011; Schuijt et al., 2016).

a – Asthme et maladies allergiques des voies respiratoires

Les maladies allergiques touchent plus d'un demi-milliard de personnes dans le monde. Le développement de l'allergie est clairement associé à certains facteurs génétiques et moléculaires, mais des facteurs environnementaux sont également impliqués. Certains facteurs environnementaux peuvent avoir une influence sur la composition et la fonctionnalité du microbiote intestinal. Des études récentes démontrent le rôle du microbiote intestinal dans l'asthme. Ainsi, les souris Germ-Free sont plus susceptibles aux maladies allergiques respiratoires, comparés aux souris conventionnelles (Olszak et al., 2012).

La réduction de la diversité du microbiote intestinal induit cette prédisposition aux allergies respiratoires (Abrahamsson et al., 2014; Bisgaard et al., 2011). Plusieurs études, chez l'homme, corroborées dans des modèles expérimentaux, ont ainsi démontré le lien entre la prise d'antibiotiques durant l'enfance et l'augmentation du risque de développer de l'asthme et des allergies respiratoires (Arrieta et al., 2015; Noverr et al., 2005; Russell et al., 2015). De plus, les nourrissons nés par césarienne sont plus susceptibles de développer ces pathologies pulmonaires (van Nimwegen et al., 2011). Ceci s'explique principalement par une diversité plus faible du microbiote cutané de la mère, comparé à son microbiote vaginal/fécal. Au cours de ces dernières années, des bactéries ont été associées à ces effets bénéfiques ou délétères dans l'apparition de l'asthme. A titre d'exemple, une augmentation, dans les premiers mois de la vie, de l'abondance de *Bacteroides fragilis* et une diminution d'*Escherichia coli* et des espèces des genres *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Rothia* et *Veillonella* ont été associées à une plus forte susceptibilité à développer des maladies respiratoires allergiques (Abrahamsson et al., 2014; Vael et al., 2008). Au contraire, la présence de *Bifidobacterium longum* dans l'intestin a été associée à une incidence plus faible de l'asthme (Akay et al., 2014).

L'association AGCC-GPR joue un rôle majeur dans la susceptibilité de l'hôte face aux maladies respiratoires allergiques. En effet, le risque d'asthme chez les nourrissons est associé à une diminution de la concentration d'acétate dans les fèces (Arrieta et al., 2015). Il a par

ailleurs été montré qu'un régime riche en fibres chez des femelles gestantes diminue le risque d'asthme chez les nourrissons (Thorburn et al., 2015). Une étude de Marsland et de son équipe a mis en évidence le mécanisme sous-tendant cet effet (Trompette et al., 2014). Les souris soumises à un régime riche en fibres ont une concentration d'AGCC circulant plus importante, ce qui diminue l'allergie comparé aux souris soumissent à un régime pauvre en fibres. C'est plus particulièrement le propionate qui induit cet effet bénéfique. Cet AGCC induit des modifications au niveau de l'hématopoïèse de la moelle osseuse, entraînant la génération de précurseurs de macrophages et de DC. Les précurseurs de DC, une fois dans le poumon, se différencient en DC mature CD11⁺ qui possèdent une activité phagocytaire augmentée mais un défaut de présentation de l'allergène et, par conséquent, d'activation des cellules effectrices Th2. Selon la même étude, l'effet bénéfique du propionate dépendrait du GPR41 et non du GRP43. Une autre hypothèse pouvant expliquer le rôle bénéfique des AGCC dans ces pathologies est leur effet sur les cellules Treg. Il a été montré qu'une alimentation riche en fibres réduit la pathologie grâce à une augmentation du nombre de cellules Treg dans le poumon. La prolifération de ces cellules est due à l'inhibition de l'HDAC9 et n'est pas médiée par les GPR41 et GPR43 (Thorburn et al., 2015).

b – Les infections respiratoires bactériennes

Le rôle bénéfique du microbiote intestinal au cours d'infections bactériennes pulmonaires a été démontré dans de nombreux contextes via l'utilisation de souris Germ-Free. Par exemple, ces souris sont plus sensibles aux infections pulmonaires causées par *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae* (Brown et al., 2017; Fagundes et al., 2012). L'utilisation de souris traitées aux antibiotiques a également permis de tirer des conclusions similaires (Clarke, 2014; Schuijt et al., 2016).

Pourtant, peu de ces études ont cherché à savoir si l'administration d'antibiotiques par voie orale éliminait également tout ou une partie du microbiote pulmonaire, en plus du microbiote intestinal, et les conséquences que cela pouvait avoir sur l'immunité pulmonaire. Les travaux de Schuijt et de son équipe ont montré que le traitement aux antibiotiques augmentait la susceptibilité à *S. pneumoniae* et que la transplantation de matière fécale par voie orale était suffisante pour rétablir le contrôle de l'infection chez la souris (Schuijt et al., 2016). Cette augmentation de la susceptibilité suite à un traitement antibiotique s'explique par une altération de la réponse cytokinique après infection (baisse de TNF- α) et une altération de l'activité phagocytaire des macrophages et des neutrophiles (Schuijt et al., 2016). La reconstitution du microbiote intestinal permet de restaurer ces paramètres illustrant ainsi la

contribution du microbiote intestinal dans l'immunité pulmonaire face aux infections bactérienne. Certaines études ont montré que la stimulation de certains récepteurs de l'immunité peut être suffisante pour induire une réponse efficace contre une infection bactérienne chez des souris Germ-Free ou traitées aux antibiotiques. La stimulation du TLR4 par le LPS chez des souris Germ-Free induit une diminution de la susceptibilité à l'infection par *K. pneumoniae* (Fagundes et al., 2012). Cette stimulation induit une diminution de la réponse anti-inflammatoire (moins d'IL-10) et une restauration de la réponse anti-inflammatoire (plus de TNF- α et de CXCL1). L'équipe de Brown, quant à elle, a identifié l'effet bénéfique de certaines bactéries capables de stimuler Nod2 dans le contrôle de l'infection par *S. pneumoniae* suite à un traitement aux antibiotiques (Brown et al., 2017). Le traitement avec des agonistes NOD chez des souris traitées aux antibiotiques participe également à la réduction de la susceptibilité face aux infections bactériennes pulmonaires notamment face à *K. pneumoniae* (Clarke, 2014). Néanmoins, le rôle du microbiote pulmonaire dans la défense de l'hôte contre *S. pneumoniae* reste à évaluer.

c – Les infections respiratoires virales – cas du virus de la grippe

L'infection respiratoire par le virus de la grippe est un parfait exemple pour étudier la communication entre le poumon et l'intestin. Au cours de ces dernières années, plusieurs équipes se sont penchées sur l'impact que pouvait avoir l'infection par le virus de la grippe sur l'intégrité intestinale mais également sur le microbiote intestinal.

c/1 – Impact du virus de la grippe sur le microbiote intestinal

L'infection par le virus de la grippe peut induire l'apparition de symptômes intestinaux de type gastro-entérite (diarrhée et vomissement). Ces symptômes ont également été observés dans des modèles murins, accompagnés d'une réduction de la taille du colon et de la mise en place d'une inflammation, sans aucune détection de virus au niveau de l'intestin (Wang et al., 2014a; Yildiz et al., 2018). Plusieurs équipes, dont la nôtre, ont montré que l'infection par le virus de la grippe induit une perturbation transitoire du microbiote intestinal (Wang et al., 2014a; Yildiz et al., 2018) (Sencio et al., 2020). Selon l'équipe de Wang, cette modification du microbiote intestinal est due à une forte production d'IFN- γ par des cellules T CCR9⁺ CD4⁺ dérivées du poumon. L'altération du microbiote intestinal stimule la production d'IL-15, à partir de cellules épithéliales intestinales, favorisant la polarisation des cellules Th17 dans l'intestin et l'induction des dommages intestinaux (Wang et al., 2014a). La modification

du microbiote intestinal, au cours d'une infection respiratoire virale, a également été étudiée avec des modèles d'infections par RSV (Antunes et al., 2019).

Plusieurs études se sont penchées sur les conséquences de la perturbation du microbiote intestinal au cours de la grippe sur les pathologies intestinales. Il a par ailleurs été rapporté que cette perturbation facilite l'infection secondaire par *Salmonella* au niveau de l'intestin (Deriu et al., 2016; Yildiz et al., 2018). Dans ce modèle, une forte production d'IFN de type 1 est responsable de la modification du microbiote (moins de bactéries anaérobies commensales) mais également de l'inhibition de la synthèse d'AMP et de la mise en place d'une réponse inflammatoire (Deriu et al., 2016). Une étude similaire a montré une augmentation de la colonisation par *Escherichia coli* et *Enterococcus faecium* dans l'intestin, suite à une infection par le virus H7N9 (Qin et al., 2015).

c/2 – Impact du microbiote intestinal sur l'infection grippale

De plus en plus d'études indiquent que des modifications du microbiote intestinal peuvent influencer la réponse immunitaire suite à l'infection par le virus de la grippe. Cette influence peut être positive, lors de l'administration de probiotiques ou de prébiotiques, mais également négative, suite à un traitement antibiotique.

Des souris traitées aux antibiotiques présentent un défaut de réponse immunitaire, aussi bien innée qu'adaptative, face à une infection par le virus de la grippe, augmentant la morbidité et la mortalité au cours de l'infection (Ichinohe et al., 2011). Ces souris présentent notamment une diminution de la génération de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, une diminution de la production d'anticorps et de la synthèse de pro-IL-1 β et de pro-IL-18 (Ichinohe et al., 2011). Ces déséquilibres de la réponse immunitaire face aux virus de la grippe sont rétablis suite à la stimulation du TLR4 par du LPS au niveau du poumon (Ichinohe et al., 2011). Les macrophages voient également leurs fonctions altérées lors d'une infection grippale chez des souris traitées aux antibiotiques. Ces macrophages présentent une diminution de leur réponse IFN de type I et II ainsi qu'une diminution de leur capacité à phagocyter les cellules infectées (Abt et al., 2012). La déplétion du microbiote intestinal induit également une diminution de la production d'ISG dans le poumon, augmentant ainsi la sévérité de l'infection grippale (Bradley et al., 2019). Pourtant, cette augmentation de la susceptibilité face au virus de la grippe, suite à l'altération du microbiote intestinal, n'impacte que les souris adultes. Le traitement antibiotique chez des souris juvéniles (moins de 6 semaines) n'a pas d'effet négatif sur l'infection grippale (Fuglsang et al., 2018). En ce qui concerne la vaccination contre le

virus de la grippe, il a été montré que des souris Germ-Free ou traitées aux antibiotiques présentent une réponse anticorps altérée suite à la vaccination. Cette altération est restaurée par administration orale d'un *E. Coli* flagellé ou d'une stimulation du TLR5 (Oh et al., 2014).

A la vue de l'importance du microbiote intestinal dans les infections grippales, certaines études se sont penchées sur un effet bénéfique des traitements à base de probiotiques ou de prébiotiques. L'équipe de Marsland a récemment montré qu'un régime riche en fibres augmentait la survie suite à l'infection grippale (Trompette et al., 2018). Ce traitement induit une augmentation de la production des AGCC ; ces derniers influencent l'hématopoïèse dans la moelle osseuse. Ceci se traduit par une augmentation des monocytes Ly6c⁻ et *in fine* des macrophages activés alternativement (M2) dans le poumon. Ces macrophages ont une activité anti-inflammatoire, due à leur faible expression de CXCL1, limitant ainsi le recrutement de neutrophiles responsables des altérations de l'épithélium respiratoire au cours de la grippe (Landsman and Jung, 2007; Trompette et al., 2018). Ainsi, les AGCC dérivés du microbiote intestinal ont une influence sur les cellules myéloïdes de la moelle osseuse. Celles-ci migrent vers le poumon et se différencient en cellules anti-inflammatoires permettant de contrôler les conséquences néfastes de l'infection grippale. Ces données suggèrent une nouvelle approche permettant potentiellement de manipuler l'axe poumon-intestin. Un effet bénéfique des AGCC a été également décrit dans l'infection respiratoire au RVS (Antunes et al., 2019). Un régime riche en fibres ou un traitement avec de l'acétate protège les souris contre l'infection par le RSV. Cet effet est médié par le GRP43 et impliquerait la production d'IFN- β par les cellules épithéliales pulmonaires, permettant une réduction de la charge virale et de l'inflammation pulmonaire chez les souris infectées.

Les approches utilisant des probiotiques ont aussi conduit à des bénéfices dans le contrôle de l'infection par le virus de la grippe. Les avantages des probiotiques dans le contexte de l'infection par le virus de la grippe ont été décrits pour la première fois chez la souris en 1999. Il a été constaté que les taux sériques d'IgG étaient plus élevés chez les souris infectées et traitées avec *Bifidobacterium breve* YIT4064, comparé aux souris n'ayant pas reçu le probiotique (Yasui et al., 1999). Suite à la parution de cet article, plusieurs études sur les probiotiques, en particulier les espèces du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, ont été menées à la fois chez la souris et l'humain. Par exemple, l'utilisation de la souche *L. bulgaricus* OLL1073R-1 améliore les fonctions du système immunitaire et notamment l'activation des cellules NK via les polysaccharides sécrétés par la bactérie (Makino et al., 2016; Nagai et al., 2011). Cet effet est bénéfique dans la prévention de l'infection grippale.

Plusieurs études se sont penchées sur le rôle bénéfique de *L. lactis* JCM 5805 lors d'une infection par le virus de la grippe (Fujii et al., 2017; Shibata et al., 2016; Sugimura et al., 2015). Ce probiotique induit notamment une plus forte expression d'IFN- α et d'ISG et une forte sécrétion d'IgA en réponse à l'infection grippale (Shibata et al., 2016; Sugimura et al., 2015).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

La grippe et les surinfections bactériennes respiratoires post-grippales représentent toujours à l'heure actuelle un important problème de santé publique et une lourde perte économique pour la société. Deux phénomènes majeurs sont à l'origine des surinfections bactériennes post-grippales : (i) un dysfonctionnement des mécanismes de défense et (ii) une altération de l'intégrité de la barrière épithéliale pulmonaire. Depuis plusieurs années, notre laboratoire a développé une expertise dans ce domaine, utilisant notamment des modèles expérimentaux pertinents (souris) permettant de caractériser les altérations immunologiques conduisant aux surinfections bactériennes post-grippales. Ainsi, les travaux récents du laboratoire ont montré le rôle de certains lymphocytes T « innés » (notamment les cellules NKT) et des cellules myéloïdes (cellules dendritiques) dans la surinfection bactérienne (Barthelemy et al., 2016, 2017, 2018; Beshara et al., 2018).

Des études récentes pointent du doigt le rôle crucial du microbiote intestinal dans la susceptibilité aux infections respiratoires, qu'elles soient virales ou bactériennes (Ichinohe et al., 2011; Schuijt et al., 2016). L'absence ou la déplétion du microbiote chez des souris Germ-Free ou des souris traitées aux antibiotiques, augmentent l'incidence de ces infections se caractérisant le plus souvent par une augmentation de la mortalité. Ces résultats, couplés aux récents travaux rapportant l'implication du microbiote intestinal dans la survenue de certaines pathologies respiratoires telles que l'asthme ou la bronchopneumopathie chronique obstructive, mettent ainsi en évidence l'existence d'un axe « intestin-poumon » dans lequel le microbiote intestinal serait essentiel (Olszak et al., 2012).

Premier objectif : Caractériser la perturbation du microbiote intestinal et son activité de fermentation au cours de la grippe

Avant le début de ma thèse, un travail démontrait un effet néfaste de l'infection par le virus de la grippe (H1N1) sur le microbiote intestinal (Wang et al., 2014a). Cette étude a caractérisé, de manière ciblée, la perturbation de certaines bactéries intestinales, mettant en avant la diminution des *Lactobacillus* au profit d'une augmentation des *Enterobacteriaceae*. Le premier objectif de ma thèse a été de caractériser de façon plus précise et non biaisée la modification de la composition du microbiote intestinal au cours de la grippe. Pour cela, différents modèles murins d'infection (H3N2, H1N1) ont été utilisés.

Afin d'analyser en détail l'effet du virus de la grippe sur le microbiote intestinal, nous avons utilisé une approche métagénomique (ANR 16S). Le microbiote intestinal a été étudié au sein de plusieurs compartiments (caecum et fèces), suite à l'infection avec différentes

Objectifs de l'étude

souches de l'IAV (H3N2/Scotland, H1N1p20009 et H1N1/WSN) dans le but de caractériser de façon plus précise l'effet potentiel du virus de la grippe sur les populations bactériennes intestinales. En parallèle de cette étude, nous avons regardé l'effet de l'infection sur les fonctions du microbiote intestinal. Nous avons plus particulièrement ciblé une possible altération de l'activité de fermentation du microbiote intestinal, se caractérisant par la production des AGCC. Ces métabolites proviennent de la fermentation de fibres et de polysaccharides complexes par le microbiote et ont récemment été décrits comme étant capables de moduler les réponses immunitaires, notamment dans le poumon. Nous avons également analysé la nature des désordres intestinaux liés à l'infection grippale. Cette partie de notre travail n'est pas développée dans la partie Résultats mais nous y reviendrons au cours de la discussion.

La dernière partie de ce premier objectif a été de comprendre comment un virus pulmonaire peut causer des perturbations au niveau intestinal. Une possible translocation du virus dans l'intestin, la sécrétion de cytokines inflammatoires ou encore l'impact de la perte de poids due à l'infection ont été nos principales hypothèses.

Deuxième objectif : Effet de la perturbation du microbiote intestinal sur l'immunité antibactérienne pulmonaire

Le microbiote intestinal participe à la mise en place, la fonctionnalité et la régulation du système immunitaire, notamment via la libération continue de composants microbiens (molécules de paroi, métabolites) capables, à distance, d'influencer la fonction de nombreuses populations cellulaires. Compte tenu du fait que l'absence de microbiote intestinal induit une augmentation de la susceptibilité aux infections bactériennes, notamment celles entraînées par *S. pneumoniae* (Clarke, 2014; Schuijt et al., 2016), nous avons émis l'hypothèse que la perturbation du microbiote intestinal observée durant l'infection par l'IAV pourrait jouer un rôle essentiel dans la surinfection bactérienne post-grippale.

Le deuxième objectif de ma thèse a été de caractériser l'effet de la perturbation du microbiote intestinal sur les mécanismes de défense contre l'infection bactérienne par *S. pneumoniae*, la cause majeure des pneumonies bactériennes chez l'homme. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de souris traitées aux antibiotiques et recolonisées avec une flore saine ou une flore provenant de souris infectées par l'IAV.

Objectifs de l'étude

Nous avons dans un premier temps étudié l'effet de la recolonisation par une flore dysbiotique sur la susceptibilité à l'infection bactérienne et sur la production des AGCC. Le transfert de la flore dysbiotique entraîne une plus forte susceptibilité à l'infection par *S. pneumoniae* et une diminution de la production des AGCC. Nous avons ensuite étudié la possibilité que ce défaut de production des AGCC, médié par la perturbation du microbiote intestinal, puisse être responsable, au moins en partie, de l'augmentation de la susceptibilité à *S. pneumoniae*.

Nous avons par la suite étudié l'effet de ces différentes recolonisations et du défaut de production des AGCC sur les principales cellules impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire suite à l'infection par *S. pneumoniae*. Nous avons montré que la recolonisation par un microbiote perturbé induit une diminution de l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires, effet restauré suite à un traitement à l'acétate, principal AGCC présent dans le sang.

Troisième objectif : Mise en place d'un traitement curatif à base d'AGCC afin de diminuer le risque de surinfections bactériennes

Après avoir montré au sein d'un modèle de recolonisation que la perturbation du microbiote intestinal, et de son activité de fermentation, observée au cours de la grippe, influe sur la mise en place de la réponse antibactérienne, nous avons regardé l'effet d'un traitement à l'acétate sur la susceptibilité aux surinfections bactériennes.

Après avoir démontré que l'acétate permet de réduire la susceptibilité aux surinfections bactériennes et la mortalité qui leur est associée, nous avons étudié les mécanismes immunologiques pouvant expliquer cet effet bénéfique. L'utilisation de souris GPR43^{-/-}, déficiente pour l'un des récepteurs de l'acétate, nous a permis de mieux comprendre ce phénomène. Parmi les populations cellulaires, nous avons montré que les macrophages alvéolaires, dont le nombre et la fonction sont réduits au cours de la grippe, sont l'une des cibles de l'acétate. Nous avons confirmé ces résultats par une approche pharmacologique grâce à l'utilisation d'un agoniste spécifique du GPR43.

Le travail effectué au cours de ma thèse a donné lieu à une publication dans Cell Reports. Nous sommes les premiers à avoir démontré l'effet délétère de l'altération transitoire du microbiote intestinal sur les défenses pulmonaires contre l'infection secondaire bactérienne. Notre travail laisse entrevoir des stratégies préventives et curatives visant à

Objectifs de l'étude

limiter ou compenser l'altération du microbiote intestinal observée durant l'infection grippale. Des applications potentielles peuvent aussi être attendues lors de pathologies liées à des dysbioses et à des infections bactériennes secondaires.

RESULTATS

La perturbation du microbiote intestinal au cours de la grippe contribue aux surinfections par pneumocoque via l'altération de la production des acides gras à chaîne courte

Gut dysbiosis during influenza contributes to pulmonary pneumococcal superinfection through altered short-chain fatty acid production

Accepté dans Cell Reports

Valentin Sencio, Adeline Barthelemy, Luciana P Tavares, Marina Gomes Machado, Daphnée Soulard, Céline Cuinat, Celso Martins Queiroz-Junior, Marie Louise Noordine, Sophie Salomé-Desnoullez, Lucie Deryuter, Benoit Foligné, Céline Wahl, Benoit Frisch, Angelica Thomaz Vieira, Christophe Paget, Graeme Milligan, Trond Ulven, Isabelle Wolowczuk, Christelle Faveeuw, Ronan Le Goffic, Muriel Thomas, Stéphanie Ferreira, Mauro M Teixeira, and François Trottein

Résumé

Les infections bactériennes secondaires compliquent souvent les infections respiratoires virales. Au regard de l'importance de l'axe intestin-poumon, nous avons émis l'hypothèse que la perturbation du microbiote intestinal pendant l'infection par le virus de la grippe A (IAV) puisse favoriser la surinfection bactérienne secondaire. Une infection sublétales par le virus de la grippe modifie, de façon transitoire, la composition et l'activité de fermentation du microbiote intestinal chez la souris. Ces changements s'expliquent, en partie, par la réduction de la prise alimentaire pendant l'infection grippale. Des expériences de transfert de flore intestinale démontrent que le microbiote dysbiotique compromet les défenses immunitaires au niveau pulmonaire contre l'infection à pneumocoque. Dans les faits, la diminution de la production de l'acétate, un acide gras à chaîne courte (AGCC) prédominant, affecte l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires. Après traitement avec de l'acétate, les souris colonisées par le microbiote dysbiotique présentent une charge bactérienne réduite. Dans un contexte d'infection grippale, la supplémentation en acétate réduit, via son interaction avec le récepteur couplé à la protéine G 43 (GPR43), la charge bactérienne locale et systémique. Cela se traduit par une pathologie pulmonaire réduite et un taux de survie amélioré chez les souris surinfectées. Enfin, l'activation pharmacologique du récepteur GPR43 pendant la grippe réduit le risque de surinfection bactérienne.

Mots Clés

Influenza A virus, surinfection bactérienne, microbiote intestinal, dysbiose, restriction alimentaire, acide gras à chaîne courte, acétate, GPR43, macrophages.

Introduction

Malgré la mise en place de programmes de vaccination et de traitements antiviraux, les infections par le virus de la grippe A (IAV) sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importantes. Les infections grippales peuvent également entraîner des pandémies sporadiques et souvent dévastatrices; la pandémie de 1918 a causé la mort de 50 millions de personnes. Des infections bactériennes graves peuvent survenir à la suite d'une infection par l'IAV et contribuer de manière significative à la morbidité et à la mortalité excessives observées pendant la grippe (McCullers, 2004). *Streptococcus pneumoniae* a été la bactérie la plus fréquemment détectée lors des pandémies de grippe de 1918 et 2009. L'utilisation de modèles murins a montré que l'infection par l'IAV perturbe l'intégrité de la barrière pulmonaire et réduit l'immunité antibactérienne innée, favorisant ainsi la prolifération bactérienne locale et la dissémination de la bactérie hors des poumons (Ballinger and Standiford, 2010; McCullers, 2014; Rynda-Apple et al., 2015; Short et al., 2014). Cette incapacité à contrôler l'infection bactérienne est associée à des changements dans le nombre et / ou les fonctions des cellules immunitaires innées, y compris les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques conventionnelles, les neutrophiles et les cellules T non conventionnelles (Barthelemy et al., 2017; Ghoneim et al., 2013; McNamee and Harmsen, 2006; Sun and Metzger, 2014). A la vue de l'importance de l'axe intestin-poumon dans cette pathologie (Budden et al., 2017; McAleer and Kolls, 2018), nous avons émis l'hypothèse que la perturbation du microbiote intestinal lors d'une infection par l'IAV puisse favoriser la surinfection bactérienne.

Le tractus gastro-intestinal abrite un écosystème microbien complexe et très diversifié. L'interaction étroitement régulée entre le microbiote et l'hôte permet l'établissement et la persistance de l'homéostasie immunitaire (Blander et al., 2017; Maslowski and Mackay, 2010; Thaïss et al., 2016). L'impact des microbes commensaux sur les réponses immunitaires de l'hôte ne se limite pas au compartiment intestinal, mais s'étend également aux compartiments systémiques et aux autres muqueuses distantes, comme les poumons (Budden et al., 2017; McAleer and Kolls, 2018). Le mécanisme par lequel le microbiote intestinal régule le nombre et / ou les fonctions des cellules immunitaires à l'état d'équilibre dépend des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), des métabolites microbiens et de leurs interactions avec les cellules progénitrices et les cellules immunitaires matures (Arpaia et al., 2013; Koh et al., 2016; Shapiro et al., 2014). Il a récemment été démontré qu'un microbiote sain joue un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les infections des voies

respiratoires, y compris contre l'IAV (Abt et al., 2012; Bradley et al., 2019; Ichinohe et al., 2011; Moriyama and Ichinohe, 2019; Steed et al., 2017) et *S. pneumoniae* (Brown et al., 2017; Clarke et al., 2010; Schuijt et al., 2016). Dans ce contexte, les agonistes des NLR modulent les fonctions des cellules immunitaires effectrices, y compris les macrophages alvéolaires et les neutrophiles.

Certaines pathologies, telles que les infections et les troubles inflammatoires ou métaboliques chroniques, peuvent modifier la diversité et la composition du microbiote intestinal, entraînant une dysbiose (Levy et al., 2017). Les changements dans les communautés bactériennes intestinales peuvent influencer certains symptômes de la maladie même dans les organes distants, comme l'ont démontré les expériences de transfert de microbiotes dysbiotiques. Seules quelques études ont décrit l'impact d'une infection respiratoire aiguë sur le microbiote intestinal, et la plupart d'entre elles concernaient des modèles murins d'infections par le virus de la grippe. Dans ce système, des infections sévères à H1N1 et H5N1 ont été associées à une altération du microbiote intestinal (Bartley et al., 2017; Deriu et al., 2016; Groves et al., 2018; Wang et al., 2014a; Yildiz et al., 2018), une observation qui semble également s'appliquer aux infections grippales chez l'homme (Qin et al., 2015). Cette perturbation du microbiote, lors d'une infection grippale, est également associée à une sensibilité accrue aux infections entériques secondaires (Deriu et al., 2016; Yildiz et al., 2018). La dysbiose associée à la grippe n'a pas encore été entièrement caractérisée et explorée de manière fonctionnelle. En effet, il reste à savoir si ces changements dans la composition du microbiote intestinal, pendant l'infection grippale, peuvent affecter les infections bactériennes à distance (voies respiratoires). Dans notre étude, nous avons constaté qu'une infection sublétales, avec les sous-types du virus de la grippe H3N2 et H1N1, est associée à des changements dans la composition du microbiote intestinal (caecal et intestinal) et à une baisse de la production des acides gras à chaîne courte (AGCC), produits finaux de la fermentation des fibres alimentaires. Des expériences visant à imiter la diminution de la prise alimentaire observée pendant la grippe (Monto et al., 2000) indiquent que ce phénomène serait responsable de la dysbiose observée pendant l'infection grippale. Les expériences de transfert de flore fécale démontrent que les altérations du microbiote compromettent l'immunité pulmonaire contre l'infection à pneumocoque. Nous avons découvert que la diminution de la production d'acétate (l'AGCC prédominant), en modifiant l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires, était responsable de cet effet. La supplémentation en acétate pendant l'infection grippale renforce les défenses pulmonaires contre l'infection

secondaire à pneumocoque et réduit la mortalité des souris surinfectées. Ce phénomène dépend du GPR3 (ou FFAR2). Enfin, l'activation du GPR43, par un agoniste hautement spécifique, mime les effets de l'acétate et protège contre la surinfection bactérienne post-grippale. Nos résultats fournissent de nouvelles perspectives sur les mécanismes physiopathologiques qui influent sur la surinfection bactérienne post-grippale et pourraient être utiles pour développer des approches thérapeutiques appropriées dans les maladies associées à la dysbiose et aux infections bactériennes secondaires.

Résultats

L'infection grippale sublétale modifie temporairement la composition et l'activité métabolique du microbiote intestinal

Afin d'étudier l'impact d'une infection grippale sublétale sur la composition et la fonction du microbiote intestinal, les fèces des souris infectées par l'IAV (H3N2) ont été collectées et une analyse métagénomique a été effectuée (gène de l'ARNr 16S). La détermination de la distance phylogénétique UniFrac pondérée (β diversité) à l'aide d'un clustering non supervisé et d'une analyse en composantes principales (PCoA) indique clairement une différence entre le microbiote fécal des souris avant infection et 7 jours post-infection (J7). Cette différence n'est plus présente 14 jours après l'infection (J14) (Figure 11A). Une analyse taxonomique n'a révélé aucun changement majeur au niveau du phylum à J7, à l'exception des Verrucomicrobia (*Akkermansia*) et, dans une moindre mesure, des Cyanobactéries (Figure S1A et Tableau S1). Des changements plus importants ont été observés pour les affiliations taxonomiques inférieures. Au sein du phylum des Bacteroidetes, l'abondance relative de la famille des *Bacteroidales* S24-7 est réduite, tandis que celle des genres *Parabacteroidetes* et *Odoribacter* est augmentée à J7 (Tableau S1). Dans le phylum des Firmicutes, nous avons observé une plus grande abondance relative des genres *Clostridiales* (non affiliés), *Ruminococcaceae* et *Mogibacteriaceae*, ainsi que des genres *Coprococcus*, *Roseburia*, *DeFluvitalea*, *Dorea*, *Ruminococcus* et *Gemmiger* (Figure S1B). En revanche, des abondances relatives plus faibles ont été observées pour la famille des *Lachnospiraceae* (principalement les genres *Lachnospiraceae* non affiliés et *Clostridium*), et les genres *Dehalobacterium* et *Lactobacillus* (classe *Bacilli*). Enfin, au sein du phylum des Proteobacteria, la proportion des classes d'*Alphaproteobacteria* et de *Gammaproteobacteria* (genre *Escherichia*) augmente, tandis que celle des *Betaproteobacteria* (genre *Sutterella*) diminue. Le PCoA des échantillons caeaux révèle également un décalage clair à J7, par

Résultats

rapport aux témoins (souris non infectées) (Figure 11B). De même, nous avons observé des variations de la composition au niveau des phylums et dans les niveaux taxonomiques inférieurs (Tableau S2). Il est à noter que, parallèlement à l'augmentation des abondances relatives de Verrucomicrobia et de Cyanobacteria (comme pour les fèces), nous avons observé une baisse spectaculaire des Actinobacteria (familles *Bifidobacteriaceae* et *Coriobacteriaceae*) dans les échantillons de caecums. Les PCR quantitatives n'ont révélé aucune différence significative dans le nombre de copies du gène de l'ARNr 16S dans les selles et le compartiment caecal après infection grippale démontrant que la charge bactérienne intestinale est globalement stable au cours de la grippe (Figure S1C). Conformément à d'autres études (Antunes et al., 2019; Yildiz et al., 2018), le génome de l'IAV n'a pas été détecté par PCR quantitative dans l'intestin des souris infectées par l'IAV (Figure S1D). Cela suggère que la dysbiose n'est pas due à la réplication virale dans l'intestin, ni au transport passif d'ARN viral. Pour approfondir ces observations, nous avons testé l'impact du virus H1N1, qui est l'autre sous-type dominant parmi les IAV humains, sur la composition du microbiote intestinal. L'infection par le virus H1N1 entraîne également des variations claires du microbiote à J7 (Figure S2, Figure S3, Tableau S3, Tableau S4). Des changements similaires au niveau de la composition ont été observés entre des souris infectées par le virus H1N1 ou par le H3N2. Des changements au niveau des *Bacteroidales S24-7*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Sutterella* et *Akkermansia* (par rapport aux souris non infectées) ont été observés pour les deux sous-types de virus. L'infection par une dose sublétales du virus de la grippe (H3N2 et H1N1) entraîne donc une dysbiose intestinale transitoire. Étant donné que les changements dans la composition du microbiote intestinal peuvent altérer sa fonctionnalité (par exemple l'activité métabolique), nous avons quantifié la production d'AGCC, principaux métabolites du microbiote intestinal, au cours de l'infection grippale. Les AGCC sont générés par la fermentation bactérienne des fibres alimentaires, atteignant des concentrations élevées dans la lumière intestinale en conditions physiologiques (Koh et al., 2016). Comme le montre la Figure 11C (gauche), la concentration totale d'AGCC dans le caecum 7 jours après l'infection par H3N2 est inférieure à celles des souris non infectées. Les concentrations d'acétate (l'AGCC prédominant), de propionate et de butyrate sont toutes plus faibles (Figure 11C, droite).

À J14, les concentrations d'AGCC, dans le caecum, sont revenues au niveau initial. Une concentration significativement réduite des AGCC est également observée à J7 chez des souris infectées par le virus H1N1 (Figure 11D). Il est connu que les AGCC produits dans

l'intestin peuvent passer dans la circulation systémique et ensuite exercer des effets biologiques à distance (en particulier l'acétate et, dans une moindre mesure, le propionate et le butyrate) (Cait et al., 2017; Macia et al., 2015; Trompette et al., 2014). Comme le montre la Figure 11E, l'infection grippale entraîne une diminution de la concentration des AGCC dans le sang à J7. En accord avec d'autres études, l'acétate est l'AGCC prédominant trouvé dans le sang (Cait et al., 2017; Macia et al., 2015; Mariño et al., 2017; Trompette et al., 2014). Ces données montrent que l'infection grippale modifie la production métabolique (fermentative) du microbiote intestinal à J7 et qu'elle affecte la concentration locale (intestinale) et systémique (sanguine) des AGCC, un groupe émergent de métabolites d'origine alimentaire dotés de fonctions de régulation immunitaire (Tan et al., 2014).

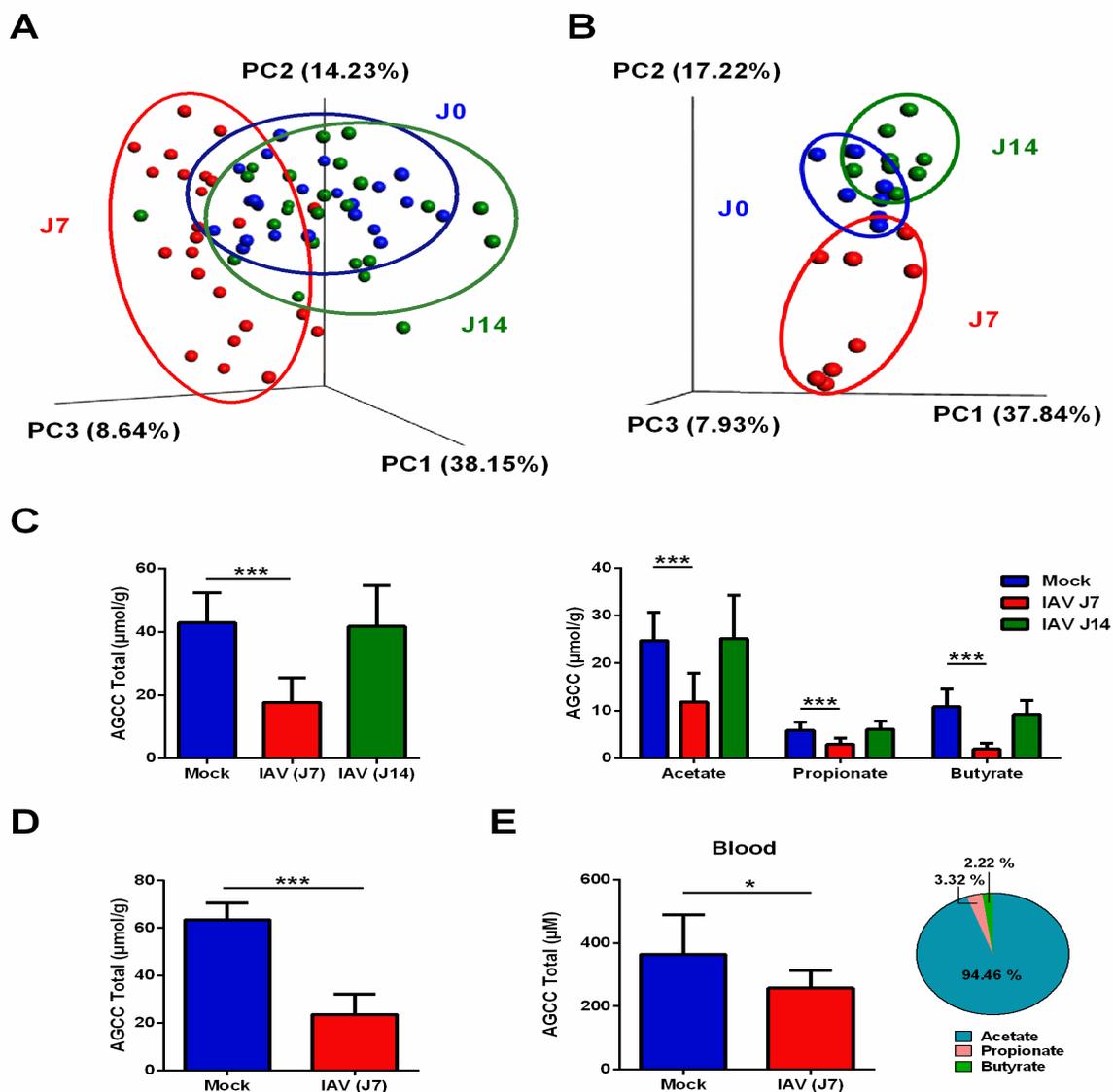


Figure 11. Altération de la composition et de l'activité fermentative (production d'AGCC) du microbiote intestinal au cours de l'infection par l'IAV. (A) Sept et quatorze jours après l'infection par

l'IAV (H3N2), la matière fécale a été collectée pour réaliser une analyse métagénomique de l'ADNr 16S. Des échantillons fécaux de chaque souris ont également été prélevés le jour de l'infection (J0). Les communautés bactériennes ont été regroupées à l'aide d'un PCoA of Weighted UniFrac distance matrices (β diversité). Les trois premières coordonnées principales (PC1, PC2 et PC3) sont tracées pour chaque échantillon et le pourcentage de variation des coordonnées principales est indiqué sur chaque axe. Chaque point représente un échantillon et chaque groupe de souris est désigné par une couleur différente (bleu: non infecté / J0, rouge: J7, vert : J14). La distance entre les points représente l'étendue de la différence de composition. La mesure de la diversité α n'a révélé aucune différence entre les trois groupes (non représentés). (B) Analyse PCoA (H3N2 / caecum). Bleu: non infecté, rouge: J7, vert: J14 (n = 8, une des trois expériences indépendantes montrées). (C) Sept et quatorze jours après l'infection, le contenu caecal a été collecté pour la quantification des AGCC. A gauche, Concentrations caecal des AGCC totaux chez les souris non infectées et infectées par l'IAV. A droite, concentrations caecal des AGCC individuels (n = 21-33, cinq expériences regroupées). (D) Concentrations caecales des AGCC totaux chez des souris non infectées et infectées par l'IAV (H1N1 / pdm09) (J7) (n = 6-8, une expérience effectuée). (E) Concentrations sanguines des AGCC totaux (9-10 sérums regroupés, 4 souris / pool). La répartition des AGCC individuels dans le sang est représentée (pour non infectée). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (C-E). Des différences significatives ont été déterminées en utilisant le test Kruskal – Wallis ANOVA (C) et le test Mann-Whitney U (D et E) (* p <0,05; *** p <0,001). Voir également les figures S1, S2 et S3 et les tableaux S1, S2, S3 et S4.

Le microbiote de souris infectées par l'IAV confère une susceptibilité aux infections bactériennes respiratoires

Grâce à la libération continue de facteurs solubles, le microbiote intestinal peut agir à distance pour moduler l'immunité pulmonaire (Abt et al., 2012; Bradley et al., 2019; Brown et al., 2017; Clarke et al., 2010; Ichinohe et al., 2011; Schuijt et al., 2016; Steed et al., 2017). Nous avons donc étudié les conséquences potentielles de la dysbiose intestinale induite par l'IAV sur les défenses antibactériennes pulmonaires. Pour cela, nous avons effectué des expériences de transfert de microbiote (protocole expérimental sur la Figure 12A). En utilisant cette approche, des rapports récents ont démontré qu'un microbiote intestinal sain peut augmenter la résistance à l'infection pulmonaire à pneumocoque (sérotypage 3) (Brown et al., 2017; Clarke et al., 2010; Schuijt et al., 2016). Pour étudier cet effet putatif dans notre modèle expérimental, les souris ont été traitées avec des antibiotiques à large spectre (ABX), pour perturber le microbiote résiduel, puis ont été soumises à une infection intranasale avec *S. pneumoniae* de sérotypage 1, un sérotypage majeur chez l'homme. Nous avons confirmé que notre traitement ABX appauvrit fortement la charge bactérienne du microbiote intestinal (Figure S4A). Par rapport aux souris conventionnelles (possédant un microbiote intact), les souris traitées aux ABX présentent une charge bactérienne plus élevée dans les poumons et l'administration, par voie orale, de microbiote intestinal prélevé chez des souris saines rétablit la clairance bactérienne (Figure 12B). Ces données confirment qu'un arrêt transitoire des

stimuli dérivés du microbiote (ici en raison du traitement ABX) peut altérer les défenses pulmonaires précoces contre l'infection bactérienne.

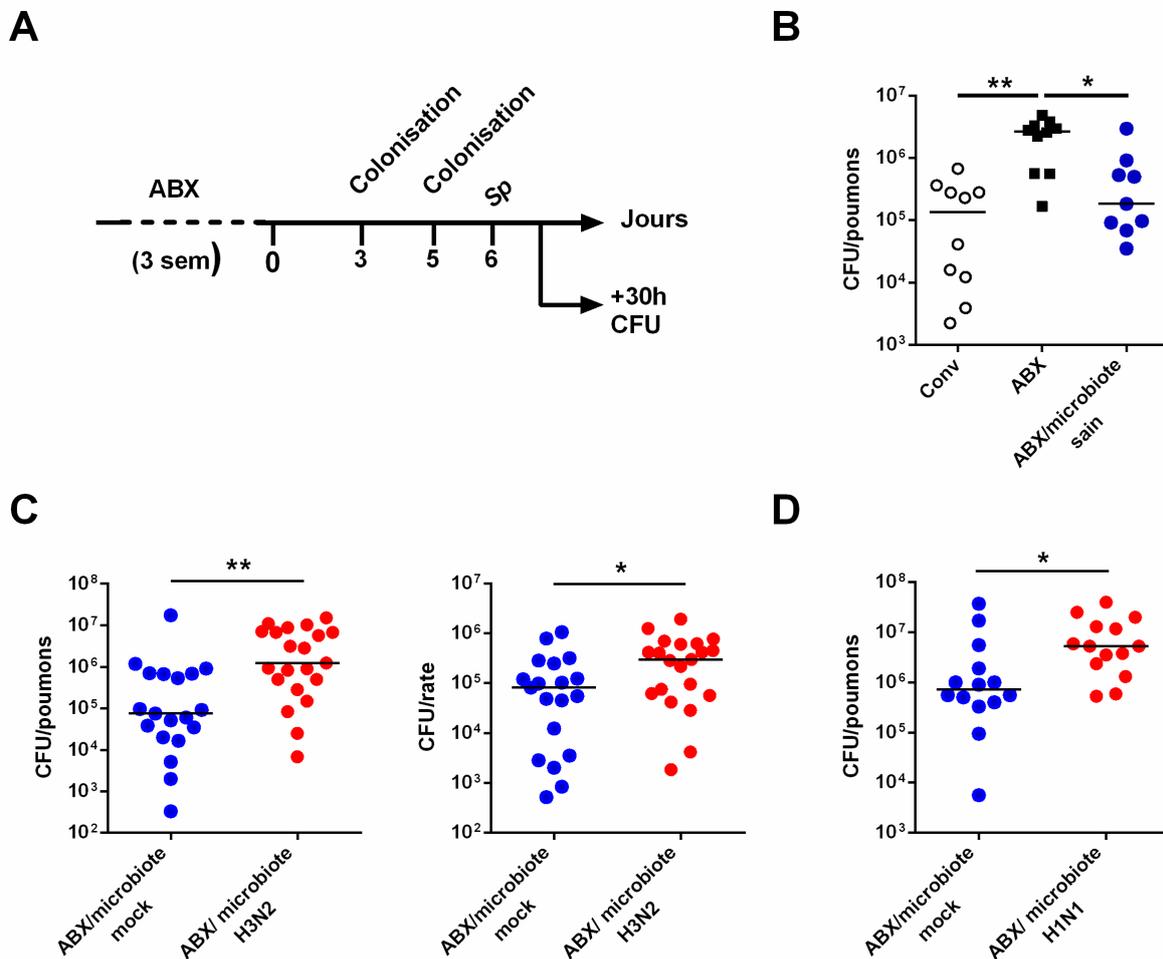


Figure 12. Sensibilité accrue à l'infection bactérienne respiratoire chez les souris colonisées par le microbiote de souris infectées par l'IAV. (A) Schéma des expériences de transfert adoptif du microbiote. Des souris conventionnelles, des souris traitées par ABX et des souris recolonisées traitées par ABX ont été infectées par *S. pneumoniae*. Dans ce dernier groupe, le microbiote caecal de souris naïves (microbiote sain) a été transplanté trois jours et cinq jours après l'arrêt des ABX. Un jour après la deuxième colonisation, les souris ont été infectées par *S. pneumoniae* (1×10^6 CFU). Des souris non recolonisées traitées par ABX ont été infectées trois jours après l'arrêt des ABX. (B) Le nombre de bactéries viables dans le poumon a été déterminé 30 h après l'infection bactérienne. Les traits pleins correspondent aux valeurs médianes (n = 10, pool de deux expériences indépendantes). (C et D) La même procédure a été effectuée, mais cette fois, des souris traitées par ABX ont été recolonisées avec le microbiote caecal prélevé sur des souris non infectées ou infectées par l'IAV (infection H3N2 ou H1N1 (respectivement C et D)). Il convient de noter, quelle que soit l'origine du microbiote (H3N2 ou H1N1), aucun virus n'a été détecté dans les poumons des souris transplantées, tel qu'évalué par une analyse quantitative RT-PCR (non représentée). (C), n = 19-21 (pool de trois expériences indépendantes) et (D), n = 14 (pool de deux expériences indépendantes). Des différences significatives ont été déterminées en utilisant le test Kruskal-Wallis ANOVA (B) et le test Mann-Whitney U (C et D) (* p < 0,05; ** p < 0,01). Voir également la figure S4.

Nous avons ensuite déterminé si une perte de ces stimuli suite à une infection grippale antérieure pouvait compromettre la défense pulmonaire antibactérienne. Pour cela, le microbiote intestinal prélevé sur des souris infectées par l'IAV a été transplanté chez des souris traitées aux ABX. Cette procédure entraîne la reconstitution du microbiote intestinal (Figure S4B). Étonnamment, les souris colonisées avec le microbiote de souris infectées par l'IAV (H3N2) ont une charge bactérienne significativement plus élevée dans les poumons que les souris colonisées avec le microbiote intestinal provenant de souris non infectées (Figure 12C, gauche). Le microbiote provenant des souris infectées par l'IAV augmente également la dissémination bactérienne depuis les poumons, comme le révèle l'augmentation de la charge bactérienne dans la rate (Figure 12C, droite). Pour déterminer si cet effet est spécifique à la souche du virus, la même procédure a été répétée en utilisant un microbiote intestinal prélevé sur des souris infectées par H1N1. Cela conduit également à une sensibilité accrue à l'infection par le pneumocoque (Figure 12D). Ce résultat indique que l'altération de la réponse pulmonaire liée au transfert de flore fécale est une conséquence générale de l'infection grippale, quel que soit le sous-type viral. Pour conclure cette partie, la perturbation microbiote intestinal lors d'une infection grippale augmente la sensibilité aux infections bactériennes respiratoires.

La réduction de la production d'acétate par le microbiote provenant de souris grippées est responsable d'une sensibilité accrue aux infections bactériennes respiratoires

Nous avons ensuite étudié si la susceptibilité à l'infection bactérienne pulmonaire induite chez des souris colonisées par le microbiote dysbiotique (collecté de souris grippées) s'associe à une diminution de la production d'AGCC. Comme attendu, la concentration en AGCC au niveau du caecum est beaucoup plus faible chez les souris traitées aux ABX comparés aux souris conventionnelles. La colonisation avec un microbiote sain restaure partiellement la quantité d'AGCC (Figure 13A). Fait intéressant, par rapport aux souris colonisées avec le microbiote provenant de souris conventionnelles, les souris colonisées avec le microbiote de souris grippées ont une concentration en AGCC significativement plus faible (Figure 13B, gauche). En particulier, les concentrations d'acétate et de propionate sont réduites (Figure 13B, droite). Il est à noter qu'à ce stade, la concentration de butyrate reste au niveau basal. Les défenses respiratoires altérées chez les souris colonisées (par un microbiote de souris grippées) s'associent donc à une réduction de la production des AGCC.

Nous avons ensuite émis l'hypothèse selon laquelle la baisse des AGCC pourrait affecter la réponse pulmonaire. Pour cela, nous avons étudié la possibilité que la supplémentation en AGCC chez des souris reconstituées avec le microbiote dysbiotique puisse restaurer la réponse pulmonaire contre *S. pneumoniae*. Nous nous sommes concentrés sur l'acétate car il représente l'AGCC prédominant dans le sang (Cait et al., 2017; Macia et al., 2015; Trompette et al., 2014) (Figure 1E). La supplémentation en acétate (directement dans l'eau du biberon) diminue le nombre de bactéries dans les poumons et réduit la propagation systémique des bactéries (Figure 13C). Les AGCC peuvent exercer des fonctions bactéricides et / ou bactériostatiques (Coussens et al., 2015; Wang et al., 2014b). Comme le montre la Figure 13D, l'acétate n'a pas d'effet direct sur la croissance de *S. pneumoniae in vitro*. Nous en concluons que l'acétate restaure la réponse pulmonaire antibactérienne défectueuse conférée par le microbiote provenant de souris grippées.

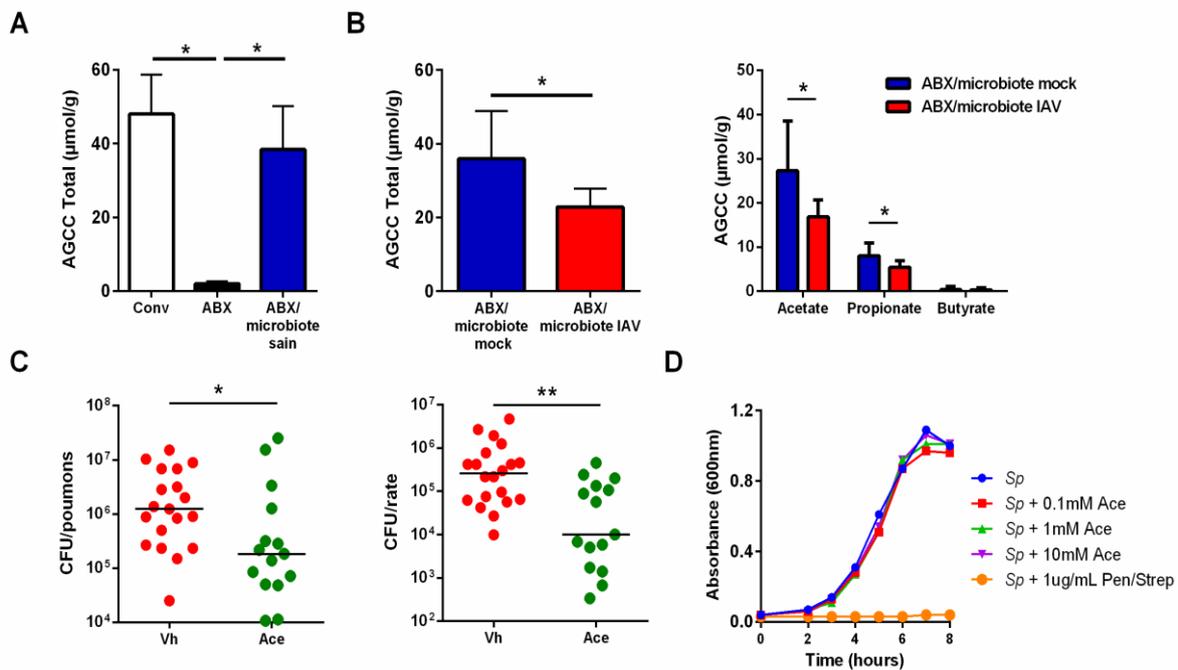


Figure 13. Réduction de la production d'AGCC chez les souris recolonisées avec un microbiote de souris grippées et effet de la supplémentation en acétate sur la défense de l'hôte contre l'infection à pneumocoque. (A) Concentration totale des AGCC dans le caecum de souris conventionnelles, souris traitées aux ABX et souris recolonisées traitées aux ABX (n = 4-7, une des deux expériences indépendantes représentées). (B) Gauche, concentration totale des AGCC dans le caecum de souris recolonisées avec le microbiote prélevé sur des souris non infectées ou infectées par IAV (H3N2 - J7). Droite, représentation des AGCC en individuel. n = 8 (une des deux expériences indépendantes représentées). (C) Des souris recolonisées (microbiote de souris infectées ou non par IAV) ont été infectées par *S. pneumoniae* (1x10⁶ CFU.). Les souris ont été traitées avec de l'acétate (Ace) (200 mM dans l'eau de biberon) ou non (Vh) cinq jours avant l'infection par pneumocoque. Le nombre de bactéries a été déterminé 30 h après l'infection. Les traits pleins correspondent aux valeurs des médianes (n = 15-20, pool de trois expériences indépendantes). (D) Des colonies de *S. pneumoniae* en phase de croissance exponentielle ont été ajoutées au milieu de culture en l'absence ou en présence

de concentrations d'acétate ou, comme contrôle positif, 1 U/ml de pénicilline et 1 µg/ml de streptomycine. La densité optique a été mesurée au fil du temps, comme indiqué sur la figure. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (A, B). Des différences significatives ont été déterminées en utilisant le test Kruskal – Wallis ANOVA (A) et le test Mann-Whitney U (B et C) (* p <0,05; ** p <0,01).

Une restriction de l'apport alimentaire (imitant celle observée pendant la grippe) altère le microbiote intestinal et la défense pulmonaire contre les infections bactériennes

Une diminution rapide de l'apport alimentaire peut modifier la composition et l'activité métabolique du microbiote intestinal (Li et al., 2017). Nous avons émis l'hypothèse que la réduction de l'apport alimentaire aux cours de l'infection puisse perturber la composition et l'activité métabolique du microbiote intestinal. Dans notre modèle d'infection sublétales, l'infection grippale est associée à une diminution de l'apport alimentaire (et à une perte de poids) entre J4 et J11, avec un pic à J7 (atteignant ~ 85%) (Figure S5A). Afin de tester si la dysbiose intestinale lors d'une infection grippale peut être due à une consommation alimentaire réduite, nous avons mis au point une expérience visant à réduire la prise alimentaire chez des souris non infectées (souris Pair-fed). Nous avons restreint l'apport alimentaire des souris non infectées, avec des réductions de 10%, 35% et 85% respectivement aux jours 4, 5 et 6 (sur la base de la mesure de la consommation alimentaire effectuée chez des souris infectées, Figure S5A, droite). Ces souris Pair-fed ont été sacrifiées après 7 jours. Comme le montre la Figure 14A, les souris Pair-fed ont perdu du poids (par rapport aux souris nourries normalement) de la même manière que les souris infectées par l'IAV, soit environ ~ 15% de leur poids initial au moment du sacrifice. Une analyse de la β diversité montre clairement une similitude entre les populations bactériennes des souris Pair-fed et des souris infectées par l'IAV à J7 (Figure 14B et non représentée). Bien que la perte de poids rapide imposée par l'alimentation ne reproduit pas totalement le phénotype de l'infection grippale, l'analyse taxonomique révèle plusieurs changements communs dans la diversité et l'abondance de certains taxons (par exemple *Parabacteroides*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillus*, *Alphaproteobacteria*, *Akkermansia*) entre les souris Pair-fed et les souris infectées (Figure S5B, Figure S5C, Tableau S5). De façon intéressante, par rapport aux souris nourries normalement, les souris Pair-fed affiche une concentration en AGCC caecale plus faible (Figure 14C et Figure S5D).

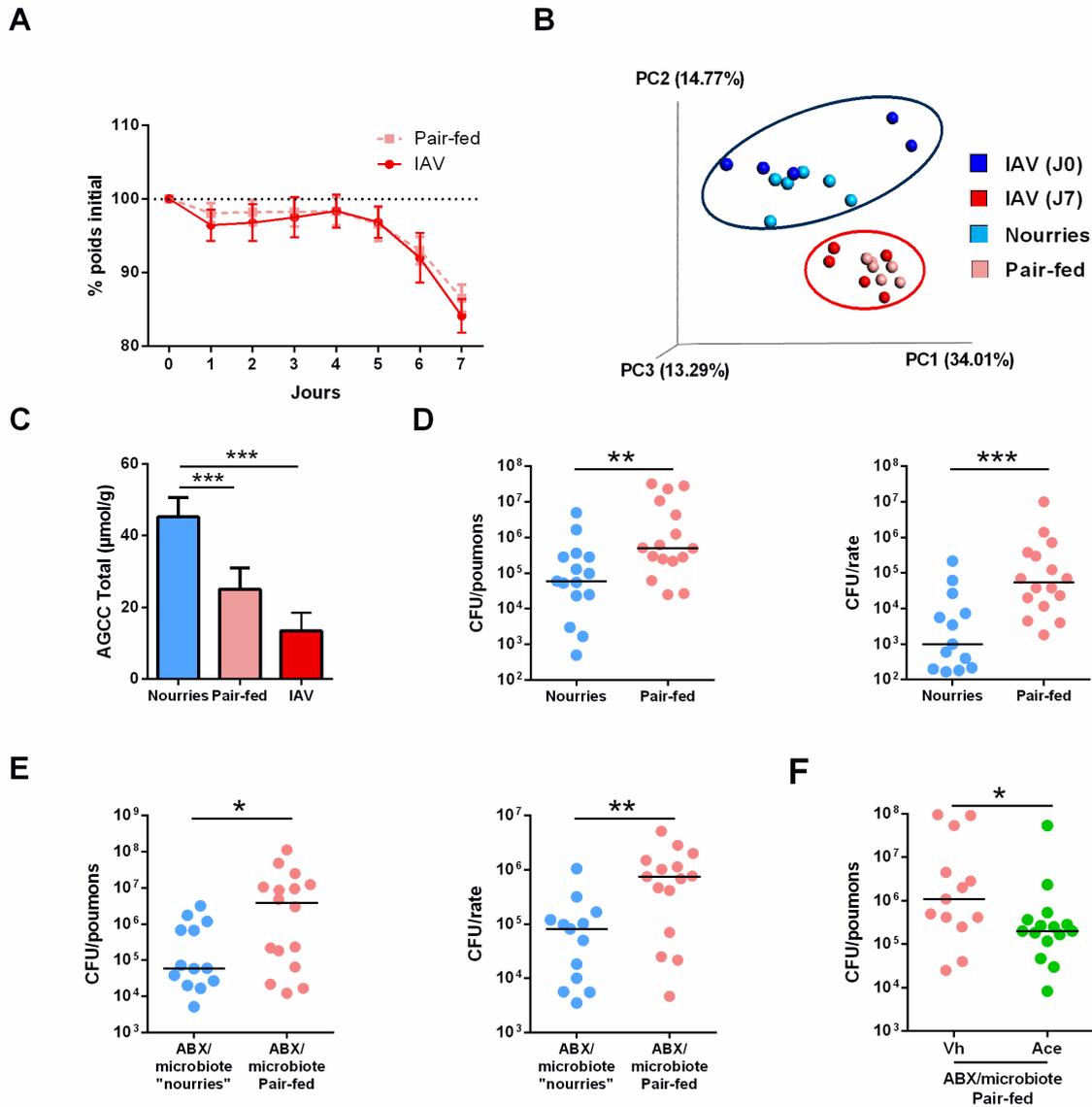


Figure 14. Altération du microbiote intestinal et des défenses pulmonaires contre l'infection aux Pneumocoques chez des souris Pair-Fed. (A) Mesure cinétique de la perte de poids de souris Pair-Fed et de souris infectées par IAV (n = 8, une expérience représentée sur trois réalisées). (B) Analyse du microbiote intestinal (fèces) chez les souris Pair-Fed. La diversité bactérienne après restriction alimentaire a été déterminée par PCoA et a été comparée à celle chez des souris infectées par IAV (H3N2, J7). (C) Concentrations des AGCC totaux dans le caecum de souris nourries, de souris Pair-Fed et de souris infectées par IAV (J7) (n = 14, pool de deux expériences indépendantes). (D) Des souris nourries et Pair-Fed ont été infectées par *S. pneumoniae* (1×10^6 CFU.). (E) Les souris traitées par ABX ont été recolonisées avec le microbiote prélevé sur des souris nourries normalement ou sur des souris Pair-Fed. Les souris recolonisées ont été infectées trois jours après la première recolonisation (1×10^6 CFU.). (F) Les souris recolonisées avec le microbiote dysbiotique (Pair-Fed) ont été traitées ou non avec de l'acétate comme décrit sur la figure 13C. (D-F), les charges bactériennes dans les poumons et la rate ont été mesurées 30 h après l'infection. Les lignes pleines correspondent aux valeurs des médianes (n = 13-16, deux expériences regroupées). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (A-C). Des différences significatives ont été déterminées en utilisant le test Kruskal – Wallis ANOVA (C) et le test Mann-Whitney U (D-F) (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001). Voir également la figure S5 et le tableau S5.

Pour étudier l'effet de la restriction alimentaire sur les défenses pulmonaires de l'hôte, les souris Pair-Fed ont été infectées par *S. pneumoniae*. Comme le montre la Figure 14D, le nombre de bactéries dans les poumons et la rate est plus élevé chez les souris Pair-fed que chez les souris nourries normalement. Pour déterminer si le microbiote intestinal est à l'origine de cette sensibilité accrue, nous avons effectué des expériences de transplantation de microbiote. Les expériences ont indiqué que cette sensibilité accrue était au moins en partie due à une altération du microbiote intestinal (Figure 14E). Nous avons ensuite testé notre hypothèse selon laquelle une réduction de la production d'acétate chez les souris Pair-Fed (en raison de la privation de fibres alimentaires) pourrait augmenter la susceptibilité à l'infection à pneumocoques. En effet, la supplémentation en acétate réduit considérablement la charge bactérienne chez les souris ayant reçu le microbiote provenant de souris Pair-Fed (Figure 14F). En résumé, la restriction alimentaire imitant celle observée pendant la grippe modifie la composition et l'activité métabolique du microbiote intestinal et augmente la sensibilité aux infections bactériennes respiratoires. Ces résultats soutiennent l'idée que la réduction de la consommation alimentaire lors d'une infection grippale contribue à la dysbiose et à une altération des défenses pulmonaires contre les infections bactériennes.

Le microbiote de souris grippées altère l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires, un effet restauré par la supplémentation en acétate

Nous avons ensuite cherché à mieux comprendre les mécanismes par lesquels le microbiote provenant de souris grippées compromet les défenses pulmonaires de l'hôte. Les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques conventionnelles, les neutrophiles, les cellules iNKT et les cellules T $\gamma\delta$ jouent un rôle (direct ou indirect) dans la clairance précoce des pneumocoques (Cao et al., 2014; Nakamatsu et al., 2007; van der Poll and Opal, 2009; Trottein and Paget, 2019). L'analyse par cytométrie en flux indique que les souris colonisées (microbiote de souris grippées ou de souris saines) présentent un nombre identique de ces cellules dans les poumons (Figure 15A, Figure S6A et Figure S6B). D'autres équipes et la nôtre avons montré que la production d'IFN- γ et d'IL-17A par les cellules iNKT et les cellules $\gamma\delta$ T, respectivement, contribue au contrôle de la croissance des pneumocoques (Barthelemy et al., 2017; Cao et al., 2014; Hassane et al., 2017). L'analyse par cytométrie en flux intracellulaire indique un nombre similaire de cellules iNKT exprimant l'IFN- γ et de cellules $\gamma\delta$ T exprimant l'IL-17A suite à l'infection par *S. pneumoniae* dans les deux groupes de souris colonisées (Figure 15B). La phagocytose est un événement précoce important dans la lutte contre *S. pneumoniae*. Pour évaluer cela, des souris colonisées ont été infectées par *S.*

pneumoniae exprimant la eGFP (sérotypage 1) et 4 h plus tard, les cellules ont été collectées à partir des lavages broncho-alvéolaires (BAL). Les macrophages alvéolaires représentent de loin la population cellulaire principale dans les fluides BAL (> 95%) et leur nombre est similaire dans les deux groupes (non représentés). L'analyse par microscopie confocale ne révèle aucune différence significative entre les groupes de souris en ce qui concerne (i) la fréquence des macrophages ayant internalisés *S. pneumoniae* et (ii) le nombre moyen de bactéries internalisées par macrophage (Figure 15C et Figure 15D). L'analyse quantitative en temps réel par PCR (16S *S. pneumoniae*) sur des macrophages alvéolaires triés confirme cette observation (Figure 15E). Nous nous sommes ensuite intéressés à une possible altération de l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires. Pour évaluer cela, l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires a été mesurée. Comparé au groupe témoin, les macrophages alvéolaires prélevés sur des souris colonisées par le microbiote de souris grippées montrent une capacité altérée à tuer les pneumocoques (Figure 15F). En effet, dans ce groupe, un nombre accru de bactéries viables internalisées a été compté après lyse des macrophages et culture bactérienne. Par conséquent, les macrophages alvéolaires isolés des souris reconstituées par le microbiote « grippé », tuent moins efficacement le pneumocoque.

Nous avons ensuite examiné l'effet d'un traitement à l'acétate sur le nombre et / ou l'activation des cellules pulmonaires. Par rapport aux souris non traitées, le traitement à l'acétate ne modifie pas de manière significative la fréquence et le nombre des macrophages, des cellules dendritiques conventionnelles, des neutrophiles et des cellules T non conventionnelles, ni le seuil d'activation de ces dernières (Figure 15A, Figure 15B et Figure S6B). Nous avons ensuite examiné si le traitement à l'acétate peut améliorer les fonctions effectrices altérées des macrophages alvéolaires. Le traitement à l'acétate n'a aucun impact sur l'activité de phagocytose des macrophages alvéolaires mais améliore leur activité bactéricide (Figure 15D-F). Pour démontrer davantage le rôle des macrophages alvéolaires dans la défense pulmonaire induite par l'acétate, les souris colonisées ont été traitées avec des liposomes chargés en clodronate. L'appauvrissement des macrophages (Figure S6C) abroge l'effet protecteur de l'acétate (Figure 15G). Pour déterminer si l'acétate cible directement les macrophages, des tests d'activité bactéricide ont été effectués *in vitro*. Le prétraitement des macrophages avec l'acétate réduit le nombre de bactéries vivantes (Figure 15H). Pour conclure, la perturbation du microbiote suite à l'infection par l'IAV réduit la clairance des pneumocoques en altérant les fonctions bactéricides des macrophages alvéolaires, un effet restauré par la supplémentation en acétate.

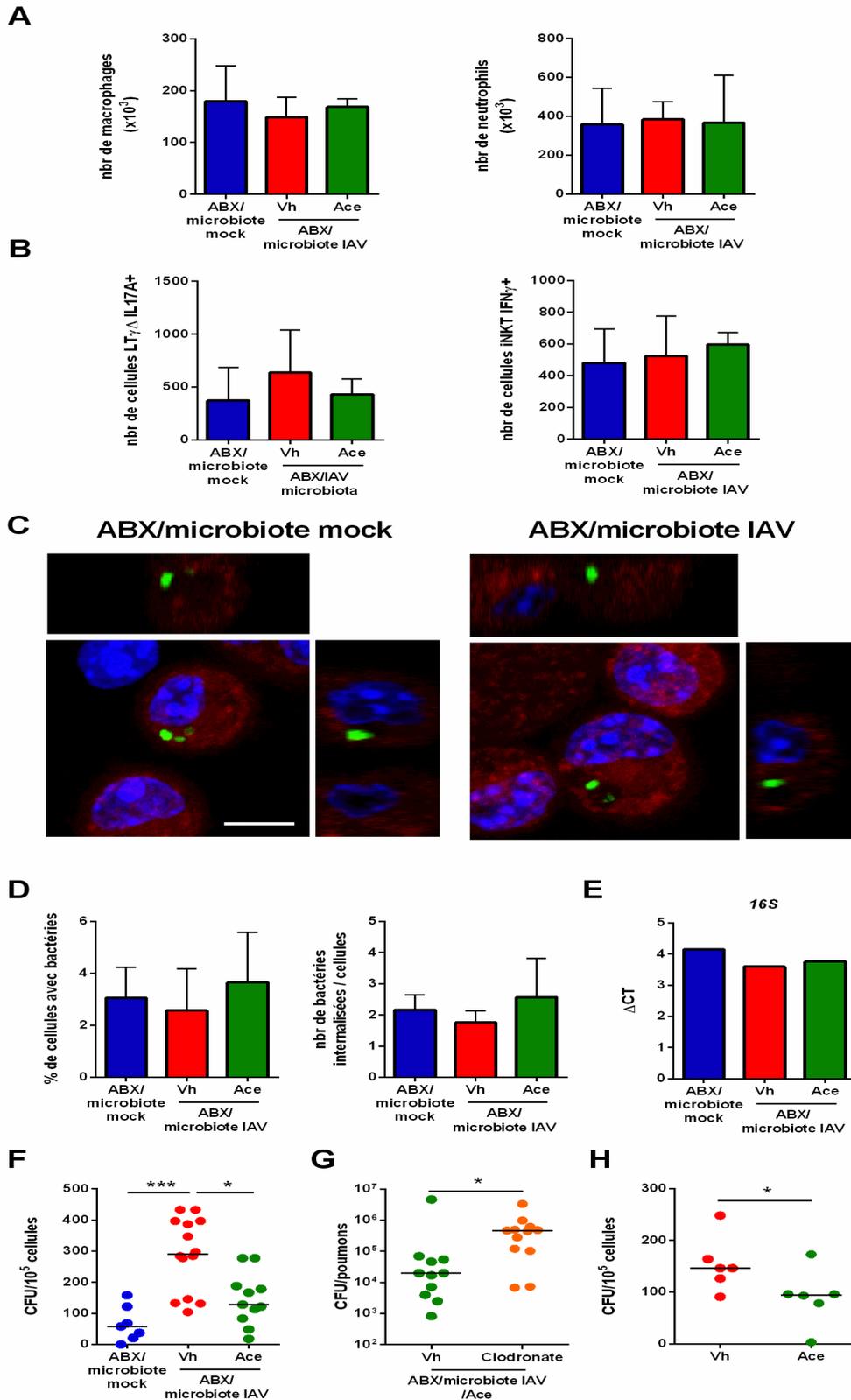


Figure 15. Altération de l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires chez des souris recolonisées avec le microbiote de souris infectées par IAV. (A) Les cellules pulmonaires de souris recolonisées (microbiote de souris infectées ou non par l'IAV) ont été analysées par cytométrie en flux. Le nombre moyen \pm SD de macrophages alvéolaires ($CD45^+Siglec F^+CD11b^{low}$) et de

neutrophiles (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺Siglec F⁻) sont représentés. (B) Les souris recolonisées ont été infectées par *S. pneumoniae* (1x10⁶ CFU) et 16 heures plus tard, le nombre moyen ± SD de cellules iNKT (CD45⁺ TCRβ⁺ CD1d tetramer⁺) positives pour l'IFN-γ et les cellules γδ T (CD45⁺ TCRβ⁻ TCRγδ⁺) positives pour IL-17A a été déterminé. (A) et (B), n = 8 (deux expériences regroupées). (C) Les souris colonisées ont été infectées par *S. pneumoniae* exprimant l'eGFP (1x10⁶ CFU.). Quatre heures plus tard, la liaison et l'internalisation des bactéries (vertes) ont été évaluées par microscopie confocale. Des images représentatives sont montrées. Le cytoplasme et la membrane cellulaire (rouge) sont marqués avec une coloration de membrane plasmique CellMask™ Green. Les noyaux (bleus) ont été visualisés par coloration au DAPI. L'image centrale est une projection à intensité maximale de la pile d'images (Barres d'échelle: 10 μm. Grossissement d'insertion: 2x). Vue orthogonale supérieure et droite pour les axes YZ et XZ. (D) La fréquence des macrophages ayant internalisés *S. pneumoniae* et le nombre moyen de bactéries internalisées par macrophage sont représentés (n = 6, une expérience représentative sur deux). À noter, 4 h après l'infection, le nombre de macrophages alvéolaires dans les BAL est identique dans les deux groupes d'animaux. Peu de neutrophiles (~ 5% du total des cellules) sont présents dans les BAL et aucun pneumocoque internalisé n'a été détecté. (E) Quantification de *S. pneumoniae* dans des macrophages alvéolaires triés (4 h après l'infection) par PCR quantitative. Les données ont été normalisées par rapport à l'expression du gène *gapdh* et les données sont exprimées en ΔCt. Une expérience représentative sur deux est illustrée. (F) Les souris colonisées (ABX / IAV) ont été traitées avec de l'acétate (Ace) (200 mM dans l'eau du biberon) ou non (Vh) cinq jours avant l'infection par pneumocoque. Les souris colonisées (ABX / mock) n'ont pas été traitées. Des macrophages alvéolaires ont été prélevés sur des souris colonisées 4 h après l'infection à *S. pneumoniae*. Après un lavage intensif, les cellules ont été lysées et étalées sur des plaques de gélose au sang. Le nombre de bactéries viables est exprimé par 1 x 10⁵ cellules (n = 7-14, deux expériences regroupées). (G) Des souris recolonisées traitées à l'acétate (ABX / IAV) ont été traitées avec des liposomes chargés en clodronate ou des liposomes vides 16 h avant l'infection par *S. pneumoniae* (voie intranasale). Les charges bactériennes dans les poumons ont été mesurées 30 h après l'infection. Les traits pleins correspondent aux valeurs des médianes (n = 11-12, deux expériences regroupées). (H) Les macrophages ont été prétraités avec de l'acétate (10 mM) pendant 1 h et ensuite exposés à *S. pneumoniae* opsonisé. Le nombre de bactéries viables a été évalué après 2 heures d'exposition post-bactérienne en comptant les CFU du lysat cellulaire. Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes (n = 6). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (A, B et D). Des différences significatives ont été déterminées en utilisant le test Kruskal – Wallis ANOVA (A, B, D, E et F) et le test Mann-Whitney U (G et H) (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001). Voir également la figure S6.

La supplémentation en acétate pendant la grippe protège contre la surinfection bactérienne

Nous avons ensuite étudié la contribution potentielle de l'altération de la production d'AGCC lors d'une infection par l'IAV sur une infection bactérienne secondaire. Pour cela, les souris infectées par l'IAV ont été traitées avec de l'acétate et secondairement infectées par *S. pneumoniae* à J7, pic de la susceptibilité à la surinfection bactérienne. La supplémentation en acétate réduit la charge bactérienne dans les poumons et entraîne une diminution de la dissémination de la bactérie dans la rate (Figure 16A). L'utilisation combinée d'acétate, de propionate et de butyrate n'améliore pas la résistance par rapport à l'acétate seul (Figure S7A). Il convient de noter que l'effet protecteur de l'acétate n'est pas associé à des changements majeurs dans la composition du microbiote intestinal (Figure 16B, Figure S7B et Figure S7C). Pour déterminer l'effet de l'acétate sur les lésions pulmonaires, nous avons effectué une

analyse histologique sur des coupes de poumons. Par rapport au groupe témoin, les souris traitées à l'acétate ont une pneumonie moins marquée. Nous avons notamment observé une diminution de l'infiltrat inflammatoire périvasculaire (Figure 16C). Nous avons ensuite déterminé si l'effet positif de l'acétate sur la charge bactérienne et la pathologie pulmonaire s'étendait à une amélioration de la morbidité et de la mortalité. Bien que le traitement à l'acétate n'ait aucun effet sur la perte de poids due à une infection par l'IAV, il favorise la reprise de poids après une infection bactérienne secondaire (Figure S8A). De façon très intéressante, la supplémentation en acétate au cours de l'infection par l'IAV améliore de manière significative la survie des souris surinfectées (~ 50% de taux de survie, Figure 16D).

Nous avons ensuite évalué les mécanismes par lesquels l'acétate améliore la morbidité et la mortalité lors de la surinfection par *S. pneumoniae*. L'altération des fonctions de barrière épithéliale, induite par le virus, contribue à la surinfection bactérienne (Barthelemy et al., 2018; McCullers, 2014; Rynda-Apple et al., 2015). Le traitement à l'acétate n'affecte pas la charge virale dans les poumons et n'a aucun effet sur l'expression des gènes associés aux fonctions de barrière pulmonaire, dont l'expression est fortement modifiée pendant la grippe (Figure 16E). De même, l'acétate n'affecte pas l'expression des gènes inductibles par l'IFN et des médiateurs antiviraux (Figure S8B). Par conséquent, l'acétate n'agit pas sur la réplication virale et la dysfonction de la barrière épithéliale pulmonaire. Nous avons ensuite postulé que l'effet bénéfique de l'acétate puisse dépendre des fonctions antibactériennes des cellules immunitaires. Comparé aux témoins, le traitement à l'acétate ne modifie pas le nombre de macrophages, de cellules dendritiques, de neutrophiles, de cellules iNKT exprimant l'IFN- γ et de cellules T $\gamma\delta$ exprimant l'IL-17A (Figure S8C et Figure S8D). Fait intéressant, la déplétion des macrophages par inoculation de liposome contenant du clodronate abroge l'effet bénéfique de l'acétate chez les souris surinfectées (Figure 16F). Dans l'ensemble, la faible production d'acétate pendant l'infection grippale influe sur la susceptibilité à l'infection bactérienne secondaire et la supplémentation en acétate est suffisante pour améliorer la surinfection bactérienne post-grippale.

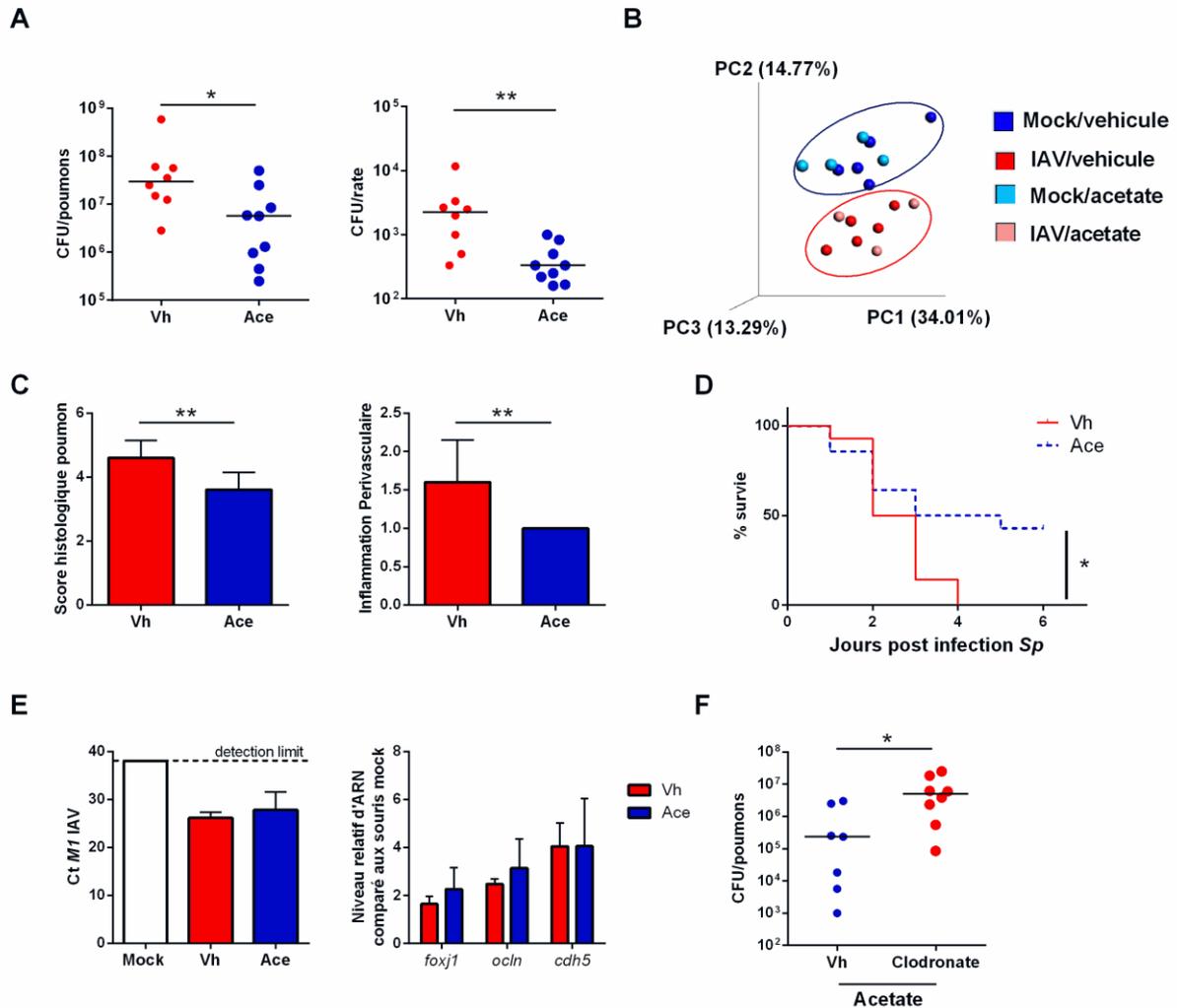


Figure 16. Effet de la supplémentation en acétate chez des souris doublement infectées par l'IAV et *S. pneumoniae*. Les souris infectées par l'IAV ont été traitées avec de l'acétate (Ace) (200 mM dans l'eau potable) ou non (Vh) à partir du deuxième jour d'infection, cinq jours avant l'infection par pneumocoque (1×10^3 CFU). (A) Le nombre de bactéries a été déterminé 30 h après infection à *S. pneumoniae*. Les traits pleins correspondent aux valeurs des médianes ($n = 8-9$, une expérience représentative sur quatre est montrée). (B), Le PCoA a été réalisée sur des échantillons (caecum) prélevés sur des souris non infectées traitées (bleu vif) ou non (bleu foncé) avec de l'acétate pendant 5 jours et sur des souris infectées 7 jours plus tôt par H1N1 et traitées (rose) ou non (rouge) avec de l'acétate après 2 jours d'infection ($n = 4-5$). (C) Analyse histologique des coupes pulmonaires. Des sections aléatoires ont été évaluées pour les niveaux de pneumonie (gauche, somme de différents paramètres), y compris les infiltrats inflammatoires périvasculaires (droite) ($n = 4$ souris / groupe). (D) La survie des animaux surinfectés a été surveillée ($n = 14$, deux expériences regroupées). (E) Gauche, les niveaux d'ARNm de l'IAV *M1* ont été mesurés dans l'ensemble des poumons par RT-PCR quantitative. Les données sont exprimées en valeurs de Ct. La ligne pointillée représente le seuil de détection. Droite, le nombre de copies d'ARNm des gènes a été quantifié par RT-PCR. Toutes les données de RT-PCR sont normalisées selon l'expression de la *Gapdh* et le niveau relatif d'ARN est exprimé par rapport aux groupes de souris non infectées (mock). Une expérience représentative sur deux ($n = 5$) (*Ocln*, *occlus*, *Cdh5*, *VE-cadhérine*). (F) Les macrophages alvéolaires de souris infectées par l'IAV et traitées à l'acétate ont été déplétés (liposomes contenant du clodronate), ou non (liposomes vides), avant infection par pneumocoque ($n = 7-8$, une expérience réalisée). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ED (C et E). Des différences significatives ont été déterminées en

utilisant le test de Mann-Whitney U (A et F) ou ANOVA suivi de holm-sidak (C). D, la survie des souris a été comparée en utilisant l'analyse de Kaplan-Meier et le test du log-rank (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Voir également les figures S7 et S8.

L'administration exogène d'un agoniste synthétique du GPR43 protège contre l'infection bactérienne secondaire post-grippale

L'acétate peut agir via le GPR43 (ou FFAR2) et, dans une moindre mesure, GPR41 (ou FFAR3) (Milligan et al., 2017). Par rapport aux souris GPR43 compétentes, l'acétate ne réduit pas significativement la charge bactérienne chez les souris *Gpr43*^{-/-} surinfectées (Figure 17A). Il convient de noter qu'aucune différence significative n'a été notée en termes de charges virales (non représentées) et bactériennes entre les souris de type sauvage traitées et les souris *Gpr43*^{-/-}. GPR43 peut être activé *in vivo* (Milligan et al., 2017). Les macrophages alvéolaires expriment des transcrits pour *gpr43*, tandis que l'expression d'ARNm de *gpr41* est beaucoup plus faible (16 fois moins exprimé) (Figure 17B). Pour étudier les conséquences potentielles de l'activation locale de GPR43 sur la surinfection bactérienne post-grippale, des souris ont été traitées avec TUG-1375 (un agoniste sélectif de GPR43) par administration intra-nasale. L'activation pharmacologique de GPR43, juste avant la surinfection par *S. pneumoniae*, conduit à une réduction significative de la charge bactérienne pulmonaire et de sa dissémination dans le sang (Figure 17C). En revanche, l'agoniste sélectif de GPR41, AR420626, ne confère aucune protection (Figure 17D). Par conséquent, l'agoniste GPR43 TUG-1375 induit le même avantage que l'acétate dans le traitement de la surinfection bactérienne post-grippale. Cette dernière découverte ouvre de nouvelles possibilités importantes dans le domaine du traitement pharmacologique de la surinfection bactérienne post-grippale.

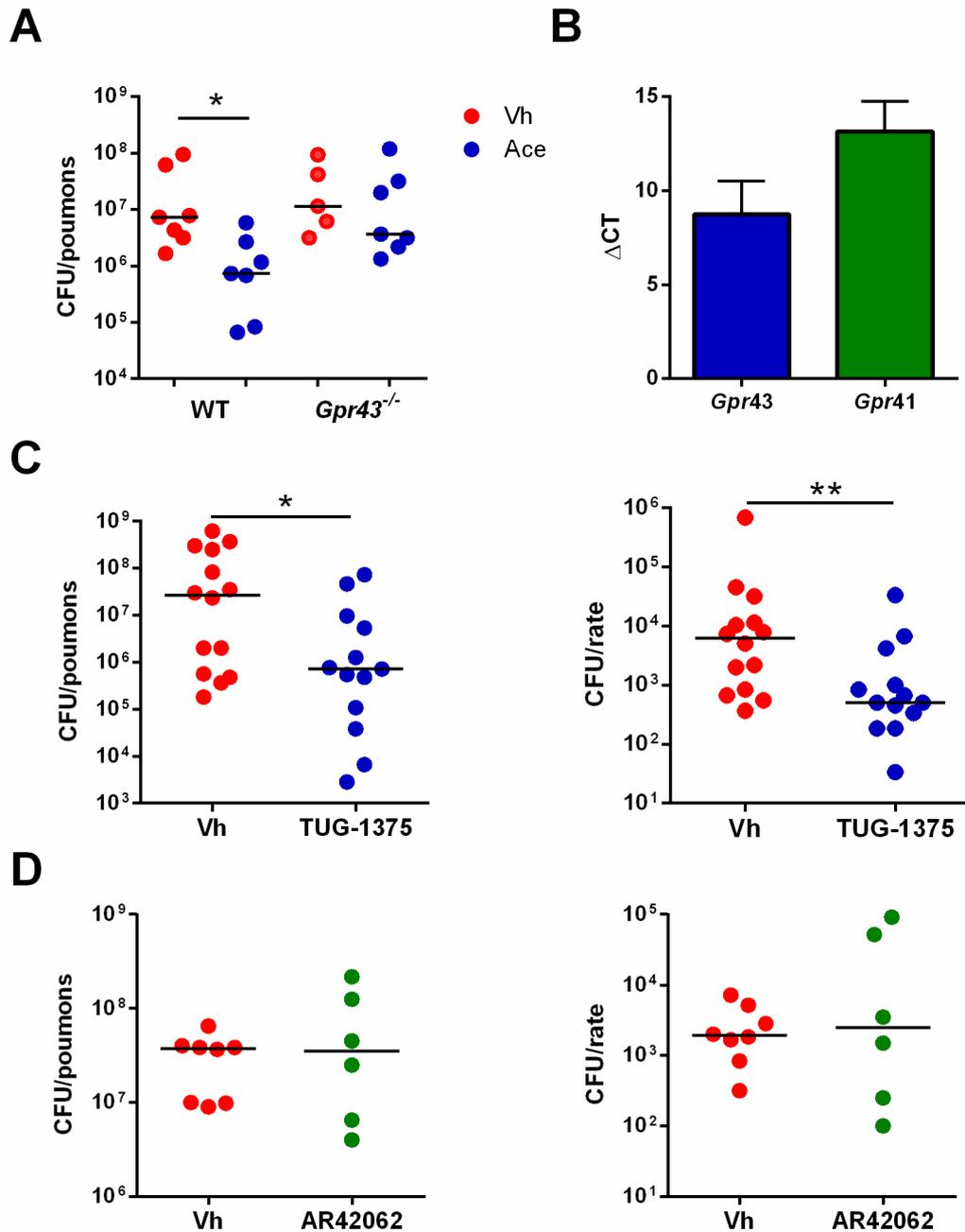


Figure 17. Effet du traitement par l'agoniste du GPR43 sur la surinfection bactérienne post-grippale. (A) Les souris de type sauvage (WT) et les souris *Gpr43*^{-/-} ont été traitées avec de l'acétate comme sur la figure 6A (n = 5-7, une expérience représentative sur deux est montrée). (B) Les niveaux de transcrits de *gpr43* et *gpr41* ont été évalués par RT-PCR quantitative sur des macrophages alvéolaires enrichis (2 expériences indépendantes). (C et D) Les souris infectées par l'IAV ont été traitées avec l'agoniste spécifique de GPR43 TUG-1375 (C) ou avec l'agoniste spécifique de GPR41 AR420626 (D) (1 mM dans 50 μ l, en intranasale) ou le véhicule (Vh) 16 h avant l'infection par pneumocoque. Le nombre de bactéries dans les poumons et la rate a été déterminé 30 h après l'infection par *S. pneumoniae*. (C), n = 13-14 (deux expériences regroupées) et (D), n = 6-8 (une expérience représentative sur deux). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ED. Des différences significatives ont été déterminées en utilisant le test Kruskal – Wallis ANOVA (A) et le test Mann-Whitney U (B-D) (* p <0,05, ** p <0,01).

Matériels et méthodes

Souris et déclaration éthique

Des souris C57BL/6J exemptes d'agents pathogènes spécifiques (mâles de 6 semaines) ont été achetées auprès de Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Les souris ont été maintenues dans une installation de niveau de biosécurité 2 au Centre de ressources animales de l'Institut Lille Pasteur pendant au moins deux semaines avant leur utilisation afin de permettre une acclimatation appropriée. Toutes les expériences étaient conformes aux réglementations et directives éthiques nationales et institutionnelles en vigueur (B59-350009, numéro de protocole de l'Institut Pasteur de Lille: 2015121722376405 et 13743-2018022211144403). Des souris Gpr43^{-/-} (> 10 rétrocroisements) ont été produites comme décrit précédemment (Maslowski et al., 2009).

Virus et bactéries

La souche du virus de l'IAV H3N2 adaptée aux souris Scotland/20/1974, la souche H1N1 WSN/1933, la souche H1N1 California/04/2009 (pdm09) et l'isolat clinique *S. pneumoniae* E1586 (sérotipe 1) ont été décrits dans (Barthelemy et al., 2018).

Régimes

Sauf indication contraire, les souris ont reçu une nourriture pour rongeurs standard (SAFE A04) (SAFE, Augy, France) et de l'eau à volonté. Ce régime contient ~ 11,8% de fibres, dont ~ 10% de fibres insolubles dans l'eau (3,6% de cellulose) et 1,8% de fibres solubles dans l'eau.

Infections et évaluation des charges bactériennes

Pour l'infection par l'IAV seul, les souris ont été anesthésiées par injection intramusculaire de 1,25 mg de kétamine plus 0,25 mg de xylazine dans 100 µl de solution saline tamponnée au phosphate (PBS), puis infectées par voie intranasale (in) avec 50 µl de PBS contenant (ou non, dans un échantillon simulé) 30 unités de formation de plaque (PFU) de la souche H3N2 A/Scotland/20/1974, 200 PFU de la souche H1N1 A/WSN/1933 ou 100 PFU de la souche H1N1 A/California/04/2009 (pdm09) (Barthelemy et al., 2017, 2018). Ces doses correspondent à des doses sublétales, qui sont nécessaires pour étudier l'infection bactérienne secondaire. Pour l'infection par *S. pneumoniae* seul, une dose élevée (1×10^6 CFU) de *S. pneumoniae* sérotipe 1, un sérotipe lié à une maladie pneumococcique invasive (isolat

clinique E1586) a été utilisée. Pour dépléter les macrophages alvéolaires, les souris ont été inoculées par i.n avec des liposomes vides ou des liposomes contenant du clodronate (50 µl, Liposoma, Amsterdam, Pays-Bas) 24 h avant l'infection par *S. pneumoniae*. Pour l'infection secondaire à pneumocoque, les souris infectées par l'IAV (H1N1, pdm2009) ont été infectées à J7 avec une faible dose de *S. pneumoniae* (1×10^3 CFU), une dose largement suffisante pour permettre la prolifération bactérienne et la dissémination. Chez les souris infectées ou co-infectées, les bactéries dans les poumons et la rate ont été comptées 30 h après l'infection par *S. pneumoniae* en plaçant des dilutions en série (de 10 fois) d'homogénats de poumon ou de rate sur des plaques de gélose au sang. Les plaques ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂ pendant une nuit et les bactéries viables ont été comptées 24 h plus tard. La survie et le poids corporel ont été surveillés quotidiennement après l'infection par l'IAV et les souris ont été euthanasiées lorsqu'elles ont perdu plus de 20% de leur poids initial.

Réactifs, anticorps, cytométrie en flux et tri cellulaire

L'agoniste GRP43 TUG-1375 (2*R*,4*R*)-2-(2-chlorophenyl)-3-(4-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)benzoyl)thiazolidine-4-carboxylic acid) et l'agoniste GPR41 *N*-(2,5-dichlorophenyl)-4-(furan-2-yl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxamide ont été produits comme décrit (Hansen et al., 2018; Hudson et al., 2014). L'acétate, le propionate et le butyrate provenaient de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). L'ampicilline, la néomycine, le métronidazole, la ciprofloxacine et la nystatine étaient de Sigma-Aldrich et la vancomycine était de R&D systems (Minneapolis, MN). Les anticorps utilisés pour la cytométrie en flux ont été décrits dans (Barthelemy et al., 2016, 2017). L'analyse par cytométrie en flux a été effectuée exactement comme décrit (Barthelemy et al., 2016). Anticorps monoclonaux contre la souris CD45 (conjugués Brilliant Violet 510), CD11b (conjugué PerCP-Cy5.5), Siglec F (conjugué PE), Ly6G (conjugué APC-H7), CD11c (conjugué PE-Cy7), MHC classe II (AF700-conjugué), CD64 (conjugué APC), TCRβ (conjugué PE-Cy7), TCR γδ (conjugué PerCP-Cy5.5), IFN-γ (AlexaFluor-647), IL-17A (PE) et les contrôles isotypiques ont été achetés auprès de BioLegend (San Diego, États-Unis) et BD Bioscience (New Jersey, États-Unis). Les tétramères CD1d (conjugués à l'APC) provenaient de la Tetramer Facility de l'Institut national des allergies et des maladies infectieuses (Emory University, Atlanta, GA). L'iodure de propidium a été acheté auprès de BioLegend (San Diego, CA).

Le marquage cellulaire et la cytométrie en flux ont été réalisées comme décrit précédemment (Barthelemy et al., 2017). En bref, les cellules mononucléaires des poumons

Résultats

ont été étalées dans des plaques à 96 puits à fond rond et ont été marquées pour les cellules mortes (ThermoFisher Scientific). Pour identifier les cellules immunitaires, les cellules mononucléaires pulmonaires ont été marquées avec des dilutions appropriées d'anticorps conjugués exactement comme décrit (Barthelemy et al., 2017). Les données ont été acquises sur un cytomètre LSRFortessa™ (Becton Dickinson Biosciences, Rungis, France) exécutant le logiciel FACSDiva™ et ont ensuite été analysées avec le logiciel FACSDiva™. Pour l'analyse, 1×10^6 cellules ont été acquises. Les macrophages ont été identifiés comme CD45⁺ Siglec F⁺ CD11b^{low} et les neutrophiles comme CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺ Siglec F⁻. Les cellules dendritiques conventionnelles ont été identifiées comme CD45⁺ CD11c^{high} MHC class II⁺ Siglec F⁻ CD64⁻, les cellules dendritiques dérivées de monocytes comme CD45⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ Cd11b⁺ Siglec F⁻ Ly6G⁻ CD64⁺, les cellules T $\gamma\delta$ comme CD45⁺ TCR β ⁻ TCR $\gamma\delta$ ⁺ et les iNKT comme CD45⁺ TCR β ⁺ CD1d tetramer⁺. Le marquage FACS intracellulaire des cellules iNKT et des cellules T $\gamma\delta$ a été réalisé comme décrit (Barthelemy et al., 2017; Hassane et al., 2017). Après marquage de la surface cellulaire, les macrophages alvéolaires ont été triés à l'aide d'un cytomètre FACS Aria (BD Biosciences).

Collecte d'échantillons, extraction d'ADN et numéro de copie du gène d'ARNr 16S

Pour étudier l'impact de l'infection grippale sur le microbiote intestinal, les souris ont été infectées via i.n. par l'IAV et leurs excréments ont été collectés à J7 et J14. Les excréments de chaque souris ont également été collectés le jour de l'infection (une heure avant l'infection par l'IAV) et ont servi de témoins. Des échantillons de caecum ont été prélevés sur différents ensembles d'animaux, y compris des souris non infectées et des souris infectées par IAV (J7 et J14). Des échantillons fécaux de souris non traitées ou traitées à l'acétate ont également été collectés à J7. Les échantillons fécaux et caeaux ainsi que les homogénats de caecum entiers ont été stockés à -80°C jusqu'à une analyse plus approfondie. L'ADN microbien a été extrait de 150 mg d'échantillons fécaux ou caeaux (QIAamp DNA stool Kit, Qiagen, Germany). La concentration d'ADN extrait a été déterminée en utilisant un intercalant fluorométrique d'ADN (SYBR® Green, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA)). Les charges bactériennes et fongiques ont été quantifiées à l'aide d'analyses qPCR. Des courbes standard ont été construites pour optimiser les expériences et effectuer une quantification absolue. La norme était un mélange de 17 ADN génomique extrait de différentes souches bactériennes avec un nombre pair de copies du gène d'ARNr 16S de chaque souche ou un mélange de 11 ADN génomique extrait de plusieurs champignons. En bref, $4,8 \mu\text{L}$ (1 ng

d'ADN) ont été ajoutés à 10 μ L de mélange (Taqman Universal MasterMix, Thermofischer) et des concentrations optimisées d'amorce/sonde pour obtenir une efficacité qPCR de $100 \pm 10\%$ sur le standard et les échantillons. Les conditions au niveau du nombre de cycles étaient celles recommandées par le fabricant. Chaque échantillon a été analysé en trois exemplaires. Les valeurs de Ct ont été calculées à l'aide des paramètres par défaut des logiciels fournis par les fabricants d'instruments de PCR en temps réel (7900HT Fast PCR en temps réel, Thermofischer). Les valeurs moyennes de Ct ont finalement été confrontées à la courbe standard pour déduire le nombre de copies de gènes d'ARNr 16S ou 18S dans chaque échantillon.

Pyroséquençage du gène ARN 16S et traitement des données

La région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S a été amplifiée en utilisant un protocole de préparation d'amplicons optimisé et standardisé (Metabiote®, GenoScreen, Lille, France). Un contrôle positif (communauté de bactéries artificielles comprenant 17 bactéries différentes (ABCv2)) et négatif (eau stérile) ont également été inclus. En bref, les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant 5 ng d'ADN génomique et des amorces de fusion à code-barres internes (à des concentrations finales de 0,2 μ M), avec une température de recuit de 50°C pendant trente cycles. Les produits de PCR ont été purifiés en utilisant des billes magnétiques Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), quantifiés selon le protocole de GenoScreen et mélangés en une quantité équimolaire. Le séquençage a été effectué sur la plate-forme Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Les données appariées ont ensuite été démultiplexées par échantillon et soumises au processus suivant: (1) recherche et suppression de l'amorce avant et arrière à l'aide de CutAdapt, sans aucune incompatibilité autorisée dans les séquences d'amorces; (2) filtrage de la qualité à l'aide du script PERL PRINSEQ-lite, en tronquant les bases à l'extrémité 3' avec un score de qualité Phred <30; (3) ensemble de lecture à extrémités appariées utilisant FLASH, avec un chevauchement minimum de 30 bases et > 97% d'identité de chevauchement.

Analyses d'affiliation taxonomique et de diversité

Des analyses taxonomiques et de diversité ont été réalisées avec le pipeline Metabiote Online v2.0 (GenoScreen, Lille, France) qui est partiellement basé sur le logiciel QIIME v1.9.1. Après le prétraitement, les séquences d'ARNr 16S de pleine longueur ont été analysées et les séquences chimériques ont été retirées de l'ensemble de données (méthode interne basée sur l'utilisation de l'algorithme USEARCH8.1). Ensuite, une étape de clustering a été réalisée

afin de regrouper des séquences similaires avec un seuil défini d'identité nucléique (97% d'identité pour une affiliation au niveau du genre sur les régions V3-V4 du gène ARNr 16S) avec Uclust v1.2.22q via un processus de sélection des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) à référence ouverte et méthode de liaison complète, créant enfin des groupes de séquences ou OTU. Une étape de nettoyage OTU basée sur les données obtenues pour la communauté ABCv2 a été réalisée. La séquence la plus abondante de chaque OTU a été considérée comme la séquence de référence de son OTU et a ensuite été comparée taxonomiquement à une base de données de référence (base de données Greengenes, version 13_8; www.greengenes.gov) par la méthode de classification RDP v2.2. Divers indices de diversité ont été calculés à l'aide de QIIME v1.9.1. Les indices de diversité α (au sein de l'échantillon) et la diversité bêta (entre les échantillons) ont été utilisés pour examiner les changements dans la structure de la communauté microbienne entre les échantillons de groupes fécaux et caecaux de souris. La mesure de la diversité α comprenait l'indice de diversité de Shannon, le nombre d'OTU observés et l'indice Chao1 (richesse et uniformité). Pour les mesures de diversité β , nous avons calculé les distances UniFrac pondérées. La méthode d'analyse des coordonnées principales (PCoA) a été utilisée pour visualiser les différences microbiennes globales du groupe. Les différences dans l'abondance relative des taxons individuels, entre les échantillons caecaux, ont été évaluées en utilisant le test de Mann-Whitney U contrôlant le taux de fausses découvertes (FDR), implémenté dans le logiciel QIIME. Le test de rang signé de Wilcoxon (test t apparié) a été utilisé pour l'analyse 16S d'échantillons fécaux.

Mesure de la consommation alimentaire et expériences de prise alimentaire Pair-fed

La consommation alimentaire a été calculée quotidiennement pendant l'infection grippale. En bref, une quantité connue de nourriture a été placée dans une cage de six souris. La quantité de nourriture restante a été mesurée toutes les 12 h. La quantité de nourriture consommée a été calculée par la différence divisée par six et exprimée en consommation alimentaire par souris et par jour. Le groupe de souris Pair-fed recevra seulement autant de nourriture par jour que celle consommée par les souris infectées par l'IAV, nous avons restreint l'accès à la nourriture au cours des trois derniers jours pour 15% (jour 4), 35% (jour 5) et 85% (jour 6), respectivement (sacrifice au jour 7). Les souris ont été anesthésiées au jour 0. La restriction alimentaire a été déterminée à l'aide de données générées à partir de souris infectées par l'IAV dans le but d'obtenir une perte de masse corporelle de $\sim 15\%$ (comme à

J7). De la nourriture était fournie deux fois par jour aux animaux Pair-fed et de l'eau était disponible à tout moment. Les souris du groupe ad libitum (normalement nourries) ont eu un accès illimité à la nourriture et à l'eau. La perte de poids des souris Pair-fed et des souris infectées par l'IAV a été mesurée quotidiennement. Les échantillons fécaux (séquençage de l'ARNr 16S) et le contenu caecal (quantification SCFA) ont été collectés au départ (contrôle) et après sept jours de protocole Pair-fed.

Mesure de la concentration des AGCC et traitement avec l'acétate ou agonistes GRP41/GPR43

Les concentrations en AGCC dans le contenu caecal ont été déterminées après extraction avec de l'éther diéthylique en utilisant la chromatographie en phase gazeuse GC-2014 avec un auto-injecteur AOC-20i (Shimadzu, Hertogenbosch, Pays-Bas) comme décrit (De Weirdt et al., 2010). Les concentrations des AGCC dans le plasma ont été déterminées après extraction avec de l'acétonitrile. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol/g}$ de contenu caecal ou en μM (sang). Pour évaluer les effets des AGCC sur la défense pulmonaire contre les infections bactériennes, les souris conventionnelles (sans traitement ABX), les souris recolonisées avec le microbiote IAV et les souris infectées par l'IAV ont été traitées avec de l'acétate (200 mM, eau potable) cinq jours avant l'infection par *S. pneumoniae* (1×10^6 CFU pour les souris conventionnelles et recolonisées et 1×10^3 CFU pour les souris infectées par l'IAV). Les souris infectées par l'IAV ont également été traitées avec une combinaison d'acétate, de propionate et de butyrate (200 mM, 50 mM et 5 mM, respectivement). L'agoniste GRP43 TUG-1375 et l'agoniste GPR41 AR420626 (solutions mères dans du DMSO à 20 mM) ont été inoculés par i.n. (50 μl , 1 mM) 16 h avant l'infection à *S. pneumoniae*. L'évaluation de la pathologie pulmonaire des souris à double infection a été réalisée comme décrit (Horvat et al., 2007).

Quantification des charges virales et évaluation de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative

L'ARN total des tissus pulmonaires a été extrait avec le kit NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, Hoerd, Allemagne). L'ARN a été transcrit de manière inverse avec le kit High-Capacity cDNA Archive (Life Technologies, USA). L'ADNc résultant a été amplifié en utilisant la PCR en temps réel à base de SYBR Green et le QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems™, USA) selon le protocole du fabricant. La quantification relative a été effectuée en utilisant le gène codant pour la glyceraldéhyde 3-

phosphate déshydrogénase (*Gapdh*). Des amorces spécifiques ont été conçues à l'aide du logiciel Primer Express (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). Les niveaux d'ARNm relatifs ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ont été déterminés en comparant (a) les seuils du cycle de PCR (Ct) pour le gène d'intérêt et le gène de ménage *Gadph* (ΔCt) et (b) les valeurs de ΔCt pour les groupes traités et contrôles ($\Delta\Delta Ct$). Les données sont exprimées sous la forme d'une augmentation de l'expression relative de l'ARN par rapport au niveau moyen d'expression chez les souris contrôles. La quantification de l'ARN viral a été effectuée comme décrit dans (Paget et al., 2011). La charge virale est normalisée par rapport au niveau d'expression de la *gapdh*. Les données ont été normalisées par rapport à l'expression du gène *gapdh* et ont été exprimées en Ct.

Expériences de transfert de microbiote

Les souris ont reçu des antibiotiques à large spectre (ampicilline 2g/L; néomycine 2g/L, métronidazole 1g/L, ciprofloxacine 1g/L, nystatine 0,08g/L et vancomycine 0,5g/L) dans de l'eau additionnée de glucose (10g/L) pour trois semaines. Les cages ont été changées tous les deux jours. L'appauvrissement des bactéries dans les fèces a été vérifié après culture dans un milieu de bouillon au thioglycollate (Sigma) pendant 24h à 37°C. Les souris traitées par antibiotiques ont été colonisées deux fois (trois jours et cinq jours après l'arrêt des antibiotiques) par administration orale de 200 μ l de suspension caecale contenant 1×10^9 bactéries récupérées à partir de souris naïves, de souris traitées ou de souris infectées par l'IAV (J7). Les souris colonisées ont été infectées par *S. pneumoniae* (1×10^6 CFU) trois jours après la première colonisation. Les poids des souris témoins et ABX (colonisées ou non) étaient égaux au moment de l'infection par pneumocoque.

Etude de la capacité de phagocytose et bactéricide *in vivo* et évaluation de la charge bactérienne dans les macrophages alvéolaires

Pour visualiser les bactéries associées aux phagocytes ou internalisées par les phagocytes, des souris recolonisées ont été infectées par *S. pneumoniae* exprimant l'eGFP (1×10^6 CFU, sérotype 1) (un cadeau du Dr JW Veening, université de Groningen, Pays-Bas). Quatre heures plus tard, des cellules de BAL (> 95% de macrophages alvéolaires) ont été lavées et étalées (u-Slide 8 Well ibiTreat, IBIDI, Martinsried, Allemagne). Les membranes ont été marquées (tache de membrane plasmique rouge foncé CellMask™, Thermofisher) et après lavages et fixation, le noyau a été marqué avec DAPI (Thermofisher) et maintenu dans du PBS. Des échantillons ont été observés avec CLSM Zeiss LSM 880 (Zeiss, Oberkochen,

Allemagne) avec l'objectif Plan Achromat 63xoil/1.4. L'excitation a été réalisée avec un laser Argon (458 à 488 à 514 nm) ou une diode laser (561 nm et 405 nm) (Lasos Lasertechnik GmbH, Iéna, Allemagne). La plage de détection spectrale a été ajustée pour chaque fluorophore en utilisant une unité de détection Quasar. Les images ont été acquises avec le logiciel ZEN (Zeiss, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne), dissociées par le logiciel AutoQuant (Bitplane, société Oxford Instruments, Zurich, Suisse) et assemblées à l'aide du logiciel ImageJ. La fréquence des macrophages ayant internalisé *S. pneumoniae* et le nombre moyen de bactéries internalisées par macrophage ont été déterminés (plus de 20 champs visuels analysés/souris). Pour déterminer la charge bactérienne dans les macrophages alvéolaires, les cellules (CD45⁺ Siglec F^{hi} CD11b⁻) ont été triées à l'aide d'un cytomètre FACS Aria (BD Biosciences) (> 99% de pureté). L'ADN a été extrait et analysé par PCR quantitative (QuantStudio 12K Flex, Applied Biosystems). Les données ont été normalisées par rapport à l'expression du gène *gapdh* et ont été exprimées en Δ Ct. Pour déterminer l'activité bactéricide des macrophages, des souris recolonisées ont été infectées par *S. pneumoniae* (sérotipe 1) (1×10^6 CFU). Quatre heures plus tard, des cellules de BAL ont été prélevées et largement lavées avec du PBS en présence de 15 μ g/ml de gentamycine (Thermo Fisher Scientific). Les cellules ont ensuite été lavées deux fois dans du PBS stérile et lysées dans de l'eau stérile. Pour évaluer l'activité bactéricide, le nombre de bactéries viables ingérées a été déterminé par étalement quantitatif de dilutions en série des lysats sur des plaques de gélose au sang. Le nombre de bactéries viables a été exprimé pour 1×10^5 cellules.

Quantification *in vitro* de l'activité bactéricide

Pour quantifier l'activité bactéricide *in vitro*, les macrophages ont été prétraités avec de l'acétate (10 mM) pendant 1 h, puis exposés avec *S. pneumoniae* opsonisé à 10 MOI. Les cellules ont été incubées à 4°C pendant 1h, suivies de 3h d'incubation à 37°C pour l'internalisation bactérienne. Les cellules ont été lavées dans du PBS stérile, incubées avec de la pénicilline et de la streptomycine (30U/ml) pendant 30 min pour tuer les bactéries extracellulaires, puis lavées et incubées avec de la vancomycine (0,75 μ g/ml) pendant 2 h. Les macrophages exposés aux bactéries ont été lysés à 0 et 2 h après l'exposition. Le nombre de bactéries viables a été déterminé par étalement quantitatif des dilutions en série des lysats sur des plaques de gélose au sang.

Croissance in vitro de S. pneumoniae

Des colonies de *S. pneumoniae* prélevées durant la croissance exponentielle ont été ajoutées au bouillon Todd Hewitt à l'absorbance de 0,04 DO (600 nm) en l'absence ou en présence de 0,1, 1 ou 10 mM d'acétate, ou 1 U/ml de pénicilline et 1 µg/ml de streptomycine utilisé ici comme contrôle positif. La densité optique a été mesurée toutes les 30 minutes.

Analyses statistiques

Sauf indication contraire, les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (SD). Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism v6. Un test de Mann-Whitney U a été utilisé pour comparer deux groupes, sauf indication contraire. Le test de rang signé de Wilcoxon (test t apparié) a été utilisé pour l'analyse 16S d'échantillons fécaux. Les comparaisons de plus de deux groupes entre eux ont été analysées avec le test unidirectionnel ANOVA Kruskal-Wallis (non paramétrique), suivi par le post-test de Dunn. La survie des souris a été comparée en utilisant l'analyse de Kaplan-Meier et le test de log-rank. *, P <0,05; **, p <0,01; ***, p <0,001.

Figures supplémentaires

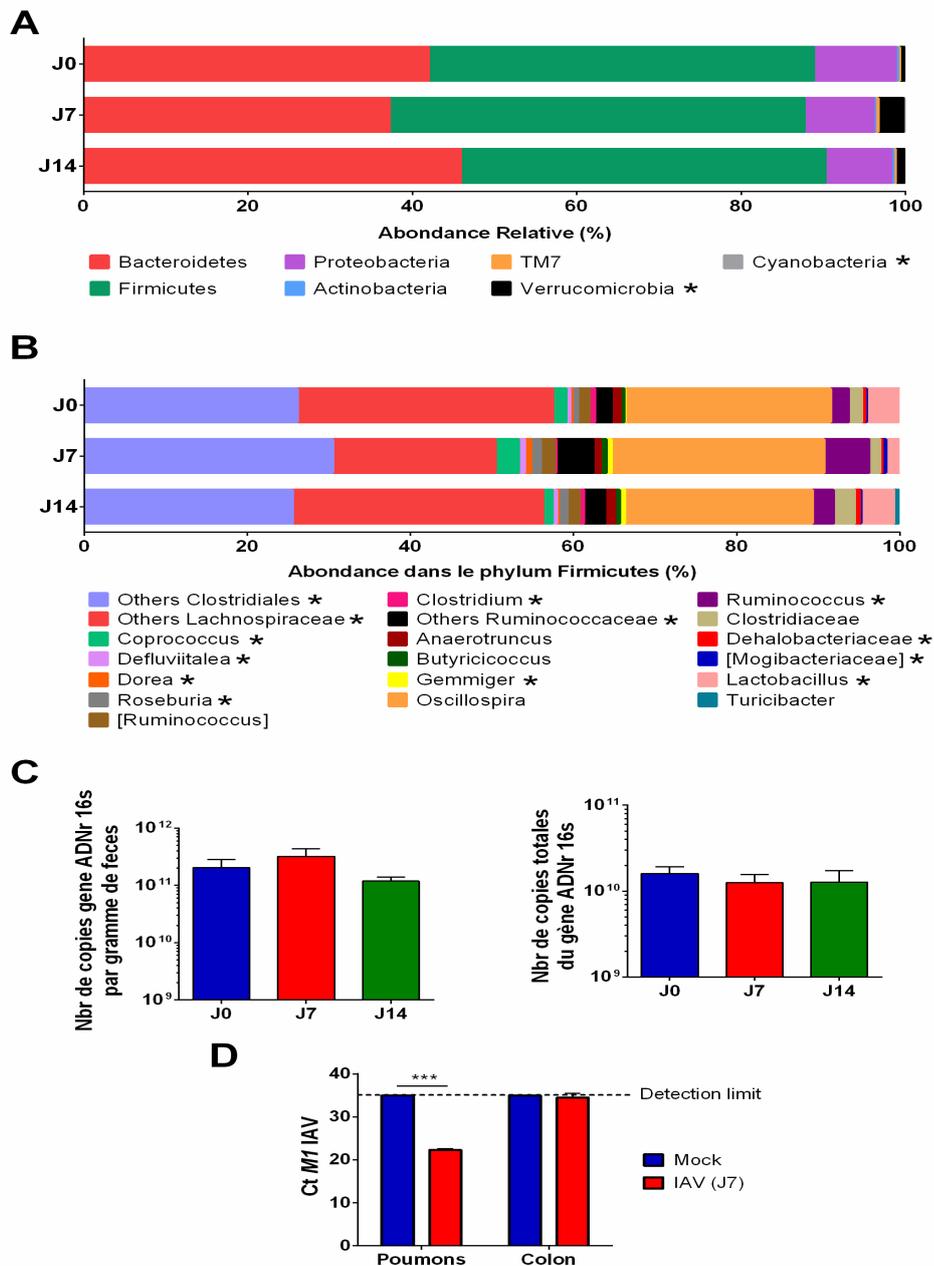


Figure S1. Effet de l'infection par l'IAV sur la composition du microbiote intestinal (A et B), Composition du microbiote au niveau du phylum (A) et au sein du phylum des Firmicutes (B) (H3N2 / fèces). Les blocs colorés indiquent les taxons avec une abondance relative moyenne (n = 24, trois expériences regroupées). (C), L'abondance bactérienne totale (H3N2) a été estimée avec par qPCR et est exprimée en nombre de copies du gène de l'ADNr 16S par gramme de selles (gauche) et par caecum (droite). (D), les niveaux d'ARNm IAV M1 ont été mesurés dans les poumons et le côlon entier par qPCR. Les données sont exprimées en valeurs de Ct. La ligne pointillée représente le seuil de détection. C et D, n = 4-7 (une expérience représentative sur deux). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (C, D). Des différences significatives ont été déterminées à l'aide du test de rang signé de Wilcoxon (A et B, tableau S1), du test ANOVA de Kruskal – Wallis (C) et du test Mann-Whitney U (D) (* p < 0,05, * p < 0,001). Voir également la figure 1 et les tableaux S1 et S2.**

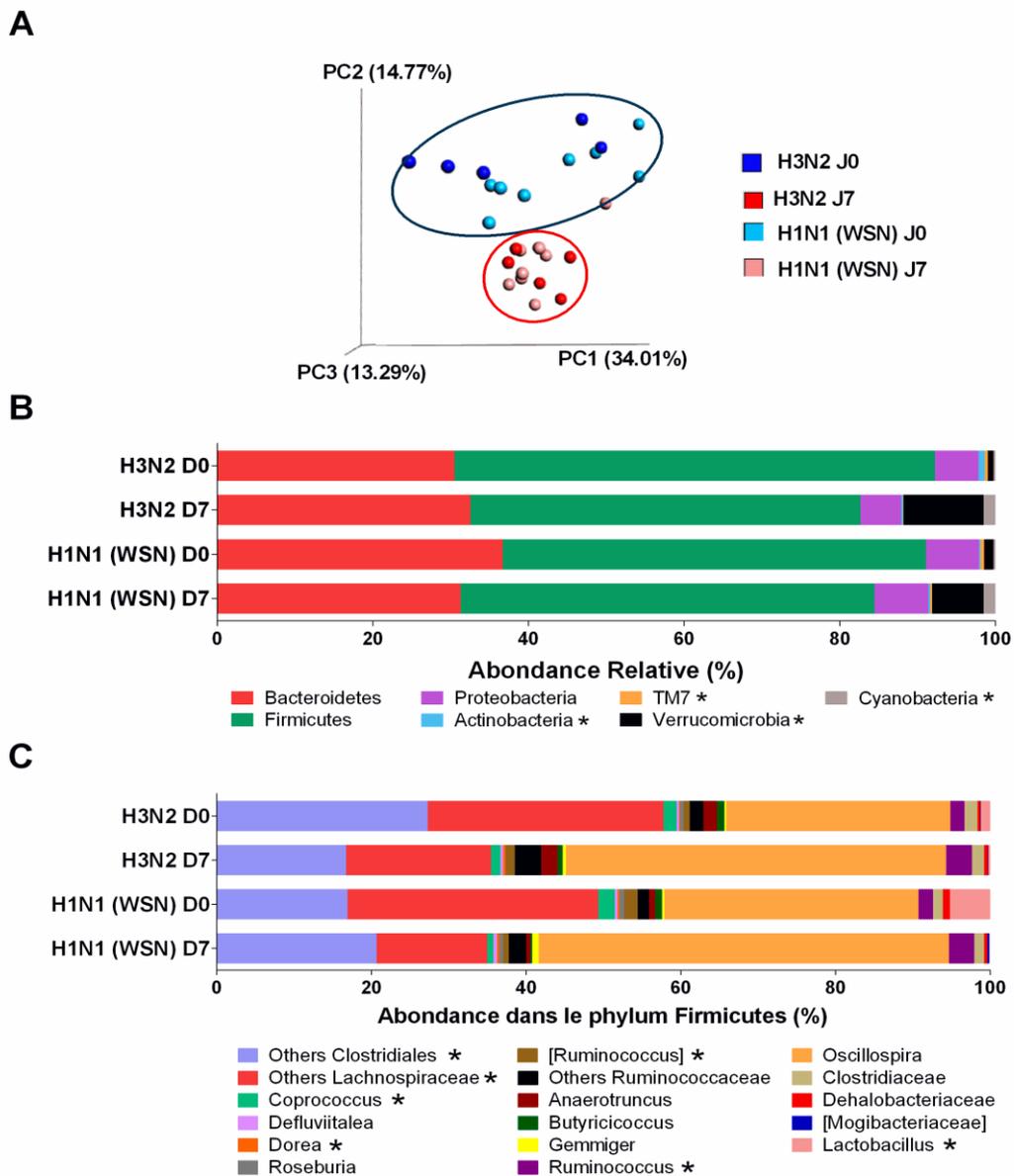


Figure S2. Comparaison de l'effet des infections à H3N2 et H1N1 (WSN) sur la composition du microbiote intestinal (A). Le PCoA a été réalisé sur des échantillons (fèces) prélevés sur des souris non infectées (H3N2 J0 et H1N1/WSN J0) (Bleu vif ou bleu foncé) et sur des souris infectées 7 jours plus tard par H3N2 (H3N2 J7, rouge) ou H1N1 (H1N1/WSN J7, rose) n = 6-8 (une des deux ou trois expériences indépendantes représentées). Les communautés microbiennes de souris non infectées par rapport à des souris infectées par l'IAV sont groupées séparément les unes des autres. Quel que soit le sous-type de l'IAV, les communautés microbiennes se sont regroupées. (B), Composition taxonomique du microbiote fécal. (C), Composition du microbiote au sein de la famille des Firmicutes (fèces). (B et C), les blocs colorés indiquent les taxons avec une abondance relative moyenne (n = 15, pool de deux expériences indépendantes). Les différences significatives (H1N1/WSN J0 contre H1N1/WSN J7) sont représentées par *. Des différences significatives ont été déterminées en utilisant le test de rang signé de Wilcoxon (tableau S3). Voir également la figure 1 et les tableaux S3.

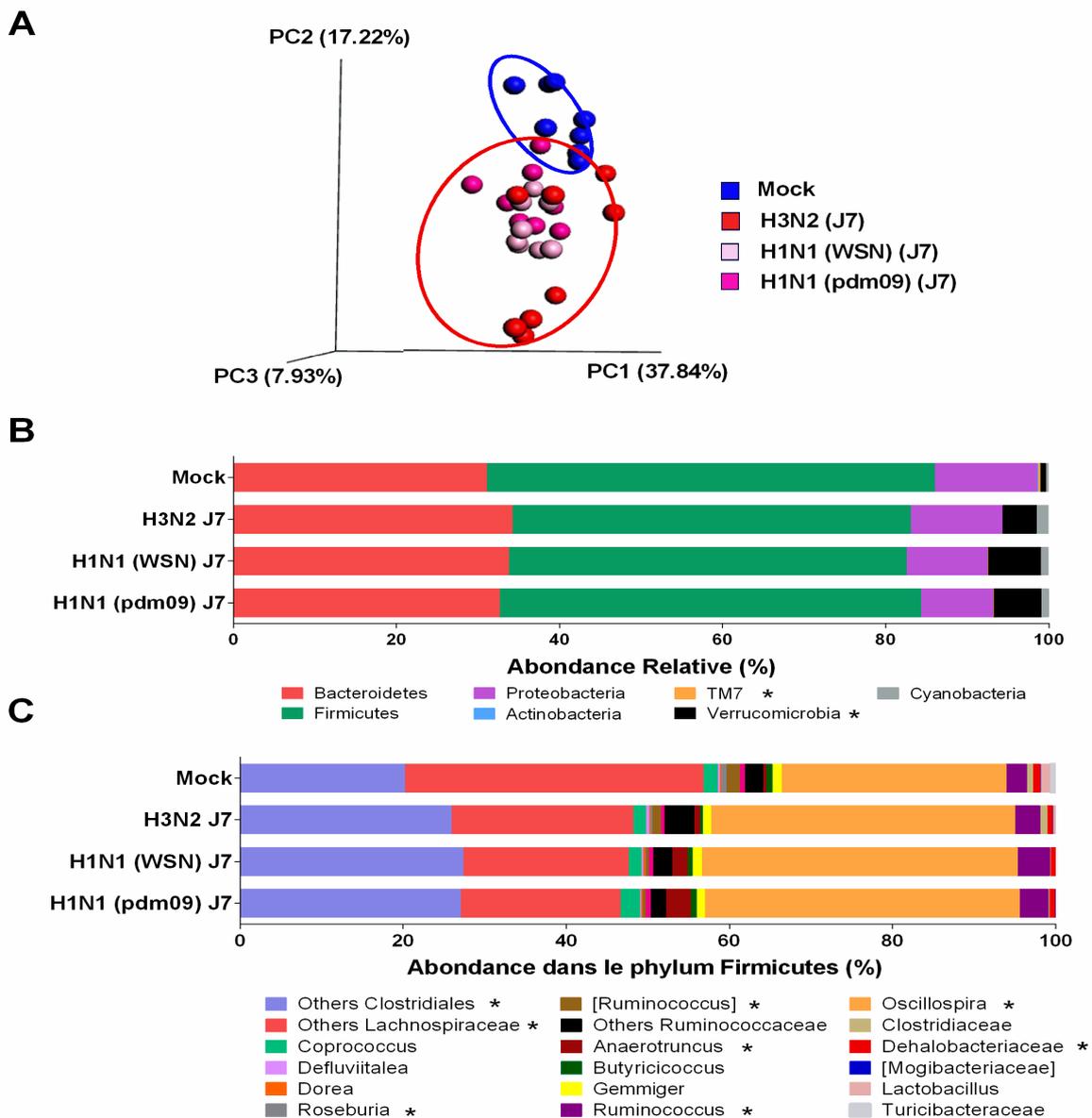


Figure S3. Comparaison de l'effet de l'infection par H3N2 et H1N1 sur la composition du microbiote intestinal. (A), Le PCoA a été réalisé sur des échantillons (caecum) prélevés sur des souris non infectées (bleu foncé) et sur des souris infectées pendant 7 jours par H3N2 (rouge), H1N1/WSN (rose) ou H1N1/pdm09 (rose foncé). (B), Composition taxonomique du microbiote caecal. (C), Composition du microbiote au sein de la famille Firmicutes. (B et C), les blocs colorés indiquent les taxons avec une abondance relative moyenne. n = 8 (une des deux expériences indépendantes représentées). Des différences significatives (*) ont été déterminées à l'aide du test de rang signé de Wilcoxon (tableau S4). Voir également la figure 1 et les tableaux S4.

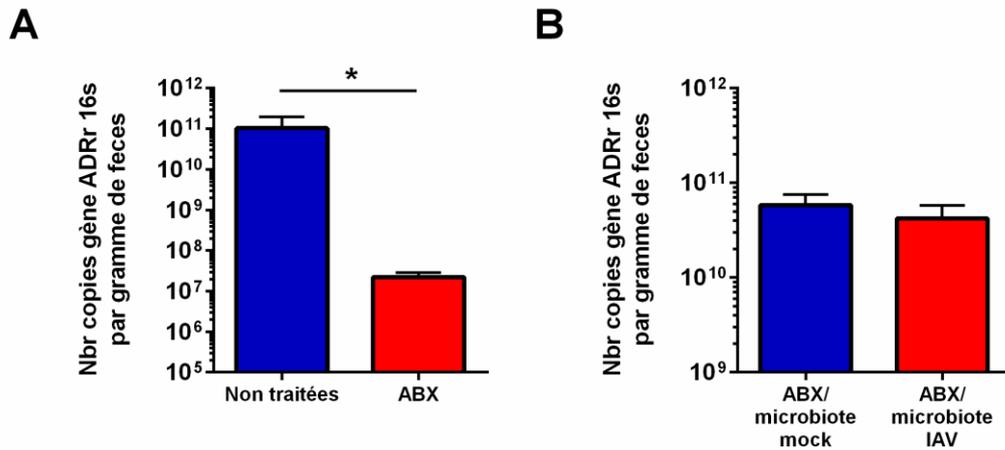


Figure S4. Nombre de copies du gène de l'ARNr 16S dans les fèces de souris après traitement ABX. (A et B), Nombre de copies du gène de l'ARNr 16S dans les selles de souris après traitement ABX (A) et recolonisation (B). Chaque point représente une seule souris et les lignes horizontales indiquent les valeurs médianes. Il convient de noter qu'aucune prolifération fongique (quantification du nombre de copies du gène de l'ARNr 18S) n'a pu être mise en évidence par qPCR après traitement par ABX (non illustré). n = 4-5 (une expérience représentative est montrée). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. Des différences significatives ont été déterminées en utilisant le test de Mann-Whitney U (* p < 0,05). Voir également la figure 2.

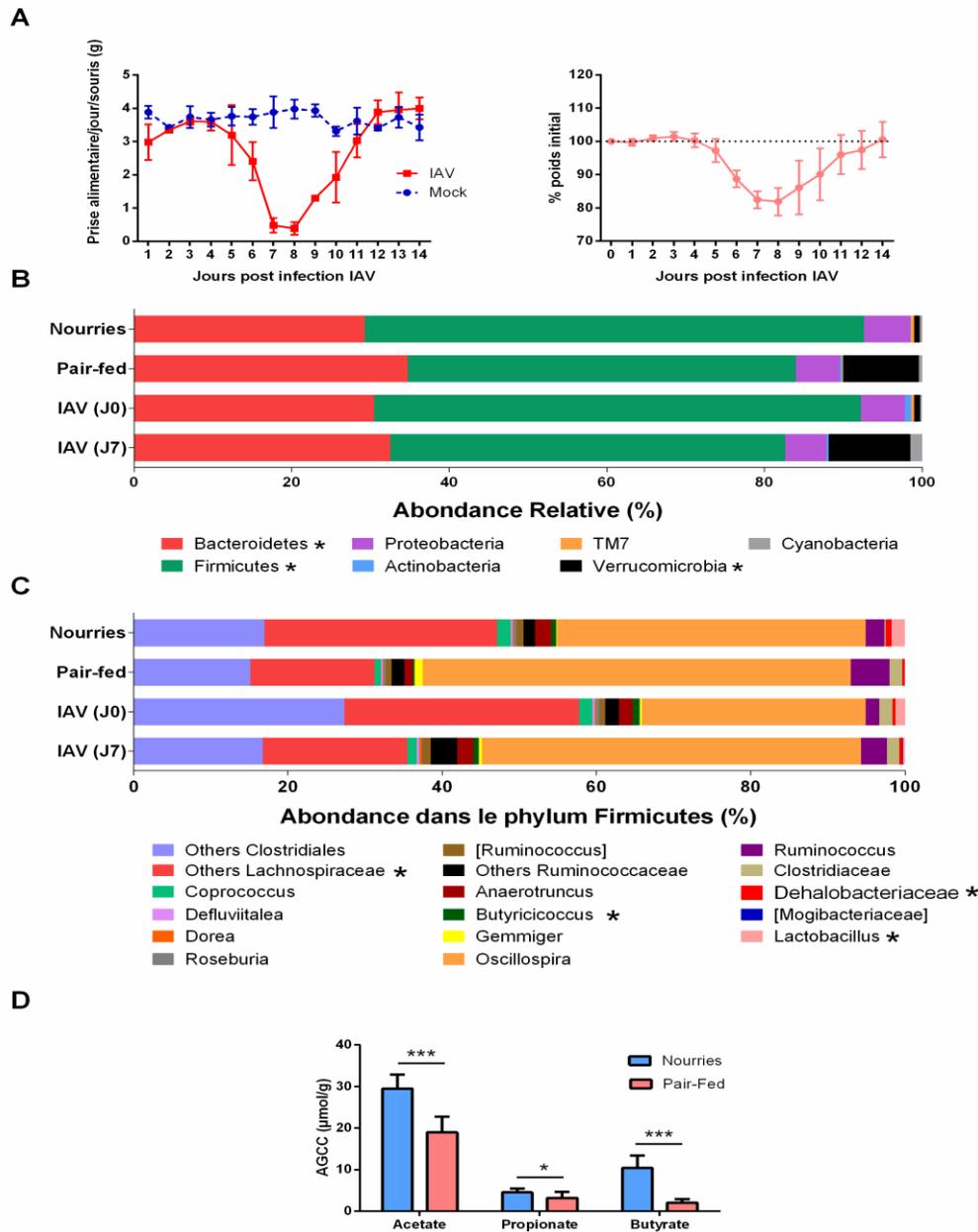


Figure S5. Mesure de la perte de poids et de consommation alimentaire pendant l'infection par l'IAV et composition taxonomique dans le microbiote intestinal de souris Pair-Fed. (A), Mesure cinétique de la consommation alimentaire (gauche) et du poids (droite) des souris infectées par l'IAV. Le poids moyen des aliments pris par jour et par souris (en grammes) (gauche) et le poids corporel initial relatif (en pourcentage) (droite) sont illustrés pour les souris non infectées. n=16 (gauche) ou n=10 (droite) (pool de deux expériences indépendantes). (B et C), Comparaison de la composition taxonomique (Phylum en B et Firmicutes en C) dans le microbiote intestinal des souris en réponse à un apport alimentaire restreint ou en réponse à une infection par l'IAV (H3N2, 7 dpi). Les blocs colorés indiquent les taxons avec une abondance relative moyenne. Les différences significatives (contrôle versus Pair-Fed) sont illustrées par * (test de rang signé de Wilcoxon, tableau S5). B et C, n = 6 (l'une des deux expériences indépendantes représentées). (D), concentrations caecal des AGCC individuels. n = 14 (deux expériences regroupées). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (A, D). Les différences significatives (contrôle versus Pair-Fed) sont illustrées par * (test de rang signé de Wilcoxon, tableau S5) (B et C). (D) Des différences significatives ont été déterminées à l'aide du test ANOVA de Kruskal – Wallis (* p <0,01, *** p <0,001) (D). Voir également la figure 1 et les tableaux S5.

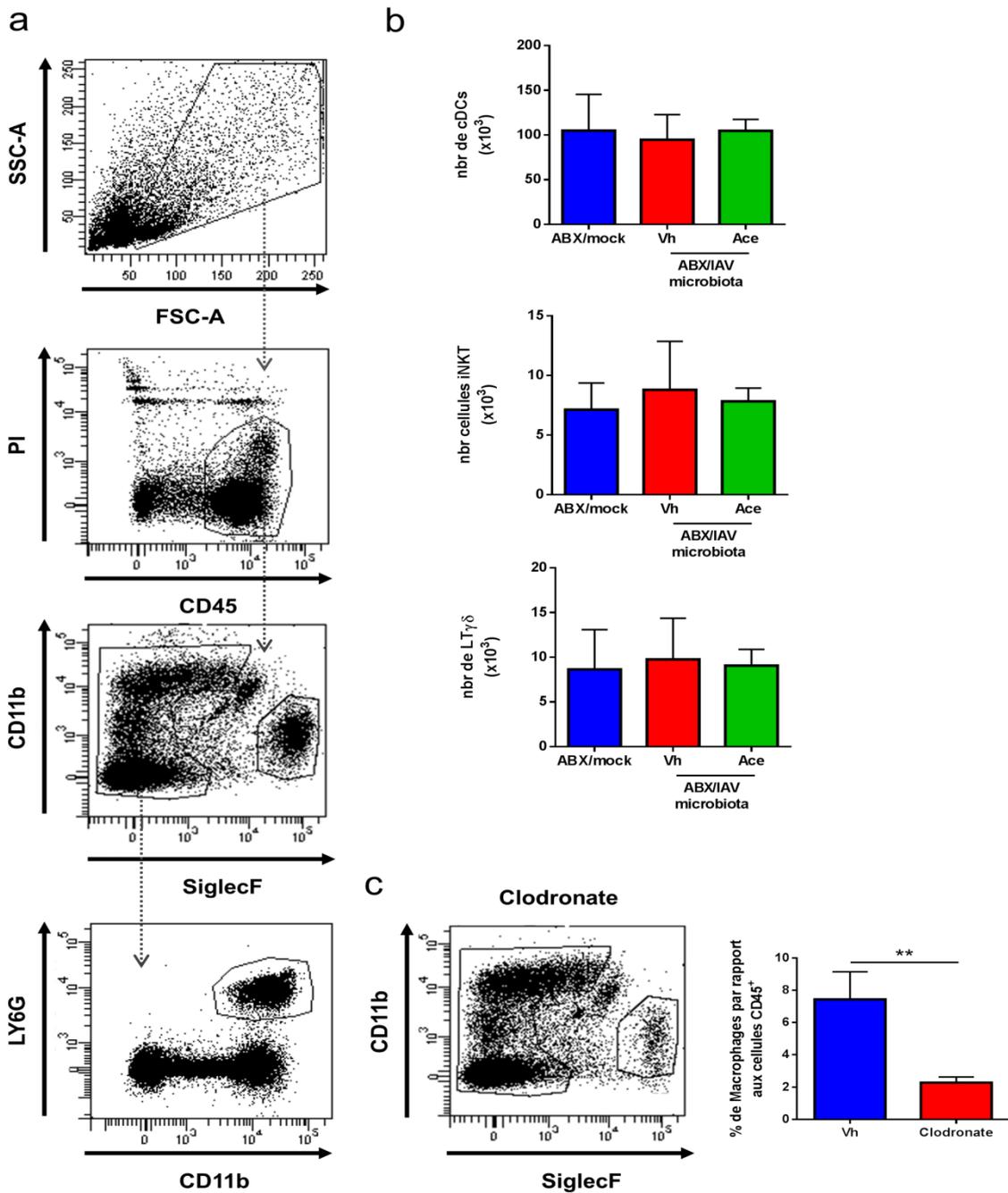
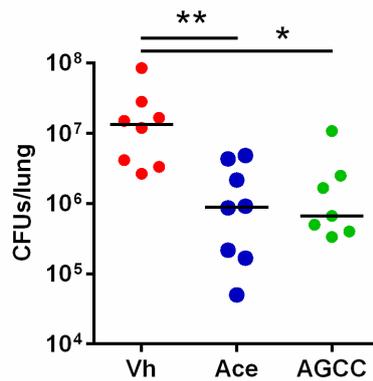
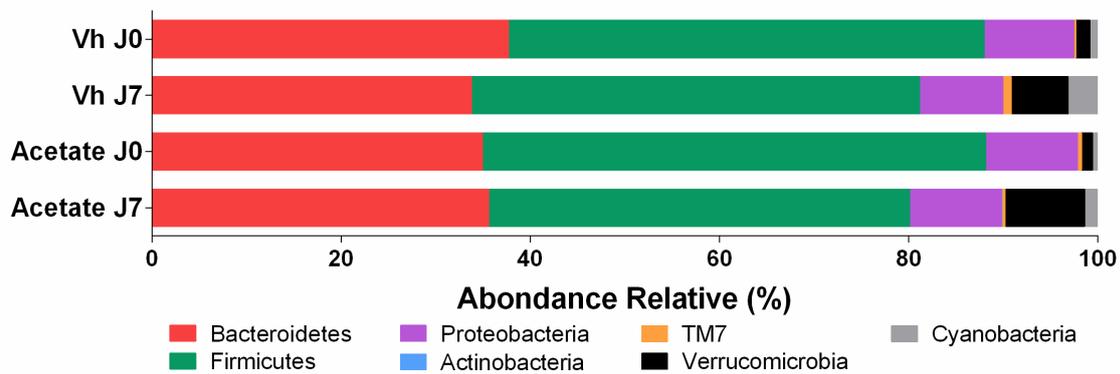


Figure S6. Analyse des cellules immunitaires innées chez les souris recolonisées. (A), Stratégie de gating pour analyser les macrophages alvéolaires (CD45⁺ SiglecF⁺ CD11b^{low}) et les neutrophiles (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺ Siglec F⁻). (B), nombre de cellules dendritiques conventionnelles (CD45⁺ CD11c^{high} MHC class II⁺ Siglec F⁻ CD64⁻), de cellules T $\gamma\delta$ (CD45⁺ TCR β ⁻ TCR $\gamma\delta$ ⁺) et d'iNKT (CD45⁺ TCR β ⁺ CD1d tetramer⁺). n=8 (pool de deux expériences indépendantes). (C), les souris receveuses ont reçu (i.n.) des liposomes chargés en clodronate. Marquage représentatif montrant la déplétion des macrophages (poumon entier) 24 h après l'inoculation du liposome clodronate (n = 5-6) Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (B, C). Des différences significatives ont été déterminées en utilisant le test Kruskal – Wallis ANOVA (B) et le test Mann-Whitney U (D) (** p <0,01). Voir également la figure 5.

A



B



C

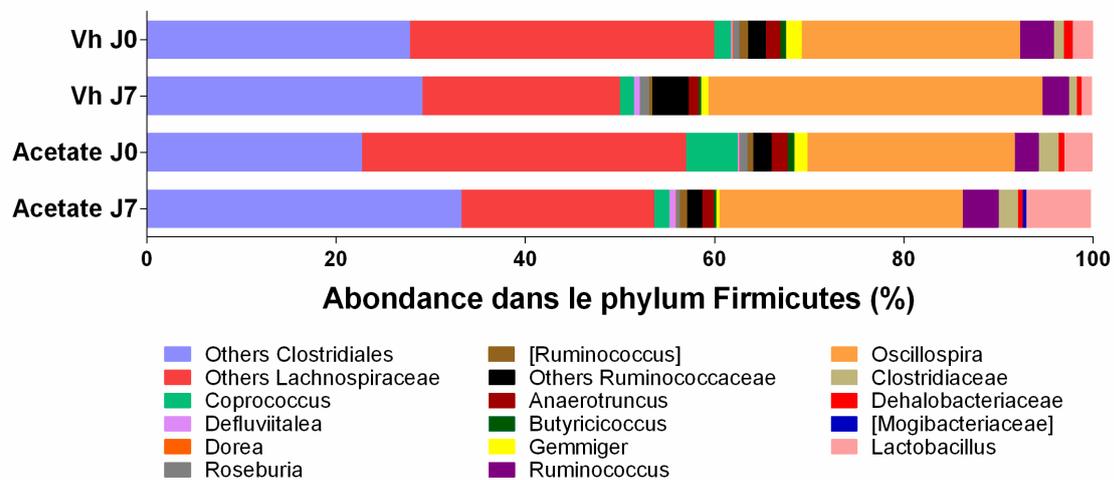


Figure S7. Effet du traitement à l'acétate sur la composition du microbiote intestinal (A)
 Les souris infectées par l'IAV ont été traitées avec de l'acétate (200 mM dans l'eau de biberon) ou la combinaison d'acétate, de propionate et de butyrate (200 mM, 50 mM, 20 mM dans l'eau d biberon) après 2 jours d'infection par l'IAV, cinq jours avant l'infection par pneumocoque (1×10^3 CFU). Le nombre de bactéries a été déterminé 30 h après l'infection par *S. pneumoniae*. Les traits pleins correspondent aux valeurs médianes ($n = 7-8$, une expérience représentative sur deux est montrée). (B et C), Composition du microbiote au niveau du phylum (A) et au sein du phylum des Firmicutes (B). Les blocs colorés indiquent les taxons avec une abondance relative moyenne ($n = 4-5$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (A). Des différences significatives ont été déterminées à l'aide du test Kruskal – Wallis ANOVA (A) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Voir également la figure 6.

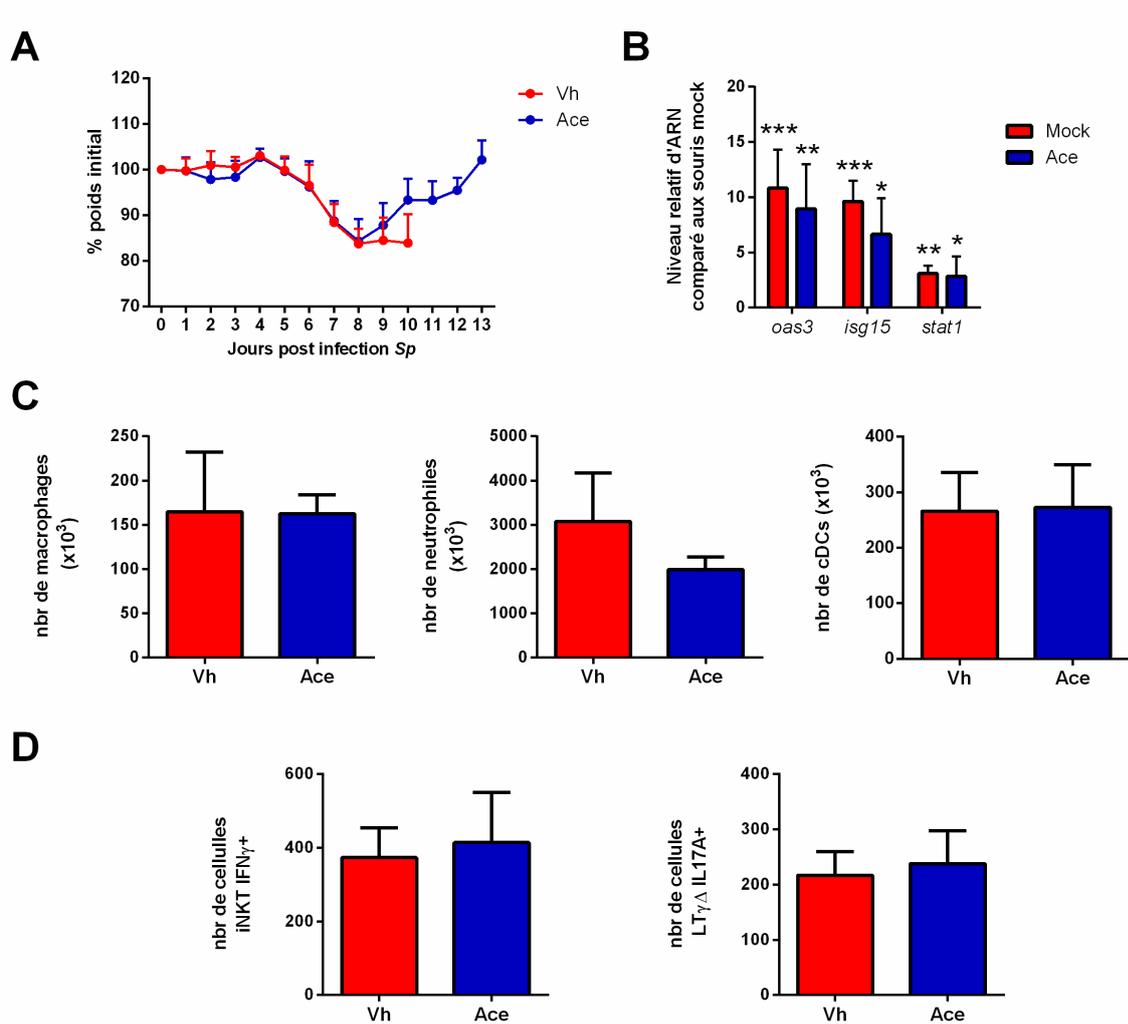


Figure S8. Analyse des cellules immunitaires innées chez des souris infectées traitées à l'acétate. (A), Evolution du poids corporel (en % poids initial \pm SD). n=14 (deux expériences regroupées). (B), La RT-PCR a été effectuée exactement comme décrit sur la figure 6c. Les données représentent la moyenne \pm SD. (C), des cellules pulmonaires de souris infectées par l'IAV (7 dpi, prétraitées ou non avec de l'acétate) ont été analysées par cytométrie en flux. Le nombre moyen \pm SD de macrophages alvéolaires (CD45⁺ Siglec F⁺ CD11b^{low}) et de neutrophiles (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺ Siglec F⁻) sont représentés. (D), des souris infectées par IAV ont été infectées par *S. pneumoniae* (1x10⁶ CFU) et 16 h plus tard, le nombre de cellules iNKT (CD45⁺ TCR β ⁺ CD1d tetramer⁺) exprimant l'IFN- γ et le nombre de cellule T $\gamma\delta$ (CD45⁺ TCR β ⁻ TCR $\gamma\delta$ ⁺) exprimant l'IL-17A ont été déterminés. B-D, n=5 (une expérience représentative sur deux est montrée). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. Des différences significatives ont été déterminées à l'aide du test de Mann-Whitney U (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001). Voir également la figure 6.

Tableau S1. Abondance relative des bactéries fécales chez les souris non infectées et les souris infectées par l'IAV (H3N2, A/Scotland/20/1974) à J7, en relation avec la figure 1 et la figure S1. Les excréments ont été prélevés sur les mêmes souris avant et après l'infection (n=24, pool de trois expériences indépendantes). * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 (dans un test de rang signé de Wilcoxon).

Taxonomie	Abondance Relative		p value
	Jour 0	Jour 7	
Bacteroidetes Phylum	41,857 ± 7,99	37,92 ± 6,89	0,1074
<i>Bacteroidales S24-7</i> Family	25,522 ± 8,05	16,261 ± 5,77	0,002 (**)
<i>Rikenellaceae</i> Family	15,744 ± 4,47	19,750 ± 9,38	0,1208
<i>Porphyromonadaceae</i> Family (<i>Parabacteroides</i> Genus)	0,470 ± 0,64	1,632 ± 1,23	< 0,0001 (***)
[<i>Odoribacteraceae</i>] Family (<i>Odoribacter</i> Genus)	0,120 ± 0,12	0,277 ± 0,3	0,0059 (**)
Firmicutes Phylum	47,229 ± 9,38	49,879 ± 7,72	0,4061
Clostridia Class	45,568 ± 10,19	49,026 ± 7,45	0,2897
Other Clostridiales Family	11,965 ± 4,09	15,680 ± 6,06	0,0053 (**)
<i>Lachnospiraceae</i> Family	17,800 ± 7,9	13,754 ± 3,75	0,0646
Other <i>Lachnospiraceae</i> Genus	15,423 ± 7,75	9,891 ± 3,46	0,0035 (**)
<i>Coprococcus</i> Genus	0,730 ± 0,46	1,478 ± 0,9	0,0002 (***)
[<i>Ruminococcus</i>] Genus	0,659 ± 0,30	0,876 ± 0,64	0,4061
<i>Clostridium</i> Genus	0,326 ± 0,28	0,118 ± 0,09	< 0,0001 (***)
<i>Roseburia</i> Genus	0,320 ± 0,37	0,618 ± 0,58	0,0449 (*)
<i>Defluviitalea</i> Genus	0,223 ± 0,22	0,380 ± 0,21	0,0001 (***)
<i>Dorea</i> Genus	0,116 ± 0,1	0,388 ± 0,45	0,0004 (***)
<i>Ruminococcaceae</i> Family	14,978 ± 5,85	18,803 ± 3,94	0,0059 (**)
Other <i>Ruminococcaceae</i> Genus	0,946 ± 0,61	2,256 ± 1,09	< 0,0001 (***)
<i>Oscillospira</i> Genus	12,159 ± 5,51	12,597 ± 4,29	0,7048
<i>Ruminococcus</i> Genus	1,044 ± 0,59	2,830 ± 1,72	< 0,0001 (***)
<i>Anaerotruncus</i> Genus	0,516 ± 0,82	0,428 ± 0,45	0,9218
<i>Butyricicoccus</i> Genus	0,236 ± 0,19	0,397 ± 0,36	0,0604
<i>Gemmiger</i> Genus	0,074 ± 0,11	0,293 ± 0,26	< 0,0001 (***)
Clostridiaceae Family	0,565 ± 0,83	0,441 ± 0,42	0,8124
<i>Dehalobacteriaceae</i> Family (<i>Dehalobacterium</i> Genus)	0,182 ± 0,16	0,133 ± 0,1	0,0258 (*)
[<i>Mogibacteriaceae</i>] Family	0,076 ± 0,08	0,214 ± 0,13	< 0,0001 (***)
Bacilli Class	1,661 ± 1,76	0,852 ± 0,98	0,0043 (**)
<i>Lactobacillaceae</i> Family (<i>Lactobacillus</i> Genus)	1,641 ± 1,76	0,849 ± 0,98	0,0059 (**)
<i>Turicibacteraceae</i> Family (<i>Turicibacter</i> Genus)	0,019 ± 0,05	0,003 ± 0,01	0,125
Proteobacteria Phylum	9,619 ± 3,89	8,306 ± 2,59	0,1688
Alphaproteobacteria Class	0,365 ± 0,37	1,078 ± 0,52	< 0,0001 (***)
Betaproteobacteria Class (<i>Sutterella</i> Genus)	4,293 ± 3,89	1,875 ± 1,19	0,0229 (*)
Deltaproteobacteria Class (<i>Desulfovibrionaceae</i> Family)	4,921 ± 2,57	5,015 ± 2,67	0,7683
Gammaproteobacteria Class (<i>Escherichia</i> Genus)	0,039 ± 0,03	0,337 ± 0,65	0,0001 (***)
Actinobacteria Phylum	0,285 ± 0,43	0,211 ± 0,49	0,178
<i>Bifidobacteriaceae</i> Family (<i>Bifidobacterium</i> Genus)	0,209 ± 0,42	0,193 ± 0,48	0,804
<i>Coriobacteriaceae</i> Family	0,076 ± 0,11	0,017 ± 0,03	0,0008 (***)
Verrucomicrobia Phylum (<i>Akkermansia</i> Genus)	0,651 ± 0,81	3,036 ± 2,68	< 0,0001 (***)
TM7 Phylum	0,266 ± 0,19	0,376 ± 0,42	0,3001
Cyanobacteria Phylum	0,089 ± 0,09	0,268 ± 0,34	0,0172 (*)

Tableau S2. Abondance relative des bactéries caecales chez les souris non infectées et les souris infectées par l'IAV (H3N2) à J7, en relation avec la figure 1. Les similitudes avec le tableau 1 sont indiquées en gras (n=16, pool de deux expériences indépendantes). * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 (test de Mann-Whitney U).

Taxonomie	Abondance Relative		p value
	Mock	IAV (J7)	
<i>Bacteroidetes</i> Phylum	41,200 ± 4,12	39,545 ± 3,34	0,4184
<i>Bacteroidales S24-7</i> Family	22,535 ± 5,35	12,735 ± 6,77	0,0002 (***)
<i>Rikenellaceae</i> Family	17,908 ± 3,87	25,555 ± 6,21	0,0006 (***)
<i>Porphyromonadaceae</i> Family (<i>Parabacteroides</i> Genus)	0,199 ± 0,11	0,791 ± 0,53	< 0,0001 (***)
[<i>Odoribacteraceae</i>] Family (<i>Odoribacter</i> Genus)	0,559 ± 0,34	0,465 ± 0,29	0,4625
<i>Firmicutes</i> Phylum	44,866 ± 2,70	44,899 ± 5,17	0,4855
<i>Clostridia</i> Class	42,996 ± 3,48	44,666 ± 5,23	0,4855
<i>Other Clostridiales</i> Family	8,795 ± 1,79	11,032 ± 2,53	0,0107 (*)
<i>Lachnospiraceae</i> Family	18,408 ± 4,44	14,110 ± 4,86	0,0317 (*)
<i>Other Lachnospiraceae</i> Genus	15,495 ± 4,84	11,450 ± 4,53	0,035 (*)
<i>Coprococcus</i> Genus	0,602 ± 0,42	0,909 ± 0,86	0,7717
[<i>Ruminococcus</i>] Genus	0,978 ± 0,44	0,693 ± 0,32	0,0559
<i>Clostridium</i> Genus	0,4243 ± 0,23	0,304 ± 0,30	0,0559
<i>Roseburia</i> Genus	0,601 ± 0,61	0,291 ± 0,27	0,1118
<i>Defluviitalea</i> Genus	0,067 ± 0,05	0,179 ± 0,10	0,0002 (***)
<i>Dorea</i> Genus	0,184 ± 0,15	0,223 ± 0,21	0,9159
<i>Ruminococcaceae</i> Family	14,400 ± 3,48	18,750 ± 3,86	0,0026 (**)
<i>Other Ruminococcaceae</i> Genus	1,643 ± 1,01	3,742 ± 3,02	0,0084 (**)
<i>Oscillospira</i> Genus	10,118 ± 3,70	12,735 ± 4,54	0,1009
<i>Ruminococcus</i> Genus	1,201 ± 0,50	1,354 ± 0,41	0,3014
<i>Anaerotruncus</i> Genus	0,982 ± 1,16	0,420 ± 0,44	0,3768
<i>Butyricicoccus</i> Genus	0,190 ± 0,16	0,160 ± 0,09	> 0,9999
<i>Gemmiger</i> Genus	0,246 ± 0,11	0,313 ± 0,24	0,6348
<i>Clostridiaceae</i> Family	0,965 ± 0,84	0,361 ± 0,48	0,0051 (**)
<i>Dehalobacteriaceae</i> Family (<i>Dehalobacterium</i> Genus)	0,328 ± 0,24	0,224 ± 0,18	0,254
[<i>Mogibacteriaceae</i>] Family	0,082 ± 0,06	0,176 ± 0,119	0,0259 (*)
<i>Bacilli</i> Class	1,814 ± 1,19	0,230 ± 0,36	< 0,0001 (***)
<i>Lactobacillaceae</i> Family (<i>Lactobacillus</i> Genus)	1,406 ± 1,19	0,220 ± 0,34	< 0,0001 (***)
<i>Turicibacteraceae</i> Family (<i>Turicibacter</i> Genus)	0,240 ± 0,43	0,003 ± 0,01	0,0182 (*)
<i>Proteobacteria</i> Phylum	9,398 ± 4,69	9,772 ± 4,09	0,8001
<i>Alphaproteobacteria</i> Class	0,099 ± 0,15	0,702 ± 0,77	0,0118 (*)
<i>Betaproteobacteria</i> Class (<i>Sutterella</i> Genus)	3,069 ± 1,85	1,630 ± 1,04	0,0169 (*)
<i>Deltaproteobacteria</i> Class (<i>Desulfovibrionaceae</i> Family)	6,212 ± 5,69	7,200 ± 3,81	0,4184
<i>Gammaproteobacteria</i> Class (<i>Escherichia</i> Genus)	0,018 ± 0,02	0,240 ± 0,76	0,1784
<i>Actinobacteria</i> Phylum	1,526 ± 1,85	0,071 ± 0,07	< 0,0001 (***)
<i>Bifidobacteriaceae</i> Family (<i>Bifidobacterium</i> Genus)	0,740 ± 0,58	0,018 ± 0,03	< 0,0001 (***)
<i>Coriobacteriaceae</i> Family	0,786 ± 1,34	0,053 ± 0,07	0,2274
<i>Verrucomicrobia</i> Phylum (<i>Akkermansia</i> Genus)	2,305 ± 2,36	4,999 ± 2,57	0,0095 (**)
<i>TM7</i> Phylum	0,619 ± 0,50	0,275 ± 0,38	0,0259 (*)
<i>Cyanobacteria</i> Phylum	0,087 ± 0,09	0,439 ± 0,56	0,2044

Tableau S3. Abondance relative des bactéries fécales chez les souris non infectées ou infectées par IAV (H1N1, A/WSN/1933) à J7, en relation avec la figure 1 et S2 et S3. Les similitudes avec le tableau 1 sont indiquées en gras (n=15, pool de deux expériences indépendantes). * p <0,05, ** p <0,01, * p <0,001 (dans un test de rang signé de Wilcoxon).**

Taxonomie	Abondance Relative		p value
	Jour 0	Jour 7	
<i>Bacteroidetes</i> Phylum	45,913 ± 11,68	44,821 ± 15,67	0,7197
<i>Bacteroidales S24-7 Family</i>	27,890 ± 11,46	19,637 ± 8,08	0,0054 (**)
<i>Rikenellaceae Family</i>	17,360 ± 2,73	23,912 ± 11,23	0,0946
<i>Porphyromonadaceae Family (Parabacteroides Genus)</i>	0,243 ± 0,12	0,504 ± 0,64	0,107
<i>[Odoribacteraceae] Family (Odoribacter Genus)</i>	0,420 ± 0,29	0,767 ± 1,06	0,5995
<i>Firmicutes</i> Phylum	42,040 ± 15,17	40,462 ± 14,88	0,4212
<i>Clostridia Class</i>	40,184 ± 14,88	40,337 ± 14,92	0,6788
<i>Other Clostridiales Family</i>	8,872 ± 1,80	10,983 ± 3,54	0,0302 (*)
<i>Lachnospiraceae Family</i>	15,146 ± 7,33	7,463 ± 2,89	< 0,0001 (***)
<i>Other Lachnospiraceae Genus</i>	12,476 ± 6,82	6,112 ± 2,63	0,0003 (***)
<i>Coprococcus Genus</i>	1,214 ± 0,93	0,564 ± 0,36	0,0151 (*)
<i>[Ruminococcus] Genus</i>	0,874 ± 0,54	0,289 ± 0,33	0,0020 (**)
<i>Clostridium Genus</i>	0,118 ± 0,23	0,081 ± 0,10	> 0,9999
<i>Roseburia Genus</i>	0,202 ± 0,19	0,159 ± 0,19	0,4143
<i>Defluviitalea Genus</i>	0,121 ± 0,13	0,155 ± 0,13	0,2676
<i>Dorea Genus</i>	0,140 ± 0,11	0,104 ± 0,21	0,0134 (*)
<i>Ruminococcaceae Family</i>	15,305 ± 8,12	21,228 ± 13,14	0,073
<i>Other Ruminococcaceae Genus</i>	0,904 ± 0,33	1,139 ± 0,68	0,6387
<i>Oscillospira Genus</i>	12,143 ± 8,24	17,645 ± 12,97	0,0946
<i>Ruminococcus Genus</i>	0,820 ± 0,44	1,300 ± 0,69	0,0103 (*)
<i>Anaerotruncus Genus</i>	0,966 ± 0,94	0,791 ± 0,95	0,5995
<i>Butyricicoccus Genus</i>	0,273 ± 0,37	0,063 ± 0,09	0,0327 (*)
<i>Gemmiger Genus</i>	0,198 ± 0,19	0,289 ± 0,22	0,0781
<i>Clostridiaceae Family</i>	0,538 ± 0,62	0,434 ± 0,55	0,8552
<i>Dehalobacteriaceae Family (Dehalobacterium Genus)</i>	0,293 ± 0,34	0,135 ± 0,12	0,0785
<i>[Mogibacteriaceae] Family</i>	0,030 ± 0,05	0,0934 ± 0,10	0,0942
<i>Bacilli Class</i>	1,85 ± 3,17	0,126 ± 0,17	0,0006 (***)
<i>Lactobacillaceae Family (Lactobacillus Genus)</i>	1,744 ± 3,12	0,126 ± 0,17	0,0006 (***)
<i>Proteobacteria</i> Phylum	7,010 ± 2,58	5,410 ± 2,55	0,2293
<i>Alphaproteobacteria Class</i>	0,578 ± 0,68	1,040 ± 1,09	0,107
<i>Betaproteobacteria Class (Sutterella Genus)</i>	3,013 ± 2,85	1,226 ± 0,77	0,0256 (*)
<i>Deltaproteobacteria Class (Desulfovibrionaceae Family)</i>	3,387 ± 2,30	2,988 ± 2,14	0,7197
<i>Gammaproteobacteria Class (Escherichia Genus)</i>	0,032 ± 0,04	0,155 ± 0,32	0,625
<i>Actinobacteria</i> Phylum	0,593 ± 0,53	0,204 ± 0,26	0,0479 (*)
<i>Bifidobacteriaceae Family (Bifidobacterium Genus)</i>	0,130 ± 0,17	0,093 ± 0,22	0,5469
<i>Coriobacteriaceae Family</i>	0,463 ± 0,48	0,112 ± 0,09	0,0479 (*)
<i>Verrucomicrobia</i> Phylum (<i>Akkermansia Genus</i>)	3,849 ± 3,34	8,117 ± 2,83	0,0003 (***)
<i>TM7</i> Phylum	0,415 ± 0,22	0,154 ± 0,15	0,0006 (***)
<i>Cyanobacteria</i> Phylum	0,179 ± 0,19	0,832 ± 0,96	0,0098 (**)

Tableau S4. Abondance relative des bactéries caecales chez les souris non infectées ou infectées par l'IAV (H1N1, A/California/04/2009) à J7, en relation avec la figure 1. et les figures S2 et S3.

Les similitudes avec le tableau 2 sont indiquées en gras (n=8). * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 (test de Mann-Whitney U).

Taxonomie	Abondance Relative		p value
	Jour 0	Jour 7	
Bacteroidetes Phylum	31,040 ± 1,81	32,590 ± 1,89	0,1296
<i>Bacteroidales</i> S24-7 Family	9,828 ± 1,46	11,632 ± 3,31	0,2317
<i>Rikenellaceae</i> Family	19,066 ± 2,09	19,442 ± 2,45	0,7023
<i>Porphyromonadaceae</i> Family (<i>Parabacteroides</i> Genus)	0,324 ± 0,14	0,610 ± 0,346	0,1296
[<i>Odoribacteraceae</i>] Family (<i>Odoribacter</i> Genus)	1,821 ± 1,250	0,904 ± 0,377	0,1296
Firmicutes Phylum	55,321 ± 3,25	52,046 ± 3,55	0,0827
<i>Clostridia</i> Class	54,298 ± 3,40	52,007 ± 3,56	0,2747
Other Clostridiales Family	11,011 ± 2,43	13,954 ± 2,15	0,0207 (*)
<i>Lachnospiraceae</i> Family	23,307 ± 5,21	12,473 ± 4,22	0,011 (**)
Other Lachnospiraceae Genus	20,152 ± 5,24	10,159 ± 2,95	0,0002 (***)
<i>Coprococcus</i> Genus	1,001 ± 0,76	1,260 ± 1,87	0,8541
[<i>Ruminococcus</i>] Genus	0,889 ± 0,11	0,179 ± 0,09	0,0003 (***)
<i>Clostridium</i> Genus	0,363 ± 0,11	0,348 ± 0,16	0,9619 (*)
<i>Roseburia</i> Genus	0,335 ± 0,28	0,020 ± 0,04	0,0003 (***)
<i>Defluviitalea</i> Genus	0,111 ± 0,06	0,064 ± 0,06	0,1369
<i>Dorea</i> Genus	0,118 ± 0,06	0,096 ± 0,08	0,3231
Ruminococcaceae Family	19,062 ± 4,07	25,148 ± 2,56	0,0070 (**)
Other <i>Ruminococcaceae</i> Genus	1,149 ± 0,67	0,948 ± 0,53	0,4331
<i>Oscillospira</i> Genus	15,206 ± 2,96	19,874 ± 2,81	0,0047 (**)
Ruminococcus Genus	1,403 ± 0,71	1,825 ± 0,32	0,0499 (*)
<i>Anaerotruncus</i> Genus	0,239 ± 0,22	1,579 ± 1,42	0,0148 (*)
<i>Butyrivicoccus</i> Genus	0,296 ± 0,20	0,397 ± 0,18	0,8541
<i>Gemmiger</i> Genus	0,600 ± 0,24	0,511 ± 0,28	0,3754
Clostridiaceae Family	0,405 ± 0,27	0,052 ± 0,06	0,0019 (**)
<i>Dehalobacteriaceae</i> Family (<i>Dehalobacterium</i> Genus)	0,494 ± 0,15	0,368 ± 0,12	0,0379 (*)
[<i>Mogibacteriaceae</i>] Family	0,018 ± 0,04	0,012 ± 0,02	0,8564
Bacilli Class	1,023 ± 0,28	0,039 ± 0,06	0,0002 (***)
Lactobacillaceae Family (<i>Lactobacillus</i> Genus)	0,615 ± 0,30	0,039 ± 0,06	0,0002 (***)
<i>Turicibacteraceae</i> Family (<i>Turicibacter</i> Genus)	0,408 ± 0,46	0,000 ± 0,00	0,0769
Proteobacteria Phylum	12,462 ± 3,60	8,831 ± 1,98	0,0499
<i>Alphaproteobacteria</i> Class	0,370 ± 0,29	0,263 ± 0,28	0,4331
<i>Betaproteobacteria</i> Class (<i>Sutterella</i> Genus)	1,575 ± 0,66	0,911 ± 0,53	0,0648
<i>Deltaproteobacteria</i> Class (<i>Desulfovibrionaceae</i> Family)	10,516 ± 3,59	7,658 ± 1,75	0,1044
Actinobacteria Phylum	0,146 ± 0,04	0,000 ± 0,00	0,0002 (***)
Bifidobacteriaceae Family (<i>Bifidobacterium</i> Genus)	0,146 ± 0,04	0,000 ± 0,00	0,0002 (***)
Verrucomicrobia Phylum (<i>Akkermansia</i> Genus)	0,699 ± 0,61	5,865 ± 1,35	0,0002 (***)
TM7 Phylum	0,274 ± 0,25	0,067 ± 0,08	0,0068 (**)
Cyanobacteria Phylum	0,397 ± 0,13	0,949 ± 0,54	0,0104 (*)

Tableau S5. Abondance relative des bactéries fécales chez les souris normalement nourries et chez les souris Pair-Fed, en relation avec la figure 4.

Les excréments ont été prélevés sur les mêmes souris avant le régime Pair-Fed (contrôle) et quatre jours après. Les similitudes avec le tableau 1 sont indiquées en gras (n = 6, une expérience représentative sur deux). * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 (dans un test de rang signé de Wilcoxon).

Taxonomie	Abondance Relative		p value
	Contrôle	Pair-Fed	
Bacteroidetes Phylum	29,265 ± 2,68	34,667 ± 2,14	0,0313 (*)
<i>Bacteroidales</i> S24-7 Family	15,522 ± 2,58	15,386 ± 1,77	> 0,9999
<i>Rikenellaceae</i> Family	13,041 ± 2,56	18,015 ± 2,85	0,0313 (*)
<i>Porphyromonadaceae</i> Family (<i>Parabacteroides</i> Genus)	0,047 ± 0,07	0,593 ± 0,44	0,0313 (*)
[<i>Odoribacteraceae</i>] Family (<i>Odoribacter</i> Genus)	0,655 ± 0,28	0,672 ± 0,51	0,8438
Firmicutes Phylum	63,314 ± 4,77	49,241 ± 3,40	0,0313 (*)
Clostridia Class	62,197 ± 5,10	49,241 ± 3,40	0,0313 (*)
Other Clostridiales Family	10,706 ± 4,45	7,424 ± 1,87	0,0625
<i>Lachnospiraceae</i> Family	21,273 ± 3,80	9,010 ± 1,74	0,0313 (*)
Other Lachnospiraceae Genus	19,103 ± 3,46	7,938 ± 1,90	0,0313 (*)
<i>Coprococcus</i> Genus	1,110 ± 0,70	0,398 ± 0,24	0,0938
[<i>Ruminococcus</i>] Genus	0,601 ± 0,24	0,367 ± 0,20	0,0938
<i>Roseburia</i> Genus	0,258 ± 0,24	0,162 ± 0,17	0,5625
<i>Defluviitalea</i> Genus	0,160 ± 0,12	0,101 ± 0,09	0,4375
<i>Dorea</i> Genus	0,040 ± 0,06	0,044 ± 0,05	0,875
<i>Ruminococcaceae</i> Family	29,628 ± 5,53	31,791 ± 4,70	0,6875
Other Ruminococcaceae Genus	0,928 ± 0,61	0,811 ± 0,11	0,8438
<i>Oscillospira</i> Genus	25,313 ± 5,54	27,347 ± 4,49	0,5625
<i>Ruminococcus</i> Genus	1,556 ± 0,59	2,469 ± 0,95	0,0938
<i>Anaerotruncus</i> Genus	1,319 ± 1,36	0,549 ± 0,37	0,4375
<i>Butyrivicoccus</i> Genus	0,423 ± 0,20	0,107 ± 0,06	0,0313 (*)
<i>Gemmiger</i> Genus	0,090 ± 0,05	0,507 ± 0,38	0,125
<i>Clostridiaceae</i> Family	0,072 ± 0,13	0,826 ± 0,67	0,0625
<i>Dehalobacteriaceae</i> Family (<i>Dehalobacterium</i> Genus)	0,519 ± 0,16	0,190 ± 0,06	0,0313 (*)
Bacilli Class	1,117 ± 1,01	0	0,0313 (*)
<i>Lactobacillaceae</i> Family (<i>Lactobacillus</i> Genus)	1,117 ± 1,01	0	0,0313 (*)
Proteobacteria Phylum	5,870 ± 2,21	5,577 ± 2,28	0,4375
<i>Alphaproteobacteria</i> Class	0,079 ± 0,09	0,986 ± 0,41	0,0313 (*)
<i>Betaproteobacteria</i> Class (<i>Sutterella</i> Genus)	0,532 ± 0,35	1,150 ± 0,66	0,1563
<i>Deltaproteobacteria</i> Class (<i>Desulfovibrionaceae</i> Family)	5,258 ± 2,08	3,441 ± 1,91	0,3125
Actinobacteria Phylum	0,056 ± 0,07	0,268 ± 0,26	0,4375
Verrucomicrobia Phylum (<i>Akkermansia</i> Genus)	0,710 ± 0,61	9,626 ± 4,36	0,0313 (*)
TM7 Phylum	0,441 ± 0,19	0,180 ± 0,25	0,0938
Cyanobacteria Phylum	0,343 ± 0,14	0,440 ± 0,44	> 0,9999

DISCUSSION

Plusieurs études réalisées au cours de ces dernières années se sont penchées sur l'impact de l'infection grippale sur le microbiote intestinal. Notre étude a été la première à analyser l'impact de la perturbation du microbiote intestinal sur la susceptibilité aux surinfections bactériennes des voies respiratoires. Nos résultats montrent que l'infection par le virus de la grippe induit une modification transitoire de la composition du microbiote intestinal ainsi qu'une diminution de son activité de fermentation (chute de la production des AGCC). Ces changements participent à l'augmentation de la susceptibilité aux surinfections bactériennes. Nous démontrons le rôle essentiel de la chute de l'acétate dans ce phénomène. En diminuant directement les défenses pulmonaires, la réduction de la production de l'acétate par le microbiote intestinal favorise l'infection secondaire. Ce travail suggère que des traitements visant à manipuler la fonctionnalité du microbiote intestinal (régimes riches en fibres, probiotiques) au cours de la grippe pourraient limiter les surinfections bactériennes secondaires

Effet de l'infection grippale sur la composition du microbiote intestinal

En lien avec plusieurs études publiées ces dernières années, nos travaux ont mis en évidence l'effet de l'infection grippale sur la composition du microbiote intestinal. Nous avons montré qu'une infection par un virus H3N2 ou H1N1 (pdm09 ou WSN) induit une altération transitoire de la composition du microbiote intestinal sept jours après infection. Des observations similaires ont été réalisées lors d'infection par le virus H5N1 (Yildiz et al., 2018) ou H1N1 PR8 (Bartley et al., 2017; Deriu et al., 2016; Wang et al., 2014a) dans un modèle murin et par le virus H7N9 lors d'une étude clinique chez l'homme (Qin et al., 2015). De plus, l'utilisation de virus aviaires (H9N2) induit également une perturbation du microbiote intestinal dans un modèle de poulet (Li et al., 2018; Yitbarek et al., 2018). Ce changement de la composition du microbiote intestinal au cours d'une infection virale respiratoire n'est pas propre au virus de la grippe puisque des études récentes montrent des conséquences similaires lors d'une infection par le virus RSV (Antunes et al., 2019; Groves et al., 2018).

Les analyses métagénomiques effectuées sur des échantillons de fèces et de caecums nous ont permis de mettre en lumière une perturbation de la β -diversité du microbiote. Cette perturbation est similaire dans les deux compartiments (caecum et colon). Peu de changements sont observés au niveau des phylums composant le microbiote intestinal ; ces changements étant visibles à des niveaux taxonomiques inférieurs. Pour autant, le phylum des Verrucomicrobia, représenté essentiellement par les bactéries du genre *Akkermansia*, voit son

abondance augmenter fortement sept jours après l'infection. L'augmentation de ce phylum au cours de l'infection grippale n'a pas été décrite dans la littérature. *A. muciniphila* est une bactérie bien connue du monde médical, puisqu'elle est utilisée en tant que probiotique dans la lutte contre le surpoids, l'obésité ou encore le diabète de type II (Cani and Everard, 2014; Plovier and Cani, 2017). Cette bactérie, capable de dégrader la couche de mucus présente sur les cellules épithéliales intestinales et d'induire la production d'AMP (Everard et al., 2013), a une abondance diminuée chez les personnes obèses (Dao et al., 2019). L'infection par le virus de la grippe induit également un changement au niveau de la composition du phylum des Proteobacteria avec notamment une diminution de l'abondance des Betaproteobacteria au profit des Alphaproteobacteria et des Gammaproteobacteria. Des variations similaires ont été observées pour les Alphaproteobacteria et les Betaproteobacteria à la suite d'une infection par le virus H5N1 (Yildiz et al., 2018). L'infection par le virus de la grippe induit une restructuration de la composition du phylum des Firmicutes alors que l'abondance de ce dernier ne varie pas au cours de l'infection. Cette restructuration est principalement caractérisée par la chute des Lactobacillus et une abondance plus importante des bactéries de la famille des Ruminococcaceae au profit de celle de la famille des Lachnospiraceae. Cette chute des Lactobacillus au cours de l'infection grippale (H3N2 ou H1N1) dans les fèces et le caecum a également été identifiée lors d'une infection par le virus H1N1 PR8 (Wang et al., 2014a). Cette perturbation du microbiote intestinal est transitoire puisqu'après 14 jours d'infection la composition du microbiote intestinal revient à son état initial. L'effet d'une altération transitoire du microbiote intestinal a également été montré lors d'une infection par H5N1 avec là encore un retour à l'état initial 14 jours après infection (Yildiz et al., 2018). Malgré ce retour apparent à la normale, il serait intéressant de déterminer l'activité du microbiote 14 jours après infection. Il est possible que celui-ci puisse participer, à distance, à la réparation pulmonaire. Des expériences de transfert de flore pourraient répondre à cette hypothèse.

Dans le cadre d'une collaboration récente avec le Dr Roger Legrand au CEA, nous avons initié des expériences visant à analyser l'impact de l'infection grippale sur le microbiote chez le primate non-humain (macaques). Les premiers résultats montrent que l'infection par l'IAV induit également une perturbation de la composition du microbiote intestinal 7 jours après l'infection. Des analyses métagénomiques plus poussées seront développées prochainement. Ce résultat préliminaire est important car il montre que la dysbiose liée à l'infection grippale n'est pas uniquement observée dans des modèles murins

mais pourrait également s'étendre aux mammifères supérieurs, dont l'homme. Comme discuté, des analyses ont suggéré des perturbations de la composition du microbiote chez l'homme suite à l'infection grippale (Qin et al., 2015). Pour autant, ces résultats posent questions car les patients sont souvent traités aux antibiotiques pour prévenir la surinfection. Notre objectif (macaque) est également d'analyser les perturbations du microbiote au niveau des voies respiratoires. Pour cela, des prélèvements ont été réalisés au niveau des voies respiratoires supérieures et inférieures. Bien que difficile à démontrer, il est probable que les perturbations du microbiote au niveau local jouent un rôle dans la surinfection bactérienne post-grippale. En cas de perturbations significatives, un programme de recherche sur cette thématique pourrait être initié.

Effet de l'infection grippale sur la production des acides gras à chaîne courte

L'infection par le virus de la grippe induit également une altération de l'activité du microbiote intestinal avec notamment une chute de l'activité de fermentation. Cette dernière entraîne une diminution de la production des AGCC, principaux métabolites produits par le microbiote intestinal. Nous avons caractérisé cette chute des AGCC au niveau du site de production (le caecum) mais également dans le sang. L'acétate, le propionate et le butyrate, les trois principaux AGCC, ont une concentration réduite après 7 jours d'infection. La diminution de la production des AGCC a été décrite dans certaines pathologies intestinales. Il a notamment été rapporté que les patients atteints d'un cancer colorectal présentent une réduction de la production des AGCC (Niccolai et al., 2019). Au contraire, les patients développant une maladie céliaque ne présentent pas de diminution de la production d'AGCC mais un changement dans le rapport acétate/propionate/butyrate. En effet, ces patients produisent moins d'acétate et plus de butyrate comparativement à des personnes saines (Niccolai et al., 2019). Concernant les personnes présentant un syndrome de l'intestin irritable, plusieurs études rapportent des résultats contradictoires. Certaines décrivent une augmentation de la production de propionate chez ces patients alors que d'autres décrivent une diminution de la production de propionate et de butyrate (Farup et al., 2016; Gargari et al., 2018; Ringel-Kulka et al., 2015; Sun et al., 2019). Ces perturbations dans la production des AGCC pourraient avoir un impact local sur le contrôle de l'inflammation intestinale.

L'altération de l'activité de fermentation du microbiote intestinal au cours de la grippe peut s'expliquer par la réduction de certaines espèces bactériennes capables de les produire. Parmi ces bactéries, la chute des *Lactobacillus* dans le caecum, bactérie connue pour produire

les trois principaux AGCC, peut expliquer la diminution de leur production au cours de la grippe (Meimandipour et al., 2010). Les diminutions de l'abondance des bactéries du genre *Bifidobacterium*, productrices d'acétate (Pessione, 2012), ou celle de la famille des *Lachnospiraceae*, productrices de butyrate (Zhang et al., 2009), peuvent également expliquer ces changements. Une analyse plus approfondie de tout le génome du microbiote intestinal, notamment au travers de l'utilisation d'une analyse Shotgun, pourra mettre en évidence l'altération des différentes voies de productions des AGCC au cours de la grippe. Cette analyse est en cours dans le cadre d'une collaboration avec la société Genoscreen (Dr Stéphanie Ferreira). En particulier, nous nous intéresserons aux enzymes impliquées dans la production des AGCC. Parallèlement à ce type d'étude, il sera très intéressant de déterminer, de façon non biaisée, les métabolites produits par le microbiote dysbiotique. Cette étude (métabolomique) pourrait conduire à l'identification de molécules, ou de familles de molécules potentiellement intéressantes et impliquées dans l'immunité pulmonaire (défense antibactérienne). Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que les métabolites (ou autres PAMPs) produits par le microbiote dysbiotique puissent aussi avoir un impact sur d'autres organes. A titre d'exemple, des travaux récents de notre équipe montrent que le tissu adipeux est affecté au cours de la grippe (Ayari et al., accepté). Des changements métaboliques profonds sont observés. Il est possible que l'axe microbiote-tissus adipeux puisse jouer un rôle important au cours de la grippe.

Mise en place de désordres intestinaux au cours de la grippe

En plus d'induire une altération de la composition et de l'activité du microbiote intestinal, l'infection par le virus de la grippe a aussi des conséquences sur l'intestin. Plusieurs études montrent la mise en place d'une inflammation intestinale au cours de la grippe expérimentale (Deriu et al., 2016; Wang et al., 2014a; Yildiz et al., 2018). Une réduction de la taille du colon, un marqueur d'inflammation et de souffrance intestinal, a été observée suite à l'infection par le virus H1N1 (Wang et al., 2014a). Nous avons confirmé ces résultats et cela avec les deux sous-types de virus (H3N2 et H1N1, résultats non montrés). De plus, des dommages tissulaires au sein de l'intestin ont été observés suite à l'infection par le virus H5N1 (Yildiz et al., 2018). Selon l'équipe de Wang, la mise en place de cette inflammation intestinale au cours de la grippe est principalement médiée par un fort recrutement de cellule Th17 et une forte expression de l'IL-17A dans l'intestin (Wang et al., 2014a). Au cours de ma thèse, j'ai aussi étudié l'impact de l'infection grippale sur l'inflammation intestinale. Mes travaux préliminaires montrent la mise en place d'une inflammation intestinale caractérisée

par une augmentation de certaines cytokines inflammatoires (IFN- γ , IL12-p40). Une analyse transcriptomique (collaboration avec le Dr Ronan Le Goffic) révèle aussi la présence de nombreux gènes de type ISG. Mes travaux ont aussi révélé que l'infection grippale conduit à une altération des propriétés de perméabilité de l'intestin. En effet, le gavage de souris grippées avec du FITC-dextran conduit à une concentration plus élevée de ce dernier dans le sang, comparativement aux souris contrôles. Ce résultat pose des questions intéressantes sur l'effet potentiel de la diffusion de métabolites ou de PAMPs microbiens. Ces derniers pourraient transitoirement induire une inflammation systémique et des désordres métaboliques (foie, tissus adipeux). De la même manière, l'infection grippale pourrait s'accompagner d'une translocation bactérienne locale et systémique. Il sera intéressant à l'avenir d'étudier les conséquences potentielles de ces phénomènes.

Une étude récente montre que l'infection par l'IAV s'accompagne d'une plus forte susceptibilité à l'infection secondaire par *S. Typhimurium* (Deriu et al., 2016). Selon cette étude, l'infection grippale induit une forte sécrétion d'IFN de type I dans l'intestin, sécrétion induisant une altération de l'activité antimicrobienne et de la réponse inflammatoire lors de l'infection par *S. Typhimurium*. Nous avons confirmé cette susceptibilité à l'infection par *S. Typhimurium* au cours de l'infection grippale (H3N2). Compte tenu du fait que les AGCC impacte directement l'invasion de cette bactérie dans l'intestin (Lawhon et al., 2002) et que la production d'AGCC chute au cours de la grippe, il serait intéressant de regarder l'effet d'une restauration des AGCC dans cette pathologie. Des travaux préliminaires (résultats non montrés) effectués au cours de ma thèse montrent un effet bénéfique du traitement à base d'AGCC sur l'augmentation de la survie chez des souris doublement infectées par l'IAV et *Salmonella*.

Les causes conduisant à la dysbiose au cours de la grippe

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les raisons de l'altération transitoire de la composition et de l'activité métabolique du microbiote intestinal au cours de l'infection grippale. L'une d'elle envisageait la translocation du virus de la grippe depuis le système respiratoire vers le système digestif. Par une approche de PCR quantitative, nous n'avons pas détecté le virus de la grippe dans le colon sept jours après infection. Cette observation a été confirmée par plusieurs équipes en utilisant les virus H5N1 (Yildiz et al., 2018) et H1N1 PR8 (Wang et al., 2014a) mais aussi le RSV (Groves et al., 2018). L'absence de virus dans le tractus digestif s'explique, en partie, par la localisation quasi-exclusive du

virus dans les voies respiratoires supérieures et le poumon, et à l'incapacité du virus à se fixer à la surface des cellules épithéliales intestinales. En effet, les acides sialiques présentés à la surface de ces cellules sont reliés au galactose en α -2,3, conformation seulement reconnue par les IAV aviaires (Ibricevic et al., 2006).

Des travaux récents montrent un rôle potentiel des interférons de type I et II dans la perturbation du microbiote intestinal. En effet, la déplétion de l'IFN- γ ou l'utilisation de souris déficientes pour l'IFNAR1 inhibent l'altération de la composition du microbiote au cours d'une infection par le virus H1N1 PR8 (Deriu et al., 2016; Wang et al., 2014a). Nos travaux effectués sur des souris déficientes pour l'IFN- γ ou l'IFNAR1 montrent une perturbation du microbiote intestinal semblable à celle observée chez les souris sauvages (données non montrées). Ces souris (*Ifng*^{-/-} et *Ifnar1*^{-/-}) présentent également une diminution de la production des AGCC au cours de la grippe. Les interférons de type I et II, considérés individuellement, ne semblent donc pas être impliqués dans la dysbiose.

L'une des caractéristiques liées à l'infection par l'IAV est la perte d'appétit (Monto et al., 2000). La baisse de la prise alimentaire ou un changement de régime alimentaire sont connus pour altérer rapidement la composition et la fonction du microbiote intestinal (David et al., 2014; Desai et al., 2016; Maslowski et al., 2009). Nous avons observé au cours de l'infection grippale, une réduction de la prise alimentaire à partir du quatrième jour d'infection. L'utilisation d'un modèle « Pair-Fed » visant à reproduire la prise alimentaire d'une souris grippée chez une souris non infectée, nous a permis d'induire une perte de poids semblable à celle observée chez les souris infectées. L'analyse métagénomique du microbiote intestinal de ces souris montre une perturbation similaire du microbiote intestinal comparé à des souris infectées par la grippe. Le régime Pair-Fed induit une augmentation du phylum des Verrucomicrobia, une augmentation des bactéries de la classe des Alphaproteobacteria, une diminution des *Lactobacillus* ou encore une restructuration du phylum des Firmicutes quasi identique à celle observée lors d'une infection grippale. Cette perturbation du microbiote intestinal chez les souris Pair-Fed pourrait s'expliquer par la diminution des fibres non fermentables contenues dans la nourriture et nécessaires au développement de certaines bactéries. Les souris Pair-Fed présentent, comme les souris infectées, une chute de la production des AGCC. De la même manière que dans un contexte d'infection grippale, cette chute des AGCC s'explique par la diminution des nutriments disponibles pour la survie des bactéries et la mise en place d'une compétition entre les bactéries (Desai et al., 2016). Nous avons montré que le régime Pair-Fed, en plus d'induire des perturbations au niveau intestinal,

induit une plus forte susceptibilité à l'infection par *S. pneumoniae*. Cette susceptibilité plus importante à la l'infection bactérienne a aussi été observée dans un contexte de jeûne drastique (48h) (Mancuso et al., 2006). L'ensemble de ces éléments suggèrent fortement que la baisse de la prise alimentaire au cours de la grippe est à l'origine des perturbations de la composition et de l'activité métabolique du microbiote. Ce résultat ouvre des perspectives intéressantes, comme discuté plus bas.

Impact de la perturbation du microbiote intestinal au cours de la grippe sur les mécanismes de défenses contre l'infection bactérienne

Afin d'étudier les conséquences de la perturbation du microbiote intestinal sur les défenses immunitaires face aux infections pulmonaires, nous avons mis en place un modèle de recolonisation de flore intestinale. Plusieurs études se sont penchées sur l'effet d'une déplétion du microbiote intestinal sur la susceptibilité aux infections bactériennes pulmonaires, notamment par des traitements aux antibiotiques ou l'utilisation de souris Germ-Free (Clarke, 2014; Fagundes et al., 2012; Schuijt et al., 2016). Aucune d'entre elles n'a étudié l'impact d'une altération transitoire du microbiote intestinal, lié à une primo-infection par exemple, dans ces pathologies. Nous avons montré que la déplétion du microbiote intestinal par un traitement aux antibiotiques (3 semaines) induit une augmentation de la susceptibilité à l'infection par *S. pneumoniae*. Ces résultats sont similaires à ceux observés dans la littérature où des souris Germ-Free ou traitées aux antibiotiques sont plus susceptibles aux infections par *S. pneumoniae* et *K. pneumoniae* (Clarke, 2014; Fagundes et al., 2012; Schuijt et al., 2016). La recolonisation de la flore intestinale chez les souris traitées aux antibiotiques par une flore venant de souris saines restaure l'immunité pulmonaire et diminue la susceptibilité à l'infection bactérienne pulmonaire. Nous avons par la suite montré que les souris recolonisées avec une flore intestinale venant de souris grippées (H3N2) sont plus susceptibles à l'infection par *S. pneumoniae* par rapport aux souris reconstituées avec une flore venant de souris saines. La perturbation transitoire du microbiote intestinal observée durant l'infection grippale est donc suffisante pour participer à l'altération de la réponse antibactérienne respiratoire. La même observation a été réalisée suite à la recolonisation avec une flore bactérienne provenant de souris infectées par un autre virus de la grippe (H1N1). Nous avons confirmé, via la recolonisation avec la flore de souris Pair-Fed, que la perte de poids observée au cours de la grippe participe à l'altération de la réponse pulmonaire antibactérienne.

De façon intéressante, la recolonisation avec une flore dysbiotique s'accompagne d'une diminution de la production des AGCC comparée à la recolonisation avec une flore saine. Les AGCC jouent un rôle essentiel dans l'immunité notamment au niveau de certaines cellules nécessaires à la mise en place d'une réponse antibactérienne (macrophages, neutrophiles, DC etc.). Nous avons émis l'hypothèse que ce défaut de production des AGCC chez les souris recolonisées par une flore dysbiotique participe à la diminution de la réponse antibactérienne pulmonaire. Un traitement avec de l'acétate (AGCC majoritaire dans le sang, >90%) est suffisant pour restaurer la réponse immunitaire antibactérienne chez des souris reconstituées avec la flore de souris infectées par l'IAV ou reconstituées avec la flore de souris Pair-Fed. Bien que certaines études décrivent un effet bactéricide de l'acétate sur certaines bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*) (Lee et al., 2002), nous avons montré que *in vitro* l'acétate n'a aucun effet bactéricide direct sur *S. pneumoniae*.

Certaines équipes ont démontré que les PAMPs dérivés des bactéries pouvaient être suffisants pour restaurer la réponse immunitaire pulmonaire chez des souris traitées aux antibiotiques. L'utilisation de LPS ou d'agonistes spécifiques des NOD est suffisante pour restaurer cette immunité chez des souris dépourvues de microbiote dans un contexte d'infection par *K. pneumoniae* (Clarke, 2014; Fagundes et al., 2012). La recolonisation du microbiote intestinal avec un pool de bactéries capables de stimuler NOD2 joue aussi un rôle bénéfique suite à l'infection par *S. pneumoniae* (Ibricevic et al., 2006). Il serait intéressant de regarder si, dans ce modèle de déplétion quasi-totale du microbiote, les AGCC jouent aussi un rôle. Des résultats préliminaires montrent qu'un traitement avec des AGCC n'est pas suffisant pour restaurer les mécanismes de défense contre l'infection par *S. pneumoniae* chez des souris traitées aux antibiotiques. Une co-stimulation avec un PAMP pourrait être nécessaire au contrôle de la charge bactérienne dans ce modèle.

Effet de l'acétate sur l'immunité antibactérienne pulmonaire

Nous avons par la suite essayé de comprendre comment le microbiote intestinal dysbiotique (contexte grippal) induit une susceptibilité accrue aux infections bactériennes et comment un traitement par l'acétate permet de restaurer les mécanismes de défense. L'analyse par cytométrie en flux n'a révélé aucune différence en termes de fréquence et de nombre de cellules immunes au sein du poumon. Que ce soit au niveau des macrophages alvéolaires, neutrophiles, DC, LT $\gamma\delta$ produisant de l'IL-17A ou des iNKT produisant de l'IFN- γ , leur nombre n'est pas réduit chez les souris recolonisées avec la flore dysbiotique.

Outre le nombre de cellules, la perturbation ou l'absence du microbiote peut altérer certaines fonctions cellulaires nécessaires au contrôle de l'infection bactérienne. Il a été montré que le traitement aux antibiotiques altère l'activité phagocytaire des macrophages alvéolaires (Schuijt et al., 2016). Dans cette même étude, les macrophages alvéolaires montrent une réponse cellulaire altérée suite à la stimulation avec du LPS. Dans notre modèle, le transfert de la flore de souris infectées par le virus de la grippe ne perturbe pas l'activité phagocytaire des macrophages alvéolaires. De façon très intéressante, c'est au niveau de l'activité bactéricide de ces cellules que la recolonisation par la flore dysbiotique a un impact. Cette diminution de l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires a été décrite chez la souris traitée à certains antibiotiques et infectées par *Mycobacterium tuberculosis* (Khan et al., 2019). Dans notre modèle, le traitement avec l'acétate restaure l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires. De façon surprenante, il a été reporté dans la littérature que la culture *in vitro* d'une lignée de macrophages avec des AGCC entraîne une diminution de la réponse inflammatoire suite une stimulation par le LPS (Liu et al., 2012).

Effet de la restauration des AGCC sur les risques de surinfections post-grippales

Des études sur l'effet bénéfique des AGCC dans des pathologies pulmonaires ont commencé à émerger ces dernières années. L'asthme est l'une des premières pathologies pulmonaires au cours de laquelle la perturbation du microbiote intestinal a été suggérée comme facteur à l'origine de la pathologie. Alors que la déplétion du GPR43 entraîne une exacerbation de cette pathologie (Maslowski et al., 2009), l'utilisation de régimes riches en fibres chez des souris sauvages, en augmentant la production d'AGCC, induit une protection contre l'asthme (Trompette et al., 2014). Dans ce contexte, un traitement avec l'acétate réduit la réponse Th2 exacerbée dans un contexte d'asthme respiratoire. L'effet est principalement médié par les DC qui, suite au traitement avec l'acétate, diminuent l'activation des lymphocytes Th2 (Cait et al., 2017)

A la vue de ces travaux, et considérant nos données dans le modèle de transfert de flore fécale, nous nous sommes interrogés sur la possibilité de protéger, au moins partiellement, les souris surinfectées en les traitant de façon préventive avec de l'acétate. L'infection grippale cause des dommages majeurs au niveau pulmonaire, tant au niveau de la structure même du poumon (profondes altérations de la barrière) qu'au niveau immunologique (immuno-suppression). La sévérité de ce modèle ne supposait aucun effet majeur d'un traitement par l'acétate. De façon assez spectaculaire, nos travaux ont montré un

effet bénéfique de l'acétate dans le contrôle de la charge bactérienne et l'augmentation de la survie (WO2019149727 - PCT/EP2018/18305095.4). Cet effet est médié par le récepteur GPR43, puisque sa déplétion entraîne une absence d'effet bénéfique de l'acétate. Une approche pharmacologique a été développée afin de confirmer ce résultat. Une collaboration a donc été initiée avec les Professeurs Milligan (Edinbourg, Ecosse) et Tron Ulven (Copenhague, Danemark), experts mondialement connus dans le domaine des GPR41/GPR43. Ce dernier a récemment conçu un nouvel agoniste du GPR43 (récepteur de l'acétate et du propionate) (Hansen et al., 2018). L'utilisation de cet agoniste (voie intra-nasale) a conduit à des résultats intéressants. En effet, la stimulation du GPR43 par cet agoniste réduit la charge bactérienne chez les souris grippées (PCT/EP19188615.9.). La diminution de la susceptibilité à la surinfection suite au traitement par l'acétate n'est pas due à un effet bénéfique de cet AGCC sur l'infection virale en elle-même. En effet, aucun changement au niveau de la charge virale, de l'expression des gènes de la barrière respiratoire ou du nombre des cellules immunitaires n'a été observé suite au traitement avec l'acétate. De la même manière, l'utilisation de souris *Gpr43*^{-/-} suggère l'absence de rôle de ce récepteur sur l'infection grippale (charge virale, inflammation pulmonaire) (résultat non montré) et la surinfection bactérienne (Sencio et al. 2020). Ce dernier résultat suggère que sans supplémentation en acétate, ce récepteur ne joue aucun rôle lors de la surinfection. Cette observation va en l'encontre de certaines études. En effet, il a été montré qu'un régime riche en fibres induit une augmentation de la survie chez des souris infectées par l'IAV (Trompette et al., 2018). Cette augmentation de la survie provient d'un effet direct des AGCC sur l'hématopoïèse et la génération de macrophages. Ces macrophages présentent la particularité de produire moins de CXCL1, limitant ainsi le recrutement de neutrophiles et les dommages induits par ces derniers sur l'épithélium respiratoire. L'impact de ce régime sur la surinfection bactérienne post-grippale n'a pas été montré dans cette étude. L'effet bénéfique des AGCC sur l'infection grippale a également été étudié dans un contexte de souris soumises à une forte température (Moriyama and Ichinohe, 2019). Cette dernière induit une altération de la réponse T CD8⁺ et de la production des anticorps; altération restaurée suite à un traitement aux AGCC ou un régime riche en fibres. Enfin, Antunes et ses collaborateurs ont récemment mis en lumière le rôle de l'acétate au cours de l'infection par RSV (Antunes et al., 2019). Nous ignorons les raisons de cette divergence entre ces travaux et les nôtres. Il est possible que les régimes utilisés (composition en fibres notamment) expliquent ces résultats.

Nos travaux ont montré que l'acétate n'induit pas de changements majeurs dans la réponse mise en place suite à la surinfection bactérienne, notamment au niveau du nombre de LT $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17A ou de iNKT producteurs d'IFN- γ , dont les rôles dans la surinfection ont bien été montrés (Barthelemy et al., 2017; Paget et al., 2011). Comme observé au sein de notre modèle de recolonisation, l'acétate agit sur les macrophages alvéolaires. La fréquence et la fonction (phagocytose, activité bactéricide) de ces cellules sont altérées au cours de la grippe, ce qui pourrait expliquer en partie la susceptibilité accrue à la surinfection bactérienne (Ghoneim et al., 2013). Nous avons montré que la déplétion des macrophages alvéolaires chez des souris traitées à l'acétate annihile les effets bénéfiques de cet AGCC lors de la surinfection bactérienne. Ce résultat suggère que l'acétate peut restaurer, à distance, les fonctions bactéricides des macrophages alvéolaires. Il sera intéressant de déterminer les mécanismes de cet effet bénéfique. L'une des approches serait de trier les macrophages alvéolaires des souris grippées et de les stimuler *in vitro* avec de l'acétate ou avec l'agoniste GPR43. Nos travaux montrent que l'acétate augmente l'activité bactéricide de ces cellules (lignée cellulaire). Des expériences sont en cours afin de déterminer les voies d'activation induites par ce traitement et les conséquences sur les principales voies impliquées dans l'activité bactéricide de ces cellules (production de NO, ROS etc).

Bien que nos travaux montrent l'importance des macrophages alvéolaires dans l'effet bénéfique de l'acétate, nous ne pouvons pas exclure le rôle d'autres types cellulaires. Les neutrophiles, autres cellules dont les fonctions sont altérées au cours de la grippe, expriment le GPR43. Il serait intéressant de regarder l'impact de la stimulation du GPR43, par l'acétate ou un agoniste, sur les neutrophiles dans un contexte de surinfection. Les AGCC sont connus pour favoriser le recrutement des neutrophiles dans les sites inflammatoires et augmenter leur activité bactéricide (Vinolo et al., 2009). Par ailleurs, des traitements à base de propionate ou de butyrate diminuent la production de TNF α et de NO suite à la stimulation des neutrophiles par du LPS (Vinolo et al., 2011). Il serait intéressant d'étudier l'impact du traitement par l'acétate en l'absence de neutrophiles, via l'utilisation d'un anticorps anti-Ly6G par exemple.

De plus, des travaux récents auxquels j'ai participé, montre une altération de la monoïose dans la moelle osseuse au cours de la grippe (Beshara et al., 2018). Cette altération cible les progéniteurs des cellules dendritiques et est due à une diminution de la production de Flt3-L (ms-like tyrosine kinase 3 ligand) qui est un facteur de différenciation des progéniteurs des cDC. Bien que des expériences préliminaires ne montrent pas d'effet bénéfique d'un traitement à l'acétate sur les cellules progénitrices des DC au cours de la

grippe (ni sur la monoïose), il serait intéressant de regarder son effet sur l'activité de ces cellules. De plus, l'étude de l'effet de l'acétate sur la génération de progéniteurs de macrophages au cours de la grippe et sur les fonctions de ces cellules (activité bactéricide etc.) pourrait également être des pistes à étudier.

La stimulation intranasale avec un agoniste du GPR43 avant la surinfection bactérienne est suffisante pour réduire la charge bactérienne. Les thérapies utilisant des agonistes au GPR commencent à voir le jour. L'obésité et le diabète de type II sont les deux premières pathologies au cours desquelles la mise en place de traitements utilisant ces agonistes a conduit à des effets bénéfiques (Ichimura et al., 2014; Milligan et al., 2017; Ulven, 2012). Nos résultats préliminaires montrent qu'une seule injection de l'agoniste pour le GPR43 n'est pas suffisante pour augmenter la survie des souris surinfectées par rapport à des souris non traitées. Ce résultat limite donc les applications thérapeutiques de notre travail, au moins sur le plan pharmacologique. Cela étant, une optimisation du protocole (inoculation répétée et/ou systémique de l'agoniste) est envisageable. Au regard de l'effet bénéfique de l'acétate sur certaines infections bactériennes respiratoires, comme *K. pneumoniae* (Gram-) (Galvão et al., 2018), il sera aussi intéressant d'étudier les effets de cet agoniste sur l'infection à *S. pneumoniae*.

Conclusion générale et perspective :

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence le rôle délétère de la perturbation du microbiote intestinal et de son activité de fermentation au cours de la grippe vis-à-vis des surinfections bactériennes. La diminution de la production des AGCC, et plus particulièrement de l'acétate, participe à l'augmentation du risque d'infection bactérienne au cours de la grippe. Le dysfonctionnement des mécanismes de défense pulmonaire et l'altération de la barrière épithéliale pulmonaire jouent un rôle critique dans les surinfections post-grippales. Nos travaux montrent que le microbiote intestinal, pourtant distant des poumons, peut jouer un rôle dans la mise en place de cette susceptibilité aux surinfections bactériennes, notamment en altérant les mécanismes de défense se développant dans les poumons. L'altération de la composition et l'activité du microbiote intestinal impacte directement l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires, activité connue pour être fortement diminuée à la suite d'une infection virale et qui contribue fortement à la prolifération de la bactérie en condition de surinfection.

L'identification de la diminution de la production des AGCC au cours d'une infection grippale nous a permis de mettre en lumière le rôle bénéfique des AGCC et plus particulièrement de l'acétate sur l'immunité pulmonaire. Un traitement composé d'acétate au cours de la grippe réduit la susceptibilité et augmente la survie face aux surinfections bactériennes. Dans ce contexte, l'acétate semble agir directement sur les macrophages alvéolaires via son récepteur, le GPR43, afin d'augmenter leur activité bactéricide et ainsi contrôler la charge bactérienne pulmonaire et la dissémination bactérienne. Cette activité bénéfique étant absente lors de la déplétion des macrophages alvéolaires ou encore lors de l'utilisation de souris déficientes pour le GPR43KO. Le rôle du couple « GPR43 – macrophage alvéolaire » dans la lutte contre les surinfections bactériennes a été confirmé grâce à l'utilisation d'agoniste spécifique du GPR43.

Notre étude offre des perspectives thérapeutiques dans le contexte des infections respiratoires. En effet, des stratégies visant à contrôler ou prévenir les perturbations de la composition et de l'activité métabolique (fermentation) du microbiote intestinal lors de la grippe (ou autres stress majeur) pourrait prévenir les surinfections. L'utilisation de régimes riches en fibres, afin d'augmenter le taux d'AGCC circulant, pourrait être une solution préventive de choix. Il en va de même pour l'utilisation de probiotiques, notamment en utilisant des souches productrices d'AGCC, qui peuvent représenter une solution aussi bien préventive que curative dans la lutte contre les surinfections bactériennes post-grippales. Nous tenterons à l'avenir d'explorer cette piste, notamment par utilisation de souches bactériennes connues pour produire de l'acétate. Enfin, des traitements à base d'agonistes des AGCC (agonistes du GPR43) pourraient aussi permettre de mieux contrôler les surinfections bactériennes.

Pris dans son ensemble, ce travail permet de mieux comprendre les mécanismes conduisant aux surinfections bactériennes post-grippales et pourrait avoir des applications thérapeutiques potentielles dans la lutte contre ces complications, qui assombrissent souvent le tableau clinique des patients.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Abeyta, M., Hardy, G.G., and Yother, J. (2003). Genetic Alteration of Capsule Type but Not PspA Type Affects Accessibility of Surface-Bound Complement and Surface Antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* *71*, 218–225.
- Abood, R.N., McHugh, K.J., Rich, H.E., Ortiz, M.A., Tobin, J.M., Ramanan, K., Robinson, K.M., Bomberger, J.M., Kolls, J.K., Manni, M.L., et al. (2019). IL-22-binding protein exacerbates influenza, bacterial superinfection. *Mucosal Immunol.* *12*, 1231–1243.
- Abrahamsson, T.R., Jakobsson, H.E., Andersson, A.F., Björkstén, B., Engstrand, L., and Jenmalm, M.C. (2014). Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *44*, 842–850.
- Abt, M.C., Osborne, L.C., Monticelli, L.A., Doering, T.A., Alenghat, T., Sonnenberg, G.F., Paley, M.A., Antenus, M., Williams, K.L., Erikson, J., et al. (2012). Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity* *37*, 158–170.
- Agarwal, D., Schmader, K.E., Kossenkov, A.V., Doyle, S., Kurupati, R., and Ertl, H.C.J. (2018). Immune response to influenza vaccination in the elderly is altered by chronic medication use. *Immun. Ageing* *15*, 19.
- Akay, H.K., Bahar Tokman, H., Hatipoglu, N., Hatipoglu, H., Siraneci, R., Demirci, M., Borsa, B.A., Yuksel, P., Karakullukcu, A., Kangaba, A.A., et al. (2014). The relationship between bifidobacteria and allergic asthma and/or allergic dermatitis: a prospective study of 0-3 years-old children in Turkey. *Anaerobe* *28*, 98–103.
- Albert, M.L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* *392*, 86–89.
- Albiger, B., Dahlberg, S., Sandgren, A., Wartha, F., Beiter, K., Katsuragi, H., Akira, S., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2007). Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell. Microbiol.* *9*, 633–644.
- Alexopoulou, L., Desnues, B., and Demaria, O. (2012). Le récepteur Toll-like 8 - Un TLR pas comme les autres. *médecine/sciences* *28*, 96–102.
- Amorim, M.J., Bruce, E.A., Read, E.K.C., Foeglein, A., Mahen, R., Stuart, A.D., and Digard, P. (2011). A Rab11- and Microtubule-Dependent Mechanism for Cytoplasmic Transport of Influenza A Virus Viral RNA. *J. Virol.* *85*, 4143–4156.
- André, G.O., Politano, W.R., Mirza, S., Converso, T.R., Ferraz, L.F.C., Leite, L.C.C., and Darrieux, M. (2015). Combined effects of lactoferrin and lysozyme on *Streptococcus pneumoniae* killing. *Microb. Pathog.* *89*, 7–17.
- Antunes, K.H., Fachi, J.L., de Paula, R., da Silva, E.F., Pral, L.P., dos Santos, A.Á., Dias, G.B.M., Vargas, J.E., Puga, R., Mayer, F.Q., et al. (2019). Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. *Nat. Commun.* *10*.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J., et al. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* *504*, 451–455.
- Arranz, R., Coloma, R., Chichon, F.J., Conesa, J.J., Carrascosa, J.L., Valpuesta, J.M., Ortin, J., and Martin-Benito, J. (2012). The Structure of Native Influenza Virion Ribonucleoproteins. *Science* *338*, 1634–1637.
- Arrieta, M.-C., Stiemsma, L.T., Dimitriu, P.A., Thorson, L., Russell, S., Yurist-Doutsch, S., Kuzeljevic, B., Gold, M.J., Britton, H.M., Lefebvre, D.L., et al. (2015). Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci. Transl. Med.* *7*, 307ra152.

Bibliographie

- Arrieta, M.-C., Arévalo, A., Stiemsma, L., Dimitriu, P., Chico, M.E., Loor, S., Vaca, M., Boutin, R.C.T., Morien, E., Jin, M., et al. (2018). Associations between infant fungal and bacterial dysbiosis and childhood atopic wheeze in a nonindustrialized setting. *J. Allergy Clin. Immunol.* *142*, 424-434.e10.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., et al. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* *500*, 232–236.
- Avadhanula, V., Rodriguez, C.A., Devincenzo, J.P., Wang, Y., Webby, R.J., Ulett, G.C., and Adderson, E.E. (2006). Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *J. Virol.* *80*, 1629–1636.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15718–15723.
- Badham, M.D., and Rossman, J.S. (2016). Filamentous Influenza Viruses. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* *3*, 155–161.
- Bauerle, P.A., and Baichwal, V.R. (1997). NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv. Immunol.* *65*, 111–137.
- Bailey, C.C., Huang, I.-C., Kam, C., and Farzan, M. (2012). Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice. *PLoS Pathog.* *8*, e1002909.
- Ballinger, M.N., and Standiford, T.J. (2010). Postinfluenza bacterial pneumonia: host defenses gone awry. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *30*, 643–652.
- Barr, T.A., Brown, S., Mastroeni, P., and Gray, D. (2010). TLR and B cell receptor signals to B cells differentially program primary and memory Th1 responses to Salmonella enterica. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 2783–2789.
- Barthelemy, A., Ivanov, S., Hassane, M., Fontaine, J., Heurtault, B., Frisch, B., Faveeuw, C., Paget, C., and Trottein, F. (2016). Exogenous Activation of Invariant Natural Killer T Cells by α -Galactosylceramide Reduces Pneumococcal Outgrowth and Dissemination Postinfluenza. *MBio* *7*.
- Barthelemy, A., Ivanov, S., Fontaine, J., Soulard, D., Bouabe, H., Paget, C., Faveeuw, C., and Trottein, F. (2017). Influenza A virus-induced release of interleukin-10 inhibits the anti-microbial activities of invariant natural killer T cells during invasive pneumococcal superinfection. *Mucosal Immunol.* *10*, 460–469.
- Barthelemy, A., Sencio, V., Soulard, D., Deruyter, L., Faveeuw, C., Le Goffic, R., and Trottein, F. (2018). Interleukin-22 Immunotherapy during Severe Influenza Enhances Lung Tissue Integrity and Reduces Secondary Bacterial Systemic Invasion. *Infect. Immun.* *86*.
- Bartley, J.M., Zhou, X., Kuchel, G.A., Weinstock, G.M., and Haynes, L. (2017). Impact of Age, Caloric Restriction, and Influenza Infection on Mouse Gut Microbiome: An Exploratory Study of the Role of Age-Related Microbiome Changes on Influenza Responses. *Front. Immunol.* *8*, 1164.
- Bassis, C.M., Erb-Downward, J.R., Dickson, R.P., Freeman, C.M., Schmidt, T.M., Young, V.B., Beck, J.M., Curtis, J.L., and Huffnagle, G.B. (2015). Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. *MBio* *6*.

Bibliographie

- Baumgarth, N., Herman, O.C., Jager, G.C., Brown, L., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1999). Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 2250–2255.
- Becker, S., Quay, J., and Soukup, J. (1991). Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *147*, 4307–4312.
- Bedford, T., Suchard, M.A., Lemey, P., Dudas, G., Gregory, V., Hay, A.J., McCauley, J.W., Russell, C.A., Smith, D.J., and Rambaut, A. (2014). Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *ELife* *3*.
- Belisle, S.E., Tisoncik, J.R., Korth, M.J., Carter, V.S., Proll, S.C., Swayne, D.E., Pantin-Jackwood, M., Tumpey, T.M., and Katze, M.G. (2010). Genomic profiling of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) receptor and interleukin-1 receptor knockout mice reveals a link between TNF-alpha signaling and increased severity of 1918 pandemic influenza virus infection. *J. Virol.* *84*, 12576–12588.
- Belkaid, Y., and Hand, T.W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* *157*, 121–141.
- Bender, B.S., Johnson, M.P., and Small, P.A. (1991). Influenza in senescent mice: impaired cytotoxic T-lymphocyte activity is correlated with prolonged infection. *Immunology* *72*, 514–519.
- Bender, B.S., Croghan, T., Zhang, L., and Small, P.A. (1992). Transgenic mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted T cells have delayed viral clearance and increased mortality after influenza virus challenge. *J. Exp. Med.* *175*, 1143–1145.
- Benjamin, J.L., Hedin, C.R.H., Koutsoumpas, A., Ng, S.C., McCarthy, N.E., Prescott, N.J., Pessoa-Lopes, P., Mathew, C.G., Sanderson, J., Hart, A.L., et al. (2012). Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 1092–1100.
- Bergmann, S. (2006). Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* *152*, 295–303.
- Berkley, J.A., Lowe, B.S., Mwangi, I., Williams, T., Bauni, E., Mwarumba, S., Ngetsa, C., Slack, M.P.E., Njenga, S., Hart, C.A., et al. (2005). Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *N. Engl. J. Med.* *352*, 39–47.
- Bernuth, H. von, Picard, C., Jin, Z., Pankla, R., Xiao, H., Ku, C.-L., Chrabieh, M., Mustapha, I.B., Ghandil, P., Camcioglu, Y., et al. (2008). Pyogenic Bacterial Infections in Humans with MyD88 Deficiency. *Science* *321*, 691–696.
- Berry, A.M., Yother, J., Briles, D.E., Hansman, D., and Paton, J.C. (1989a). Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* *57*, 2037–2042.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D., and Paton, J.C. (1989b). Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* *57*, 2324–2330.
- Beshara, R., Sencio, V., Soulard, D., Barthélémy, A., Fontaine, J., Pinteau, T., Deruyter, L., Ismail, M.B., Paget, C., Sirard, J.-C., et al. (2018). Alteration of Flt3-Ligand-dependent de novo generation of conventional dendritic cells during influenza infection contributes to respiratory bacterial superinfection. *PLoS Pathog.* *14*, e1007360.
- van den Biggelaar, A.H.J., Pomat, W., Bosco, A., Phuanukoonnon, S., Devitt, C.J., Nadal-Sims, M.A., Siba, P.M., Richmond, P.C., Lehmann, D., and Holt, P.G. (2011). Pneumococcal conjugate vaccination at birth in a high-risk setting: No evidence for neonatal T-cell tolerance. *Vaccine* *29*, 5414–5420.

Bibliographie

- Biggerstaff, M., Cauchemez, S., Reed, C., Gambhir, M., and Finelli, L. (2014). Estimates of the reproduction number for seasonal, pandemic, and zoonotic influenza: a systematic review of the literature. *BMC Infect. Dis.* *14*, 480.
- Bisgaard, H., Li, N., Bonnelykke, K., Chawes, B.L.K., Skov, T., Paludan-Müller, G., Stokholm, J., Smith, B., and Krogfelt, K.A. (2011). Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J. Allergy Clin. Immunol.* *128*, 646-652.e1-5.
- Biswas, A., Petnicki-Ocwieja, T., and Kobayashi, K.S. (2012). Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *90*, 15–24.
- Black, S., Shinefield, H., Fireman, B., Lewis, E., Ray, P., Hansen, J.R., Elvin, L., Ensor, K.M., Hackell, J., Siber, G., et al. (2000). Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *19*, 187–195.
- Blander, J.M., Longman, R.S., Iliev, I.D., Sonnenberg, G.F., and Artis, D. (2017). Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nat. Immunol.* *18*, 851–860.
- Bogaert, D., de Groot, R., and Hermans, P. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect. Dis.* *4*, 144–154.
- Bonten, M.J.M., Huijts, S.M., Bolkenbaas, M., Webber, C., Patterson, S., Gault, S., van Werkhoven, C.H., van Deursen, A.M.M., Sanders, E.A.M., Verheij, T.J.M., et al. (2015). Polysaccharide Conjugate Vaccine against Pneumococcal Pneumonia in Adults. *N. Engl. J. Med.* *372*, 1114–1125.
- Bou Ghanem, E.N., Clark, S., Roggensack, S.E., McIver, S.R., Alcaide, P., Haydon, P.G., and Leong, J.M. (2015). Extracellular Adenosine Protects against *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection by Regulating Pulmonary Neutrophil Recruitment. *PLoS Pathog.* *11*.
- Bradley, K.C., Jones, C.A., Tompkins, S.M., Tripp, R.A., Russell, R.J., Gramer, M.R., Heimburg-Molinaro, J., Smith, D.F., Cummings, R.D., and Steinhauer, D.A. (2011). Comparison of the receptor binding properties of contemporary swine isolates and early human pandemic H1N1 isolates (Novel 2009 H1N1). *Virology* *413*, 169–182.
- Bradley, K.C., Finsterbusch, K., Schnepf, D., Crotta, S., Llorian, M., Davidson, S., Fuchs, S.Y., Staeheli, P., and Wack, A. (2019). Microbiota-Driven Tonic Interferon Signals in Lung Stromal Cells Protect from Influenza Virus Infection. *Cell Rep.* *28*, 245-256.e4.
- Branger, J., Knapp, S., Weijer, S., Leemans, J.C., Pater, J.M., Speelman, P., Florquin, S., and van der Poll, T. (2004). Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice. *Infect. Immun.* *72*, 788–794.
- Brass, A.L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S.P., Krishnan, M.N., Feeley, E.M., Ryan, B.J., Weyer, J.L., van der Weyden, L., Fikrig, E., et al. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* *139*, 1243–1254.
- Bridy-Pappas, A.E., Margolis, M.B., Center, K.J., and Isaacman, D.J. (2005). *Streptococcus pneumoniae*: Description of the Pathogen, Disease Epidemiology, Treatment, and Prevention. *Pharmacotherapy* *25*, 1193–1212.
- Briles, D.E., Hollingshead, S.K., Paton, J.C., Ades, E.W., Novak, L., van Ginkel, F.W., and Benjamin, W.H. (2003). Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* *188*, 339–348.

Bibliographie

- Brooks, L.R.K., and Mias, G.I. (2018). *Streptococcus pneumoniae's* Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front. Immunol.* *9*.
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., et al. (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* *278*, 11312–11319.
- Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M., Holden, D.W., Paton, J.C., Ehrenstein, M.R., Walport, M.J., and Botto, M. (2002). The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 16969–16974.
- Brown, R.L., Sequeira, R.P., and Clarke, T.B. (2017). The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nat. Commun.* *8*, 1512.
- Brundage, J.F., and Shanks, G.D. (2008). Deaths from Bacterial Pneumonia during 1918–19 Influenza Pandemic. *Emerg. Infect. Dis.* *14*, 1193–1199.
- Budden, K.F., Gellatly, S.L., Wood, D.L.A., Cooper, M.A., Morrison, M., Hugenholtz, P., and Hansbro, P.M. (2017). Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 55–63.
- Bui, M., Whittaker, G., and Helenius, A. (1996). Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J. Virol.* *70*, 8391–8401.
- Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1994). Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* *371*, 37–43.
- Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, P.J., van der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G., van Goudoever, J.B., van Seuningen, I., and Renes, I.B. (2009). The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem. J.* *420*, 211–219.
- Butler, J.C. (1993). Pneumococcal Polysaccharide Vaccine Efficacy: An Evaluation of Current Recommendations. *JAMA* *270*, 1826.
- Byrd-Leotis, L., Cummings, R.D., and Steinhauer, D.A. (2017). The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Cait, A., Hughes, M.R., Antignano, F., Cait, J., Dimitriu, P.A., Maas, K.R., Reynolds, L.A., Hacker, L., Mohr, J., Finlay, B.B., et al. (2017). Microbiome-driven allergic lung inflammation is ameliorated by short-chain fatty acids. *Mucosal Immunol.*
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* *57*, 1470–1481.
- Canvin, J.R., Marvin, A.P., Sivakumaran, M., Paton, J.C., Boulnois, G.J., Andrew, P.W., and Mitchell, T.J. (1995). The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J. Infect. Dis.* *172*, 119–123.
- Cao, J., Wang, D., Xu, F., Gong, Y., Wang, H., Song, Z., Li, D., Zhang, H., Li, D., Zhang, L., et al. (2014). Activation of IL-27 signalling promotes development of postinfluenza pneumococcal pneumonia. *EMBO Mol. Med.* *6*, 120–140.

Bibliographie

- Carlson, A., Thung, S.F., and Norwitz, E.R. (2009). H1N1 Influenza in Pregnancy: What All Obstetric Care Providers Ought to Know. *Rev. Obstet. Gynecol.* 2, 139–145.
- Carrat, F., and Flahault, A. (2007). Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 25, 6852–6862.
- Caruso, R., Warner, N., Inohara, N., and Núñez, G. (2014). NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity* 41, 898–908.
- Cash, H.L., Whitham, C.V., Behrendt, C.L., and Hooper, L.V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313, 1126–1130.
- Cebula, A., Seweryn, M., Rempala, G.A., Pabla, S.S., McIndoe, R.A., Denning, T.L., Bry, L., Kraj, P., Kisielow, P., and Ignatowicz, L. (2013). Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. *Nature* 497, 258–262.
- Chai, J.T., Digby, J.E., and Choudhury, R.P. (2013). GPR109A and vascular inflammation. *Curr. Atheroscler. Rep.* 15, 325.
- Charlson, E.S., Bittinger, K., Haas, A.R., Fitzgerald, A.S., Frank, I., Yadav, A., Bushman, F.D., and Collman, R.G. (2011). Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 957–963.
- Chen, B.J., Leser, G.P., Morita, E., and Lamb, R.A. (2007). Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase, but Not the Matrix Protein, Are Required for Assembly and Budding of Plasmid-Derived Virus-Like Particles. *J. Virol.* 81, 7111–7123.
- Chen, B.J., Leser, G.P., Jackson, D., and Lamb, R.A. (2008). The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J. Virol.* 82, 10059–10070.
- Chen, L.-W., Chen, P.-H., and Hsu, C.-M. (2011). Commensal microflora contribute to host defense against *Escherichia coli* pneumonia through Toll-like receptors. *Shock Augusta Ga* 36, 67–75.
- Chen, Q., Sun, L., and Chen, Z.J. (2016). Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.* 17, 1142–1149.
- Chen, T., Long, W., Zhang, C., Liu, S., Zhao, L., and Hamaker, B.R. (2017). Fiber-utilizing capacity varies in *Prevotella*- versus *Bacteroides*-dominated gut microbiota. *Sci. Rep.* 7.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.
- Chien, Y.-W., Klugman, K.P., and Morens, D.M. (2009). Bacterial Pathogens and Death during the 1918 Influenza Pandemic. *N. Engl. J. Med.* 361, 2582–2583.
- Choi, Y.S., and Baumgarth, N. (2008). Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 205, 3053–3064.
- Choi, Y.S., Dieter, J.A., Rothausler, K., Luo, Z., and Baumgarth, N. (2012). B-1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM. *Eur. J. Immunol.* 42, 120–129.

Bibliographie

- Chu, H., Khosravi, A., Kusumawardhani, I.P., Kwon, A.H.K., Vasconcelos, A.C., Cunha, L.D., Mayer, A.E., Shen, Y., Wu, W.-L., Kambal, A., et al. (2016). Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science* 352, 1116–1120.
- Chung, Y., Chang, S.H., Martinez, G.J., Yang, X.O., Nurieva, R., Kang, H.S., Ma, L., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2009). Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 30, 576–587.
- Clarke, T.B. (2014). Microbial Programming of Systemic Innate Immunity and Resistance to Infection. *PLOS Pathog.* 10, e1004506.
- Clarke, T.B., Davis, K.M., Lysenko, E.S., Zhou, A.Y., Yu, Y., and Weiser, J.N. (2010). Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat. Med.* 16, 228–231.
- Coates, B.M., Staricha, K.L., Wiese, K.M., and Ridge, K.M. (2015). Influenza A Virus Infection, Innate Immunity, and Childhood. *JAMA Pediatr.* 169, 956–963.
- Collins, S.D. (1932). Excess Mortality from Causes other than Influenza and Pneumonia during Influenza Epidemics. *Public Health Rep.* 47, 2159–2179.
- Comalada, M., Ballester, I., Bailón, E., Sierra, S., Xaus, J., Gálvez, J., de Medina, F.S., and Zarzuelo, A. (2006). Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1010–1021.
- Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I., and Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 326, 1694–1697.
- Coussens, A.K., Wilkinson, R.J., and Martineau, A.R. (2015). Phenylbutyrate Is Bacteriostatic against *Mycobacterium tuberculosis* and Regulates the Macrophage Response to Infection, Synergistically with 25-Hydroxy-Vitamin D3. *PLoS Pathog.* 11, e1005007.
- Cox, N.J., and Subbarao, K. (2000). Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu. Rev. Med.* 51, 407–421.
- Cucchiara, S., Iebba, V., Conte, M.P., and Schippa, S. (2009). The microbiota in inflammatory bowel disease in different age groups. *Dig. Dis. Basel Switz.* 27, 252–258.
- Cummings, J.H. (1981). Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 22, 763–779.
- Cummings, J.H., and Macfarlane, G.T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 443–459.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., and Macfarlane, G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221–1227.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., and Tuomanen, E.I. (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377, 435–438.
- Damjanovic, D., Small, C.-L., Jeyanathan, M., Jeyanathan, M., McCormick, S., and Xing, Z. (2012). Immunopathology in influenza virus infection: uncoupling the friend from foe. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 144, 57–69.

Bibliographie

- Damjanovic, D., Lai, R., Jeyanathan, M., Hogaboam, C.M., and Xing, Z. (2013). Marked improvement of severe lung immunopathology by influenza-associated pneumococcal superinfection requires the control of both bacterial replication and host immune responses. *Am. J. Pathol.* *183*, 868–880.
- Das, K., Aramini, J.M., Ma, L.-C., Krug, R.M., and Arnold, E. (2010). Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 530–538.
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., et al. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* *505*, 559–563.
- Davis, B.M., Aiello, A.E., Dawid, S., Rohani, P., Shrestha, S., and Foxman, B. (2012). Influenza and Community-acquired Pneumonia Interactions: The Impact of Order and Time of Infection on Population Patterns. *Am. J. Epidemiol.* *175*, 363–367.
- Davis, K.M., Nakamura, S., and Weiser, J.N. (2011). Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 3666–3676.
- Dawood, F.S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M.W., Lindstrom, S., Garten, R.J., Gubareva, L.V., Xu, X., Bridges, C.B., and Uyeki, T.M. (2009). Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2605–2615.
- Dawson, T.C., Beck, M.A., Kuziel, W.A., Henderson, F., and Maeda, N. (2000). Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am. J. Pathol.* *156*, 1951–1959.
- De Weirdt, R., Possemiers, S., Vermeulen, G., Moerdijk-Poortvliet, T.C.W., Boschker, H.T.S., Verstraete, W., and Van de Wiele, T. (2010). Human faecal microbiota display variable patterns of glycerol metabolism. *FEMS Microbiol. Ecol.* *74*, 601–611.
- Deriu, E., Boxx, G.M., He, X., Pan, C., Benavidez, S.D., Cen, L., Rozengurt, N., Shi, W., and Cheng, G. (2016). Influenza Virus Affects Intestinal Microbiota and Secondary Salmonella Infection in the Gut through Type I Interferons. *PLoS Pathog.* *12*, e1005572.
- Derrien, M., Vaughan, E.E., Plugge, C.M., and de Vos, W.M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *54*, 1469–1476.
- Desai, M.S., Seekatz, A.M., Koropatkin, N.M., Kamada, N., Hickey, C.A., Wolter, M., Pudlo, N.A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., et al. (2016). A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* *167*, 1339–1353.e21.
- Deyle, E.R., Maher, M.C., Hernandez, R.D., Basu, S., and Sugihara, G. (2016). Global environmental drivers of influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 13081–13086.
- Didierlaurent, A., Goulding, J., Patel, S., Snelgrove, R., Low, L., Bebien, M., Lawrence, T., van Rijt, L.S., Lambrecht, B.N., Sirard, J.-C., et al. (2008). Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J. Exp. Med.* *205*, 323–329.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* *303*, 1529–1531.
- Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 519–550.

Bibliographie

- Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunger, M.K., and Bultman, S.J. (2011). The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metab.* *13*, 517–526.
- Donohoe, D.R., Collins, L.B., Wali, A., Bigler, R., Sun, W., and Bultman, S.J. (2012). The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol. Cell* *48*, 612–626.
- Donovan, S.M. (2017). Introduction to the special focus issue on the impact of diet on gut microbiota composition and function and future opportunities for nutritional modulation of the gut microbiome to improve human health. *Gut Microbes* *8*, 75–81.
- Dorrington, M.G., Roche, A.M., Chauvin, S.E., Tu, Z., Mossman, K.L., Weiser, J.N., and Bowdish, D.M.E. (2013). MARCO is required for TLR2- and Nod2-mediated responses to *Streptococcus pneumoniae* and clearance of pneumococcal colonization in the murine nasopharynx. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 250–258.
- Dou, D., Hernández-Neuta, I., Wang, H., Östbye, H., Qian, X., Thiele, S., Resa-Infante, P., Kouassi, N.M., Sender, V., Hentrich, K., et al. (2017). Analysis of IAV Replication and Co-infection Dynamics by a Versatile RNA Viral Genome Labeling Method. *Cell Rep.* *20*, 251–263.
- Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., and Daniels, R. (2018). Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.* *9*, 1581.
- Edwards, A.D., Diebold, S.S., Slack, E.M.C., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* *33*, 827–833.
- Effros, R.B., and Walford, R.L. (1983). The immune response of aged mice to influenza: diminished T-cell proliferation, interleukin 2 production and cytotoxicity. *Cell. Immunol.* *81*, 298–305.
- Ehre, C., Worthington, E.N., Liesman, R.M., Grubb, B.R., Barbier, D., O'Neal, W.K., Sallenave, J.-M., Pickles, R.J., and Boucher, R.C. (2012). Overexpressing mouse model demonstrates the protective role of Muc5ac in the lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 16528–16533.
- Ekmekci, I., von Klitzing, E., Fiebiger, U., Escher, U., Neumann, C., Bacher, P., Scheffold, A., Kühl, A.A., Bereswill, S., and Heimesaat, M.M. (2017). Immune Responses to Broad-Spectrum Antibiotic Treatment and Fecal Microbiota Transplantation in Mice. *Front. Immunol.* *8*, 397.
- Ellis, G.T., Davidson, S., Crotta, S., Branzk, N., Papayannopoulos, V., and Wack, A. (2015). TRAIL+ monocytes and monocyte-related cells cause lung damage and thereby increase susceptibility to influenza-*Streptococcus pneumoniae* coinfection. *EMBO Rep.* *16*, 1203–1218.
- Engelhardt, K.R., Shah, N., Faizura-Yeop, I., Kocacik Uygun, D.F., Frede, N., Muise, A.M., Shteyer, E., Filiz, S., Chee, R., Elawad, M., et al. (2013). Clinical outcome in IL-10- and IL-10 receptor-deficient patients with or without hematopoietic stem cell transplantation. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 825–830.
- Engelich, G., White, M., and Hartshorn, K.L. (2001). Neutrophil survival is markedly reduced by incubation with influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: role of respiratory burst. *J. Leukoc. Biol.* *69*, 50–56.
- Erny, D., Hrabě de Angelis, A.L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Muhlakoiv, T., Jakobshagen, K., Buch, T., et al. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat. Neurosci.* *18*, 965–977.

Bibliographie

- Everitt, A.R., Clare, S., Pertel, T., John, S.P., Wash, R.S., Smith, S.E., Chin, C.R., Feeley, E.M., Sims, J.S., Adams, D.J., et al. (2012). IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature* *484*, 519–523.
- Fagundes, C.T., Amaral, F.A., Vieira, A.T., Soares, A.C., Pinho, V., Nicoli, J.R., Vieira, L.Q., Teixeira, M.M., and Souza, D.G. (2012). Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 1411–1420.
- Fan, X., and Rudensky, A.Y. (2016). Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes. *Cell* *164*, 1198–1211.
- Feeley, E.M., Sims, J.S., John, S.P., Chin, C.R., Pertel, T., Chen, L.-M., Gaiha, G.D., Ryan, B.J., Donis, R.O., Elledge, S.J., et al. (2011). IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry. *PLoS Pathog.* *7*, e1002337.
- Filippo, C.D., Cavalieri, D., Paola, M.D., Ramazzotti, M., Poulet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., and Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 14691–14696.
- Franchi, L., Muñoz-Planillo, R., and Núñez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat. Immunol.* *13*, 325–332.
- Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T.H., Sventoraityte, J., Nikolaus, S., Mayr, G., Domingues, F.S., Albrecht, M., Nothnagel, M., Ellinghaus, D., et al. (2008). Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat. Genet.* *40*, 1319–1323.
- Franz, K.M., Neidermyer, W.J., Tan, Y.-J., Whelan, S.P.J., and Kagan, J.C. (2018). STING-dependent translation inhibition restricts RNA virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, E2058–E2067.
- Frasca, D., and Blomberg, B.B. (2009). Effects of aging on B cell function. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 425–430.
- Fuglsang, E., Pizzolla, A., Krych, L., Nielsen, D.S., Brooks, A.G., Frøkiær, H., and Reading, P.C. (2018). Changes in Gut Microbiota Prior to Influenza A Virus Infection Do Not Affect Immune Responses in Pups or Juvenile Mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *8*, 319.
- Fujii, T., Jounai, K., Horie, A., Takahashi, H., Suzuki, H., Ohshio, K., Fujiwara, D., and Yamamoto, N. (2017). Effects of heat-killed *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 on mucosal and systemic immune parameters, and antiviral reactions to influenza virus in healthy adults; a randomized controlled double-blind study.
- Fujisawa, H. (2001). Inhibitory Role of Neutrophils on Influenza Virus Multiplication in the Lungs of Mice. *Microbiol. Immunol.* *45*, 679–688.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Suzuki, T., et al. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* *469*, 543.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* *504*, 446–450.
- Gadola, S.D., Moins-Teisserenc, H.T., Trowsdale, J., Gross, W.L., and Cerundolo, V. (2000). TAP deficiency syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* *121*, 173–178.

Bibliographie

- Galvão, I., Tavares, L.P., Corrêa, R.O., Fachi, J.L., Rocha, V.M., Rungue, M., Garcia, C.C., Cassali, G., Ferreira, C.M., Martins, F.S., et al. (2018). The Metabolic Sensor GPR43 Receptor Plays a Role in the Control of *Klebsiella pneumoniae* Infection in the Lung. *Front. Immunol.* 9, 142.
- Gambaryan, A.S., Tuzikov, A.B., Piskarev, V.E., Yamnikova, S.S., Lvov, D.K., Robertson, J.S., Bovin, N.V., and Matrosovich, M.N. (1997). Specification of Receptor-Binding Phenotypes of Influenza Virus Isolates from Different Hosts Using Synthetic Sialylglycopolymers: Non-Egg-Adapted Human H1 and H3 Influenza A and Influenza B Viruses Share a Common High Binding Affinity for 6'-Sialyl(N-acetyl)lactosamine. *Virology* 232, 345–350.
- Gamblin, S.J., and Skehel, J.J. (2010). Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 285, 28403–28409.
- Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B., and Pei, G. (2004). Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol. Cell* 14, 303–317.
- Gaudier, E., Jarry, A., Blottière, H.M., de Coppet, P., Buisine, M.P., Aubert, J.P., Labois, C., Cherbut, C., and Hoebler, C. (2004). Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G1168-1174.
- Gazit, R., Gruda, R., Elboim, M., Arnon, T.I., Katz, G., Achdout, H., Hanna, J., Qimron, U., Landau, G., Greenbaum, E., et al. (2006). Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*. *Nat. Immunol.* 7, 517–523.
- Geno, K.A., Gilbert, G.L., Song, J.Y., Skovsted, I.C., Klugman, K.P., Jones, C., Konradsen, H.B., and Nahm, M.H. (2015). Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 871–899.
- Gensollen, T., Iyer, S.S., Kasper, D.L., and Blumberg, R.S. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 352, 539–544.
- Geuking, M.B., Cahenzli, J., Lawson, M.A.E., Ng, D.C.K., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K.D., and Macpherson, A.J. (2011). Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* 34, 794–806.
- GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., et al. (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 1621–1634.
- Ghoneim, H.E., Thomas, P.G., and McCullers, J.A. (2013). Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 1250–1259.
- Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., and Nelson, K.E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355–1359.
- Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., and Walzer, T. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol. Rev.* 220, 169–182.
- Grijalva, C.G., Griffin, M.R., Edwards, K.M., Williams, J.V., Gil, A.I., Verastegui, H., Hartinger, S.M., Vidal, J.E., Klugman, K.P., and Lanata, C.F. (2014). The Role of Influenza and Parainfluenza Infections in Nasopharyngeal Pneumococcal Acquisition Among Young Children. *Clin. Infect. Dis.* 58, 1369–1376.

Bibliographie

- Groves, H.T., Cuthbertson, L., James, P., Moffatt, M.F., Cox, M.J., and Tregoning, J.S. (2018). Respiratory Disease following Viral Lung Infection Alters the Murine Gut Microbiota. *Front. Immunol.* *9*, 182.
- Guarda, G., Zenger, M., Yazdi, A.S., Schroder, K., Ferrero, I., Menu, P., Tardivel, A., Mattmann, C., and Tschopp, J. (2011). Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 2529–2534.
- Guillot, L., Goffic, R.L., Bloch, S., Escriou, N., Akira, S., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2005). 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.* *280*, 5571–5580.
- Guo, H., and Topham, D.J. (2010). Interleukin-22 (IL-22) Production by Pulmonary Natural Killer Cells and the Potential Role of IL-22 during Primary Influenza Virus Infection. *J. Virol.* *84*, 7750–7759.
- Gupta, R.K., George, R., and Nguyen-Van-Tam, J.S. (2008). Bacterial Pneumonia and Pandemic Influenza Planning. *Emerg. Infect. Dis.* *14*, 1187–1192.
- Hakansson, A., and Molin, G. (2011). Gut microbiota and inflammation. *Nutrients* *3*, 637–682.
- Hakansson, A., Roche, H., Mirza, S., McDaniel, L.S., Brooks-Walter, A., and Briles, D.E. (2001). Characterization of Binding of Human Lactoferrin to Pneumococcal Surface Protein A. *Infect. Immun.* *69*, 3372–3381.
- Halestrap, A.P., and Wilson, M.C. (2012). The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life* *64*, 109–119.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P.H., and Chhatwal, G.S. (1999). Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* *67*, 1683–1687.
- Hansen, A.H., Sergeev, E., Bolognini, D., Sprenger, R.R., Ekberg, J.H., Ejsing, C.S., McKenzie, C.J., Rexen Ulven, E., Milligan, G., and Ulven, T. (2018). Discovery of a Potent Thiazolidine Free Fatty Acid Receptor 2 Agonist with Favorable Pharmacokinetic Properties. *J. Med. Chem.* *61*, 9534–9550.
- Harris, A., Cardone, G., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Brecher, M., White, J.M., and Steven, A.C. (2006). Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 19123–19127.
- Hashimoto, Y., Moki, T., Takizawa, T., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. (2007). Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 2448–2457.
- Hassane, M., Demon, D., Souldard, D., Fontaine, J., Keller, L.E., Patin, E.C., Porte, R., Prinz, I., Ryffel, B., Kadioglu, A., et al. (2017). Neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion regulates the $\gamma\delta$ T17 cell response in respiratory bacterial infections. *Mucosal Immunol.* *10*, 1056–1068.
- Hause, B.M., Collin, E.A., Liu, R., Huang, B., Sheng, Z., Lu, W., Wang, D., Nelson, E.A., and Li, F. (2014). Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio* *5*, e00031-00014.
- Heer, A.K., Shamshiev, A., Donda, A., Uematsu, S., Akira, S., Kopf, M., and Marsland, B.J. (2007). TLR signaling fine-tunes anti-influenza B cell responses without regulating effector T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 2182–2191.

Bibliographie

- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526–1529.
- Henrichsen, J. (1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2759–2762.
- Heo, J.Y., Seo, Y.B., Choi, W.S., Lee, J., Noh, J.Y., Jeong, H.W., Kim, W.J., Kim, M.J., Lee, H.Y., and Song, J.Y. (2017). Cost-effectiveness of pneumococcal vaccination strategies for the elderly in Korea. *PLOS ONE* 12, e0177342.
- Hetzl, M., Brock, M., Selmer, T., Pierik, A.J., Golding, B.T., and Buckel, W. (2003). Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein. *Eur. J. Biochem.* 270, 902–910.
- Hijazi, Z., Molla, A.M., Al-Habashi, H., Muawad, W.M., Molla, A.M., and Sharma, P.N. (2004). Intestinal permeability is increased in bronchial asthma. *Arch. Dis. Child.* 89, 227–229.
- Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., Davies, J., Ervine, A., Poulter, L., Pachter, L., et al. (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* 5, e8578.
- Hirst, R.A., Kadioglu, A., O’Callaghan, C., and Andrew, P.W. (2004). The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin. Exp. Immunol.* 138, 195–201.
- Hoeppli, R.E., Wu, D., Cook, L., and Levings, M.K. (2015). The Environment of Regulatory T Cell Biology: Cytokines, Metabolites, and the Microbiome. *Front. Immunol.* 6.
- Holm, C.K., Rahbek, S.H., Gad, H.H., Bak, R.O., Jakobsen, M.R., Jiang, Z., Hansen, A.L., Jensen, S.K., Sun, C., Thomsen, M.K., et al. (2016). Influenza A virus targets a cGAS-independent STING pathway that controls enveloped RNA viruses. *Nat. Commun.* 7.
- Holt, P.G., Strickland, D.H., Wikström, M.E., and Jahnsen, F.L. (2008). Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 142–152.
- Honce, R., and Schultz-Cherry, S. (2019). Impact of Obesity on Influenza A Virus Pathogenesis, Immune Response, and Evolution. *Front. Immunol.* 10.
- Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292, 1115–1118.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 159–169.
- Hooper, L.V., Stappenbeck, T.S., Hong, C.V., and Gordon, J.I. (2003). Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* 4, 269–273.
- Horvat, J.C., Beagley, K.W., Wade, M.A., Preston, J.A., Hansbro, N.G., Hickey, D.K., Kaiko, G.E., Gibson, P.G., Foster, P.S., and Hansbro, P.M. (2007). Neonatal chlamydial infection induces mixed T-cell responses that drive allergic airway disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 556–564.
- Hotomi, M., Yuasa, J., Briles, D.E., and Yamanaka, N. (2016). Pneumolysin plays a key role at the initial step of establishing pneumococcal nasal colonization. *Folia Microbiol. (Praha)* 61, 375–383.

Bibliographie

- Høverstad, T., and Midtvedt, T. (1986). Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *J. Nutr.* *116*, 1772–1776.
- Huang, S., Chen, J., Chen, Q., Wang, H., Yao, Y., Chen, J., and Chen, Z. (2013). A Second CRM1-Dependent Nuclear Export Signal in the Influenza A Virus NS2 Protein Contributes to the Nuclear Export of Viral Ribonucleoproteins. *J. Virol.* *87*, 767–778.
- Hudson, B.D., Christiansen, E., Murdoch, H., Jenkins, L., Hansen, A.H., Madsen, O., Ulven, T., and Milligan, G. (2014). Complex pharmacology of novel allosteric free fatty acid 3 receptor ligands. *Mol. Pharmacol.* *86*, 200–210.
- Hutchinson, E.C., Charles, P.D., Hester, S.S., Thomas, B., Trudgian, D., Martínez-Alonso, M., and Fodor, E. (2014). Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat. Commun.* *5*, 4816.
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J.H., Chinwalla, A.T., Creasy, H.H., Earl, A.M., FitzGerald, M.G., Fulton, R.S., et al. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* *486*, 207–214.
- Hwang, I., Scott, J.M., Kakarla, T., Duriancik, D.M., Choi, S., Cho, C., Lee, T., Park, H., French, A.R., Beli, E., et al. (2012). Activation mechanisms of natural killer cells during influenza virus infection. *PLoS One* *7*, e51858.
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K., and Brown, J.S. (2010). The *Streptococcus pneumoniae* Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms. *Infect. Immun.* *78*, 704–715.
- Ibricevic, A., Pekosz, A., Walter, M.J., Newby, C., Battaile, J.T., Brown, E.G., Holtzman, M.J., and Brody, S.L. (2006). Influenza Virus Receptor Specificity and Cell Tropism in Mouse and Human Airway Epithelial Cells. *J. Virol.* *80*, 7469–7480.
- Ichimura, A., Hasegawa, S., Kasubuchi, M., and Kimura, I. (2014). Free fatty acid receptors as therapeutic targets for the treatment of diabetes. *Front. Pharmacol.* *5*.
- Ichinohe, T., Pang, I.K., and Iwasaki, A. (2010). Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat. Immunol.* *11*, 404–410.
- Ichinohe, T., Pang, I.K., Kumamoto, Y., Peaper, D.R., Ho, J.H., Murray, T.S., and Iwasaki, A. (2011). Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 5354–5359.
- Inohara, N., Ogura, Y., Chen, F.F., Muto, A., and Nuñez, G. (2001). Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* *276*, 2551–2554.
- von Itzstein, M., Wu, W.Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M.L., White, H.F., and Oliver, S.W. (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* *363*, 418–423.
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., et al. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* *139*, 485–498.
- Ivanov, S., Renneson, J., Fontaine, J., Barthelemy, A., Paget, C., Fernandez, E.M., Blanc, F., De Trez, C., Van Maele, L., Dumoutier, L., et al. (2013). Interleukin-22 Reduces Lung Inflammation during Influenza A Virus Infection and Protects against Secondary Bacterial Infection. *J. Virol.* *87*, 6911–6924.

Bibliographie

- Iwanaga, T., Takebe, K., Kato, I., Karaki, S.-I., and Kuwahara, A. (2006). Cellular expression of monocarboxylate transporters (MCT) in the digestive tract of the mouse, rat, and humans, with special reference to *slc5a8*. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* *27*, 243–254.
- Iwasaki, A., and Pillai, P.S. (2014). Innate immunity to influenza virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 315–328.
- Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., Muramoto, Y., Fujii, K., and Kawaoka, Y. (2006). The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J. Virol.* *80*, 5233–5240.
- Izcue, A., Coombes, J.L., and Powrie, F. (2006). Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* *212*, 256–271.
- Jamieson, A.M., Pasmán, L., Yu, S., Gamradt, P., Homer, R.J., Decker, T., and Medzhitov, R. (2013). Role of Tissue Protection in Lethal Respiratory Viral-Bacterial Coinfection. *Science* *340*, 1230–1234.
- Jedrzejewski, M.J. (2001). Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *65*, 187–207.
- Jeisy-Scott, V., Kim, J.H., Davis, W.G., Cao, W., Katz, J.M., and Sambhara, S. (2012). TLR7 Recognition Is Dispensable for Influenza Virus A Infection but Important for the Induction of Hemagglutinin-Specific Antibodies in Response to the 2009 Pandemic Split Vaccine in Mice. *J. Virol.* *86*, 10988–10998.
- Jiang, F., Ramanathan, A., Miller, M.T., Tang, G.-Q., Gale, M., Patel, S.S., and Marcotrigiano, J. (2011). Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature* *479*, 423–427.
- Johansson, C., and Kelsall, B.L. (2005). Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin. Immunol.* *17*, 284–294.
- Johnstone, R.W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 287–299.
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F., and Rudensky, A.Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 531–564.
- Julkunen, I., Sareneva, T., Pirhonen, J., Ronni, T., Melén, K., and Matikainen, S. (2001). Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* *12*, 171–180.
- Kadioglu, A., Coward, W., Colston, M.J., Hewitt, C.R.A., and Andrew, P.W. (2004). CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect. Immun.* *72*, 2689–2697.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 288–301.
- Kamp, M.E., Shim, R., Nicholls, A.J., Oliveira, A.C., Mason, L.J., Binge, L., Mackay, C.R., and Wong, C.H.Y. (2016). G Protein-Coupled Receptor 43 Modulates Neutrophil Recruitment during Acute Inflammation. *PLoS One* *11*, e0163750.
- Kang, Y.-S., Kim, J.Y., Bruening, S.A., Pack, M., Charalambous, A., Pritsker, A., Moran, T.M., Loeffler, J.M., Steinman, R.M., and Park, C.G. (2004). The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular

Bibliographie

- polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 215–220.
- Karlsson, E.A., Sheridan, P.A., and Beck, M.A. (2010). Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 3127–3133.
- Kash, J.C., Walters, K.-A., Davis, A.S., Sandouk, A., Schwartzman, L.M., Jagger, B.W., Chertow, D.S., Li, Q., Kuestner, R.E., Ozinsky, A., et al. (2011). Lethal synergism of 2009 pandemic H1N1 influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* coinfection is associated with loss of murine lung repair responses. *MBio* *2*.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., et al. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* *23*, 19–28.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* *11*, 373–384.
- Keely, S., Talley, N.J., and Hansbro, P.M. (2012). Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease. *Mucosal Immunol.* *5*, 7–18.
- Keilman, L.J. (2019). Seasonal Influenza (Flu). *Nurs. Clin. North Am.* *54*, 227–243.
- Keller, L.E., Bradshaw, J.L., Pipkins, H., and McDaniel, L.S. (2016). Surface Proteins and Pneumolysin of Encapsulated and Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* Mediate Virulence in a Chinchilla Model of Otitis Media. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *6*.
- Kelsall, B. (2008). Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. *Mucosal Immunol.* *1*, 460–469.
- Kendrick, S.F.W., O’Boyle, G., Mann, J., Zeybel, M., Palmer, J., Jones, D.E.J., and Day, C.P. (2010). Acetate, the key modulator of inflammatory responses in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology*. *Baltim. Md* *51*, 1988–1997.
- Kerr, A.R., Paterson, G.K., Riboldi-Tunnicliffe, A., and Mitchell, T.J. (2005). Innate Immune Defense against Pneumococcal Pneumonia Requires Pulmonary Complement Component C3. *Infect. Immun.* *73*, 4245–4252.
- Khan, A.Q., Chen, Q., Wu, Z.-Q., Paton, J.C., and Snapper, C.M. (2005). Both Innate Immunity and Type 1 Humoral Immunity to *Streptococcus pneumoniae* Are Mediated by MyD88 but Differ in Their Relative Levels of Dependence on Toll-Like Receptor 2. *Infect. Immun.* *73*, 298–307.
- Khan, N., Mendonca, L., Dhariwal, A., Fontes, G., Menzies, D., Xia, J., Divangahi, M., and King, I.L. (2019). Intestinal dysbiosis compromises alveolar macrophage immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.* *12*, 772–783.
- Kharat, A.S., and Tomasz, A. (2003). Inactivation of the *srtA* Gene Affects Localization of Surface Proteins and Decreases Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to Human Pharyngeal Cells In Vitro. *Infect. Immun.* *71*, 2758–2765.
- Kim, H.-J., and Bae, S.-C. (2011). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am. J. Transl. Res.* *3*, 166–179.
- Kim, C.U., Lew, W., Williams, M.A., Liu, H., Zhang, L., Swaminathan, S., Bischofberger, N., Chen, M.S., Mendel, D.B., Tai, C.Y., et al. (1997). Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J. Am. Chem. Soc.* *119*, 681–690.

Bibliographie

- Kim, H.M., Lee, Y.-W., Lee, K.-J., Kim, H.S., Cho, S.W., van Rooijen, N., Guan, Y., and Seo, S.H. (2008). Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. *J. Virol.* 82, 4265–4274.
- Kim, L., McGee, L., Tomczyk, S., and Beall, B. (2016). Biological and Epidemiological Features of Antibiotic-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Pre- and Post-Conjugate Vaccine Eras: a United States Perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 525–552.
- Kim, M.H., Kang, S.G., Park, J.H., Yanagisawa, M., and Kim, C.H. (2013). Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology* 145, 396-406.e1-10.
- Klein, E.Y., Monteforte, B., Gupta, A., Jiang, W., May, L., Hsieh, Y.-H., and Dugas, A. (2016). The frequency of influenza and bacterial coinfection: a systematic review and meta-analysis. *Influenza Other Respir. Viruses* 10, 394–403.
- Kleinerman, E.S., Daniels, C.A., Polisson, R.P., and Snyderman, R. (1976). Effect of virus infection on the inflammatory response. Depression of macrophage accumulation in influenza-infected mice. *Am. J. Pathol.* 85, 373–382.
- Klugman, K.P., Chien, Y.-W., and Madhi, S.A. (2009). Pneumococcal pneumonia and influenza: A deadly combination. *Vaccine* 27, C9–C14.
- Kobasa, D., Jones, S.M., Shinya, K., Kash, J.C., Copps, J., Ebihara, H., Hatta, Y., Hyun Kim, J., Halfmann, P., Hatta, M., et al. (2007). Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 445, 319–323.
- Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L.T., and Ley, R.E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4578–4585.
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., and Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 165, 1332–1345.
- Kondo, T., Kawai, T., and Akira, S. (2012). Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol.* 33, 449–458.
- Kopf, M., Brombacher, F., and Bachmann, M.F. (2002). Role of IgM antibodies versus B cells in influenza virus-specific immunity. *Eur. J. Immunol.* 32, 2229–2236.
- Koppe, U., Suttorp, N., and Opitz, B. (2012). Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell. Microbiol.* 14, 460–466.
- Koppel, E.A., Wieland, C.W., Berg, V.C.M. van den, Litjens, M., Florquin, S., Kooyk, Y. van, Poll, T. van der, and Geijtenbeek, T.B.H. (2005). Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur. J. Immunol.* 35, 2962–2969.
- Koren, O., Goodrich, J.K., Cullender, T.C., Spor, A., Laitinen, K., Bäckhed, H.K., Gonzalez, A., Werner, J.J., Angenent, L.T., Knight, R., et al. (2012). Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 150, 470–480.
- Korona-Glowniak, I., and Malm, A. (2012). Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* Strains Colonizing Upper Respiratory Tract of Healthy Preschool Children in Poland. *Sci. World J.* 2012, 1–10.

Bibliographie

- Kostic, A.D., Howitt, M.R., and Garrett, W.S. (2013). Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes Dev.* 27, 701–718.
- Krajmalnik-Brown, R., Ilhan, Z.-E., Kang, D.-W., and DiBaise, J.K. (2012). Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. *Nutr. Clin. Pract. Off. Publ. Am. Soc. Parenter. Enter. Nutr.* 27, 201–214.
- Kudva, A., Scheller, E.V., Robinson, K.M., Crowe, C.R., Choi, S.M., Slight, S.R., Khader, S.A., Dubin, P.J., Enelow, R.I., Kolls, J.K., et al. (2011). Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 1666–1674.
- Kumar, P., Thakar, M.S., Ouyang, W., and Malarkannan, S. (2013). IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection. *Mucosal Immunol.* 6, 69–82.
- La Gruta, N.L., Turner, S.J., and Doherty, P.C. (2004). 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* 172, 5553–5560.
- Landsman, L., and Jung, S. (2007). Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 3488–3494.
- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M., and Altier, C. (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA: Short-chain fatty acids and *Salmonella* invasion. *Mol. Microbiol.* 46, 1451–1464.
- Le Goffic, R., Pothlichet, J., Vitour, D., Fujita, T., Meurs, E., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2007). Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 3368–3372.
- Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J.-Y., Lannoy, V., Decobecq, M.-E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Van Damme, J., et al. (2003). Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.* 278, 25481–25489.
- Lee, B., Robinson, K.M., McHugh, K.J., Scheller, E.V., Mandalapu, S., Chen, C., Di, Y.P., Clay, M.E., Enelow, R.I., Dubin, P.J., et al. (2015). Influenza-induced type I interferon enhances susceptibility to gram-negative and gram-positive bacterial pneumonia in mice. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 309, L158–L167.
- Lee, J., Mo, J.-H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.-T., Lee, H.-K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., et al. (2006). Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 1327–1336.
- Lee, Y., Cesario, T., Owens, J., Shanbrom, E., and Thrupp, L.D. (2002). Antibacterial activity of citrate and acetate. *Nutrition* 18, 665–666.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A.A., Thaïss, C.A., and Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 219–232.
- Li, G., Xie, C., Lu, S., Nichols, R.G., Tian, Y., Li, L., Patel, D., Ma, Y., Brocker, C.N., Yan, T., et al. (2017). Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metab.* 26, 672-685.e4.
- Li, M., van Esch, B.C.A.M., Wagenaar, G.T.M., Garssen, J., Folkerts, G., and Henricks, P.A.J. (2018). Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 831, 52–59.

Bibliographie

- Lindsay, M.I. (1970). Hong Kong Influenza: Clinical, Microbiologic, and Pathologic Features in 127 Cases. *JAMA* 214, 1825.
- Liu, B., Mori, I., Hossain, M.J., Dong, L., Takeda, K., and Kimura, Y. (2004). Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Gen. Virol.* 85, 423–428.
- Liu, L., Li, L., Min, J., Wang, J., Wu, H., Zeng, Y., Chen, S., and Chu, Z. (2012). Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell. Immunol.* 277, 66–73.
- Loo, Y.-M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M.A., García-Sastre, A., Katze, M.G., et al. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J. Virol.* 82, 335–345.
- Lopez-Siles, M., Khan, T.M., Duncan, S.H., Harmsen, H.J.M., Garcia-Gil, L.J., and Flint, H.J. (2012). Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic *Faecalibacterium prausnitzii* can utilize pectin, uronic acids, and host-derived substrates for growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 420–428.
- Louis, P., Duncan, S.H., McCrae, S.I., Millar, J., Jackson, M.S., and Flint, H.J. (2004). Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *J. Bacteriol.* 186, 2099–2106.
- Lowen, A.C. (2017). Constraints, Drivers, and Implications of Influenza A Virus Reassortment. *Annu. Rev. Virol.* 4, 105–121.
- Lowen, A.C., Mubareka, S., Steel, J., and Palese, P. (2007). Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog.* 3, 1470–1476.
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5598–5603.
- MacDonald, V.E., and Howe, L.J. (2009). Histone acetylation: where to go and how to get there. *Epigenetics* 4, 139–143.
- Macfarlane, S., and Macfarlane, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 67–72.
- Macia, L., Tan, J., Vieira, A.T., Leach, K., Stanley, D., Luong, S., Maruya, M., Ian McKenzie, C., Hijikata, A., Wong, C., et al. (2015). Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat. Commun.* 6, 6734.
- Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662–1665.
- Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288, 2222–2226.
- Mahowald, M.A., Rey, F.E., Seedorf, H., Turnbaugh, P.J., Fulton, R.S., Wollam, A., Shah, N., Wang, C., Magrini, V., Wilson, R.K., et al. (2009). Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5859–5864.

Bibliographie

- Maier, H.E., Lopez, R., Sanchez, N., Ng, S., Gresh, L., Ojeda, S., Burger-Calderon, R., Kuan, G., Harris, E., Balmaseda, A., et al. (2018). Obesity Increases the Duration of Influenza A Virus Shedding in Adults. *J. Infect. Dis.* *218*, 1378–1382.
- Maier, H.J., Kashiwagi, T., Hara, K., and Brownlee, G.G. (2008). Differential role of the influenza A virus polymerase PA subunit for vRNA and cRNA promoter binding. *Virology* *370*, 194–204.
- Makino, S., Sato, A., Goto, A., Nakamura, M., Ogawa, M., Chiba, Y., Hemmi, J., Kano, H., Takeda, K., Okumura, K., et al. (2016). Enhanced natural killer cell activation by exopolysaccharides derived from yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *J. Dairy Sci.* *99*, 915–923.
- Malley, R., Henneke, P., Morse, S.C., Cieslewicz, M.J., Lipsitch, M., Thompson, C.M., Kurt-Jones, E., Paton, J.C., Wessels, M.R., and Golenbock, D.T. (2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 1966–1971.
- Maloy, K.J., and Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* *474*, 298–306.
- von der Malsburg, A., Abutbul-Ionita, I., Haller, O., Kochs, G., and Danino, D. (2011). Stalk domain of the dynamin-like MxA GTPase protein mediates membrane binding and liposome tubulation via the unstructured L4 loop. *J. Biol. Chem.* *286*, 37858–37865.
- Manco, S., Hernon, F., Yesilkaya, H., Paton, J.C., Andrew, P.W., and Kadioglu, A. (2006). Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. *Infect. Immun.* *74*, 4014–4020.
- Mancuso, P., Huffnagle, G.B., Olszewski, M.A., Phipps, J., and Peters-Golden, M. (2006). Leptin corrects host defense defects after acute starvation in murine pneumococcal pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 212–218.
- Mändar, R., and Mikelsaar, M. (1996). Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol. Neonate* *69*, 30–35.
- Mariño, E., Richards, J.L., McLeod, K.H., Stanley, D., Yap, Y.A., Knight, J., McKenzie, C., Kranich, J., Oliveira, A.C., Rossello, F.J., et al. (2017). Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* *18*, 552–562.
- Marks, M., Burns, T., Abadi, M., Seyoum, B., Thornton, J., Tuomanen, E., and Pirofski, L. (2007). Influence of neutropenia on the course of serotype 8 pneumococcal pneumonia in mice. *Infect. Immun.* *75*, 1586–1597.
- Marriott, H.M., Mitchell, T.J., and Dockrell, D.H. (2008). Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr. Mol. Med.* *8*, 497–509.
- Marriott, H.M., Gascoyne, K.A., Gowda, R., Geary, I., Nicklin, M.J.H., Iannelli, F., Pozzi, G., Mitchell, T.J., Whyte, M.K.B., Sabroe, I., et al. (2012). Interleukin-1 β regulates CXCL8 release and influences disease outcome in response to *Streptococcus pneumoniae*, defining intercellular cooperation between pulmonary epithelial cells and macrophages. *Infect. Immun.* *80*, 1140–1149.
- Martin, K., and Helenius, A. (1991). Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J. Virol.* *65*, 232–244.
- Martin, P.M., Ananth, S., Cresci, G., Roon, P., Smith, S., and Ganapathy, V. (2009). Expression and localization of GPR109A (PUMA-G/HM74A) mRNA and protein in mammalian retinal pigment epithelium. *Mol. Vis.* *15*, 362–372.

Bibliographie

- Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 229–265.
- Maslowski, K.M., and Mackay, C.R. (2010). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat. Immunol.* *12*, 5.
- Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., et al. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* *461*, 1282–1286.
- McAleer, J.P., and Kolls, J.K. (2018). Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. *Eur. J. Immunol.* *48*, 39–49.
- McAuley, J.L., Corcilius, L., Tan, H.-X., Payne, R.J., McGuckin, M.A., and Brown, L.E. (2017). The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. *Mucosal Immunol.* *10*, 1581–1593.
- McCool, T.L., and Weiser, J.N. (2004). Limited Role of Antibody in Clearance of *Streptococcus pneumoniae* in a Murine Model of Colonization. *Infect. Immun.* *72*, 5807–5813.
- McCown, M.F., and Pekosz, A. (2006). Distinct domains of the influenza a virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J. Virol.* *80*, 8178–8189.
- McCullers, J.A. (2001). Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front. Biosci.* *6*, d877-889.
- McCullers, J.A. (2004). Effect of Antiviral Treatment on the Outcome of Secondary Bacterial Pneumonia after Influenza. *J. Infect. Dis.* *190*, 519–526.
- McCullers, J.A. (2014). The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 252–262.
- McCullers, J.A., and Bartmess, K.C. (2003). Role of Neuraminidase in Lethal Synergism between Influenza Virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* *187*, 1000–1009.
- McCullers, J.A., and Rehg, J.E. (2002). Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. *J. Infect. Dis.* *186*, 341–350.
- McGeoch, D., Fellner, P., and Newton, C. (1976). Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *73*, 3045–3049.
- McGill, J., Heusel, J.W., and Legge, K.L. (2009). Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 803–812.
- McNamee, L.A., and Harmsen, A.G. (2006). Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* *74*, 6707–6721.
- McNeela, E.A., Burke, A., Neill, D.R., Baxter, C., Fernandes, V.E., Ferreira, D., Smeaton, S., El-Rachkidy, R., McLoughlin, R.M., Mori, A., et al. (2010). Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog.* *6*, e1001191.
- Mendelson, M., Tekoah, Y., Zilka, A., Gershoni-Yahalom, O., Gazit, R., Achdout, H., Bovin, N.V., Meninger, T., Mandelboim, M., Mandelboim, O., et al. (2010). NKp46 O-Glycan Sequences That Are Involved in the Interaction with Hemagglutinin Type 1 of Influenza Virus. *J. Virol.* *84*, 3789–3797.

Bibliographie

- Milligan, G., Shimpukade, B., Ulven, T., and Hudson, B.D. (2017). Complex Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors. *Chem. Rev.* *117*, 67–110.
- Mills, C.E., Robins, J.M., and Lipsitch, M. (2004). Transmissibility of 1918 pandemic influenza. *Nature* *432*, 904–906.
- Milner, J.J., and Beck, M.A. (2012). The impact of obesity on the immune response to infection. *Proc. Nutr. Soc.* *71*, 298–306.
- Milner, J.J., Rebeles, J., Dhungana, S., Stewart, D.A., Sumner, S.C.J., Meyers, M.H., Mancuso, P., and Beck, M.A. (2015). Obesity increases mortality and modulates the lung metabolome during pandemic H1N1 influenza virus infection in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 4846–4859.
- Mitra, S., Förster-Fromme, K., Damms-Machado, A., Scheurenbrand, T., Biskup, S., Huson, D.H., and Bischoff, S.C. (2013). Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD 16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics* *14 Suppl 5*, S16.
- Moberley, S., Holden, J., Tatham, D.P., and Andrews, R.M. (2013). Vaccines for preventing pneumococcal infection in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD000422.
- Mogensen, T.H., Berg, R.S., Paludan, S.R., and Østergaard, L. (2008). Mechanisms of dexamethasone-mediated inhibition of Toll-like receptor signaling induced by *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* *76*, 189–197.
- Molinari, N.-A.M., Ortega-Sanchez, I.R., Messonnier, M.L., Thompson, W.W., Wortley, P.M., Weintraub, E., and Bridges, C.B. (2007). The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine* *25*, 5086–5096.
- Molloy, M.J., Bouladoux, N., and Belkaid, Y. (2012). Intestinal microbiota: shaping local and systemic immune responses. *Semin. Immunol.* *24*, 58–66.
- Monto, A.S., Gravenstein, S., Elliott, M., Colopy, M., and Schweinle, J. (2000). Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch. Intern. Med.* *160*, 3243–3247.
- Morens, D.M., and Fauci, A.S. (2007). The 1918 Influenza Pandemic: Insights for the 21st Century. *J. Infect. Dis.* *195*, 1018–1028.
- Morens, D.M., Taubenberger, J.K., and Fauci, A.S. (2008). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* *198*, 962–970.
- Mori, I., Komatsu, T., Takeuchi, K., Nakakuki, K., Sudo, M., and Kimura, Y. (1995). In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *J. Gen. Virol.* *76 (Pt 11)*, 2869–2873.
- Moriyama, M., and Ichinohe, T. (2019). High ambient temperature dampens adaptive immune responses to influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 3118–3125.
- Morris, A., Beck, J.M., Schloss, P.D., Campbell, T.B., Crothers, K., Curtis, J.L., Flores, S.C., Fontenot, A.P., Ghedin, E., Huang, L., et al. (2013). Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *187*, 1067–1075.
- Morris, D.E., Cleary, D.W., and Clarke, S.C. (2017). Secondary Bacterial Infections Associated with Influenza Pandemics. *Front. Microbiol.* *8*.
- Moscona, A. (2005). Oseltamivir resistance--disabling our influenza defenses. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2633–2636.

Bibliographie

- Mozdzanowska, K., Maiese, K., and Gerhard, W. (2000). Th cell-deficient mice control influenza virus infection more effectively than Th- and B cell-deficient mice: evidence for a Th-independent contribution by B cells to virus clearance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 2635–2643.
- Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* *34*, 137–143.
- Murugaiyan, G., Mittal, A., Lopez-Diego, R., Maier, L.M., Anderson, D.E., and Weiner, H.L. (2009). IL-27 Is a Key Regulator of IL-10 and IL-17 Production by Human CD4⁺ T Cells. *J. Immunol.* *183*, 2435–2443.
- Nagai, T., Makino, S., Ikegami, S., Itoh, H., and Yamada, H. (2011). Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* *11*, 2246–2250.
- Nair, H., Brooks, W.A., Katz, M., Roca, A., Berkley, J.A., Madhi, S.A., Simmerman, J.M., Gordon, A., Sato, M., Howie, S., et al. (2011). Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* *378*, 1917–1930.
- Nakajima, A., Nakatani, A., Hasegawa, S., Irie, J., Ozawa, K., Tsujimoto, G., Suganami, T., Itoh, H., and Kimura, I. (2017). The short chain fatty acid receptor GPR43 regulates inflammatory signals in adipose tissue M2-type macrophages. *PLOS ONE* *12*, e0179696.
- Nakamatsu, M., Yamamoto, N., Hatta, M., Nakasone, C., Kinjo, T., Miyagi, K., Uezu, K., Nakamura, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., et al. (2007). Role of interferon-gamma in Valpha14⁺ natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes Infect.* *9*, 364–374.
- Nakamura, S., Davis, K.M., and Weiser, J.N. (2011). Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 3657–3665.
- Nakanishi, Y., Sato, T., and Ohteki, T. (2015). Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization. *Mucosal Immunol.* *8*, 152–160.
- Nakaya, H.I., Hagan, T., Duraisingham, S.S., Lee, E.K., Kwissa, M., Roupheal, N., Frasca, D., Gersten, M., Mehta, A.K., Gaujoux, R., et al. (2015). Systems Analysis of Immunity to Influenza Vaccination across Multiple Years and in Diverse Populations Reveals Shared Molecular Signatures. *Immunity* *43*, 1186–1198.
- Narasaraju, T., Yang, E., Samy, R.P., Ng, H.H., Poh, W.P., Liew, A.-A., Phoon, M.C., van Rooijen, N., and Chow, V.T. (2011). Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am. J. Pathol.* *179*, 199–210.
- Nelson, A.L., Roche, A.M., Gould, J.M., Chim, K., Ratner, A.J., and Weiser, J.N. (2007). Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect. Immun.* *75*, 83–90.
- Nguyen, K.T., Holloway, M.P., and Altura, R.A. (2012). The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* *3*, 137–151.
- Nguyen, T.T.T., Graf, B.A., Randall, T.D., and Baumgarth, N. (2017). sIgM-FcμR Interactions Regulate Early B Cell Activation and Plasma Cell Development after Influenza Virus Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *199*, 1635–1646.
- Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., and Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* *336*, 1262–1267.

Bibliographie

- Nilsson, N.E., Kotarsky, K., Owman, C., and Olde, B. (2003). Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *303*, 1047–1052.
- van Nimwegen, F.A., Penders, J., Stobberingh, E.E., Postma, D.S., Koppelman, G.H., Kerkhof, M., Reijmerink, N.E., Dompeling, E., van den Brandt, P.A., Ferreira, I., et al. (2011). Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *128*, 948-955.e1-3.
- Nobusawa, E., Aoyama, T., Kato, H., Suzuki, Y., Tateno, Y., and Nakajima, K. (1991). Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology* *182*, 475–485.
- Noton, S.L., Medcalf, E., Fisher, D., Mullin, A.E., Elton, D., and Digard, P. (2007). Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J. Gen. Virol.* *88*, 2280–2290.
- Noverr, M.C., Falkowski, N.R., McDonald, R.A., McKenzie, A.N., and Huffnagle, G.B. (2005). Development of allergic airway disease in mice following antibiotic therapy and fungal microbiota increase: role of host genetics, antigen, and interleukin-13. *Infect. Immun.* *73*, 30–38.
- Ogunniyi, A.D., Folland, R.L., Briles, D.E., Hollingshead, S.K., and Paton, J.C. (2000). Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* *68*, 3028–3033.
- Oh, J.Z., Ravindran, R., Chassaing, B., Carvalho, F.A., Maddur, M.S., Bower, M., Hakimpour, P., Gill, K.P., Nakaya, H.I., Yarovsky, F., et al. (2014). TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. *Immunity* *41*, 478–492.
- Ohata, A., Usami, M., and Miyoshi, M. (2005). Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxigenase activation. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* *21*, 838–847.
- Ohira, H., Fujioka, Y., Katagiri, C., Mamoto, R., Aoyama-Ishikawa, M., Amako, K., Izumi, Y., Nishiumi, S., Yoshida, M., Usami, M., et al. (2013). Butyrate attenuates inflammation and lipolysis generated by the interaction of adipocytes and macrophages. *J. Atheroscler. Thromb.* *20*, 425–442.
- Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 60–71.
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M.P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J.N., Siebert, R., Baron, R.M., Kasper, D.L., et al. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* *336*, 489–493.
- Opitz, B., Püschel, A., Schmeck, B., Hocke, A.C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R.R., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2004). Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* *279*, 36426–36432.
- Paget, C., Ivanov, S., Fontaine, J., Blanc, F., Pichavant, M., Renneson, J., Bialecki, E., Pothlichet, J., Vendeville, C., Barba-Spaeth, G., et al. (2011). Potential role of invariant NKT cells in the control of pulmonary inflammation and CD8+ T cell response during acute influenza A virus H3N2 pneumonia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 5590–5602.
- Paget, C., Ivanov, S., Fontaine, J., Renneson, J., Blanc, F., Pichavant, M., Dumoutier, L., Ryffel, B., Renauld, J.C., Gosset, P., et al. (2012). Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during

Bibliographie

- influenza A virus infection: potential role in protection against lung epithelial damages. *J. Biol. Chem.* *287*, 8816–8829.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., and Brown, P.O. (2007). Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLOS Biol.* *5*, e177.
- Park, J., Kim, M., Kang, S.G., Jannasch, A.H., Cooper, B., Patterson, J., and Kim, C.H. (2015). Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR-S6K pathway. *Mucosal Immunol.* *8*, 80–93.
- Parker, D., and Prince, A. (2011). Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *45*, 189–201.
- Pelaseyed, T., Bergström, J.H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M.H., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Nyström, E.E.L., et al. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.* *260*, 8–20.
- Peñaloza, H.F., Nieto, P.A., Muñoz-Durango, N., Salazar-Echegarai, F.J., Torres, J., Parga, M.J., Alvarez-Lobos, M., Riedel, C.A., Kalergis, A.M., and Bueno, S.M. (2015). Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Immunology* *146*, 100–112.
- Perrier, C., and Corthésy, B. (2011). Gut permeability and food allergies. *Clin. Exp. Allergy* *41*, 20–28.
- Perrone, L.A., Plowden, J.K., García-Sastre, A., Katz, J.M., and Tumpey, T.M. (2008). H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog.* *4*, e1000115.
- Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G.C., Gendler, S.J., Velcich, A., Lundberg, J.O., Roos, S., Holm, L., and Phillipson, M. (2011). Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *300*, G327–333.
- Petnicki-Ocwieja, T., Hrcir, T., Liu, Y.-J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., and Kobayashi, K.S. (2009). Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15813–15818.
- Phipps, J.C., Aronoff, D.M., Curtis, J.L., Goel, D., O'Brien, E., and Mancuso, P. (2010). Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* *78*, 1214–1220.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Näslund, T.I., Liljeström, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* *314*, 997–1001.
- Pinto, L.H., and Lamb, R.A. (2006). The M2 Proton Channels of Influenza A and B Viruses. *J. Biol. Chem.* *281*, 8997–9000.
- Pociask, D.A., Scheller, E.V., Mandalapu, S., McHugh, K.J., Enelow, R.I., Fattman, C.L., Kolls, J.K., and Alcorn, J.F. (2013). IL-22 Is Essential for Lung Epithelial Repair following Influenza Infection. *Am. J. Pathol.* *182*, 1286–1296.
- van der Poll, T., and Opal, S.M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet Lond. Engl.* *374*, 1543–1556.

Bibliographie

- Potter, C.W., and Jennings, R. (2011). A definition for influenza pandemics based on historical records. *J. Infect.* *63*, 252–259.
- Pragman, A.A., Kim, H.B., Reilly, C.S., Wendt, C., and Isaacson, R.E. (2012). The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. *PloS One* *7*, e47305.
- Prendergast, A.J., Klenerman, P., and Goulder, P.J.R. (2012). The impact of differential antiviral immunity in children and adults. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 636–648.
- Priyadarshini, M., Kotlo, K.U., Dudeja, P.K., and Layden, B.T. (2018). Role of Short Chain Fatty Acid Receptors in Intestinal Physiology and Pathophysiology. *Compr. Physiol.* *8*, 1091–1115.
- Purnama, C., Ng, S.L., Tetlak, P., Setiagani, Y.A., Kandasamy, M., Baalasubramanian, S., Karjalainen, K., and Ruedl, C. (2014). Transient ablation of alveolar macrophages leads to massive pathology of influenza infection without affecting cellular adaptive immunity. *Eur. J. Immunol.* *44*, 2003–2012.
- Qin, N., Zheng, B., Yao, J., Guo, L., Zuo, J., Wu, L., Zhou, J., Liu, L., Guo, J., Ni, S., et al. (2015). Influence of H7N9 virus infection and associated treatment on human gut microbiota. *Sci. Rep.* *5*, 14771.
- Rabes, A., Suttorp, N., and Opitz, B. (2016). Inflammasomes in Pneumococcal Infection: Innate Immune Sensing and Bacterial Evasion Strategies. In *Inflammasome Signaling and Bacterial Infections*, S. Backert, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 215–227.
- Ragsdale, S.W., and Pierce, E. (2008). Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim. Biophys. Acta* *1784*, 1873–1898.
- Rajilić-Stojanović, M., and de Vos, W.M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.* *38*, 996–1047.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* *118*, 229–241.
- Rapozo, D.C.M., Bernardazzi, C., and de Souza, H.S.P. (2017). Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. *World J. Gastroenterol.* *23*, 2124–2140.
- Raqib, R., Sarker, P., Bergman, P., Ara, G., Lindh, M., Sack, D.A., Nasirul Islam, K.M., Gudmundsson, G.H., Andersson, J., and Agerberth, B. (2006). Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 9178–9183.
- Ren, B., Szalai, A.J., Hollingshead, S.K., and Briles, D.E. (2004). Effects of PspA and Antibodies to PspA on Activation and Deposition of Complement on the Pneumococcal Surface. *Infect. Immun.* *72*, 114–122.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* *2*, 361–367.
- van Riel, D., Leijten, L.M.E., van der Eerden, M., Hoogsteden, H.C., Boven, L.A., Lambrecht, B.N., Osterhaus, A.D.M.E., and Kuiken, T. (2011). Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF- α induction. *PLoS Pathog.* *7*, e1002099.
- Robinson, K.M., Choi, S.M., McHugh, K.J., Mandalapu, S., Enelow, R.I., Kolls, J.K., and Alcorn, J.F. (2013). Influenza A exacerbates *Staphylococcus aureus* pneumonia by attenuating IL-1 β production in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 5153–5159.

Bibliographie

- Robinson, K.M., McHugh, K.J., Mandalapu, S., Clay, M.E., Lee, B., Scheller, E.V., Enelow, R.I., Chan, Y.R., Kolls, J.K., and Alcorn, J.F. (2014). Influenza A virus exacerbates *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice by attenuating antimicrobial peptide production. *J. Infect. Dis.* *209*, 865–875.
- Robinson, K.M., Lee, B., Scheller, E.V., Mandalapu, S., Enelow, R.I., Kolls, J.K., and Alcorn, J.F. (2015). The role of IL-27 in susceptibility to post-influenza *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Respir. Res.* *16*.
- Rodrigues, H.G., Takeo Sato, F., Curi, R., and Vinolo, M.A.R. (2016). Fatty acids as modulators of neutrophil recruitment, function and survival. *Eur. J. Pharmacol.* *785*, 50–58.
- Romagnani, S. (1999). Th1/Th2 Cells: *Inflamm. Bowel Dis.* *5*, 285–294.
- Rooks, M.G., and Garrett, W.S. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 341–352.
- Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G.F., and Kobilka, B.K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* *459*, 356–363.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Orqvist, A., and Masure, H.R. (1997). Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *25*, 819–829.
- van Rossum, A.M.C., Lysenko, E.S., and Weiser, J.N. (2005). Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infect. Immun.* *73*, 7718–7726.
- Roussos, A., Koursarakos, P., Patsopoulos, D., Gerogianni, I., and Philippou, N. (2003). Increased prevalence of irritable bowel syndrome in patients with bronchial asthma. *Respir. Med.* *97*, 75–79.
- Roy, A.-M.M., Parker, J.S., Parrish, C.R., and Whittaker, G.R. (2000). Early Stages of Influenza Virus Entry into Mv-1 Lung Cells: Involvement of Dynamin. *Virology* *267*, 17–28.
- Roy, C.C., Kien, C.L., Bouthillier, L., and Levy, E. (2006). Short-Chain Fatty Acids: Ready for Prime Time? *Nutr. Clin. Pract.* *21*, 351–366.
- Roy, M.G., Livraghi-Butrico, A., Fletcher, A.A., McElwee, M.M., Evans, S.E., Boerner, R.M., Alexander, S.N., Bellinghausen, L.K., Song, A.S., Petrova, Y.M., et al. (2014). Muc5b is required for airway defence. *Nature* *505*, 412–416.
- Russell, R.J., Kerry, P.S., Stevens, D.J., Steinhauer, D.A., Martin, S.R., Gamblin, S.J., and Skehel, J.J. (2008). Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 17736–17741.
- Russell, S.L., Gold, M.J., Reynolds, L.A., Willing, B.P., Dimitriu, P., Thorson, L., Redpath, S.A., Perona-Wright, G., Blanchet, M.-R., Mohn, W.W., et al. (2015). Perinatal antibiotic-induced shifts in gut microbiota have differential effects on inflammatory lung diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* *135*, 100–109.
- Russell, W.R., Gratz, S.W., Duncan, S.H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., Duncan, G., Johnstone, A.M., Lobley, G.E., Wallace, R.J., et al. (2011). High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am. J. Clin. Nutr.* *93*, 1062–1072.
- Russler-Germain, E.V., Rengarajan, S., and Hsieh, C.-S. (2017). Antigen-specific regulatory T-cell responses to intestinal microbiota. *Mucosal Immunol.* *10*, 1375–1386.

Bibliographie

- Rust, M.J., Lakadamyali, M., Zhang, F., and Zhuang, X. (2004). Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 567–573.
- Rutten, E.P.A., Lenaerts, K., Buurman, W.A., and Wouters, E.F.M. (2014). Disturbed intestinal integrity in patients with COPD: effects of activities of daily living. *Chest* *145*, 245–252.
- Rynda-Apple, A., Robinson, K.M., and Alcorn, J.F. (2015). Influenza and Bacterial Superinfection: Illuminating the Immunologic Mechanisms of Disease. *Infect. Immun.* *83*, 3764–3770.
- Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., et al. (2010). Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* *11*, 76–83.
- Sanders, C.J., Doherty, P.C., and Thomas, P.G. (2011). Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. *Cell Tissue Res.* *343*, 13–21.
- Sansonetti, P.J., and Di Santo, J.P. (2007). Debugging how bacteria manipulate the immune response. *Immunity* *26*, 149–161.
- Sarvestani, S.T., and McAuley, J.L. (2017). The role of the NLRP3 inflammasome in regulation of antiviral responses to influenza A virus infection. *Antiviral Res.* *148*, 32–42.
- Scanlon, K.L., Diven, W.F., and Glew, R.H. (1989). Purification and properties of *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase. *Enzyme* *41*, 143–150.
- Schaub, A., Fütterer, A., and Pfeffer, K. (2001). PUMA-G, an IFN-gamma-inducible gene in macrophages is a novel member of the seven transmembrane spanning receptor superfamily. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3714–3725.
- Schauber, J., Svanholm, C., Termén, S., Iffland, K., Menzel, T., Scheppach, W., Melcher, R., Agerberth, B., Lührs, H., and Gudmundsson, G.H. (2003). Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* *52*, 735–741.
- Schmeck, B., Huber, S., Moog, K., Zahlten, J., Hocke, A.C., Opitz, B., Hammerschmidt, S., Mitchell, T.J., Kracht, M., Rosseau, S., et al. (2006). Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappaB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *290*, L730–L737.
- Schuijt, T.J., Lankelma, J.M., Scicluna, B.P., de Sousa E Melo, F., Roelofs, J.J.T.H., de Boer, J.D., Hoogendijk, A.J., de Beer, R., de Vos, A., Belzer, C., et al. (2016). The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut* *65*, 575–583.
- Schulz, O., Diebold, S.S., Chen, M., Näslund, T.I., Nolte, M.A., Alexopoulou, L., Azuma, Y.-T., Flavell, R.A., Liljeström, P., and Reis e Sousa, C. (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* *433*, 887–892.
- Schwab, C., Berry, D., Rauch, I., Rennisch, I., Ramesmayer, J., Hainzl, E., Heider, S., Decker, T., Kenner, L., Müller, M., et al. (2014). Longitudinal study of murine microbiota activity and interactions with the host during acute inflammation and recovery. *ISME J.* *8*, 1101–1114.
- Scott, K.P., Martin, J.C., Campbell, G., Mayer, C.-D., and Flint, H.J. (2006). Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium “*Roseburia inulinivorans*.” *J. Bacteriol.* *188*, 4340–4349.

Bibliographie

- Seibert, C.W., Rahmat, S., Krause, J.C., Eggink, D., Albrecht, R.A., Goff, P.H., Krammer, F., Duty, J.A., Bouvier, N.M., García-Sastre, A., et al. (2013). Recombinant IgA is sufficient to prevent influenza virus transmission in guinea pigs. *J. Virol.* *87*, 7793–7804.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., and Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* *90*, 859–904.
- Seljeset, S., and Siehler, S. (2012). Receptor-specific regulation of ERK1/2 activation by members of the “free fatty acid receptor” family. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* *32*, 196–201.
- Seo, S.-U., Kwon, H.-J., Song, J.-H., Byun, Y.-H., Seong, B.L., Kawai, T., Akira, S., and Kweon, M.-N. (2010). MyD88 Signaling Is Indispensable for Primary Influenza A Virus Infection but Dispensable for Secondary Infection. *J. Virol.* *84*, 12713–12722.
- Shahangian, A., Chow, E.K., Tian, X., Kang, J.R., Ghaffari, A., Liu, S.Y., Belperio, J.A., Cheng, G., and Deng, J.C. (2009). Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 1910–1920.
- Shak, J.R., Ludewick, H.P., Howery, K.E., Sakai, F., Yi, H., Harvey, R.M., Paton, J.C., Klugman, K.P., and Vidal, J.E. (2013). Novel Role for the *Streptococcus pneumoniae* Toxin Pneumolysin in the Assembly of Biofilms. *MBio* *4*.
- Shao, W., Li, X., Goraya, M.U., Wang, S., and Chen, J.-L. (2017). Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Shaper, M., Hollingshead, S.K., Benjamin, W.H., and Briles, D.E. (2004). PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infect. Immun.* *72*, 5031–5040.
- Shapiro, H., Thaiss, C.A., Levy, M., and Elinav, E. (2014). The cross talk between microbiota and the immune system: metabolites take center stage. *Curr. Opin. Immunol.* *30*, 54–62.
- Shibata, T., Kanayama, M., Haida, M., Fujimoto, S., Oroguchi, T., Sata, K., Mita, N., Kutsuzawa, T., Ikeuchi, M., Kondo, M., et al. (2016). *Lactococcus lactis* JCM5805 activates anti-viral immunity and reduces symptoms of common cold and influenza in healthy adults in a randomized controlled trial.
- Shieh, W.-J., Blau, D.M., Denison, A.M., DeLeon-Carnes, M., Adem, P., Bhatnagar, J., Sumner, J., Liu, L., Patel, M., Batten, B., et al. (2010). 2009 Pandemic Influenza A (H1N1). *Am. J. Pathol.* *177*, 166–175.
- Shockman, G.D., Daneo-Moore, L., Kariyama, R., and Massidda, O. (1996). Bacterial Walls, Peptidoglycan Hydrolases, Autolysins, and Autolysis. *Microb. Drug Resist.* *2*, 95–98.
- Short, K.R., Kroeze, E.J.B.V., Fouchier, R.A.M., and Kuiken, T. (2014). Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *Lancet Infect. Dis.* *14*, 57–69.
- Short, K.R., Kasper, J., van der Aa, S., Andeweg, A.C., Zaaraoui-Boutahar, F., Goeijenbier, M., Richard, M., Herold, S., Becker, C., Scott, D.P., et al. (2016). Influenza virus damages the alveolar barrier by disrupting epithelial cell tight junctions. *Eur. Respir. J.* *47*, 954–966.
- Short, K.R., Kedzierska, K., and van de Sandt, C.E. (2018). Back to the Future: Lessons Learned From the 1918 Influenza Pandemic. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *8*.
- Shreiner, A.B., Kao, J.Y., and Young, V.B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *31*, 69–75.

Bibliographie

- Shrestha, S., Foxman, B., Weinberger, D.M., Steiner, C., Viboud, C., and Rohani, P. (2013). Identifying the Interaction Between Influenza and Pneumococcal Pneumonia Using Incidence Data. *Sci. Transl. Med.* *5*, 191ra84-191ra84.
- Shulman, M.J., Collins, C., Pennell, N., and Hozumi, N. (1987). Complement activation by IgM: evidence for the importance of the third constant domain of the mu heavy chain. *Eur. J. Immunol.* *17*, 549–554.
- Sieczkarski, S.B., and Whittaker, G.R. (2002). Influenza Virus Can Enter and Infect Cells in the Absence of Clathrin-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* *76*, 10455–10464.
- Silverman, R.H. (2007). Viral Encounters with 2',5'-Oligoadenylate Synthetase and RNase L during the Interferon Antiviral Response. *J. Virol.* *81*, 12720–12729.
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Manicassamy, S., Munn, D.H., et al. (2014a). Activation of the receptor (Gpr109a) for niacin and the commensal metabolite butyrate suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* *40*, 128–139.
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Manicassamy, S., Munn, D.H., et al. (2014b). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* *40*, 128–139.
- Sivaprakasam, S., Gurav, A., Paschall, A.V., Coe, G.L., Chaudhary, K., Cai, Y., Kolhe, R., Martin, P., Browning, D., Huang, L., et al. (2016). An essential role of Ffar2 (Gpr43) in dietary fibre-mediated promotion of healthy composition of gut microbiota and suppression of intestinal carcinogenesis. *Oncogenesis* *5*, e238.
- Sleeman, K.L., Griffiths, D., Shackley, F., Diggle, L., Gupta, S., Maiden, M.C., Moxon, E.R., Crook, D.W., and Peto, T.E.A. (2006). Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. *J. Infect. Dis.* *194*, 682–688.
- van der Sluijs, K.F., van Elden, L.J.R., Nijhuis, M., Schuurman, R., Pater, J.M., Florquin, S., Goldman, M., Jansen, H.M., Lutter, R., and van der Poll, T. (2004). IL-10 Is an Important Mediator of the Enhanced Susceptibility to Pneumococcal Pneumonia after Influenza Infection. *J. Immunol.* *172*, 7603–7609.
- van der Sluijs, K.F., van Elden, L.J.R., Nijhuis, M., Schuurman, R., Florquin, S., Shimizu, T., Ishii, S., Jansen, H.M., Lutter, R., and van der Poll, T. (2006). Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against *Streptococcus pneumoniae* during postinfluenza pneumonia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *290*, L194-199.
- Smith, A.M., and McCullers, J.A. (2014). Secondary bacterial infections in influenza virus infection pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *385*, 327–356.
- Smith, K., McCoy, K.D., and Macpherson, A.J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* *19*, 59–69.
- Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J.N., and Garrett, W.S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* *341*, 569–573.
- Solís, G., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Fernández, N., Margolles, A., and Gueimonde, M. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* *16*, 307–310.
- Sorbara, M.T., and Philpott, D.J. (2011). Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. *Immunol. Rev.* *243*, 40–60.

Bibliographie

- Sørensen, U.B., Henrichsen, J., Chen, H.C., and Szu, S.C. (1990). Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. *Microb. Pathog.* 8, 325–334.
- Sörman, A., Zhang, L., Ding, Z., and Heyman, B. (2014). How antibodies use complement to regulate antibody responses. *Mol. Immunol.* 61, 79–88.
- Spellerberg, B., Rosenow, C., Sha, W., and Tuomanen, E.I. (1996). Pneumococcal cell wall activates NF- κ B in human monocytes: aspects distinct from endotoxin. *Microb. Pathog.* 20, 309–317.
- Speshock, J.L., Doyon-Reale, N., Rabah, R., Neely, M.N., and Roberts, P.C. (2007). Filamentous influenza A virus infection predisposes mice to fatal septicemia following superinfection with *Streptococcus pneumoniae* serotype 3. *Infect. Immun.* 75, 3102–3111.
- Srivastava, A., Henneke, P., Visintin, A., Morse, S.C., Martin, V., Watkins, C., Paton, J.C., Wessels, M.R., Golenbock, D.T., and Malley, R. (2005). The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect. Immun.* 73, 6479–6487.
- Stacheli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J., and Weissmann, C. (1986). Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* 44, 147–158.
- Stauffer, S., Feng, Y., Nebioglu, F., Heilig, R., Picotti, P., and Helenius, A. (2014). Stepwise priming by acidic pH and a high K⁺ concentration is required for efficient uncoating of influenza A virus cores after penetration. *J. Virol.* 88, 13029–13046.
- Steed, A.L., Christophi, G.P., Kaiko, G.E., Sun, L., Goodwin, V.M., Jain, U., Esaulova, E., Artyomov, M.N., Morales, D.J., Holtzman, M.J., et al. (2017). The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon. *Science* 357, 498–502.
- Steel, J., and Lowen, A.C. (2014). Influenza A virus reassortment. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 385, 377–401.
- Steel, H.C., Cockeran, R., Anderson, R., and Feldman, C. (2013). Overview of Community-Acquired Pneumonia and the Role of Inflammatory Mechanisms in the Immunopathogenesis of Severe Pneumococcal Disease. *Mediators Inflamm.* 2013, 1–18.
- Stein-Streilein, J., Bennett, M., Mann, D., and Kumar, V. (1983). Natural killer cells in mouse lung: surface phenotype, target preference, and response to local influenza virus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 131, 2699–2704.
- Sugimura, T., Takahashi, H., Jounai, K., Ohshio, K., Kanayama, M., Tazumi, K., Tanihata, Y., Miura, Y., Fujiwara, D., and Yamamoto, N. (2015). Effects of oral intake of plasmacytoid dendritic cells-stimulative lactic acid bacterial strain on pathogenesis of influenza-like illness and immunological response to influenza virus. *Br. J. Nutr.* 114, 727–733.
- Sun, K., and Metzger, D.W. (2008). Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection. *Nat. Med.* 14, 558–564.
- Sun, K., and Metzger, D.W. (2014). Influenza Infection Suppresses NADPH Oxidase-Dependent Phagocytic Bacterial Clearance and Enhances Susceptibility to Secondary Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *J. Immunol.* 192, 3301–3307.

Bibliographie

- Sun, J., Madan, R., Karp, C.L., and Braciale, T.J. (2009). Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat. Med.* *15*, 277–284.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* *339*, 786–791.
- Sun, S., Zhao, G., Xiao, W., Hu, J., Guo, Y., Yu, H., Wu, X., Tan, Y., and Zhou, Y. (2011). Age-related sensitivity and pathological differences in infections by 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Virol. J.* *8*, 52.
- Suzuki, T., Yoshida, S., and Hara, H. (2008). Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. *Br. J. Nutr.* *100*, 297–305.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., and Herber, A. (2009). Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* *60 Suppl 6*, 61–71.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* *100*, 655–669.
- Tan, S., and Tatsumura, Y. (2015). Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med. J.* *56*, 366–367.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A.N., Mackay, C.R., and Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv. Immunol.* *121*, 91–119.
- Tan, J., McKenzie, C., Vuillermin, P.J., Gerverse, G., Vinuesa, C.G., Mebius, R.E., Macia, L., and Mackay, C.R. (2016). Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. *Cell Rep.* *15*, 2809–2824.
- Tang, Y., Chen, Y., Jiang, H., Robbins, G.T., and Nie, D. (2011). G-protein-coupled receptor for short-chain fatty acids suppresses colon cancer. *Int. J. Cancer* *128*, 847–856.
- Tate, M.D., Brooks, A.G., and Reading, P.C. (2008). The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice. *Respir. Res.* *9*, 57.
- Tate, M.D., Pickett, D.L., van Rooijen, N., Brooks, A.G., and Reading, P.C. (2010). Critical Role of Airway Macrophages in Modulating Disease Severity during Influenza Virus Infection of Mice. *J. Virol.* *84*, 7569–7580.
- Taubenberger, J.K., and Morens, D.M. (2006). 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* *12*, 15–22.
- Taut, K., Winter, C., Briles, D.E., Paton, J.C., Christman, J.W., Maus, R., Baumann, R., Welte, T., and Maus, U.A. (2008). Macrophage Turnover Kinetics in the Lungs of Mice Infected with *Streptococcus pneumoniae*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *38*, 105–113.
- Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S.-I., and Kuwahara, A. (2008). Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* *59 Suppl 2*, 251–262.
- Thaiss, C.A., Zmora, N., Levy, M., and Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature* *535*, 65–74.
- Thomas, P.G., Dash, P., Aldridge, J.R., Ellebedy, A.H., Reynolds, C., Funk, A.J., Martin, W.J., Lamkanfi, M., Webby, R.J., Boyd, K.L., et al. (2009). The Intracellular Sensor NLRP3 Mediates Key Innate and Healing Responses to Influenza A Virus via the Regulation of Caspase-1. *Immunity* *30*, 566–575.

Bibliographie

- Thorburn, A.N., McKenzie, C.I., Shen, S., Stanley, D., Macia, L., Mason, L.J., Roberts, L.K., Wong, C.H.Y., Shim, R., Robert, R., et al. (2015). Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat. Commun.* *6*, 7320.
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y.S., Parker, H.E., Habib, A.M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* *61*, 364–371.
- Tomasz, A. (1974). THE ROLE OF AUTOLYSINS IN CELL DEATH. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *235*, 439–447.
- Tomasz, A., and Saukkonen, K. (1989). The nature of cell wall-derived inflammatory components of pneumococci: *Pediatr. Infect. Dis. J.* *8*, 902.
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., et al. (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* *9*, e1003657.
- Topping, D.L., and Clifton, P.M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* *81*, 1031–1064.
- Trompette, A., Gollwitzer, E.S., Yadava, K., Sichelstiel, A.K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Jung, T., Nicod, L.P., Harris, N.L., et al. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.* *20*, 159–166.
- Trompette, A., Gollwitzer, E.S., Pattaroni, C., Lopez-Mejia, I.C., Riva, E., Pernot, J., Ubags, N., Fajas, L., Nicod, L.P., and Marsland, B.J. (2018). Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c-Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8+ T Cell Metabolism. *Immunity* *48*, 992-1005.e8.
- Trottein, F., and Paget, C. (2019). Mechanisms of bacterial superinfection post-influenza: a role for unconventional T cells. *Front. Immunol.* *10*.
- Trotter, Y., Dunn, F.L., Drachman, R.H., Henderson, D.A., Pizzi, M., and Langmuir, A.D. (1959). Asian influenza in the United States, 1957-1958. *Am. J. Hyg.* *70*, 34–50.
- Tu, A.H., Fulgham, R.L., McCrory, M.A., Briles, D.E., and Szalai, A.J. (1999). Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* *67*, 4720–4724.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., and Gordon, J.I. (2007). The human microbiome project. *Nature* *449*, 804–810.
- Ulven, T. (2012). Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. *Front. Endocrinol.* *3*, 111.
- Usami, M., Kishimoto, K., Ohata, A., Miyoshi, M., Aoyama, M., Fueda, Y., and Kotani, J. (2008). Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutr. Res. N. Y.* *N 28*, 321–328.
- Vael, C., Nelen, V., Verhulst, S.L., Goossens, H., and Desager, K.N. (2008). Early intestinal *Bacteroides fragilis* colonisation and development of asthma. *BMC Pulm. Med.* *8*, 19.
- Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E.K., and Hooper, L.V. (2011). The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* *334*, 255–258.

Bibliographie

- Vergara-Alert, J., Busquets, N., Ballester, M., Chaves, A.J., Rivas, R., Dolz, R., Wang, Z., Pleschka, S., Majó, N., Rodríguez, F., et al. (2014). The NS segment of H5N1 avian influenza viruses (AIV) enhances the virulence of an H7N1 AIV in chickens. *Vet. Res.* *45*, 7.
- Vinolo, M.A.R., Rodrigues, H.G., Hatanaka, E., Hebeda, C.B., Farsky, S.H.P., and Curi, R. (2009). Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *117*, 331–338.
- Vinolo, M.A.R., Ferguson, G.J., Kulkarni, S., Damoulakis, G., Anderson, K., Bohlooly-Y, M., Stephens, L., Hawkins, P.T., and Curi, R. (2011). SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS One* *6*, e21205.
- Voltolini, C., Battersby, S., Etherington, S.L., Petraglia, F., Norman, J.E., and Jabbour, H.N. (2012). A novel antiinflammatory role for the short-chain fatty acids in human labor. *Endocrinology* *153*, 395–403.
- de Vries, E., Tscherne, D.M., Wienholts, M.J., Cobos-Jiménez, V., Scholte, F., García-Sastre, A., Rottier, P.J.M., and de Haan, C.A.M. (2011). Dissection of the Influenza A Virus Endocytic Routes Reveals Macropinocytosis as an Alternative Entry Pathway. *PLoS Pathog.* *7*, e1001329.
- Wall, R., Ross, R.P., Shanahan, F., O'Mahony, L., O'Mahony, C., Coakley, M., Hart, O., Lawlor, P., Quigley, E.M., Kiely, B., et al. (2009). Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *Am. J. Clin. Nutr.* *89*, 1393–1401.
- Wang, H., Coligan, J.E., and Morse, H.C. (2016). Emerging Functions of Natural IgM and Its Fc Receptor FCMR in Immune Homeostasis. *Front. Immunol.* *7*, 99.
- Wang, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L., and Liu, Y.-C. (2012). Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Dig. Dis. Sci.* *57*, 3126–3135.
- Wang, J., Li, F., Wei, H., Lian, Z.-X., Sun, R., and Tian, Z. (2014a). Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation. *J. Exp. Med.* *211*, 2397–2410.
- Wang, L., Llorente, C., Hartmann, P., Yang, A.-M., Chen, P., and Schnabl, B. (2015). Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *J. Immunol. Methods* *421*, 44–53.
- Wang, Y., Dai, A., Huang, S., Kuo, S., Shu, M., Tapia, C.P., Yu, J., Two, A., Zhang, H., Gallo, R.L., et al. (2014b). Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *Benef. Microbes* *5*, 161–168.
- Wartha, F., Beiter, K., Albiger, B., Fernebro, J., Zychlinsky, A., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2007). Capsule and d-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell. Microbiol.* *9*, 1162–1171.
- Weber, J.R., Freyer, D., Alexander, C., Schröder, N.W.J., Reiss, A., Küster, C., Pfeil, D., Tuomanen, E.I., and Schumann, R.R. (2003). Recognition of Pneumococcal Peptidoglycan: An Expanded, Pivotal Role for LPS Binding Protein. *Immunity* *19*, 269–279.
- Weber, S.E., Tian, H., and Pirofski, L. (2011). CD8⁺ Cells Enhance Resistance to Pulmonary Serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *186*, 432–442.
- Webster, R.G., and Laver, W.G. (1967). Preparation and properties of antibody directed specifically against the neuraminidase of influenza virus. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *99*, 49–55.

Bibliographie

- Weis, W., Brown, J.H., Cusack, S., Paulson, J.C., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1988). Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* *333*, 426–431.
- Whitsett, J.A., and Alenghat, T. (2015). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat. Immunol.* *16*, 27–35.
- Willemsen, L.E.M., Koetsier, M.A., van Deventer, S.J.H., and van Tol, E. a. F. (2003). Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. *Gut* *52*, 1442–1447.
- Willner, D., Haynes, M.R., Furlan, M., Schmieder, R., Lim, Y.W., Rainey, P.B., Rohwer, F., and Conrad, D. (2012). Spatial distribution of microbial communities in the cystic fibrosis lung. *ISME J.* *6*, 471–474.
- Wilson, I.A., and Cox, N.J. (1990). Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu. Rev. Immunol.* *8*, 737–771.
- Wisskirchen, C., Ludersdorfer, T.H., Müller, D.A., Moritz, E., and Pavlovic, J. (2011). The cellular RNA helicase UAP56 is required for prevention of double-stranded RNA formation during influenza A virus infection. *J. Virol.* *85*, 8646–8655.
- Wong, J.M.W., de Souza, R., Kendall, C.W.C., Emam, A., and Jenkins, D.J.A. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* *40*, 235–243.
- Worobey, M., Han, G.-Z., and Rambaut, A. (2014). A synchronized global sweep of the internal genes of modern avian influenza virus. *Nature* *508*, 254–257.
- Wright, A.E., Douglas, S.R., and Sanderson, J.B. (1989). An experimental investigation of the rôle of the blood fluids in connection with phagocytosis. 1903. *Rev. Infect. Dis.* *11*, 827–834.
- Wu, W., Sun, M., Chen, F., Cao, A.T., Liu, H., Zhao, Y., Huang, X., Xiao, Y., Yao, S., Zhao, Q., et al. (2017). Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43. *Mucosal Immunol.* *10*, 946–956.
- Wunderink, R.G., and Waterer, G.W. (2014). Community-Acquired Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* *370*, 543–551.
- Xu, Z., and Knight, R. (2015). Dietary effects on human gut microbiome diversity. *Br. J. Nutr.* *113 Suppl*, S1-5.
- Yasui, H., Kiyoshima, J., Hori, T., and Shida, K. (1999). Protection against influenza virus infection of mice fed *Bifidobacterium breve* YIT4064. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *6*, 186–192.
- Yazar, A., Atis, S., Konca, K., Pata, C., Akbay, E., Calikoglu, M., and Hafta, A. (2001). Respiratory symptoms and pulmonary functional changes in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* *96*, 1511–1516.
- Yildiz, S., Mazel-Sanchez, B., Kandasamy, M., Manicassamy, B., and Schmolke, M. (2018). Influenza A virus infection impacts systemic microbiota dynamics and causes quantitative enteric dysbiosis. *Microbiome* *6*, 9.
- Yitbarek, A., Weese, J.S., Alkie, T.N., Parkinson, J., and Sharif, S. (2018). Influenza A virus subtype H9N2 infection disrupts the composition of intestinal microbiota of chickens. *FEMS Microbiol. Ecol.* *94*.
- Yoon, S.-W., Webby, R.J., and Webster, R.G. (2014). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *385*, 359–375.

Bibliographie

York, A., and Fodor, E. (2013). Biogenesis, assembly, and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell. *RNA Biol.* *10*, 1274–1282.

Zambon, M.C. (2001). The pathogenesis of influenza in humans. *Rev. Med. Virol.* *11*, 227–241.

Zhang, Z., Clarke, T.B., and Weiser, J.N. (2009). Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *J. Clin. Invest.*

Zhou, G., Juang, S.W.W., and Kane, K.P. (2013). NK cells exacerbate the pathology of influenza virus infection in mice. *Eur. J. Immunol.* *43*, 929–938.

Zysk, G., Bejo, L., Schneider-Wald, B.K., Nau, R., and Heinz, H. (2000). Induction of necrosis and apoptosis of neutrophil granulocytes by *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Exp. Immunol.* *122*, 61–66.

ANNEXES

Annexe I – Publications, brevets et communications scientifiques

Publications :

Barthelemy, A., **Sencio, V.**, Soulard, D., Deruyter, L., Faveeuw, C., Le Goffic, R., and Trottein, F. (2018). Interleukin-22 Immunotherapy during Severe Influenza Enhances Lung Tissue Integrity and Reduces Secondary Bacterial Systemic Invasion. **Infect. Immun.** 86.

Beshara, R., **Sencio, V.**, Soulard, D., Barthélémy, A., Fontaine, J., Pinteau, T., Deruyter, L., Ismail, M.B., Paget, C., Sirard, J.-C., et al. (2018). Alteration of Flt3-Ligand-dependent de novo generation of conventional dendritic cells during influenza infection contributes to respiratory bacterial superinfection. **PLoS Pathog.** 14, e1007360.

Georgel, A.-F., Cayet, D., Pizzorno, A., Rosa-Calatrava, M., Paget, C., **Sencio, V.**, Dubuisson, J., Trottein, F., Sirard, J.-C., and Carnoy, C. (2019). Toll-like receptor 5 agonist flagellin reduces influenza A virus replication independently of type I interferon and interleukin 22 and improves antiviral efficacy of oseltamivir. **Antiviral Research** 168, 28–35.

von Gerichten, J., Lamprecht, D., Opálka, L., Soulard, D., Marsching, C., Pilz, R., **Sencio, V.**, Herzer, S., Galy, B., Nordström, V., et al. (2019). Bacterial immunogenic α -galactosylceramide identified in the murine large intestine: dependency on diet and inflammation. **J. Lipid Res.** 60, 1892–1904.

Brevets :

Patent PCT/EP2018/18305095.4 (31 Jan 2018) “Use of short chain fatty acids for the treatment of bacterial superinfections post-influenza”.

Inventors: Barthelemy B, **Sencio V**, Teixeira M, Trottein F, Vieira, A.

Patent PCT/EP19188615.9. (26 July 2019) “Use of free fatty acid receptor 2 (FFAR 2) agonists for the treatment of bacterial superinfections post-influenza”.

Inventors: **Sencio V**, Trond Ulven, Trottein F.

Communications orales :

Séminaire hebdomadaire – Centre d’infection et d’immunité de Lille (18 octobre 2019) - Sujet : Effect of the gut microbiota in post-influenza bacterial superinfections

Symposium - Structure for Infectious, Inflammatory and Immune diseases (SF3i) (30 mars 2017) - Sujet : Rôle du microbiote intestinal dans les surinfections bactériennes post-grippales

Communications par posters :

Congrès Targeting Microbiota - Porto (28-30 octobre 2018) - Sujet : Influenza-associated gut dysbiosis promotes pulmonary bacterial superinfection through altered short-chain fatty acid production

18^{ème} Journée André Verbert – Colloque annuel des Doctorants de Lille (Septembre 2018) – Sujet : Influenza-associated gut dysbiosis promotes pulmonary bacterial superinfection through altered short-chain fatty acid production

Résumé :

Introduction: Le virus influenza A (IAV) est responsable d'épidémies de gripes chaque année, et de pandémies tous les 10 à 15 ans. Des infections bactériennes graves (infections à pneumocoques) peuvent survenir suite à l'infection grippale et contribuent à la morbidité et à la mortalité excessive de la grippe. L'infection par IAV réduit l'immunité antibactérienne, favorisant le développement local des bactéries et leur dissémination. Il a été démontré que le microbiote intestinal a un impact sur les réponses immunitaires de l'hôte. La déplétion (traitement antibiotique) ou l'absence (souris sans germe) de microbiote augmente la susceptibilité aux infections par IAV et *Streptococcus pneumoniae*. Nous avons émis l'hypothèse que la perturbation de la composition et de la fonction du microbiote intestinal au cours de l'infection par IAV pourrait influencer les surinfections bactériennes pulmonaires.

Résultats: Une analyse métagénomique réalisée au cours de l'infection grippale montre une altération transitoire du microbiote intestinal et une perturbation de son activité de fermentation (acides gras à chaîne courte, AGCC). Des expériences de transfert de flore fécale ont montré que les souris reconstituées avec un microbiote altéré (souris grippées) sont plus sensibles à l'infection bactérienne par rapport aux souris reconstituées avec un microbiote sain. La restauration du défaut de production des AGCC (par apport exogène) chez les souris colonisées et au cours de l'infection grippale réduit la susceptibilité aux (sur)infections bactériennes. C'est principalement l'acétate, AGCC majoritaire dans l'intestin et le sang, qui entraîne ces effets bénéfiques sur le contrôle de la charge bactérienne en condition de surinfection. Suite au traitement, les macrophages alvéolaires présentent une capacité plus importante à tuer les bactéries permettant de diminuer la charge bactérienne dans le poumon et diminuer le risque de mortalité au cours de la surinfection. La déplétion d'un des récepteurs de l'acétate, le récepteur couplé à la protéine G 43 (GPR43), inhibe son effet bénéfique. L'utilisation d'agonistes du récepteur GPR43 (mimant l'effet des AGCC) au cours de l'infection grippale réduit également la susceptibilité aux surinfections bactériennes.

Conclusion: Ces résultats constituent une avancée majeure dans la lutte contre les surinfections bactériennes et laissent entrevoir des applications thérapeutiques. Notamment par le biais de traitement riche en fibres (source indirect d'AGCC) ou à base de probiotiques producteurs d'AGCC

Abstract

Introduction: Influenza A virus (IAV) is responsible for epidemics and, every 10-15 years, for pandemics. Secondary bacterial infections (pneumococcus) can develop in the aftermath of influenza and strongly contribute to excessive mortality of influenza. IAV infection leads to dysfunctional pulmonary defense and to altered barrier functions, thus favoring the local bacterial outgrowth and dissemination (bacteremia). The gut microbiota has a critical role in immune responses. For instance, the depletion of the microbiota by antibiotics or its absence (germ-free animals) leads to enhanced susceptibility to respiratory infections including *Streptococcus pneumoniae*. We hypothesized that IAV infection may alter the functionality of the gut microbiota to favor secondary bacterial infections.

Results: Metagenomic analyses demonstrated a transient alteration of the composition of the gut microbiota during IAV infection and an alteration of its fermentative activity (short chain fatty acids, SCFAs). Fecal transfer experiments revealed that the dysbiotic microbiota (collected from IAV-infected mice) can transfer enhanced susceptibility to bacterial infections in recipient mice. Restoration of SCFAs (exogenous delivery) during IAV infection reduced the incidence of bacterial superinfection. It is mainly the acetate, the main SCFA in the intestine and the blood, which causes these beneficial effects on the control of the bacterial load during superinfection. Following treatment, alveolar macrophages have a greater killing activity that lower the bacterial load in the lung and reduce the risk of mortality during superinfection. Depletion of one of the acetate receptors, GPR43, inhibits its beneficial effect. The use of agonists more specific to GPR43 (mimicking the effect of SCFAs) during influenza infection also reduces the susceptibility to bacterial superinfections.

Conclusion: Collectively, these findings provide a novel mechanistic scenario for post-influenza bacterial superinfection and might have therapeutic applications in diseases associated with dysbiosis and secondary bacterial infections.