



HAL
open science

Apport de la microscopie 2-photon pour l'exploration des conséquences pulmonaires après infection d'un modèle murin par Influenzavirus

Frédéric Rivière

► **To cite this version:**

Frédéric Rivière. Apport de la microscopie 2-photon pour l'exploration des conséquences pulmonaires après infection d'un modèle murin par Influenzavirus. Virologie. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ020 . tel-03697254

HAL Id: tel-03697254

<https://theses.hal.science/tel-03697254v1>

Submitted on 16 Jun 2022

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.

Apport de la microscopie 2-photon pour
l'exploration des conséquences pulmonaires
après infection d'un modèle murin
par *Influenzavirus*

Contribution of 2-photon microscopy for exploration of lung involvement
after murine model infection with *Influenzavirus*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569 : Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Immunologie
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Unité Interactions Hôte-agents pathogènes**
- **Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA)**, sous la direction de
Jean Nicolas TOURNIER, professeur, le co-encadrement d'**Emmanuelle BILLON-DENIS**,
chargée de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 10 mai 2022, par
Frédéric RIVIERE

Composition du Jury

Christian POÛS Professeur - Université Paris-Saclay	Président
Anne BERGERON-LAFAURIE PU-PH - Hôpitaux Universitaires (Genève)	Rapporteuse & Examinatrice
Alexandre BOISSONNAS Directeur de recherche – CIMI (Paris)	Rapporteur & Examineur
Catherine CHAPON Maître de conférence – CEA (Fontenay aux Roses)	Examinatrice
Daniel FIOLE Ingénieur – ESRF (Grenoble)	Examineur
Nolwenn JOUVENET Directeur de recherche – Institut Pasteur (Paris)	Examinatrice
Jean Nicolas TOURNIER Professeur – IRBA (Bretigny sur Orge)	Directeur de thèse

Titre : Apport de la microscopie 2-photon pour l'exploration des conséquences pulmonaires après infection d'un modèle murin par *Influenzavirus*

Mots clés : *Influenzavirus*, microscopie 2-photon, imagerie intravitale

Introduction. La grippe, responsable de pandémies mortelles, est aussi associée à une mortalité significative chaque hiver malgré un vaccin et des traitements antiviraux. L'inflammation peut être une cible thérapeutique nécessitant de bien en comprendre les mécanismes immuns. Les études évaluant la réaction immunitaire innée induite par *Influenzavirus* sont basées sur des méthodes quantitatives ou fonctionnelles. Les explorations anatomiques sont le plus souvent absentes ou n'intégrant qu'une vision globale sur coupes histologiques. La problématique de cette thèse a été d'étudier l'apport de la microscopie 2-photon (M2P) pour l'évaluation des conséquences pulmonaires après infection à *Influenzavirus* d'un modèle murin selon plusieurs modalités : sur poumon fixé, *ex vivo* et en comparant différentes souches virales.

Méthodes. Pour l'analyse sur poumon fixé, nous avons infecté par A/Puerto Rico/8/34 H1N1 (PR8) des souris C57BL6 transgéniques CD11C^{+YFP} comparativement à des souris non infectées. Différentes analyses étaient effectuées : cytométrie en flux, dosages des cytokines, et observation en M2P après marquage par Ac anti F4/80 couplé au fluorochrome BV421.

La méthode du « Live Lung Slice » a été modifiée sans agarose pour la microscopie intravitale *ex vivo* pour analyser sa faisabilité, la préservation de la viabilité cellulaire et l'évaluation de la mobilité cellulaire.

Afin d'explorer plusieurs souches virales d'*Influenzavirus*, nous avons infecté le même modèle animal avec la souche A/WSN/1933 H1N1 (WSN) et appliqué les mêmes techniques. Pour comparer différents virus, nous avons exploré selon les mêmes modalités des poumons de hamsters infectés par *SARS-Cov2*. Les données ont été comparées à celles obtenues avec PR8.

Résultats. Sur poumon fixé, M2P apporte des données complémentaires à la cytométrie en flux et au dosage des cytokines, par l'observation de lésions épithéliales bronchiques, de l'évolution de la localisation de l'infection. L'ajout du marquage F4/80 couplé au fluorochrome BV421 permet de visualiser le recrutement et la diffusion pulmonaire des macrophages. De plus, les interactions entre macrophages et cellules infectées sont observées par les reconstructions 3D permises par l'imagerie du poumon en profondeur.

M2P intravitale *ex vivo* sans agarose démontre sa faisabilité et la préservation de la viabilité cellulaire mettant en évidence une mobilité accrue des macrophages significativement supérieures aux cellules dendritiques.

L'infection par WSN induit les mêmes résultats que PR8. Par contre, après infection par *SARS-Cov2*, aucune lésion de l'épithélium bronchique n'est observée, le virus se localise exclusivement au niveau de l'épithélium alvéolaire et le recrutement macrophagique est localisé au site infecté alternant avec des zones de poumon sain, à la différence de la grippe durant laquelle on observe une homogénéité pulmonaire de l'infiltration macrophagique.

Conclusion.

M2P est bien supérieure à l'histologie conventionnelle et complémentaire aux explorations habituelles en apportant des données anatomiques lésionnelles, virologiques et recrutements cellulaires indispensables à la bonne compréhension des conséquences pulmonaires induites par *Influenzavirus*.

La préservation de la viabilité cellulaire confirme la faisabilité de la méthode *ex vivo* de notre protocole de « Live Lung Slice » adapté. L'amplification de la mobilité des cellules dendritiques et des macrophages leur procure une disponibilité accrue pour optimiser leurs interactions avec les cellules infectées.

M2P est également un excellent outil pour la comparaison des conséquences pulmonaires après infection par différentes souches virales.

Au total, M2P semble indispensable par l'exploration anatomique des conséquences structurales et de la réaction immunitaire innée après infection par *Influenzavirus*. Les perspectives de son application semblent immenses : études des co-infections, des surinfections, de l'impact de stratégie thérapeutique.

Title : Contribution of 2-photon microscopy for exploration of lung involvement after murine model infection with *Influenzavirus*

Keywords : *Influenzavirus*, 2-photon microscopy, intravitral imaging

Introduction. Influenza virus, responsible for deadly pandemics, was associated each winter with significant mortality despite vaccine and antiviral treatments. Inflammation seems to be therapeutic target requiring good understanding of its post-infection immune mechanisms. Studies evaluating innate immune reaction induced by *Influenzavirus* are based on quantitative or functional methods. The anatomical explorations have most often been absent or only integrating global vision on histological sections. In this context, the goal of this thesis was to study contribution of 2-photon microscopy (2PM) for the evaluation of pulmonary consequences after *Influenzavirus* infection of mice model according to several modalities: fixed lung, *ex vivo* and comparison of different viral strains.

Methods. We infected C57BL6 transgenic CD11C^{+YFP} mice with A/Puerto Rico/8/34 H1N1 (PR8) for analysis on fixed lung compared to mock-infected mice. Several analyzes were performed: flow cytometry, cytokines concentration assays, and 2PM observation after staining with anti F4/80 antibody coupled with BV421.

The adapted "Live Lung Slice" method without agarose has been chosen for *ex vivo* intravitral microscopy to analyze its feasibility, the preservation of cellular viability and evaluation of cellular mobility.

In order to explore several viral strains of *Influenzavirus*, we infected the same mice model with strain A/WSN/1933 H1N1 (WSN) and applied same techniques. To compare different viruses, we explored lungs of hamsters infected with *SARS-Cov2* using the same methods. The data were compared to those obtained with PR8 virus.

Results.

On a fixed lung, 2PM provided complementary and additive data to flow cytometry and cytokine assay by observing bronchial and bronchiolar epithelium lesions, localization of infection initially at the bronchial and bronchiolar epithelium before diffusion later to alveolar epithelium. The addition of F4/80 staining coupled with BV421 made it possible to visualize recruitment and pulmonary diffusion of macrophages. In addition, interactions between macrophages and infected cells are observed by 3D reconstructions enabled by 2PM imaging of lung in depth.

Ex vivo intravitral 2PM without agarose demonstrated its feasibility and preservation of cellular viability. Thus making possible to demonstrate from D1 the covered distance and macrophages movement speed significantly greater than that of dendritic cells.

WSN infection induced same results as PR8. On the other hand, after infection by *SARS-Cov2*, no epithelial lesions were observed in 2PM, virus was localized exclusively at the level of alveolar epithelium. Macrophages recruitment was very localized at infected site alternating with areas of healthy lung, at the difference of flu during which we observed pulmonary homogeneity of macrophage infiltration.

Conclusion.

M2P is superior to conventional histology and complementary to usual explorations by providing anatomical lesions, virological and cellular recruitment data essential for a better understanding of pulmonary consequences induced by *Influenzavirus* infection.

The preservation of cellular viability confirms feasibility of *ex vivo* method of our adapted "Live Lung Slice" protocol without agarose. The amplification from D1 post-infection of dendritic cells mobility but especially of macrophages gives them increased availability to optimize their interactions with the infected cells.

2PM is also an excellent tool for comparing pulmonary consequences after infection with different viral strains.

To conclude, 2PM appears essential for the anatomical exploration of structural consequences and innate immune reaction after infection by *Influenzavirus*. The prospects for its application seem important: studies of co-infections, bacterial or fungal superinfections, impact of therapeutic strategy.

« La différence entre le possible et l'impossible se trouve dans la détermination. » Gandhi

« Mieux vaut une seule journée de clarté et de concentration qu'un siècle entier d'ignorance et de distraction. » Bouddha

Je tiens à remercier Monsieur Poüs d'avoir accepté de présider le jury, Monsieur Boissonnas et Madame Bergeron-Lafaurie d'avoir accepté de juger mon travail, en tant que rapporteurs, avec une dédicace spéciale à Mme Bergeron-Lafaurie, votre présence m'honore même si elle a été inductrice d'un boost d'angoisse. Je remercie également Mesdames Chapon et Jouvenet ainsi que Monsieur Fiole d'avoir accepté de participer à ce jury ainsi que Monsieur Lefèvre d'y avoir siégé comme membre invité et merci de notre collaboration très sympathique m'ayant permis de découvrir le site de l'INRAe à Jouy en Josas.

Je voulais chaleureusement remercier Jean-Nicolas Tournier et Emmanuelle Billon-Denis d'avoir accepté un doctorant atypique, car même si cela se développe actuellement, un praticien d'HIA à l'IRBA n'était pas habituel en 2018. Je tenais spécifiquement à remercier Emmanuelle pour ta présence, ton accompagnement au quotidien, tes conseils avisés et tes relectures attentives, tu as rendu ce travail possible malgré mes particularités, le COVID et les contraintes hospitalières.

Merci à Monsieur Frédéric Tangy de m'avoir accueilli dans son unité pendant plus de 2 ans tant que le microscope était hébergé à l'institut Pasteur.

Merci à l'ensemble de l'équipe de l'unité Immunité-Pathogène, tout d'abord Julien de m'avoir éduqué à la microscopie, aidé lors de mes expérimentations en microscopie, avoir réparé le microscope souvent capricieux, et merci pour nos discussions philosophiques lors des longues acquisitions dans le noir et le froid. Merci à Annabelle, Clarisse et Laurence, nos 3 techniciennes d'exception, toujours là pour rendre service avec gentillesse et exigence. Merci à Marie, Clémence, Émilie, Cédric, Jessica, Arnaud, Cyril de m'avoir accepté et intégré à l'équipe.

Rien n'aurait été possible sans le soutien inconditionnel de mon entourage : mon épouse Aurore tout en compréhension, mais pas forcément en patience depuis 20 ans, Deborah et Annaïs tout en non-discrimination sur la composition du bac à légumes..., mes parents, mon frère, Alexia et Gabriel pour leur soutien.

Merci à Jacques et Frédéric d'avoir permis que j'obtienne les autorisations d'effectuer ce travail. Merci à l'ensemble du service de pneumologie (Anne-Pia, Wanda, Marie-Alice), que j'ai régulièrement abandonné et principalement à Hervé, mon équipier de luxe, bien qu'il m'est définitivement lâchement abandonné à son tour. Merci à Olivier de m'avoir fait les analyses statistiques.

Merci à tous celles et ceux ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sommaire

1. Introduction générale
2. *Influenzavirus* = Virus de la Grippe
 - 2.1. Virologie générale
 - 2.1.1. Morphologie
 - 2.1.2. Réservoir des virus *Influenza*
 - 2.1.3. Cycle réplicatif
 - 2.1.4. Mutations/Réarrangements
 - 2.1.5. Facteurs de virulence
 - 2.1.5.1. HA
 - 2.1.5.2. Polymérase
 - 2.1.5.3. NS1
 - 2.1.5.4. NA
 - 2.2. Grippe maladie
 - 2.2.1. Saisonnalité et transmission
 - 2.2.2. Épidémiologie
 - 2.2.3. Présentation clinique
 - 2.2.4. Traitement spécifique antiviral
 - 2.2.5. Vaccination
 - 2.2.6. Mesures de protection non spécifiques
3. Anatomie et Immunologie pulmonaire
 - 3.1. Appareil respiratoire
 - 3.1.1. Anatomie des voies aériennes
 - 3.1.2. Parenchyme pulmonaire
 - 3.1.3. Particularités de l'appareil respiratoire de la souris
 - 3.2. Immunité
 - 3.2.1. Physiologique
 - 3.2.1.1. Mécanique
 - 3.2.1.2. Cellules épithéliales
 - 3.2.1.3. Cellules immunitaires innées pulmonaires (dont les différences Homme/Souris)
 - 3.2.1.3.1. Cellules résidentes du poumon
 - 3.2.1.3.1.1. Macrophage alvéolaire et interstitiel

3.2.1.3.1.2. Cellules dendritiques (CD)

3.2.1.3.2. Cellules recrutées en conditions infectieuses/inflammatoires

3.2.1.3.2.1. Monocytes

3.2.1.3.2.2. Polynucléaires neutrophiles (PNN)

3.2.1.3.3. Particularités de la souris

4. Grippe et Poumon

4.1. Modèles animaux et étude la grippe

4.1.1. Modèle souris

4.1.2. Modèle furets

4.1.3. Autres modèles animaux

4.1.4. Synthèse comparative entre les modèles

4.2. Orages cytokiniques

4.3. Immune innée post infection à *Influenzavirus*

4.4. Mécanismes d'*Influenzavirus* pour échapper à l'immunité innée

4.5. Recrutement cellulaire

4.5.1. Macrophage alvéolaires

4.5.2. Monocytes

4.5.3. PNN

4.5.4. CDs

4.6. Conséquences d'une inflammation disproportionnée

4.7. Déterminants de l'hôte modulant la réaction immune

4.7.1. Données en pratique clinique

4.7.2. Données précliniques sur modèle animal

4.8. Perspectives de cibles thérapeutiques

5. Microscopie 2-Photon

5.1. Principe général de la M2P

5.1.1. Notions historiques de la M2P

5.1.2. Principes physiques de la M2P

5.1.3. Notion de seconde harmonique

5.1.4. Fluorescence

5.1.5. Résumé de montage d'un M2P

5.2. Avantages et limites

5.3. Modalités d'imagerie pulmonaire intravitale

5.3.1. Différentes techniques

5.3.1.1. Imagerie intravitale *in vivo stricto sensu*

5.3.1.2. Technique *ex vivo*

5.3.1.2.1. Poumon isolé-perfusé-ventilé

5.3.1.2.2. Coupe pulmonaire

5.3.2. Comparaison critique des différentes techniques d'imageries intravitales (*in vivo* vs *ex vivo*)

5.4. Applications de la M2P

5.4.1. Recherche en pathologies pulmonaires

5.4.1.1. Étude des interactions cellulaires

5.4.1.2. Étude du microenvironnement

5.4.2. Focus sur les critères de choix du modèle animal

5.4.3. Applications en pratique clinique

5.5. Comparaison avec l'analyse histologique en microscopie optique « conventionnelle »

6. Problématiques posées dans la thèse

7. Travaux expérimentaux

7.1. Intérêt de la M2P pour l'exploration des conséquences pulmonaires après infection par *Influenzavirus* sur poumon fixé

7.1.1. Introduction

7.1.2. Article (Contribution of 2-photon microscopy for exploration of lung involvement after murine model infection with *Influenzavirus*)

7.1.3. Synthèse

7.2. Microscopie intravitale *ex vivo*

7.2.1. Introduction

7.2.2. Méthodologie

7.2.3. Résultats

7.2.3.1. Cinétique de déplacement cellulaire

7.2.3.1.1. Distance parcourue

7.2.3.1.2. Vitesse de déplacement

7.2.3.2. Interactions cellulaires

7.2.4. Discussion

7.3. Apport de la M2P pour la comparaison de virus à tropisme respiratoire

7.3.1. Comparaisons entre 2 souches virales d'*Influenzavirus* (PR8 et WSN)

7.3.1.1. Introduction

7.3.1.2. Méthodes

7.3.1.3. Résultats

7.3.1.4. Discussion

7.3.2. Comparaisons entre 2 virus de familles différentes (*SARS-Cov2 / Influenzavirus*)

7.3.2.1. Introduction

7.3.2.2. Publication acceptée

7.3.2.3. Conclusion comparaison *SARS-Cov2/Influenzavirus*

7.3.3. Synthèse études comparatives entre virus

8. Discussion générale et perspectives

8.1. Discussion

8.2. Perspectives

9. Conclusion

10. Références

1. Introduction générale

La grippe demeure un sujet d'étude d'intérêt car les épidémies saisonnières sont responsables d'environ 10.000 décès par an en France. Pouvant sévir sur un mode pandémique, elle a d'ailleurs été responsable, durant le 20^{ème} siècle, de plusieurs pandémies (Figure 1) : la grippe dite espagnole de 1918, asiatique en 1957 (H2N2), Hong Kong en 1968 (H3N2), Russe en 1977 (H1N1) et 2009 (p2009 H1N1)) (3,4).

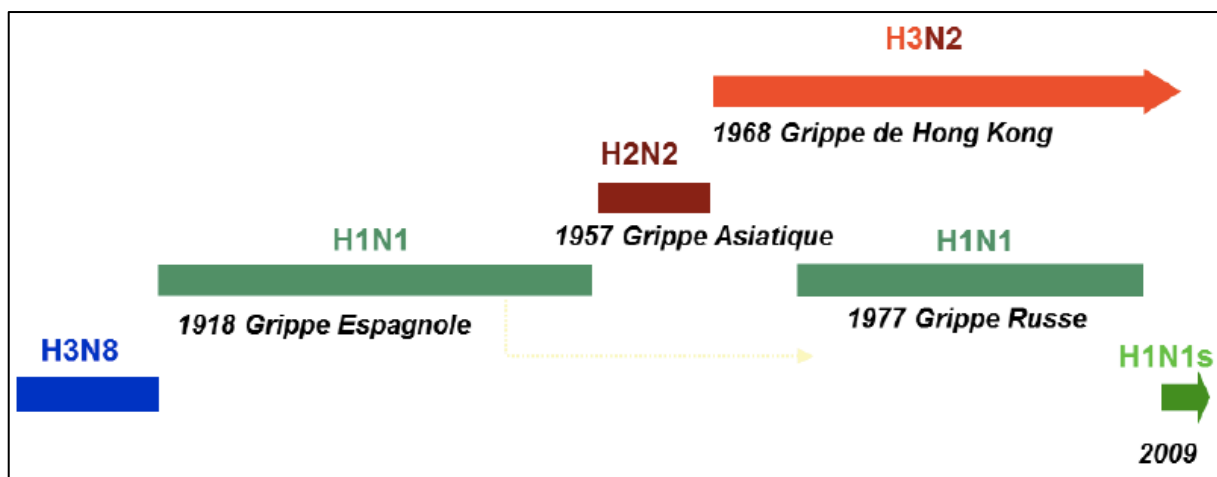


Figure 1. Pandémie survenue au cours du 20^{ème} et 21^{ème} siècle. (3)

En plus d'être un réel sujet d'intérêt de santé publique, elle doit assurément intéresser les Armées et les services de sécurité intérieure car répertoriée parmi les agents infectieux naturels potentiellement utilisables lors de conflits armés ou en bioterrorisme comme agent du risque B(5). Elle possède de nombreuses caractéristiques, qui présument d'une utilisation potentielle à des fins malveillantes du virus de la grippe: sa pathogénicité pour l'espèce humaine, sa facilité de production, sa contagiosité par aérosols, sa sévérité voire sa létalité, la relative efficacité des stratégies vaccinales et des traitements anti viraux (5).

L'étude de la grippe a surtout un intérêt médical afin d'optimiser la prise en charge des patients présentant une grippe grave. Optimisation car sur le plan thérapeutique, les traitements antiviraux, tels que l'oseltamivir, n'ont que peu d'impact sur la mortalité liée à la grippe. S'ils ont validé leur efficacité sur la réduction des symptômes des formes légères à

modérées ne nécessitant pas d'hospitalisation, ils ont échoué à montrer une réduction sur la mortalité des formes graves (6,7) même à haute dose (8).

L'échec des molécules antivirales sur les formes graves doit mener vers l'exploration d'autres cibles thérapeutiques. Il apparaît intéressant d'étudier la composante immunitaire innée non spécifique déclenchée après l'infection. Il existe de nombreuses preuves que la réponse immunitaire innée au virus de la grippe est très complexe et joue un rôle clé dans la protection contre l'infection (gravité ou non). Il est également clair que certains aspects de l'immunité innée peuvent entraîner une certaine morbidité notamment liée aux lésions pulmonaires induites par cette immunité dérégulée (9,10).

Étudier la grippe est un sujet d'intérêt au regard de l'histoire et de l'actualité, il s'agit d'une problématique potentiellement stratégique pour les Armées et pour l'optimisation de la prise en charge des patients. Nous avons choisi de l'étudier par une approche innovante via la microscopie 2-photon pour l'exploration des mécanismes immunitaires post infection par le virus de la grippe.

2. *Influenzavirus* = virus de la Grippe

2.1. Virologie générale

2.1.1. Morphologie

Influenzavirus fait partie de la famille des Orthomyxoviridae. C'est un virus à ARN simple brin à polarité négative. Il est divisé en 4 sous-types : A, B, C et D. Seul les sous-types A et B sont pathogènes pour l'Homme, le sous-type A étant le plus fréquent et le plus pathogène en pathologie humaine (11,12). Les premiers virus *Influenza* A et B ont été découverts respectivement en 1933 (H1N1) et en 1940.

Les virus *Influenza* A sont subdivisés selon leurs 2 protéines de surface : hémagglutinine (HA ou H) et neuraminidase (NA ou N). Le virus *Influenza* B n'a pas de subdivision mais 2 lignages antigéniquement et génétiquement distincts sont décrits : B/Victoria/ 2/87 (Victoria lineage) and B/Yamagata/16/88 (Yamagata lineage). A ce jour, 17 hémagglutinines et 9 neuraminidases ont été identifiées (12).

La particule virale *Influenza A* est composée d'une enveloppe lipidique dérivant de la cellule hôte et exprime à sa surface les protéines HA, NA et M2. Associé à l'intérieur de la bicouche lipidique se retrouvent les protéines de la matrice M1 ainsi que le complexe de ribonucléase composé des 8 segments d'ARN, des polymérases basiques (PB1 et PB2), d'une polymérase acide (PA) et de la nucléoprotéine (NP). La protéine NS2 (ou Nuclear Export Protein (NEP)) fait un pont entre les protéines de la matrice et le complexe ribonucléoprotéique (Figure 2). (11)

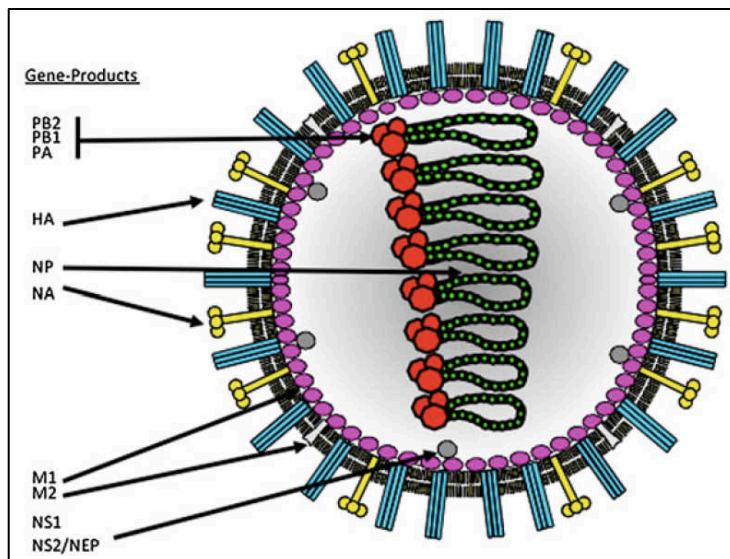


Figure 2. Représentation schématique d'une particule virale *Influenza A* représentant les 8 segments ARN codant pour les protéines structurales et non structurales correspondantes. (11)

2.1.2. Réservoir des virus *Influenza*

Les oiseaux sauvages sont le réservoir principal des virus *Influenza*, le porc constituant l'autre réservoir. D'autres mammifères, notamment marins, ont été identifiés comme hôte intermédiaire. Certains virus *Influenza* ont la capacité d'infecter directement l'espèce humaine, toutefois, le plus fréquemment, la transmission se fait via un hôte intermédiaire, qui est principalement le porc. Le tractus respiratoire du porc possède les mêmes récepteurs que les oiseaux et que l'Homme agissant ainsi comme un carrefour de circulation et de réarrangement virologique. Cela permet une adaptation de la souche aviaire à l'Homme, une transmission facilitée entre les espèces (oiseaux, porcs, Homme), et donc une diffusion interhumaine possible (1).

Devant l'émergence d'une souche animale (aviaire ou porcine), l'OMS a élaboré des étapes de vigilance illustrés sur la figure 2 allant de l'émergence (1) à la pandémie (6). (Figure 3)

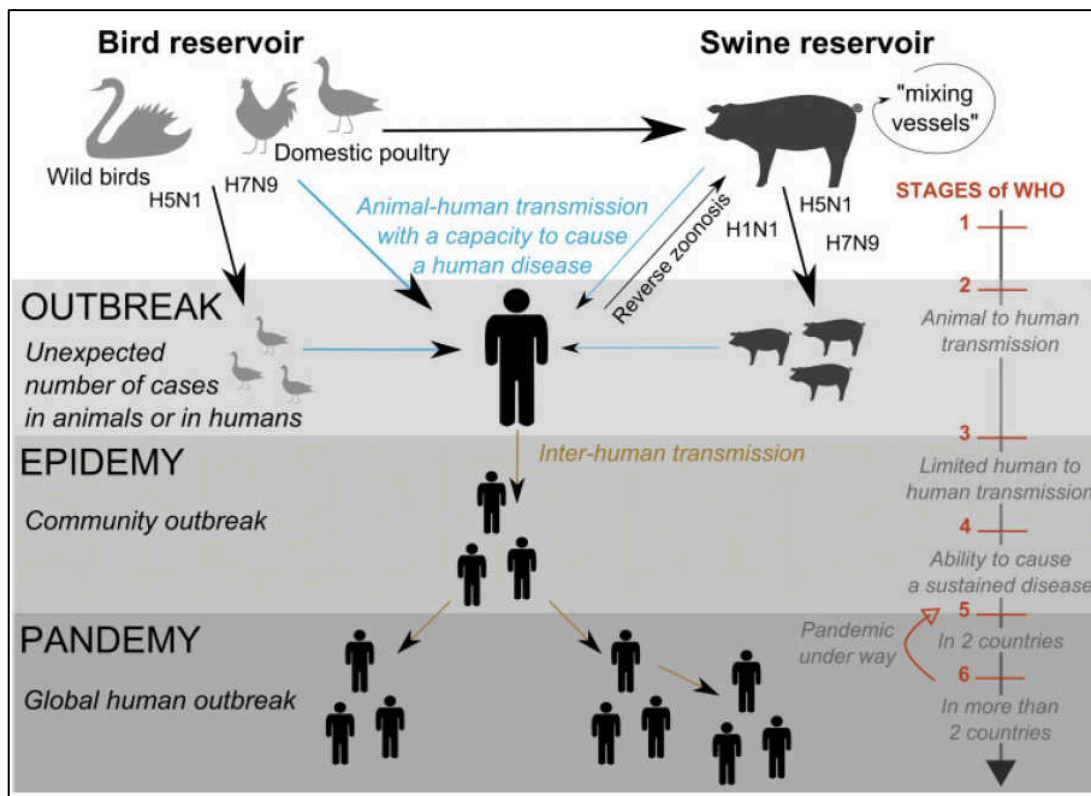


Figure 3. Représentation schématique montrant les évènements majeurs aboutissant à l'émergence d'un virus *Influenza* pandémique à partir des 2 réservoirs animaux principaux jusqu'à sa diffusion humaine. Gradation de l'OMS des étapes de vigilance suite à l'émergence d'un virus *Influenza* à risque pandémique. (1)

2.1.3. Cycle répliatif (Figure 4)

Afin d'initier le cycle cellulaire de répliation virale, le virus doit se lier via l'HA à son récepteur cellulaire qui est un acide sialique, l'entrée dans la cellule se faisant principalement par endocytose. L'acidité du pH de l'endosome assure le clivage de l'HA ; ce changement de conformation permet d'exposer le peptide de fusion situé à l'extrémité N-terminale activant la formation d'un pore dans la membrane de l'endosome par lequel passe le complexe ribonucléoprotéique (RNP=ARN+NP+polymérasés). Le relargage du complexe dans le cytoplasme nécessite l'action de M2 permettant le clivage entre RNP et M1.

Le RNP va migrer du cytoplasme vers le noyau médié par PB2 et NP. Les segments génomiques viraux sont répliqués et transcrits par le complexe polymérase ARN dépendant viral (PB1, PB2, PA, RNP). Les ARN viraux permettent la synthèse de 2 types d'ARN : ARNc (complémentaire) servant de matrice pour la synthèse d'ARNv et ARNm, qui sera traduit et permettra la synthèse des protéines virales.

Les nouveaux RNP vont s'associer avec M1 et NS2. Dans le cytoplasme, le complexe RNP-M1-NS2 se dirige vers la membrane cytoplasmique ; la protéine M2, HA et NA se dirige également vers la membrane. Un bourgeonnement s'effectue au pôle apical de la cellule. Lorsque la particule virale est formée, NA vient cliver les acides sialiques libérant ainsi la particule virale pour poursuivre le processus d'infection. (11)

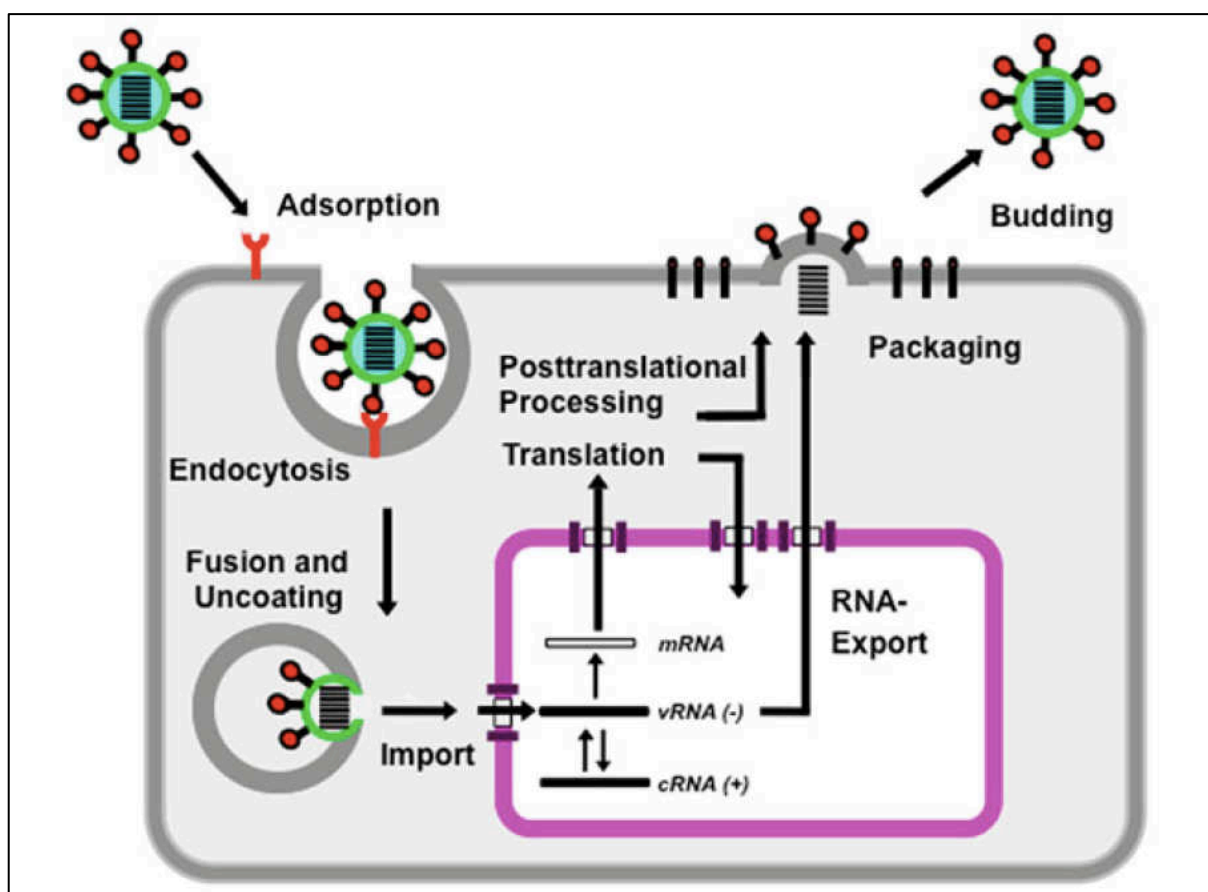


Figure 4. Cycle de répllication virale *Influenzavirus* (11)

2.1.4. Mutations/Réarrangements

Le complexe polymérase ne possède pas d'activité de relecture, donc de nombreuses mutations s'accumulent dans le génome viral au cours de la réplication conduisant à de potentiels changements dans toutes les protéines. Cela peut notamment altérer la conformation des épitopes HA et NA contre lesquels sont générés les anticorps neutralisants. Les virus de la grippe A sont classés selon les différences antigéniques des protéines HA et NA. Le taux élevé de mutations possibles lors de la réplication virale se traduit par une multitude de nouvelles mutations à chaque cycle de réplication. Cela permet au virus de s'adapter rapidement aux changements de l'environnement avec pour conséquence un échappement de l'immunité innée et une résistance contre les traitements antiviraux. Les modifications altèrent également les propriétés antigéniques rendant les vaccins existants moins ou peu efficaces. Ces mutations sont responsables des variations saisonnières.

En raison de la segmentation du génome, lors d'une infection par 2 souches d'*Influenzavirus*, il peut y avoir recombinaison des segments génétiques de deux virus différents : réarrangement génétique (Figure 5). Ce mécanisme est à l'origine des souches à risque pandémique. Par son activité de liaison aux récepteurs cellulaires et de fusion, l'HA est un déterminant majeur du tropisme tissulaire, de la propagation et de la pathogénicité dans les organismes infectés. Aujourd'hui 17 sous-types HA (H1-H17) et 9 sous-types NA (N1-N9) sont connus, ils peuvent se réarranger et conduire à de nouvelles propriétés. Toutes les combinaisons ne seront finalement pas avantageuses, mais peuvent conduire à la création d'un virus combinant la capacité de se répliquer chez l'Homme avec de nouvelles propriétés antigéniques (déplacement antigénique). Cela a été décrit au moins trois fois dans le siècle dernier, entraînant les pandémies de 1918 ("Grippe espagnole"), 1957 ("Grippe asiatique") et 1968 ("Grippe de Hong Kong") qui ont causé ensemble près de 40 millions de décès dans le monde. La pandémie d'origine porcine de type H1N1 de 2009 provient d'un réarrangement entre des segments génétiques d'*Influenzavirus* humains et aviaires, ainsi que porcins. La souche *Influenzavirus* ainsi recombinaison dénommée Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) devient hautement pathogène pour les humains, comme cela s'est produit à Hong-Kong en 1997. (11)

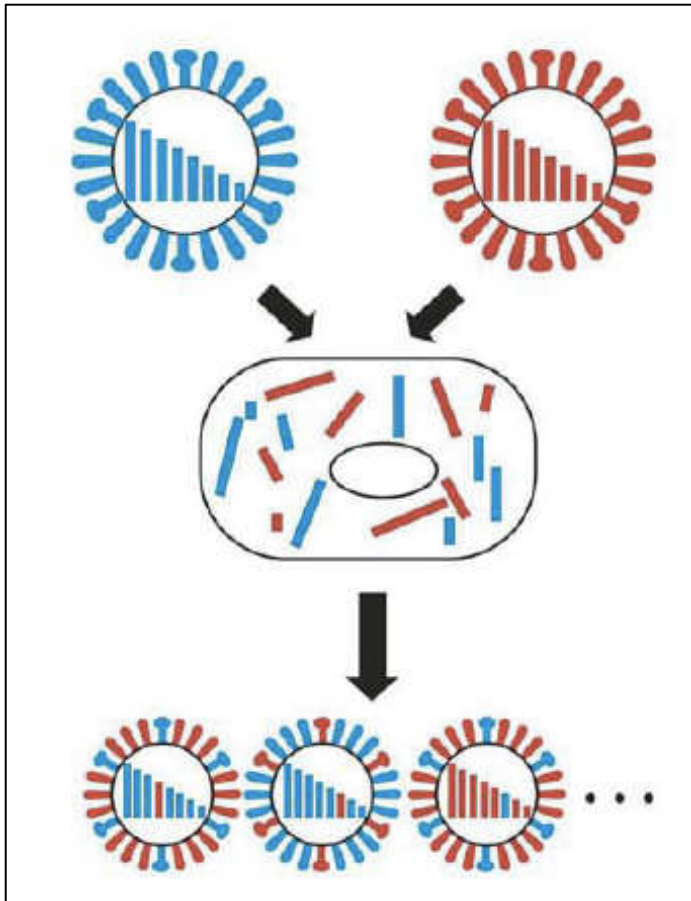


Figure 5. Représentation schématique du mécanisme de réarrangement génétique.

2.1.5. Facteurs de virulence (11,13)

2.1.5.1. HA

Les substitutions d'acides aminés dans HA qui affectent la préférence de liaison au récepteur peuvent influencer la gamme d'hôtes cellulaires et le tropisme tissulaire pouvant ainsi altérer la virulence. L'un des déterminants de virulence le plus connu des virus HPAI est le site de clivage multi basique (MBCS) de l'HA. La séquence du site de clivage détermine par quelle protéase cellulaire HA0 est clivée et détermine le tropisme viral et la virulence. Le clivage de l'HA par les protéases cellulaires est une étape cruciale du cycle de réplication car des particules virales avec des HA non clivées ne seraient pas infectieuses. L'HA des Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI) et virus de la grippe humaine abrite un site de clivage monobasique qui est clivé par des protéases trypsine-like. Ces protéases trypsine-like ne sont présentes que dans les voies respiratoires des humains et les voies respiratoires et/ou intestinales des oiseaux, limitant ainsi la réplication virale à ces tissus.

Dans le modèle furet, l'incorporation d'un MBCS dans l'HA d'un virus de la grippe humaine (H3N2) n'a pas entraîné d'augmentation de la virulence ni de modification du tropisme tissulaire. Ces résultats suggèrent que, en plus d'un MBCS, d'autres facteurs sont impliqués dans la virulence.

2.1.5.2. Polymérase

Les polymérase du virus de la grippe, en particulier PB2, se sont avérées être des déterminants importants de la virulence. La substitution d'un acide aminé lysine (K) en acide glutamique (E) à la position 627 dans PB2 a été largement étudiée dans le contexte de l'adaptation des mammifères. Il semble que cette substitution soit un mécanisme d'adaptation aux contraintes physiologiques, par exemple : différences de température corporelle. La plupart des virus de la grippe aviaire A, qui peut se répliquer à une température relativement élevée d'environ 41°C dans le tube digestif des oiseaux, possède un résidu E à la position 627. En revanche, les virus de la grippe humaine A se répliquent à une température plus basse d'environ 33°C. Ces virus ont typiquement un résidu K à cette position. De plus, cette mutation a été impliquée dans l'augmentation de la virulence des isolats humains d'un virus HPAI (H5N1) et a été trouvé dans un cas humain mortel d'infection par un HPAI (H7N7). En l'absence de mutation E627K, une substitution d'aspartate (D) à asparagine (N) à la position 701 de PB2 (H5N1) s'est avérée augmenter la virulence. La mutation adaptative D701N a provoqué une amélioration de la liaison de PB2-Importine alpha1 dans les cellules de mammifères entraînant un transport accru de PB2 dans le noyau. Il convient de noter que, contrairement à d'autres virus de la grippe humaine, pH1N1 ne contient pas de résidus d'adaptation des mammifères 627K et/ou 701N. Cependant, l'absence de ces marqueurs d'adaptation chez les mammifères dans PB2 a été compensée dans une certaine mesure par une substitution de sérine (S) et d'arginine (R) à la position 590 et 591 qui peuvent affecter l'interaction de la protéine avec des facteurs viraux et/ou cellulaires et d'où sa capacité à favoriser la réplication du virus chez les mammifères.

PB1 contribue à la virulence des virus grippaux A en induisant l'apoptose cellulaire. PB1 favorise et augmenterait la gravité de la pneumonie secondaire. En particulier, une

substitution N à S à la position 66 (N66S) du virus HPAI (H5N1) et de la grippe pandémique de 1918 est en partie responsable de la haute virulence de ces virus. La variante PB1 N66S réduit la production d'interféron (IFN), qui fait partie de la réponse immunitaire innée. Contrairement aux précédents virus de la grippe pandémique pH1N1 ne code pas pour un PB1, du fait de la présence de trois codons stop prématurés. Étonnamment, lorsque la capacité de codage de PB1 (pH1N1) est restaurée, la virulence n'est que modestement affectée chez la souris et le furet.

2.1.5.3. NS1

En réponse à la présence d'agents pathogènes chez l'hôte, des IFN sont sécrétés par les cellules et « interfèrent » avec la réplication virale. Pour permettre une infection non « interférée », les virus de la grippe ont des mécanismes d'échappement aux réponses immunitaires de l'hôte, y compris la réponse IFN de type I. La protéine NS1 du virus de la grippe a plusieurs modes d'action notamment comme antagoniste de l'IFN. NS1 a été largement étudiée en tant que déterminant moléculaire de la virulence. Les virus de la grippe dépourvus de NS1 ne sont capables de se répliquer que dans des cellules qui ont une réponse IFN absente ou fortement diminuée. Le virus H5N1, contrairement aux autres virus humains, aviaires et porcins, est relativement résistant aux effets antiviraux des IFN, ce qui entraîne une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires. Cet effet nécessite un acide glutamique en position 92 de NS1 et permet la réplication du virus en présence d'IFN. De plus, une mutation type E92D augmente la virulence de HPAI (H5N1) chez la souris.

2.1.5.4. NA

HA se lie aux acides sialiques et NA les clive, l'équilibre entre l'activité HA et NA semble critique pour la réplication et la transmission du virus. La protéine NA s'est avérée jouer un rôle essentiel dans la haute virulence du H1N1 (1918) chez la souris. Une fonction majeure de la NA se produit au stade final de l'infection. NA virale clive les acides sialiques des récepteurs cellulaires. Le clivage par NA des acides sialiques empêche l'agrégation du virion et libère la liaison du virus de la cellule hôte mourante, permettant une libération efficace de la descendance du virion et sa propagation vers de nouvelles cibles cellulaires. En tant que

barrière mécanique, le mucus de l'épithélium respiratoire est riche en acides sialiques, qui agissent comme un leurre pour les molécules HA et NA permettent de détacher les virus de ce mucus.

2.2. Grippe maladie

2.2.1. Saisonnalité et transmission

La grippe peut survenir sous 2 modes épidémiques : saisonnière avec une récurrence annuelle hivernale ou pandémique après émergence d'un nouveau virus à diffusion mondiale.

Les modifications mineures se produisant dans les protéines virales entre les saisons (appelées dérive antigénique) entraînent les épidémies annuelles, avec une saisonnalité hivernale dans les régions tempérées (novembre-avril au niveau de l'hémisphère nord, et mai-octobre dans l'hémisphère sud).

En revanche, les pandémies surviennent dans les suites d'un réarrangement antigénique concernant les protéines de la surface suite à une recombinaison de plusieurs virus circulant chez les animaux.(14) La figure 14 illustre le mécanisme aboutissant à une mutation responsable de l'évolution saisonnière de *Influenzavirus* ou à un réarrangement génétique responsable de l'émergence d'une nouvelle souche virale à risque pandémique. (15)

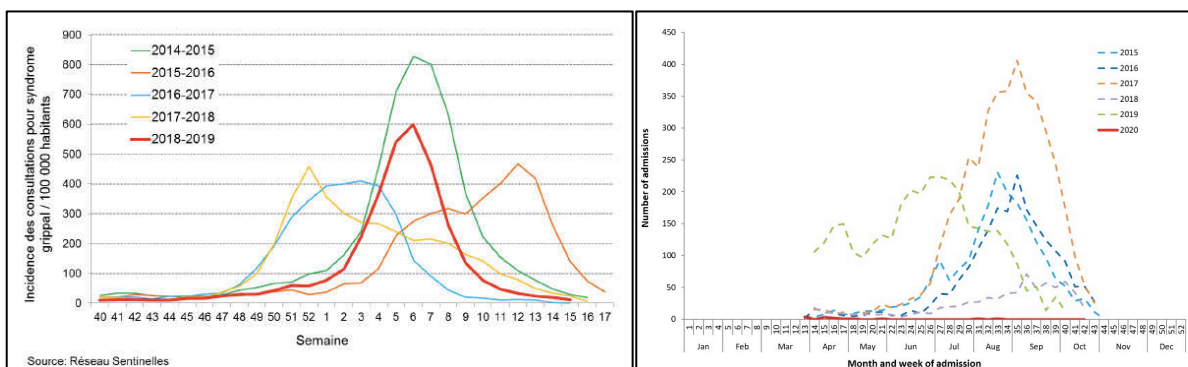


Figure 6. Saisonnalité de la circulation virale selon l'hémisphère (Santé Publique France – Australian National Notifiable Diseases Surveillance System).

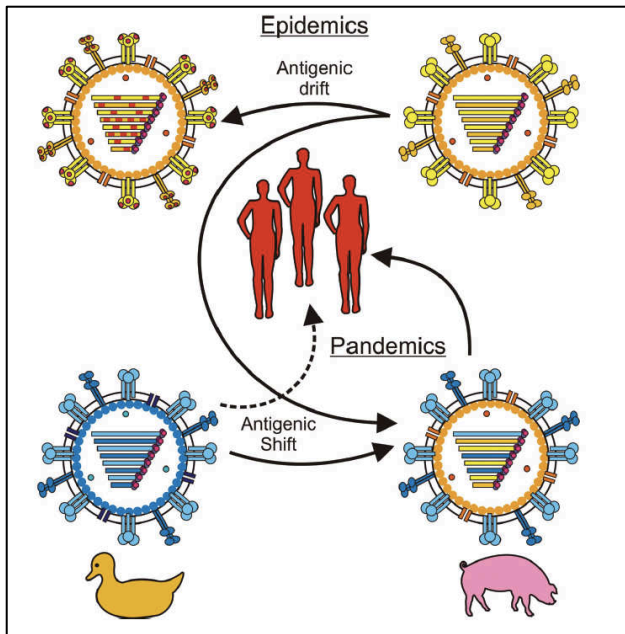


Figure 7. Mécanismes de mutation ponctuelle ou de réarrangement génétique aboutissant à une souche saisonnière ou pandémique.(15)

2.2.2. Épidémiologie

L'OMS estime que la grippe saisonnière est responsable annuellement d'environ 5 millions de cas graves dans le monde et de 300.000 à 650.000 décès.

Selon Santé Publique France, on dénombre 2 à 6 millions de cas de grippe par an en France, environ 10.000 décès (90% des personnes décédées ont plus de 65 ans).

La diffusion épidémique est liée dans la capacité du virus à se propager efficacement d'une personne à l'autre. Trois mécanismes de transmission de la grippe ont été identifiés : aérosols, gouttelettes et transmission par contact. Lors d'un éternuement ou une toux, la personne infectée expulse des particules infectieuses mesurant de 0,1 μ m à 100 μ m de diamètre. Les aérosols permettent une stagnation dans l'environnement de quelques minutes à plusieurs heures, la durée étant dépendante des conditions de température et d'humidité. Ces particules infectantes en suspension peuvent être inhalées et déposées dans la partie supérieure ou inférieure des voies respiratoires. Le virus reste infectieux pendant une courte période sur les mains mais peut rester infectieux sur les surfaces non poreuses dans l'environnement jusqu'à 48h. (16)

2.2.3. Présentation clinique (Figure 8)

Après 3-5 jours d'incubation, le tableau clinique de la grippe est rarement asymptomatique et peut rapidement mettre en jeu le pronostic vital du patient avec un tableau de détresse respiratoire aiguë (grippe maligne) selon sur les caractéristiques de l'hôte et du virus.

Les symptômes apparaissent brutalement : fièvre, frissons, céphalées, myalgie, altération rapide de l'état général accompagnés de symptômes respiratoires (toux, dyspnée, wheezing...). Des signes extra-respiratoires peuvent accompagner le tableau tels que : photophobie, conjonctivite, larmoiement.

Le tableau clinique peut évoluer spontanément vers la guérison avec restitution *ad integrum* en 7 à 14 jours, mais une aggravation secondaire est possible avec la survenue de complication pulmonaire ou extra-pulmonaire.

La pneumonie grippale ou grippe maligne a été décrite pour la première fois lors de la pandémie de 1957, bien que suspectée dès la pandémie de 1918(16). Les patients décrivent des symptômes typiques de la grippe (Cf. ci-dessus), suivis d'une détresse respiratoire aiguë d'installation rapidement progressive avec dyspnée et signes de lutte respiratoire (tachypnée, mise en jeu des muscles respiratoires accessoires, désaturation...). L'imagerie thoracique révèle des opacités bilatérales diffuses non systématisées. Ce tableau peut aboutir à un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) nécessitant des manœuvres de réanimation respiratoire (oxygénothérapie haut débit, intubation orotrachéale et ventilation mécanique) en urgence. La mortalité est élevée et les séries autopsiques révèlent des bronchites nécrosantes, des hémorragies intra alvéolaires et des dommages alvéolaires diffus. Les surinfections pulmonaires bactériennes compliquent fréquemment la grippe selon un tableau en 2 phases : initialement une présentation typique de la grippe d'évolution favorable puis secondairement récidive de la fièvre associée à une dyspnée, une toux expectorante voire hémoptoïque et une aggravation radiologique avec des condensations alvéolaires. Les surinfections bactériennes sont fréquemment liées à *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* voire *Staphylococcus aureus* (+/- sécréteur de la leucocidine de Panton-Valentine). (14,16)

En plus des complications pulmonaires, certaines atteintes extra-pulmonaires peuvent survenir : myosite avec rhabdomyolyse, insuffisance rénale aigüe, des complications cardiaques à type de myocardite, péricardite. La grippe a également été associée à des manifestations neurologiques : syndrome de Reyes, encéphalomyélite, myélite, syndrome de Guillain-Barré, méningite aseptique.

Certains facteurs liés à l'hôte sont pronostiques et associés à une morbidité plus importante tels que : âge >65 ans et <5 ans, 3^{ème} trimestre de grossesse, certaines immunodépression (transplantation d'organe ou de moelle, VIH avec CD4<200), certains traitements (immunosuppresseurs), des comorbidités (respiratoires, cardiaque, rénales...).

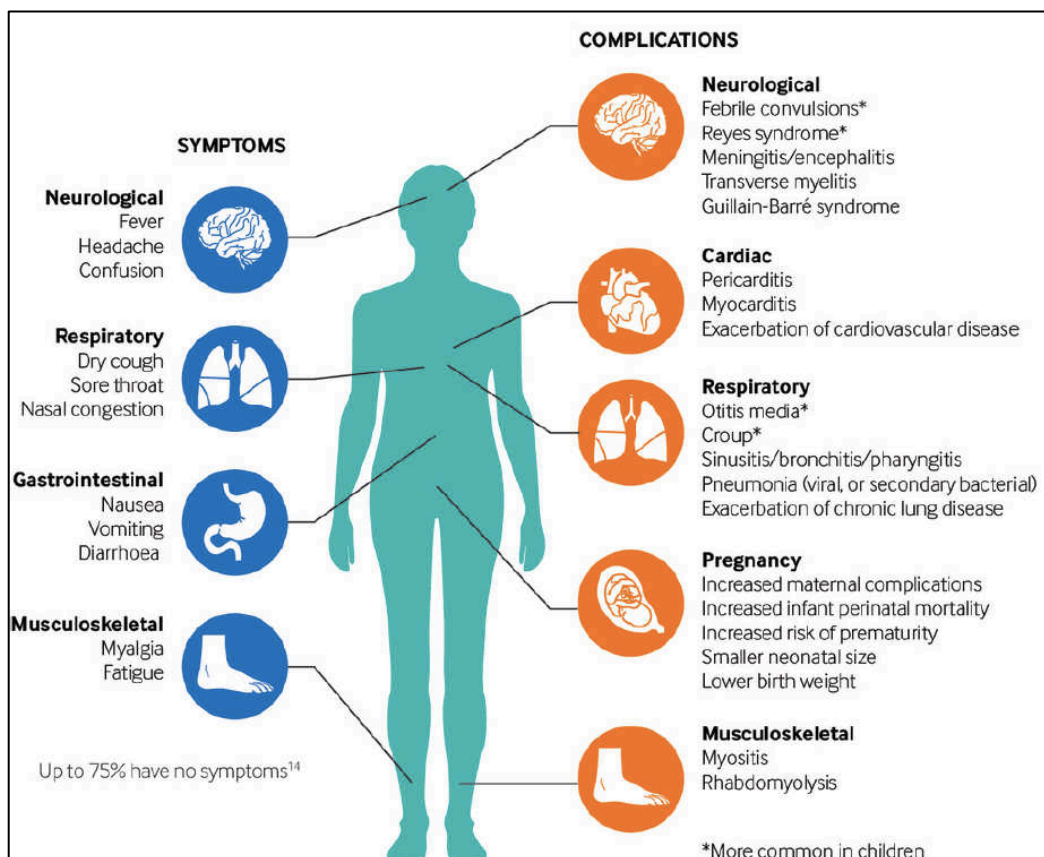


Figure 8. Schéma représentant les symptômes et complications possibles lors d'infection grippale. (14)

Le diagnostic clinique n'est pas aisé car le syndrome grippal peut révéler une autre infection virale hivernale (VRS, PIV...). La sensibilité de l'analyse clinique est faible (env. 30%).

Le diagnostic de certitude est virologique et repose aujourd’hui essentiellement sur la biologie moléculaire compte tenu de la sensibilité, de la spécificité et du délai rapide d’obtention des résultats. Ces tests ne sont indiqués que lors d’hospitalisation, de formes graves ou pour les patients immunodéprimés. Ils sont effectués sur aspiration ou écouvillonnage nasopharyngé, ou sur prélèvement endoscopique bronchique (aspiration bronchique, prélèvement distal protégé ou lavage broncho alvéolaire). La figure 9 montre les sensibilités/spécificités et le délai de rendu des résultats de chaque test. (16)

	Sensitivity	Turnaround time	Advantages	Disadvantages
Viral culture	Close to 100%	3–10 days	High sensitivity and specificity; virus available for characterisation (recovery of new and divergent strains); ability to recover other viruses	Poor specimen quality might affect yield; results not available in time to inform clinical decision making; time and labour intensive; specialised laboratory facilities required
Rapid viral culture*	70–90%	1–3 days	Faster than traditional viral culture; less expertise needed than for traditional cell culture	Less sensitive than traditional viral culture; might miss divergent influenza viruses; specialised laboratory facilities required
Rapid antigen detection: direct fluorescent antibody	70–90%	1–4 h	Rapid turnaround; can identify additional pathogens (different staining methods); can assess sample quality	Sensitivity and specificity dependent on expertise of technician; specialised equipment required; virus is not available for characterisation of antigenicity
Rapid antigen detection: immunochromatogenic assay	59–93%	<30 min	No specialised equipment or technical skill required; specialised specimen transport not required; rapid results	Least sensitive method; virus is not available for characterisation of antigenicity
RT-PCR	Close to 100%	1–8 h	High sensitivity and specificity; specimen quality and handling have less impact on sensitivity; typing, subtyping, and sequencing possible; can be combined with multiplex technology	Expensive; specialised equipment and trained personnel required; potential for cross-contamination; might miss divergent strains (dependent on primers)

* This technique is a modification of conventional viral culture, where the clinical specimen is inoculated onto a cell monolayer and centrifuged before incubation. Specimens are then stained and examined by immunofluorescence.

Figure 9. Sensibilité et spécificité de chaque test permettant le diagnostic de grippe.(16)

2.2.4. Traitement spécifique antiviral (Figure 10)

Bien qu’ayant une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et étant largement utilisés, l’efficacité des inhibiteurs de la neuraminidase reste très controversée. L’administration très précoce semble être associée à l’efficacité des inhibiteurs des neuraminidases (dans les 48 premières heures suivant l’apparition des symptômes). Des études supplémentaires ont montré que la prophylaxie semble réduire la survenue de symptôme de grippe, mais aucune donnée sur la transmissibilité du virus(17).

Les études évaluant l'efficacité des inhibiteurs des NA sur des patients sans comorbidité présentant une grippe non compliquée montrent une réduction de la durée des symptômes cliniques de moins d'un jour (18,19).

Une revue Cochrane n'a trouvé aucune diminution du risque d'hospitalisation ou de complications graves avec un traitement à l'oseltamivir (20), d'autres études évaluant ces traitements dans des patients d'unités de soins intensifs ne retrouvent aucune réduction de la mortalité (6,7). De plus, l'utilisation d'une dose plus élevée que celle de l'AMM d'inhibiteur de NA sur des patients en unité de soins intensifs n'entraîne aucune modification en termes de durée d'hospitalisation, de durée de ventilation mécanique ni de mortalité. (8)

Des traitements immunomodulateurs (AINS, macrolides, corticostéroïdes ...) ont été utilisés sur des patients essentiellement en unité de soins continus pour grippe grave sans validation par des études randomisées. Une méta-analyse majoritairement d'études rétrospectives montre une efficacité significative sur la mortalité de l'utilisation des macrolides ou AINS mais pas des corticostéroïdes (21,22). De plus, l'ajout à un inhibiteur de NA de Naproxène (AINS) et de Clarithromycine (macrolide) en traitement des patients hospitalisés pour grippe (hors unité de soins intensifs) semble montrer une réduction significative de la mortalité, de la nécessité d'admission en réanimation et de la durée d'hospitalisation. Cette étude n'ayant inclus que 100 patients par bras devra être confirmée par une étude randomisée de plus grand ampleur, mais semble apporter un signal positif de l'intérêt de cibler la réaction immune innée sur le plan thérapeutique(23).

	Route	Treatment dose	Prophylactic dose	Special population considerations
Oseltamivir (Tamiflu; Roche)	Oral	Adults: 75 mg twice daily for 5 days Children (2 weeks and older): weight-based dosing twice a day for 5 days	Adults: 75 mg once daily for 7–10 days Children (3 months and older): weight-based dosing once a day for 7–10 days	Available in the USA and European Union; dose adjusted in renal failure; drug of choice in pregnancy; drug of choice in patients with severe infection or patients admitted to hospital; side-effects include nausea or vomiting, rare and serious skin reactions, and neuropsychiatric effects (observed in post-marketing studies in Japan)
Zanamivir (Relenza; GlaxoSmithKline)	Inhaled	7 years and older: 10 mg twice daily for 5 days	5 years and older: 10 mg once daily for 7–10 days	Available in the USA and European Union (except for Cyprus); contraindicated in patients with underlying lung disease; contraindicated in intubated patients (ventilator blockage)
Peramivir (Rapivab; BioCryst Pharmaceuticals)	Intravenous	18 years and older: 600 mg in a single dose	NA	Available in the USA; dose adjusted in renal failure; given for at least 5 days if used to treat patients in hospital

NA=not applicable.

Figure 10. Options thérapeutiques anti grippales (USA et UE)

2.2.5. Vaccination

Compte tenu de l'absence d'efficacité formelle, notamment dans les formes graves, des traitements antiviraux, la vaccination reste la pierre angulaire des traitements contre la grippe afin d'en réduire la morbidité.

En raison des changements dans les souches circulantes, de la dérive antigénique, les vaccins sont mis à jour annuellement selon les recommandations de l'OMS sur la base de la surveillance des souches circulantes. Ce processus a lieu deux fois par an en février pour l'hémisphère nord et en septembre pour l'hémisphère sud.

Actuellement, la vaccination trivalente ou quadrivalente inactivée contient des antigènes de deux souches d'*Influenzavirus* (pH1N1 et H3N2) et une ou deux souches du virus de la grippe B (ligne Yamagata et Victoria). La protection peut être sous-optimale, surtout en cas de forte divergence entre les antigènes utilisés pour la vaccination et ceux de la grippe saisonnière en circulation (1,14,16).

En matière de vaccination anti grippale (Figure 11 résume le schéma vaccinal selon le vaccin indiqué et utilisé), les recommandations du ministère des solidarités et de la santé (juillet 2021) sont les suivantes :

-La vaccination contre la grippe est recommandée chaque année pour les personnes âgées de 65 ans et plus.

-La recommandation vaccinale s'applique également dans certaines situations particulières : les femmes enceintes, les personnes atteintes de maladies chroniques.

Schéma vaccinal

Vaccins administrés par voie intramusculaire (préférentiellement) ou sous cutanée profonde :

Vaccin tétravalent : Vaxigrip Tetra®

Âges	Dose (ml)	Nombre de doses
6 mois à 36 mois	0,5**	1 ou 2*
3 ans à 8 ans	0,5	1 ou 2*
A partir de 9 ans	0,5	1

*2 doses à un mois d'intervalle en primovaccination, 1 dose en rappel annuel.

**La vaccination avec les vaccins grippaux tétravalents est effectuée avec une dose entière dès l'âge de 6 mois

Vaccin tétravalent : Inluvac Tetra®

Ce vaccin dispose d'une AMM à partir de l'âge de 3 ans

Âges	Dose (ml)	Nombre de doses
A partir de 3 ans	0,5**	1 ou 2*
A partir de 9 ans	0,5	1

*2 doses à un mois d'intervalle en primovaccination, 1 dose en rappel annuel.

**La vaccination avec les vaccins grippaux tétravalents est effectuée avec une dose entière dès l'âge de 6 mois

Efluelda®

Âges	Dose (ml)	Nombre de doses
65 ans et plus	0,7	1

Administration de préférence par voie intramusculaire dans le deltoïde (la voie sous-cutanée peut cependant également être utilisée).

Figure 11. Schéma vaccinale selon le calendrier vaccinal et recommandations vaccinales. Juillet 2021. Ministère des solidarités et de la santé.

2.2.6. Mesures de protection non spécifiques

Bien connues et largement diffusées depuis quelques mois, les mesures de protection individuelles étaient déjà bien décrites et étudiées notamment en prévention de la diffusion d'un virus grippal pandémique : hygiène des mains et port du masque.

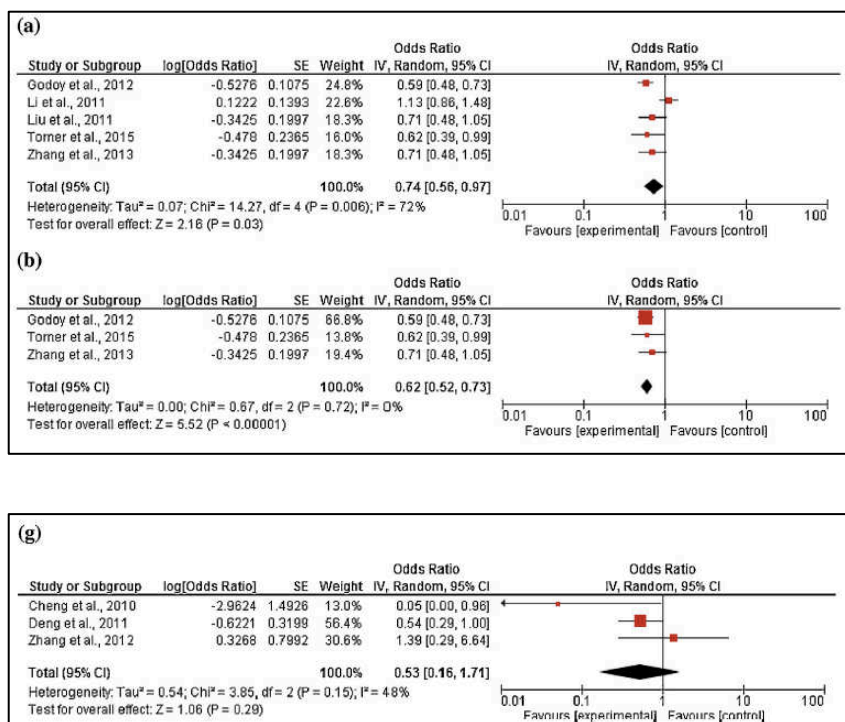


Figure 12. Forest-plot de résultats de méta-analyse sur le lavage des mains et le risque de transmission grippe (a. Lavages des mains au sens large, b. fréquence des lavages, g. port du masque).

Cette méta-analyse démontre que le lavage des mains et leur répétition est associé significativement à un risque minoré de transmission du virus de la grippe. Les résultats concernant le caractère préventif du port du masque ne sont pas univoques et très variables selon les études. Si la méta-analyse ne retient que les 3 essais randomisés, le port du masque ne semble pas efficace pour prévenir la diffusion de la grippe (Figure 12.g). En revanche, si l'ensemble des études (étude de cohorte et cas-contrôle) traitant de l'intérêt du port du masque sont prises en compte, le port du masque semble être significativement efficace en prévention (N : 1736 ; OR : 0,41 ; CI 0,18-0,92).(24)

Une étude récente a élargi la question à l'ensemble des virus respiratoires au sens large (dont le SARS-Cov2) et montre une réduction significative des contaminations si port du masque (effet préventif) (Figure 13). Cet effet protecteur est également retrouvé sur les analyses de sous-groupe entre les professionnels de santé ($p < 10^{-5}$) et les non professionnels de santé ($p : 0.002$). (25)

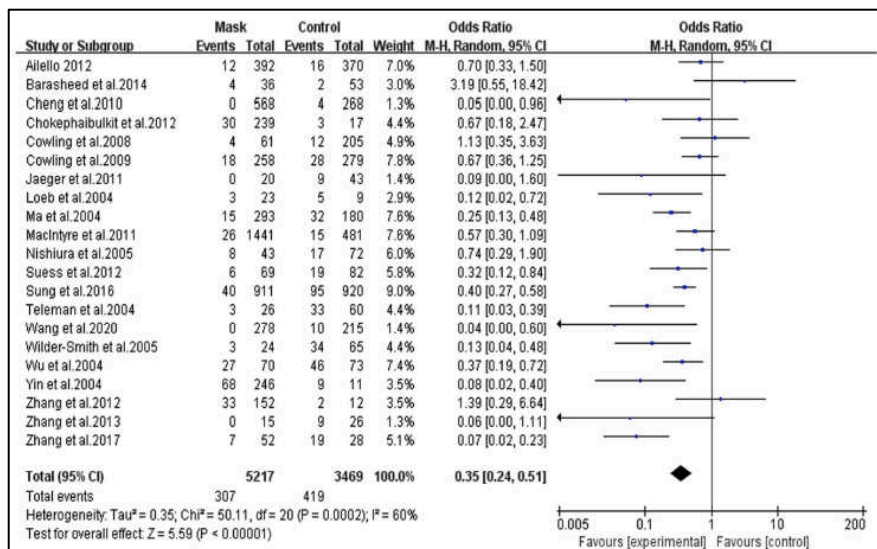


Figure 13. Forest-plot de résultats de méta-analyse sur le port du masque et le risque de transmission de virus respiratoires.

3. Anatomie et Immunologie pulmonaire

3.1. Appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est composé des voies aériennes supérieures et inférieures, du parenchyme pulmonaire et des muscles respiratoires (diaphragme et muscles respiratoires accessoires). Nous ne traiterons dans ce chapitre uniquement de l'anatomie des voies aériennes et du parenchyme pulmonaire.

3.1.1. Anatomie des voies aériennes

Les voies aériennes supérieures (Figure 14) associent les fosses nasales du rhino, oro et hypopharynx et le larynx jusqu'aux cordes vocales. Elles permettent l'écoulement de l'air inhalé vers la trachée en assurant l'humidification et le réchauffement de l'air extérieur. Du fait de la présence de cils, notamment au niveau des fosses nasales, elles assurent la première ligne de défense avec un rôle de barrière mécanique. Elles ont également des fonctions extra respiratoires : goût, olfaction, phonation, déglutition.

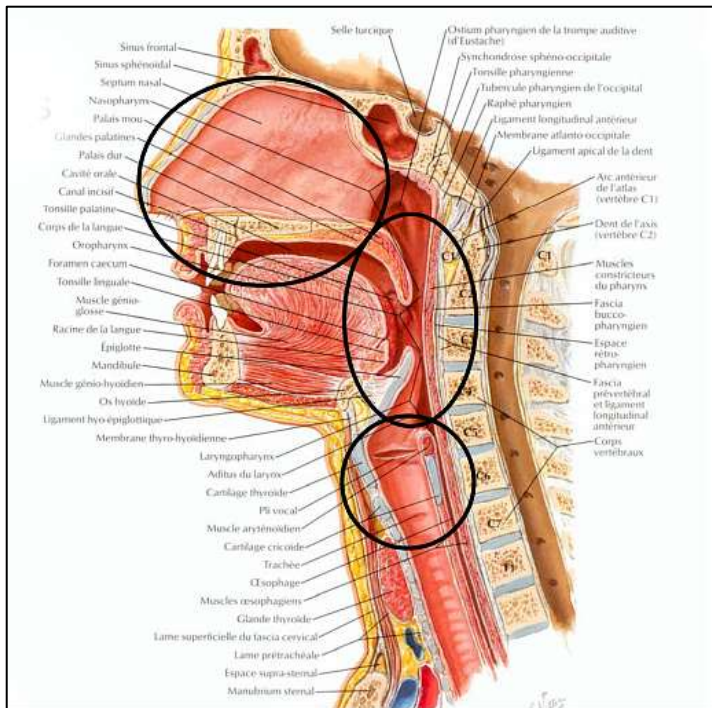


Figure 14. Anatomie des voies aériennes supérieures (fosse nasale, rhino-oro-hypopharynx, larynx).

Les voies aériennes inférieures comprennent la trachée (génération 0), les troncs bronchiques souches droit et gauche (génération 1) et proximaux puis l'ensemble des subdivisions bronchiques jusqu'aux bronchioles terminales (Figure 15 et 16). Les bronches des troncs souches à la 16^{ème} division assurent la conduction de l'air inhalé, puis la 17^{ème} à la 19^{ème} division correspondent à la zone de transition où la propagation des gaz est mixte (convection et diffusion) (bronchioles dites respiratoires) puis la zone respiratoire où s'effectuent les échanges gazeux avec les canaux alvéolaires et les alvéoles.

Histologiquement, les bronches (Figure 17) contiennent du cartilage jusqu'à la 7-8^{ème} division puis les bronchioles en sont dépourvues. L'épithélium respiratoire de surface, depuis la trachée jusqu'aux bronchioles (Figure 17), est pseudo stratifié : toutes les cellules sont ancrées à la lame basale, mais seules certaines d'entre elles s'allongent jusqu'à la lumière bronchique. Cet épithélium est principalement constitué de cellules basales, ciliées, mucosécrétrices, neuroendocrines et intermédiaires, avec un réseau de glandes sous-muqueuses contenant des cellules sécrétrices muqueuses et séreuses. L'épithélium respiratoire bordant les bronchioles les plus proximales est également pseudo stratifié et comprend quelques rares

cellules basales, des cellules ciliées et des cellules sécrétrices non ciliées de Clara, tandis que les bronchioles les plus distales sont bordées par un épithélium monostratifié dépourvu de cellules basales.

Les cellules ciliées sont des cellules cylindriques hautes de 0,04 à 0,06 mm dans les grosses bronches, un peu plus basses dans les petites bronches. Leur pôle superficiel porte un mince plateau cuticulaire que surmontent les cils et qui est intimement soudé au plateau des cellules voisines, en sorte que l'ensemble forme une cuticule générale assurant une liaison solide entre les cellules qui, lorsqu'elles desquament, le font par paquets. Au-dessus de la cuticule se dressent les cils vibratiles (5 à 7 μ m de hauteur).

Entre les cellules ciliées se trouvent des cellules caliciformes dont le pôle superficiel contient de nombreuses vacuoles de mucus épais, visqueux.

Les cellules basales forment une assise régulière sous les cellules précédentes ; ces cellules sont des éléments germinatifs.

La membrane basale, ou vitrée, limite l'épithélium. C'est une formation hyaline contenant des fibres réticulées et, au niveau de la trachée, des fibres collagènes. La figure 18 résume la composition et les différences des épithélium bronchique, bronchiolaire et alvéolaire. (26)

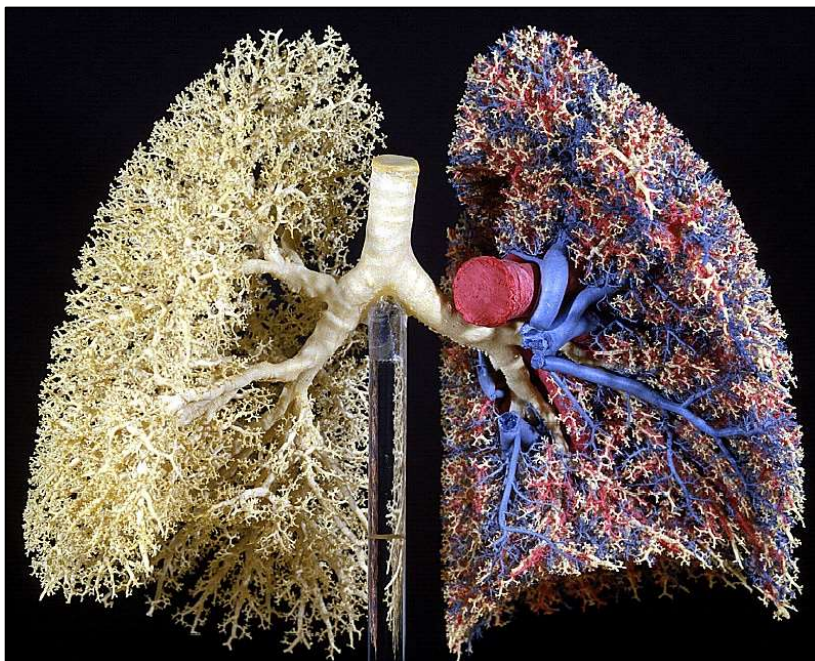


Figure 15. Moulage de l'arbre respiratoire illustrant les divisions bronchiques (blanc), la vascularisation fonctionnelle artérielle pulmonaire (rouge), le retour veineux pulmonaire (bleu). E. R. Weibel, Université de Berne.

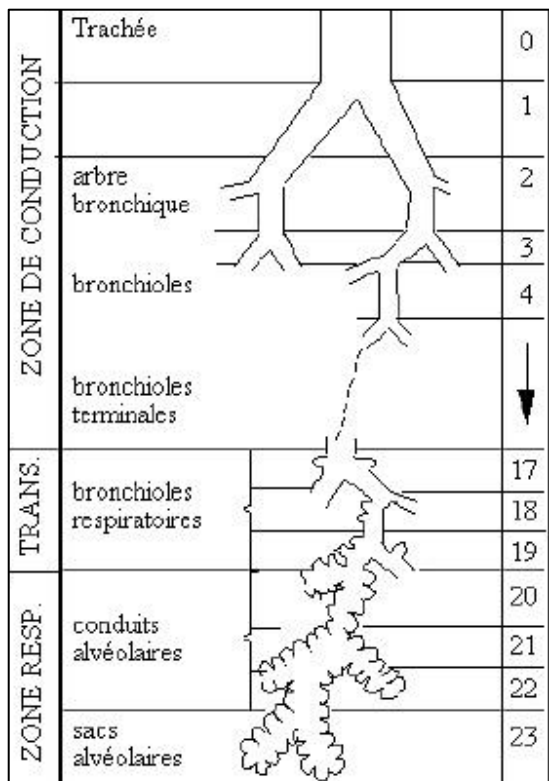


Figure 16. Schéma des divisions bronchiques. Préfault Ch. L'essentiel en physiologie respiratoire, Sauramps médical, 1986

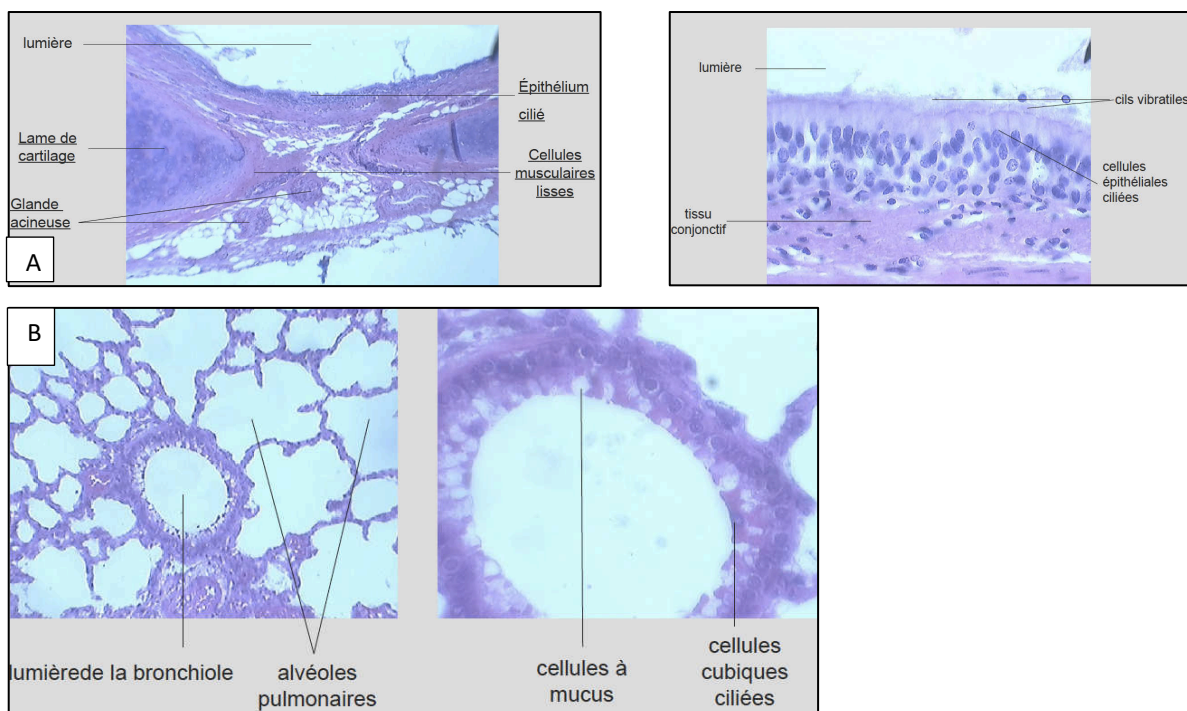


Figure 17. A. Coupe histologique d'une bronche (X40) et zoom sur l'épithélium (X400).

B. Coupe histologique d'une bronchiole (X100) au sein d'alvéoles et zoom sur l'épithélium bronchiolaire (X400).

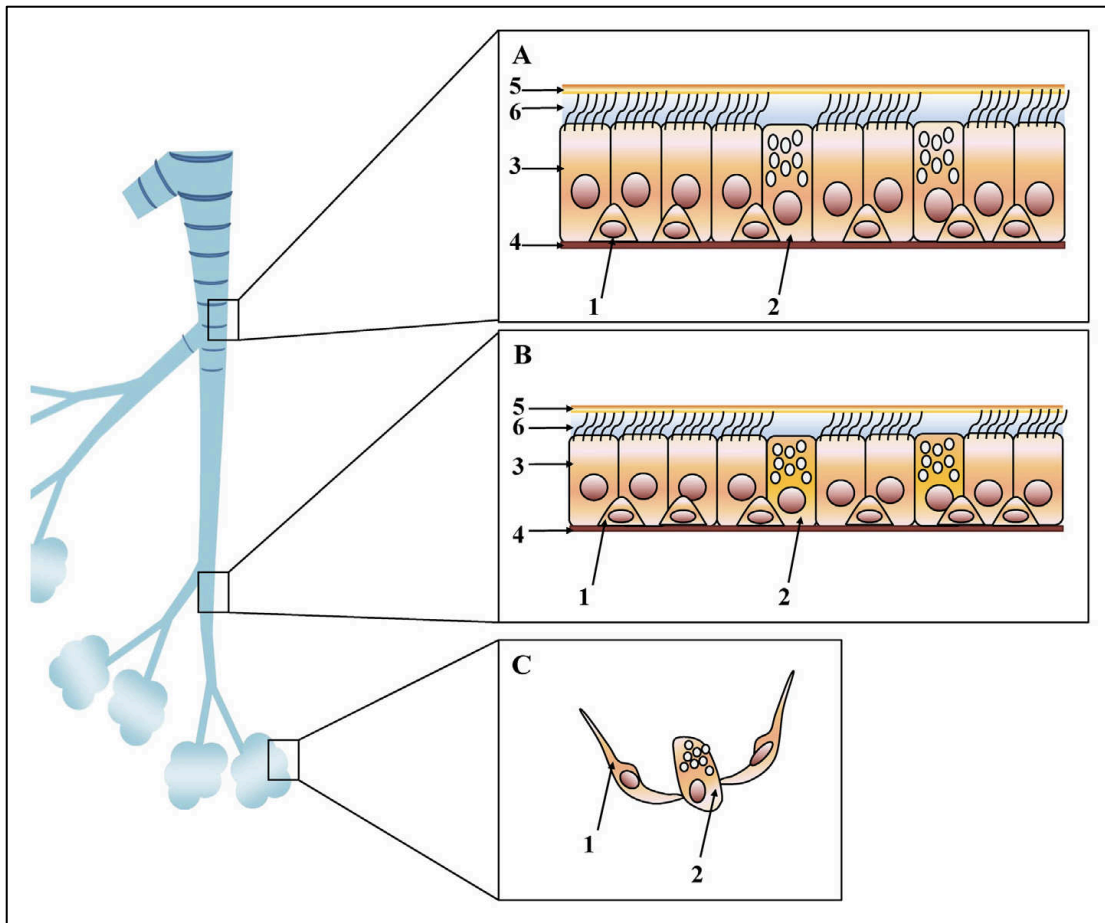


Figure 18. Structure de l'épithélium des voies respiratoires. (26)

- A. L'épithélium bronchique est constitué de cellules basales (1), de cellules caliciformes (2) et de cellules ciliées (3) reposant sur une membrane basale (4). Le mucus bordant cet épithélium est composé de 2 phases : phase gel (5) superficielle et phase sol (6) plus fluide où baignent les cils.
- B. Les bronchioles sans cartilage ni glande présentent un épithélium constitué de cellules basales (1), de cellules sécrétrices non ciliées (cellules de Clara) (2) et de cellules ciliées (3).
- C. L'épithélium alvéolaire est constitué des pneumocytes de type I (1) et de type II (2).

3.1.2. Parenchyme pulmonaire

Le parenchyme pulmonaire est la zone finale de diffusion des gaz et des échanges gazeux. Il est constitué d'alvéoles (Figure 18). L'atrium est l'extrémité d'un canal alvéolaire au niveau de laquelle s'abouchent 2 à 3 sacs alvéolaires. Le sac alvéolaire est une zone dilatée sur laquelle s'ouvrent de nombreuses alvéoles juxtaposées. Ces 2 éléments correspondent à l'extrémité

borgne des canaux alvéolaires. En sus de cet orifice principal, il existe des communications interalvéolaires supplémentaires par des pores ou canaux : pore de Kohn fait communiquer deux alvéoles contiguës et le pore de Lambert, qui relie une alvéole à un conduit mitoyen. Ces communications supplémentaires permettent une ventilation collatérale, au sein d'un même lobule car les parois inter-lobulaires épaisses n'autorisent pas la formation de pores. La ventilation collatérale préserve partiellement la fonctionnalité des alvéoles desservies par un conduit qui serait obstrué. Par contre, elle présente aussi un inconvénient : elle favorise la dissémination au sein d'un lobule de processus pathologiques qu'ils soient infectieux ou cancéreux. Un adulte dispose en moyenne de 280 à 300 millions d'alvéoles (surface totale estimée à 80m²).

L'épithélium alvéolaire simple et pavimenteux est constitué de 2 types cellulaires. Le pneumocyte 1, qui sont des cellules pavimenteuses représentant 40% des cellules épithéliales mais recouvrant 90% de la surface alvéolaire totale. Ils développent une très grande surface cellulaire. Leur cytoplasme aplati permet d'assurer une diffusion passive rapide alvéolo-capillaire. Les pneumocytes 2 sont des cellules cubiques, sans extension cytoplasmique, enchâssées entre les pneumocytes 1. Elles assurent la synthèse des protéines du surfactant et servent de cellule souche de l'épithélium alvéolaire. Lors de la destruction de cet épithélium fragile, la ré-épithélisation commence par une prolifération des pneumocytes 2, dont certains se différencieront en pneumocytes 1.

Le réseau capillaire pulmonaire constitue la zone fonctionnelle (anatomo-histologique) de la circulation pulmonaire où s'effectue l'hématose. Constituant le versant sanguin de l'échangeur, il est un composant majeur de l'interstitium. La barrière alvéolo-capillaire (Figure 19) est la zone fonctionnelle réelle où s'effectue l'échange des gaz respiratoires par diffusion passive : siège de l'hématose. La structure histologique de la barrière alvéolo-capillaire est donc constituée par le cytoplasme des pneumocytes 1, la lame basale commune et des extensions cytoplasmiques des cellules endothéliales. Son épaisseur est comprise entre 0,2 et 0,5µm.

Les caractéristiques élastiques du poumon découlent de la structure du parenchyme, qui est constitué essentiellement par l'interstitium composé d'un tissu conjonctif élastique très vascularisé. Les propriétés de ce tissu conjonctif (élastine et collagène) seront utiles en

microscopie 2-photon car elles sont détectables par génération d'une seconde harmonique, comme nous le décrivons ultérieurement.

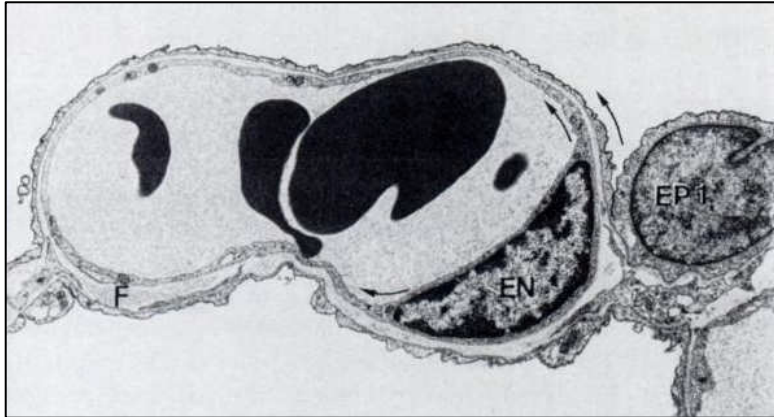


Figure 19. Barrière alvéolo-capillaire (EP1 : pneumocytes 1, EN : cellules endothéliales, Flèche : extensions cytoplasmiques de EP1, F : interstitium). (27)

3.1.3. Particularités de l'appareil respiratoire de la souris

L'appareil respiratoire de la souris a quelques spécificités notamment anatomiques. Il débute par le rhinarium, se poursuit par la trachée puis l'arbre bronchique allant des bronches souches droites et gauche aux sacs alvéolaires. Le poumon de la souris est composé du poumon gauche constitué d'un seul lobe et du poumon droit constitué de 4 lobes.

Sur le plan histologique, l'épithélium respiratoire est comparable à l'épithélium humain avec un épithélium pseudostratifié au niveau bronchique, monostratifié au niveau bronchiolaire et l'épithélium alvéolaire est constitué de pneumocytes I et II.

3.2. Immunité

Comme décrit précédemment, le rôle premier de l'appareil respiratoire est d'assurer les échanges gazeux, et de ce fait il est une porte d'entrée grande ouverte sur l'extérieur y compris pour les polluants et les pathogènes. Il doit donc être doté d'un système de surveillance et de protection adapté avec une composante mécanique (barrière et tapis mucociliaire) et une composante immune. Cette veille immunitaire permet le maintien d'un équilibre subtil entre tolérance (identification d'un antigène sans mise en œuvre

d'inflammation permettant une préservation de la physiologie et de l'intégrité respiratoire) et réaction immune adaptée proportionnée et régulée (mise en œuvre d'une réaction immunitaire destinée à combattre activement et le plus efficacement possible un agent infectieux).

L'immunité peut être globalement divisée en 2 :

-Immunité innée est une réponse immédiate qui survient chez tout individu de manière non spécifique aux pathogènes. Elle constitue la première ligne de défense vis-à-vis de divers agents pathogènes, basée sur les barrières mécaniques, des acteurs biochimiques (cytokines, compléments...) et cellulaires (macrophages, monocytes, polynucléaires).

-Immunité adaptative est une réponse différée découlant de la reconnaissance du pathogène et de leur présentation aux lymphocytes T naïfs. Cette interaction entraîne leur prolifération et leur différenciation en lymphocytes B et T effecteurs.

Le chapitre ci-dessous traitera exclusivement des acteurs de l'immunité innée.

3.2.1. Physiologique

3.2.1.1. Mécanique

La 1^{ère} ligne de défense de l'arbre respiratoire est ciliaire et ce dès les voies aériennes supérieures, où sont retenues les particules >10 μ m et expulsées lors du mouchage ou éternuement. Les particules de 5 à 10 μ m parviennent au niveau des voies aériennes inférieures et leur élimination dépend de l'escalator mucociliaire. Les cellules caliciformes au niveau bronchique et cellules de Clara au niveau bronchiolaire produisent le mucus, dont le rôle est d'emprisonner les « impuretés ». Ces cellules jouent également un rôle antibactérien par la sécrétion de lysozyme, lactoferrine...(28)

Les cellules ciliées sont les cellules épithéliales les plus nombreuses présentant à leur pôle apical une différenciation ciliaire. Les cils sont composés de protéines structurelles uniques (dynéines) et des protéines motrices produisant un mouvement unidirectionnel coordonné indispensable pour l'efficacité de la clairance mucociliaire (Figure 20). Une pathologie touchant la clairance mucociliaire (mucoviscidose impactant la composition du mucus, dyskinésie ciliaire impactant la mobilité ciliaire) expose à un risque accrue d'infection respiratoire.

Une autre composante de la défense mécanique provient des complexes jonctionnels intercellulaires assurant l'étanchéité de l'épithélium (Figure 21). Les jonctions serrées sont composées de protéines membranaires type claudines, occludines, mais également de nombreuses protéines membranaires périphériques, tel que zonula occludens (ZO) (29).

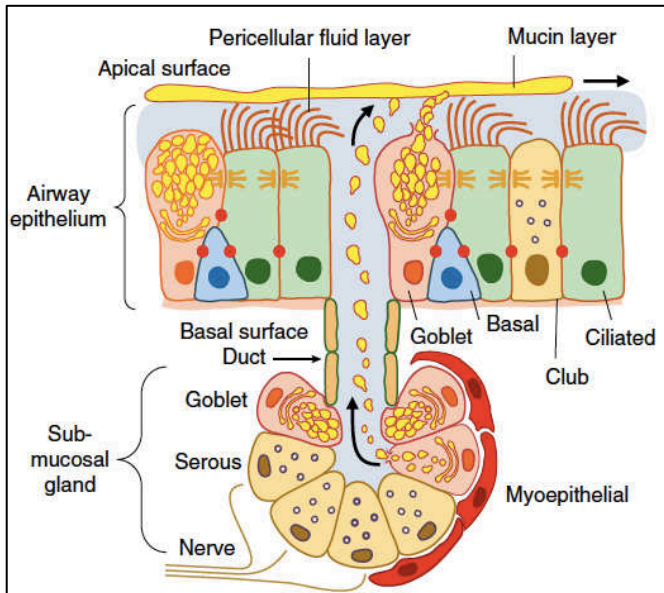


Figure 20. Schéma représentant les composantes muqueuses et sous muqueuses de la mise en œuvre de la clairance mucociliaire.(28)

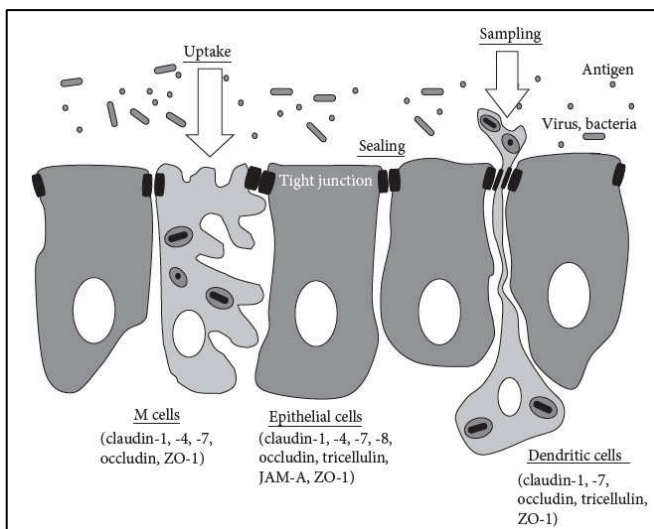


Figure 21. Schéma représentant les jonctions intercellulaires au niveau de l'épithélium respiratoire. (29)

3.2.1.2. Cellules épithéliales

Les cellules épithéliales bronchiques participent à la défense mécanique. Même si ce ne sont pas des cellules immunitaires *stricto sensu*, les cellules épithéliales alvéolaires notamment les pneumocytes 1 sont les premières cellules participant à la veille immunologique. Elles sont dotées de récepteurs type pattern-recognition receptors (PRR) tel que les Toll-Like receptors (TLR). Ces récepteurs leur permettent de reconnaître des molécules de « dangers » PAMP (pathogen-associated molecular pattern) et de produire certaines chimiokines et cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, RANTES....) via l'activation du facteur de transcription NF-KB stimulant ainsi le recrutement des monocytes et polynucléaires neutrophiles.(30)

3.2.1.3. Cellules immunitaires innées pulmonaires (dont les différences Homme/Souris)

La défense mécanique et cellulaire épithéliale, précédemment évoquée, est le premier rempart contre les contaminants extérieurs, toutefois elle peut être mise en défaut notamment par les particules de petites tailles (virus, polluants,...); elle doit donc être complétée par une défense cellulaire assurant une veille immunologique reposant sur les composantes cellulaires de l'immunité non spécifique innée en activant la réponse immunitaire adaptative ou non selon la menace. L'immunité innée assure également un rôle de protection en assurant un état basal prévenant ainsi l'épithélium d'une inflammation excessive et en régulant l'activation de la réponse adaptative (Figure 22). (30)

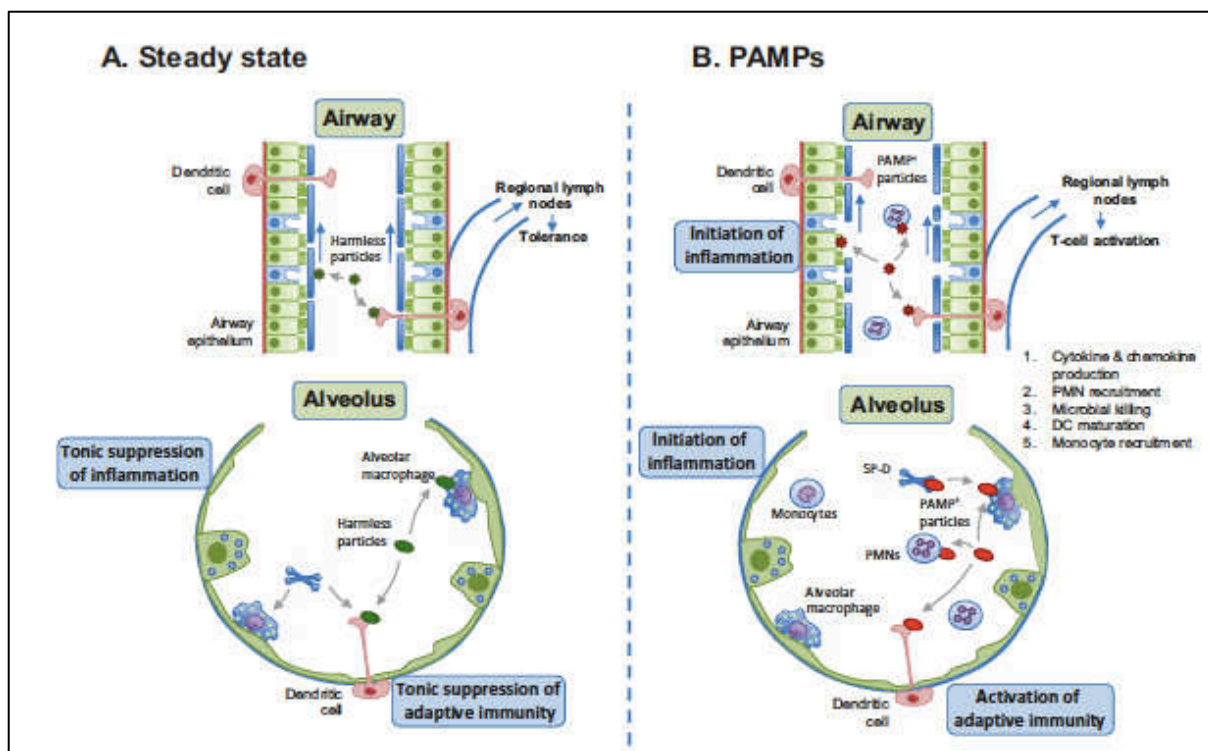


Figure 22. Synthèse générale du rôle de l'immunité innée soit en assurant une homéostasie basale soit en stimulant les acteurs immunitaires et inflammatoires de l'immunité innée et adaptative en cas d'infection. (30)

3.2.1.3.1. Cellules résidentes du poumon

3.2.1.3.1.1. Macrophage alvéolaire et interstitiel

Les macrophages mesurent 15-50 μm de diamètre. Ils sont globalement divisés en 2 catégories : macrophages interstitiels (MI) et macrophages alvéolaires (MA).

Les MI résident au sein du parenchyme pulmonaires (CD11b+, CD11c-). Ils ont une fonction régulatrice et produisent de forte concentration d'IL-10 (31,32). La famille des MI s'est étoffée depuis la découverte de plusieurs sous population de MI au sein de plusieurs organes (peau, tube digestif) présent dans le compartiment extravasculaire essentiellement au niveau de l'interstitium bronchique et non alvéolaire. Ces populations de MI ont un profil transcriptomique différent incitant à envisager des fonctions différentes. Leur profil moléculaire semble assez similaire quel que soit l'organe étudié contrairement aux macrophages spécifiques d'organe (MA, microglie, Langerhans, Kupffer ...) (33).

Les MA (CD11b low, CD11c+, CD206, CD169) sont présents au niveau des voies aériennes et exercent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie immunitaire pulmonaire et de

la défense de l'hôte, du fait de sa localisation à l'interface entre l'épithélium pulmonaire et l'environnement extérieur.

Après avoir envisagé que les MA proviennent de monocytes circulants, il a été démontré à l'instar de la microglie cérébrale, des cellules de Kupffer hépatiques, que les MA étaient une entité cellulaire propre. Ils proviennent de la colonisation alvéolaire en *post-partum* immédiate d'une différenciation de monocytes sous la dépendance de la production de GM-CSF par les pneumocytes II. Il semble que le TGF β participe au renouvellement des MA.(34). Toutefois, une question reste sans réponse formelle : la pérennisation des MA dérive-elle d'une seule vague de différenciation de monocytes circulants en période post-natale puis d'une prolifération locale et/ou du recrutement de MA dérivés de la différenciation de monocytes médullaires ? (Figure 23). (34,35)

Les fonctions principales des MA sont (30–32):

- « Éboueurs » du poumon en phagocytant les particules inhalées de l'environnement, les pollens, les polluants...
- Recyclage et homéostasie du surfactant en catabolisant les protéines du surfactant.
- Phagocytose et cellule présentatrice de l'antigène.
- Réguler et proportionner la réponse inflammatoire et immune (Il-10).

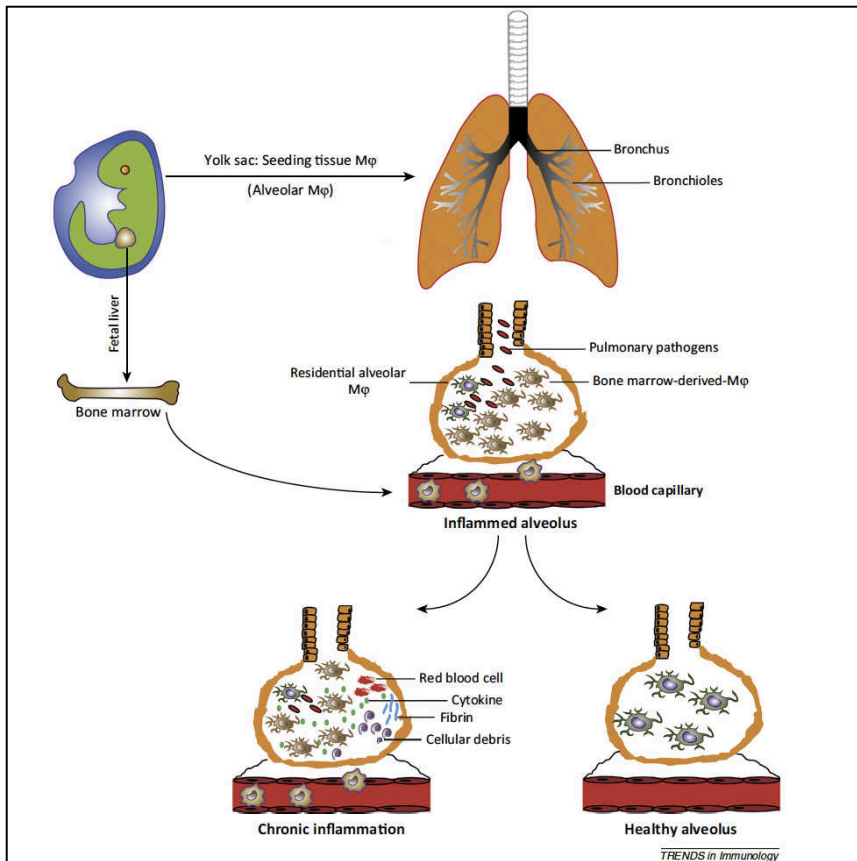


Figure 23. Schéma représentant l'origine des MA. (35)

3.2.1.3.1.2. Cellules dendritiques (CD)

Découvertes par Paul Langerhans en 1868, ce n'est qu'en 1998 que le rôle des CD comme la cellule présentatrice de l'antigène n'a été défini. La CD est devenue un groupe de plusieurs sous-unités cellulaires avec des différenciations et fonctions différentes selon leur compartiment d'action au niveau de l'appareil respiratoire (36) (Figure 24 et 25).

DC subsets	CD11c	CD11b	MHC II	B220	GR-1	CD4	CD8	DEC-205
Airway DC	+++	—	++	—	—	—	—	++
Interstitial DC	+++	+++	++	—	—	—	—	+
Alveolar DC	+++	—	++	—	—	—	—	++
Plasmacytoid DC	++	—	+	++	+	+/-	+/-	—
Precursor DC	+++	—	—	—	nd	—	—	nd

nd = not determined

Figure 24. caractéristique phénotypiques des sous-types de CD pulmonaire murine.(37)

DC type	Mouse [5, 48, 71–74]	Human [8, 65, 69, 75, 76]	
Myeloid (mDC)	CD11c ⁺ , MHCII ⁺ , CD11b ⁺	DC1	CD11c ⁺ , HLA-DR ⁺ , BDCA-1 ⁺
		DC2	CD11c ⁺ , HLA-DR ⁺ , BDCA-3 ⁺
Plasmacytoid (pDC)	CD11c ^{low} , MHCII ^{low} , CD11b ⁻ , 120G8 ⁺ , Gr-1 (Ly6G/C) ⁺ , B220 ⁺	CD11c ⁻ , HLA-DR ⁺ , BDCA-2 ⁺ , CD123 ⁺	

Figure 25. Comparaison des marqueurs de différenciation des CD myéloïdes et plasmacytoïdes humains et murins.

Les CD sont présentes tout au long de l'appareil respiratoire : voies aériennes supérieures, inférieures, plèvre, espace interstitiel. Elles sont à l'affût de tout agent extérieur inerte ou pathogène, régulant le degré de stimulation des CD en terme de maturation, migration et activation de la réponse immune adaptative. Une substance inerte sans réaction inflammatoire n'entraîne pas de maturation des CD. Une inflammation et/ou un agent pathogène reconnu par les PRR conduit à l'activation et maturation des CD. Les PRR sont variables selon le sous-type de CD, chacune étant ainsi spécialisée dans la reconnaissance de certaines classes de pathogènes. Les CD peuvent maturer sous l'effet des cytokines mais également directement par reconnaissance d'un agent pathogène.

Après maturation, la CD acquiert la capacité de migration de son compartiment pulmonaire vers le relai ganglionnaire de drainage suivant un gradient de chimiokines pour y présenter l'antigène aux lymphocytes T naïfs (Figure 26) (38). La maturation des CD pourrait être régulée négativement par les MA via la synthèse de NO (monoxyde d'azote). (36,37).

La différenciation lymphocytaire est dépendante de l'antigène « inerte » présenté par la CD au lymphocyte T naïf pouvant aboutir à différents lymphocytes T effecteurs ou régulateurs. (Figure 27)(38)

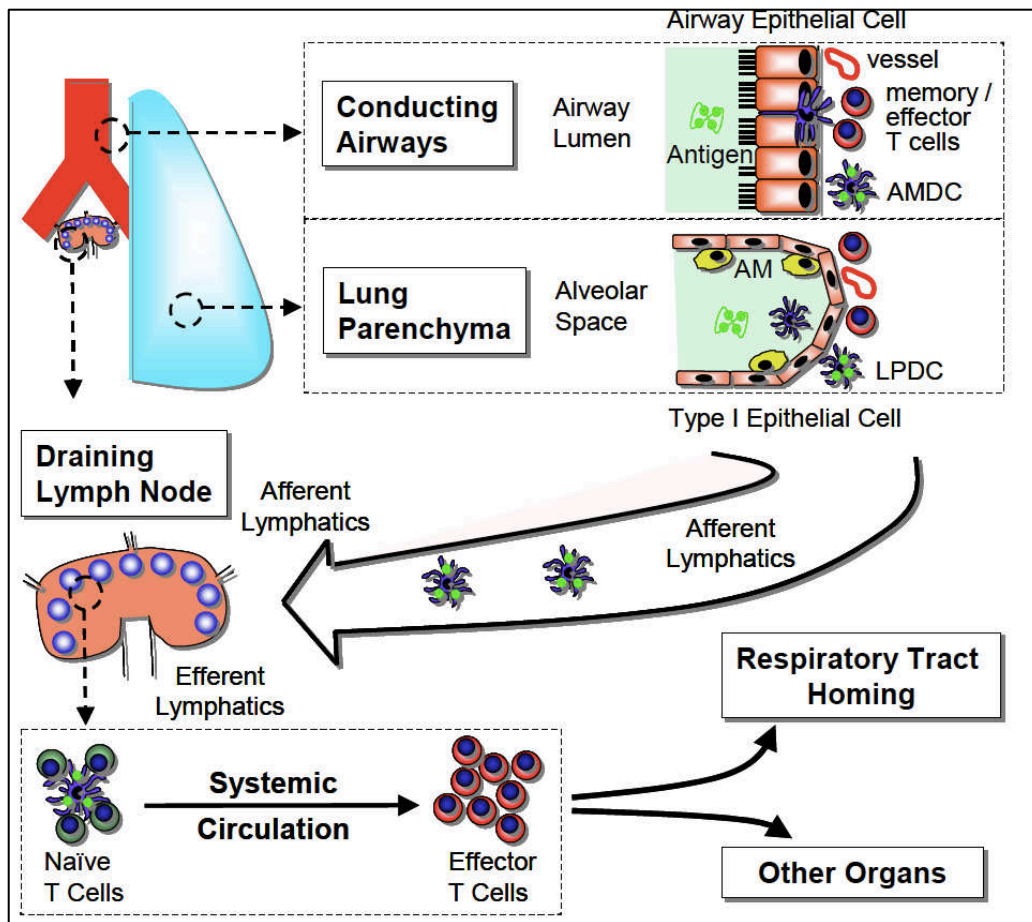


Figure 26. Compartimentation de l'action des CD.(38)

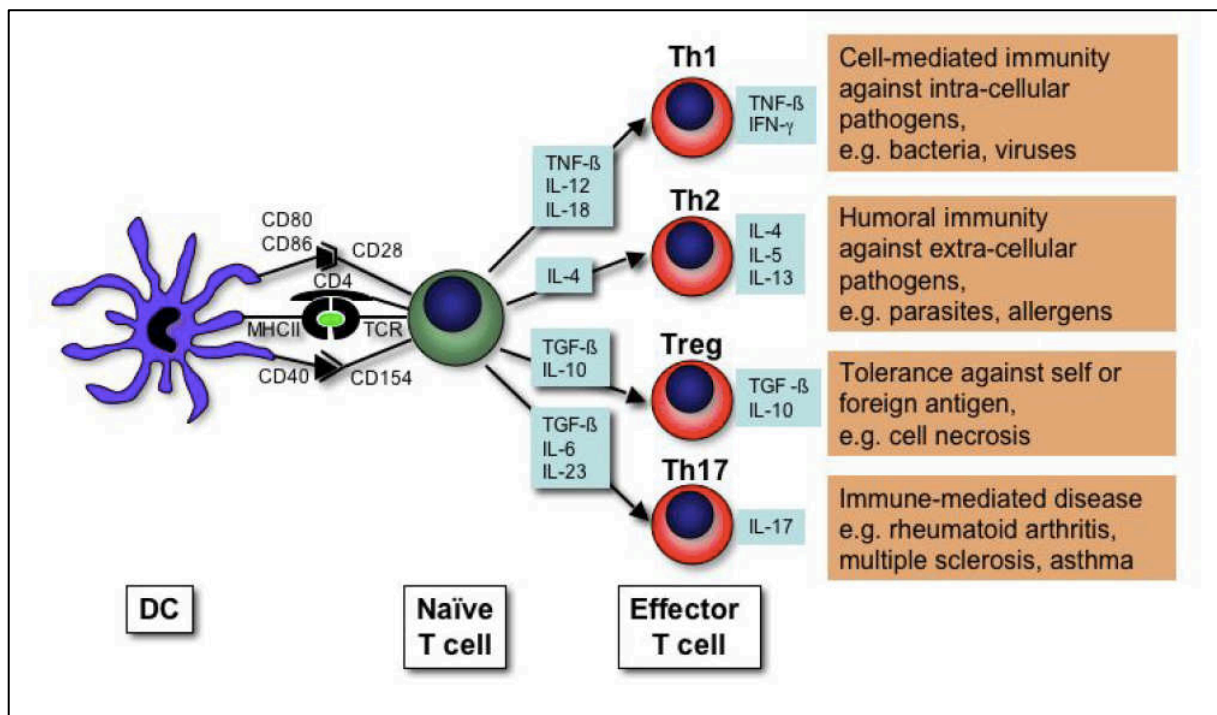


Figure 27. Impact de la présentation de l'antigène par la CD au lymphocyte T naïf sur l'induction de lymphocyte T effecteurs ou régulateur selon l'antigène présenté. (38)

3.2.1.3.2. Cellules recrutées en conditions infectieuses/inflammatoires

3.2.1.3.2.1. Monocytes

A l'état basal, les monocytes sont classiquement absents de l'appareil respiratoire. Les monocytes circulants ont la capacité de migrer dans un tissu « agressé » et se différencier en macrophages. Ces monocytes ainsi recrutés acquièrent une fonctionnalité pro-inflammatoire, de destruction de l'agent pathogène via les dérivés réactifs de l'oxygène (O_2^-) et de l'azote ainsi que la production de cytokines amplifiant la réaction inflammatoire. Le panel des cytokines du microenvironnement conditionnent la différenciation et les fonctionnalités de ces macrophages dérivés des monocytes (30). Rodero et col ont montré en imagerie intravitale de poumons de souris, dérivant du croisement de plusieurs modèles murins (permettant ainsi de préciser les types cellulaires observés) que les monocytes sans différenciation macrophagique participaient à l'état basal à la veille immunitaire physiologique, en circulant dans le poumon principalement au niveau du compartiment vasculaire pouvant ainsi interagir rapidement, si agression, avec le microenvironnement à partir de la circulation sanguine (figure 81) (39). Jakubzick et col ont montré que ces monocytes ne participent pas constamment au renouvellement des macrophages résidents mais peuvent avoir une fonction macrophagique-like sans en acquérir la différenciation moléculaire (40).

3.2.1.3.2.2. Polynucléaires neutrophiles (PNN)

Les PNN sont la sous-unité leucocytaire circulante la plus abondante, sensible au moindre signe de danger (PAMP, DAMP, chimiokines, cytokines...) induisant un recrutement rapide dans le tissu. Ils agissent soit en phagocytant le pathogène soit en produisant des dérivés réactifs de l'oxygène. Ils peuvent également contenir l'infection par immobilisation du pathogène par le relargage du Neutrophil Extracellular Traps (NET) composé d'ADN décondensé, d'histones, d'élastases de myelopéroxydases. (30,32)

3.2.1.3.3. Particularités de la souris

Les cellules de l'immunité innée présentes dans le poumon de souris sont identiques à celles de l'Homme. Toutefois il existe quelques particularités, notamment au niveau des marqueurs de membranes permettant de repérer les différents types cellulaires (Figure 28). (41)

Chez la souris, MA et MI expriment le F4/80, marqueur caractéristique de monocytes et macrophages et se distinguent phénotypiquement sur la base de l'expression d'autres marqueurs, avec également la description de plusieurs sous population de MI (33). Les MA se caractérisent également par leur expression de SiglecF.

	Marker	Eosinophils	Neutrophils	Plasmacytoid DCs	CD103 ⁺ DCs	CD11b ⁺ DCs	AM	IM	Ly6C ⁺ Mo/MΦ	Ly6C ⁻ Mo/MΦ
1	CD45	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	CD11b	+	+	-	-	+	-	+	+	+
3	CD11c	-	-	±	+	+	+	+	-	±
4	CD24	+	+	+	+	+	-	-	-	-
5	CD64	-	-	-	-	-	+	+	±	±
6	Ly6C	-	±	+	-	±	-	-	+	-
7	MHC II	-	-	±	+	+	±	+	-	-
8	CD14	-	-	NT	-	±	±	+	-	-
9	CD36	-	-	NT	+	±	+	+	±	-
10	CD103	-	-	-	+	-	-	-	-	-
11	CD206	-	-	-	-	±	+	±	-	-
12	Siglec F	+	-	-	-	-	+	-	-	-
13	Ly6G	-	+	-	-	-	-	-	-	-
14	F4/80	+	-	-	-	±	+	+	+	+
15	PDCA-1	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Definition of abbreviations: AM, alveolar macrophages; DCs, dendritic cells; IM, interstitial macrophages; Mo, monocytes; MΦ, alveolar macrophages; MHC II, major histocompatibility complex class II; NT, not tested.

Symbols indicate the expression of a given marker. +, high expression; ±, low or intermediate expression; -, absence of expression. For a more differentiated assessment of expression, see Figure E2 in the online supplement. The minimal set of surface markers required for the accurate identification of macrophages and DCs in the mouse lung is shown in **boldface**.

Figure 28. Marqueurs membranaires permettant de préciser le phénotype des cellules myéloïdes du poumon de souris à l'état basal.(41)

4. Grippe et Poumon

4.1. Modèles animaux et étude la grippe

Les modèles *in vitro* et *in silico* ne peuvent en aucun cas reproduire la complexité de la physiopathologie et des interactions immunologiques secondaires à une infection virale chez l'humain. Il semble donc primordial pour comprendre toutes les étapes de la pathogénèse de l'infection à *Influenzavirus* et envisager les futures stratégies thérapeutiques ou vaccinales d'avoir recours en pré clinique aux modèles animaux, dans le respect des directives européennes sur l'éthique, l'expérimentation et le bien-être animal.

4.1.1. Modèle souris

La souris est un modèle fréquemment utilisé en recherche virologique, pour son coût abordable, sa petite taille permettant des manipulations facilitées et la multitude de fonds génétiques « wild-type » et modifications génétiques (knock-out...) possibles.

Les virus influenza humains ne sont pas pathogènes pour la souris (dont les fonds génétiques les plus utilisés sont BALB/c et C57BL/6). Pour être infectant chez la souris, *Influenzavirus* a dû être adapté par passages successifs à partir de la souche humaine aboutissant après 332 passages à la souche A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8), souche la plus utilisée en expérimentation animale sur le sujet Grippe. D'autres souches ont été obtenues par le même procédé : A/WSN/1933 (WSN), B/Lee/1940. (42)

La symptomatologie clinique présentée par la souris après inoculation du virus de la grippe est marquée par une hypothermie, une asthénie majeure avec prostration, un refus de s'alimenter aboutissant à une perte pondérale parfois importante posant parfois une problématique éthique à l'expérimentation (point limite) et une respiration difficile mimant les formes pulmonaires sévères de la maladie humaine.

La technique d'inoculation virale est importante car en dépendent la symptomatologie, la létalité et donc la dose à inoculer. Pour PR8, la dose létale 50 (BALB/C) est 6 fois supérieure si instillation directe en intranasale comparativement à l'aérosol, même si le titre viral dans le lavage nasal ou le broyat pulmonaire sont identiques quelle que soit la technique.

Le modèle souris n'est pas adapté à l'étude de la transmissibilité. En effet, PR8 est relativement peu transmissible entre souris au sein de la même cage (environ 5% de risque de contamination) avec un pic de transmissibilité entre souris infectées et souris « saines » dans les 24-48 heures post inoculation. (43)

En résumé, la souris est un modèle adapté à l'étude des conséquences physiopathologiques de la grippe de par sa maniabilité et sa physiologie immunitaire rendues possibles par l'adaptation, à cette espèce, des souches virales humaines.

4.1.2. Modèle furets

C'est le modèle historique. Le Furet est le premier animal à avoir été utilisé en recherche sur le virus de la grippe et conserve actuellement un intérêt majeur notamment dans le développement de vaccin.

Ce modèle a plusieurs avantages, qui en font un « gold standard » pour l'étude de la grippe :

- La symptomatologie grippale du furet s'apparente beaucoup à la grippe humaine.
- Les souches virales humaines ne nécessitent pas d'adaptation pour infecter le furet.
- Les caractéristiques du furet en termes de voies aériennes, d'éternuement, lui confèrent un intérêt pour l'étude de toutes les composantes de la maladie (transmission, clinique...).

Il a plusieurs inconvénients, qui limitent son utilisation : le coût, la taille des animaux plus contraignante que la souris, la nécessité d'équipements adaptés en terme d'habitat, la faible disponibilité des réactifs. De plus, les souches virales humaines étant pathogènes pour le furet, il peut être difficile d'obtenir des animaux naïfs de la grippe ; ce qui nécessite une rigueur extrême de protection dans leur condition de vie/transport afin d'éviter toute contamination grippale accidentelle. La transmissibilité entre animaux peut être un avantage si la transmission est l'objet de l'étude mais devient une contrainte si non et nécessite dans tous les cas une rigueur de manipulation, de séparation et d'habitat des animaux. L'ensemble de ces contraintes tend à limiter le nombre d'animaux utilisés pouvant impacter la nécessaire analyse de la variabilité et la puissance statistique, limitant donc la portée des conclusions obtenues.(42-44)

4.1.3. Autres modèles animaux

D'autres animaux ont été ou peuvent être utilisés dans les recherches sur la grippe.

Le cochon est un modèle intéressant : pathogénicité des souches virales, hôte intermédiaire, symptomatologie clinique similaire à l'humain, physiopathologie similaire mais beaucoup de contraintes limitent son utilisation : économique (coût important), logistique importante en termes de logement, d'alimentation et de superficie compte tenu de leur taille et éthique relative aux alternatives possible.(44)

Le cochon d'inde est un modèle récent mais la faible disponibilité des réactifs, l'absence de symptomatologie clinique post infection en limitent sa diffusion. Le cotton rat est probablement un modèle d'avenir car il peut être infecté avec des souches virales sans adaptation nécessaire, il a une symptomatologie clinique similaire à l'humain, son prix est compétitif et les réactifs d'analyses deviennent de plus en plus disponibles. Le hamster est également sensible aux souches virales humaines sans adaptation, mais supporte des titres viraux très élevés au niveau pulmonaire rendant difficilement extrapolable les conclusions, ce qui limite son utilisation.(42,44)

Compte tenu de leur proximité physiologique et génétique, les primates non humains sont assurément en théorie les meilleurs modèles animaux. Les considérations éthiques, leur coût, l'importante logistique en terme d'équipement et la nécessité des personnels très expérimentés en font le modèle le moins accessible. Même si le virus se réplique dans les voies aériennes de ces animaux, ils ne développent aucune symptomatologie. L'intérêt de ce modèle demeure dans l'étude des stratégie vaccinale ou thérapeutique avec une analyse biologique de la réaction immune la plus proche de celle des humains.(42,44)

4.1.4. Synthèse comparative entre les modèles

Les figures 29 et 30 résument les caractéristiques cliniques, les avantages et inconvénients de chaque modèle animal (furet, souris, cochon, primate non humain).

Le chercheur a donc à sa disposition une large variété de modèle animal. Il est donc de son choix de sélectionner le meilleur modèle selon des critères composites prenant en compte le

modèle le plus approprié pour répondre à la question posée et permettre des interprétations et conclusions pertinentes en intégrant également la résultante des avantages/inconvénients de chaque modèle ainsi que les considérations éthiques, budgétaires et d'équipements disponibles.(43,44)

Clinical Signs	Animal Model			
	Ferret	Mouse	Pig	Nonhuman Primates
Nasal discharge	YES	NOT OBSERVED	YES	YES
Coughing/ sneezing	YES (sneezing)	NOT OBSERVED	OCCASIONALLY - intensity varies with the strain -	YES - only upon infection with highly pathogenic viruses -
Malaise	YES	YES	NOT OBSERVED	YES
Fever	YES	NO - develop hypothermia -	OCCASIONALLY - intensity varies with the strain -	OCCASIONALLY - only upon infection with highly pathogenic viruses -
Anorexia - weight loss -	YES - more predominant for highly pathogenic viruses -	YES	MINOR	MINOR
Neurological complications	OCCASIONALLY - high path avian viruses -	OCCASIONALLY - high path avian viruses -	NOT OBSERVED	NOT OBSERVED
Hypercytopenia - cytokine storm -	YES - in some cases of highly virulent strains -	YES - upon infection with highly pathogenic viruses -	LIMITED	YES

Figure 29. Comparaison de la symptomatologie clinique selon le modèle animal. (44)

Species	Advantages	Disadvantages
Mice	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Small size ✓ Low cost (animals, housing) ✓ Homogeneous responses - inbred, pathogen free ✓ Availability of molecular biology/immunology reagents ✓ Pathology of viral pneumonia caused by highly pathogenic viruses (1918 H1N1, HPAI H5N1) similar to humans 	<ul style="list-style-type: none"> × Seasonal influenza virus strains need adaptation in order to achieve efficient replication and virulence × Respiratory tract anatomy and receptor distribution different from humans × Not suitable for study of live-attenuated vectored vaccines × Not suitable for transmission experiments
Ferret	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Respiratory tract anatomy and receptor distribution similar to humans ✓ Human-like clinical signs and pathology of disease ✓ Human and avian influenza virus isolates replicate without prior adaptation ✓ Suitable for transmission experiments 	<ul style="list-style-type: none"> × Limited availability of molecular biology/immunology reagents × Host response variability—genetically outbred × Need to confirm seronegativity to influenza × Systemic disease different than in humans × Genome not annotated × Practical considerations—use of high number of animals per group very expensive
Pig	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Human and avian influenza virus isolates replicate without prior adaptation ✓ Availability of molecular biology/immunology reagents 	<ul style="list-style-type: none"> × Host response variability—genetically outbred × Need to confirm seronegativity to influenza (maternal antibodies might be problematic) × Seem to mount an abnormal response in certain heterologous challenges, which has not been observed in humans or other species × Practical issues—big size, husbandry requirements
NHP	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Respiratory tract anatomy and receptor distribution similar to humans ✓ High similarity to the human immune system ✓ Susceptible to non-adapted human strains ✓ Broad availability of molecular biology/immunology reagents 	<ul style="list-style-type: none"> × Lack of clinical signs upon infection with seasonal strains × Host response variability—genetically outbred × Need to confirm seronegativity to influenza × Ethical concerns × Prohibitively expensive × Very experienced personnel and highly specific facilities needed × Variable degree of permissiveness for influenza virus infection and clinical signs

Figures 30. Synthèse comparative des avantages et inconvénients de différents modèles animaux pour l'exploration de la grippe.(44)

4.2. Orages cytokiniques

La définition de l'orage cytokinique n'est pas unanimement définie ; elle production massive de cytokines pro-inflammatoires, régulée ou non, résultant de multiples mécanismes infectieux ou non (45).

L'orage cytokinique pourrait être divisé en 2 phases : la production de cytokines induite directement par l'infection (cytokines primaires) et celle induite en aval par les cytokines primaires et les cellules de la réaction immune recrutées (cytokines secondaires).

Après avoir déjoué les barrières mécaniques de l'appareil respiratoire, *Influenzavirus* infecte les cellules épithéliales respiratoires. Le virus est phagocyté par les MA résidents conduisant à la vague de cytokines primaires. Cette production de cytokines a pour objectif d'initier une rapide cascade de réponses antivirales aboutissant à la production de cytokines/chimiokines par les cellules infectées et les cellules de l'immunité innée. Les cytokines/chimiokines produites, les cellules sécrétrices et leurs fonctions sont illustrées sur la figure 31.(45)

Dans ce paragraphe, nous décrivons le rôle des principales cytokines produites après une infection par *Influenzavirus*. (10,46,47)

Les principales cytokines primaires sont produites par les cellules épithéliales (interférons (Interférons (IFN-I et III), IL-1 β , TNF, IL-6, MCP-1) et les MA résidents (TNF, IFNs, IL-6, MCP-1, IP-10).

Les IFN-I (α/β) et -III ont pour objectif d'induire les conditions antivirales. Ils sont produits par divers types cellulaires (dont pneumocytes, MA, cellules dendritiques...). L'IFN-I se lie à son récepteur IFNAR aboutissant à la transcription de l'interferon-stimulated genes (ISG) dont le but est d'inhiber la réplication virale au niveau des cellules épithéliales. L'IFN-III se lie à son récepteur IFNLR et induit également une inhibition de la réplication. Les voies via IFN-I et -III permettent une action coordonnée mais indépendante l'une de l'autre afin d'activer la réponse immune et la clairance virale.

L'IL-1 β est produite par les CD, les MA résidents et les macrophages dérivées des monocytes. Il est indispensable à la phase initiale de l'infection par l'activation de la réponse CD8+, mais doit être rapidement régulé car sa pérennisation à la phase tardive de l'infection est corrélée à la mortalité et la survenue de dégâts tissulaires.

Le TNF- β peut être produit par divers types cellulaires (cellules épithéliales, MA résidents, CD). C'est la cytokine pro-inflammatoire par excellence en contribuant à l'intensité des symptômes avec un rôle plus limité dans le contrôle de la réplication virale. Il assure une perméabilité vasculaire afin de faciliter le recrutement cellulaire au site de l'infection.

L'IL-6 produite par les cellules épithéliales, endothéliales et les MA résidents est directement corrélée à la sévérité de l'infection grippale. L'IL-6 est indispensable à la limitation de l'extension de l'inflammation post infectieuse et favorise la clairance virale.

Le monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) est produit par les MA résidents et assure l'obtention d'un gradient de chimiokines recrutant les monocytes circulants et permettant leur différenciation en macrophages dérivés des monocytes.

En réaction à la vague cytokinique primaire en réponse directe à l'infection, la seconde vague de cytokines dites secondaires permet d'amplifier le recrutement cellulaire (polynucléaires neutrophiles, macrophages dérivés des monocytes, cellules NK). L'objectif de cette seconde vague est de parfaire la clairance virale, de réguler la réponse immune afin de limiter les dégâts au niveau du poumon et de débiter la restauration de ce dernier. Les principales cytokines produites durant cette seconde vague, en plus de celles de la 1^{ière} vague, sont : pro-inflammatoires telle que RANTES, IP-10, MIP-1 et anti-inflammatoires comme IL-10 et amphiréguline.

RANTES (CCL-5) est produit par les macrophages dérivés des monocytes et exerce une action chimiotactique permettant l'afflux de cellules NK et de monocytes circulants.

L'IP-10 (Interferon Inductible-10 ou CXCL-10) est une chimiokine produite par les monocytes et active les chimiokines dépendantes des IFN. Elle permet également le recrutement de macrophages dérivés des monocytes, de cellules NK et de Lymphocyte T.

Le macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1 α et 1 β ou CCL-3 et CCL-4) est produit par les monocytes, les polynucléaires neutrophiles, les CD et assure par chimiotactisme l'afflux de monocytes et le recrutement de macrophages dérivés des monocytes, de cellules NK et de lymphocytes T.

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire. Elle est synthétisée par les lymphocytes T régulateurs mais également d'autres types cellulaires tel que les CD, les macrophages, ... et réprime la synthèse des cytokines pro-inflammatoires. IL-10 semble jouer un rôle régulateur avec une temporalité importante (48).

L'amphiréguline est produite par les lymphocytes T reg et les T helper à la phase tardive de l'action dominante de l'immunité adaptative. Elle contribue à la réparation tissulaire et la restauration de l'homéostasie pulmonaire.

Mediator	Main Cell Source	Type and Function
Cytokines and growth factors		
Interleukin-1	Macrophages, epithelial cells; pyroptotic cells	Proinflammatory alarmin cytokine; pyrogenic function, macrophage and Th17 cell activation
Interleukin-2	T cells	Effector T-cell and regulatory T-cell growth factor
Interleukin-6	Macrophages, T cells, endothelial cells	Proinflammatory cytokine; pyrogenic function, increased antibody production, induction of acute-phase reactants
Interleukin-9	Th9 cells	Protection from helminth infections, activation of mast cells, association with type I interferon in Covid-19 ²⁶
Interleukin-10	Regulatory T cells, Th9 cells	Antiinflammatory cytokine; inhibition of Th1 cells and cytokine release
Interleukin-12	Dendritic cells, macrophages	Activation of the Th1 pathway; induction of interferon- γ from Th1 cells, CTLs, and NK cells; acting in synergy with interleukin-18
Interleukin-17	Th17 cells, NK cells, group 3 innate lymphoid cells	Promoting neutrophilic inflammation, protection from bacterial and fungal infections
Interleukin-18	Monocytes, macrophages, dendritic cells	Proinflammatory alarmin cytokine; activation of Th1 pathway, acting in synergy with interleukin-12
Interleukin-33	Macrophages, dendritic cells, mast cells, epithelial cells	Proinflammatory alarmin cytokine; amplification of Th1 and Th2 cells, activation of NK cells, CTLs, and mast cells
Interferon- γ	Th1 cells, CTLs, group 1 innate lymphoid cells, and NK cells	Proinflammatory cytokine; activation of macrophages
Tumor necrosis factor	Macrophages, T cells, NK cells, mast cells	Increasing vascular permeability; pyrogenic function
GM-CSF	Th17 cells	Proinflammatory cytokine
VEGF	Macrophages	Angiogenesis
Chemokines		
Interleukin-8 (CXCL8)	Macrophages, epithelial cells	Recruitment of neutrophils
MIG (CXCL9)	Monocytes, endothelial cells, keratinocytes	Interferon-inducible chemokine; recruitment of Th1 cells, NK cells, plasmacytoid dendritic cells
IP-10 (CXCL10)	Monocytes, endothelial cells, keratinocytes	Interferon-inducible chemokine; recruitment of macrophages, Th1 cells, NK cells
MCP-1 (CCL2)	Macrophages, dendritic cells, cardiac myocytes	Recruitment of Th2 cells, monocytes, dendritic cells, basophils
MIP-1 α (CCL3)	Monocytes, neutrophils, dendritic cells, NK cells, mast cells	Recruitment of macrophages, Th1 cells, NK cells, eosinophils, dendritic cells; pyrogenic function
MIP-1 β (CCL4)	Macrophages, neutrophils, endothelium	Recruitment of macrophages, Th1 cells, NK cells, dendritic cells
BLC (CXCL13)	B cells, follicular dendritic cells	Recruitment of B cells, CD4 T cells, dendritic cells [†]
Plasma proteins		
CRP	Hepatocytes	Monomeric CRP increases interleukin-8 and MCP-1 secretion; interleukin-6 increases CRP expression
Complement	Hepatocytes, other cells	Complement activation contributes to tissue damage in cytokine storm; complement inhibition can reduce immunopathologic effects of cytokine storm
Ferritin	Ubiquitous	Primary site of iron storage in cells

* BLC denotes B-lymphocyte chemoattractant; Covid-19 coronavirus disease 2019; CRP C-reactive protein; CTLs cytotoxic T lymphocytes; CXCL C-X-C motif chemokine ligand; GM-CSF granulocyte–macrophage colony-stimulating factor; IP-10 interferon-inducible protein 10; MCP-1 monocyte chemoattractant protein 1; MIG monokine induced by interferon- γ ; MIP-1 α and MIP-1 β macrophage inflammatory protein 1 α and 1 β , respectively; NK natural killer; Th1, Th2, Th9, and Th17 cells types 1, 2, 9, and 17 helper T cells, respectively; and VEGF vascular endothelial growth factor.

[†] In idiopathic multicentric Castleman’s disease, the levels of CXCL13 are the most elevated of all the cytokines or chemokines.

Figure 31. Caractéristiques des cytokines/chimiokines participants à l’orage cytokinique post infection (45).

4.3. Immune innée post infection à *Influenzavirus*

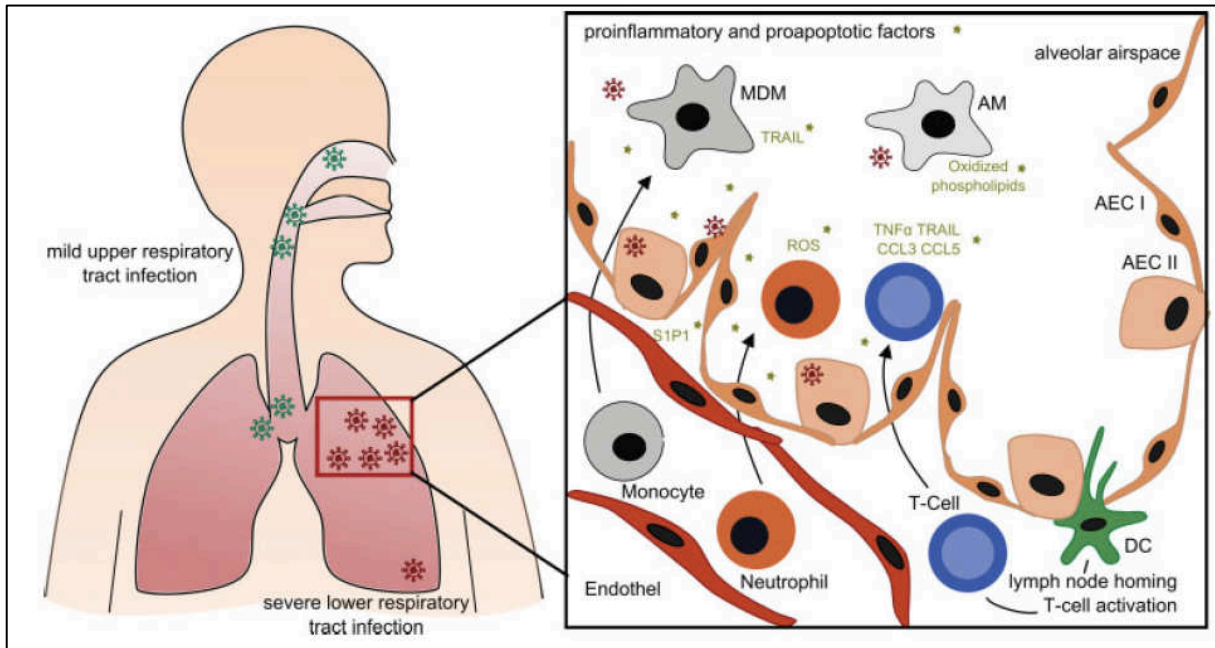


Figure 32. Illustration des acteurs clés de la réaction immunitaire au niveau pulmonaire après infection par *Influenzavirus* (1).

Dans ce premier paragraphe faisant une synthèse générale, nous nous proposons de décrire les grands mécanismes et acteurs sur lesquels nous reviendrons précisément dans les chapitres ultérieurs spécifiques.

Comme l'illustre la figure 32, après pénétration du virus dans les voies aériennes inférieures, l'infection des cellules épithéliales (bronchiques, pneumocytes I et II) et la phagocytose par les MA résidents déclenchent la sécrétion de cytokines pro inflammatoires (INF-I, -III, TNF, IL-6, MIP-1, MCP-1, IP-10...) aboutissant au recrutement par chimiotactisme de cellules circulantes (1,2):

-Afflux précoce et court de polynucléaires neutrophiles, qui ont un rôle ambivalent ; leur déplétion a pour conséquence une infection non contrôlée évoluant vers une forme sévère et un excès de mortalité ; mais un recrutement excessif et dérégulé aboutit à un sur-risque de lésions pulmonaires, d'où la nécessité d'une importante régulation.

-Monocytes qui se différencieront en macrophages dérivées des monocytes.

-Les CD, dans le même temps, migreront vers le relai ganglionnaire de voisinage pour présenter l'antigène au lymphocytes T naïfs activant la réponse immunitaire adaptative en induisant leur différenciation en T effecteur et régulateurs.

4.4. Mécanismes d'*Influenzavirus* pour échapper à l'immunité innée

Face à la pression de l'immunité innée, *Influenzavirus* a développé des stratégies d'échappement. La protéine non structurale NS1 inhibe à plusieurs étapes l'activation de la voie de RIG-I et la translocation nucléaire de NF- κ B aboutissant à une régulation négative via NS1 de la production par la cellule infectée d'IFN (Figure 33 (schéma de gauche)). La polymérase PB2 et le complexe PB1-F2 bloquent également la production d'IFN (via l'inhibition de la voie MAVS).

De plus, les cellules épithéliales infectées activent la voie PKR, qui a une action antivirale en inhibant la synthèse protéique, dont les protéines virales. Comme l'illustre la figure 33 (schéma de droite), cette voie est finement régulée par p53. Le virus agit par deux mécanismes sur cette voie : par la liaison de la protéine virale NP au complexe p53-hsp40, qui libère p53, et inhibe l'action de PKR et poursuivant la traduction des protéines virales. Le second mécanisme est l'activation par la protéine virale M2 de la formation du complexe p53-hsp40, qui inhibe la libération de p53 limitant ainsi la synthèse protéique, notamment cellulaire, et conduit finalement à l'apoptose de la cellule infectée (15).

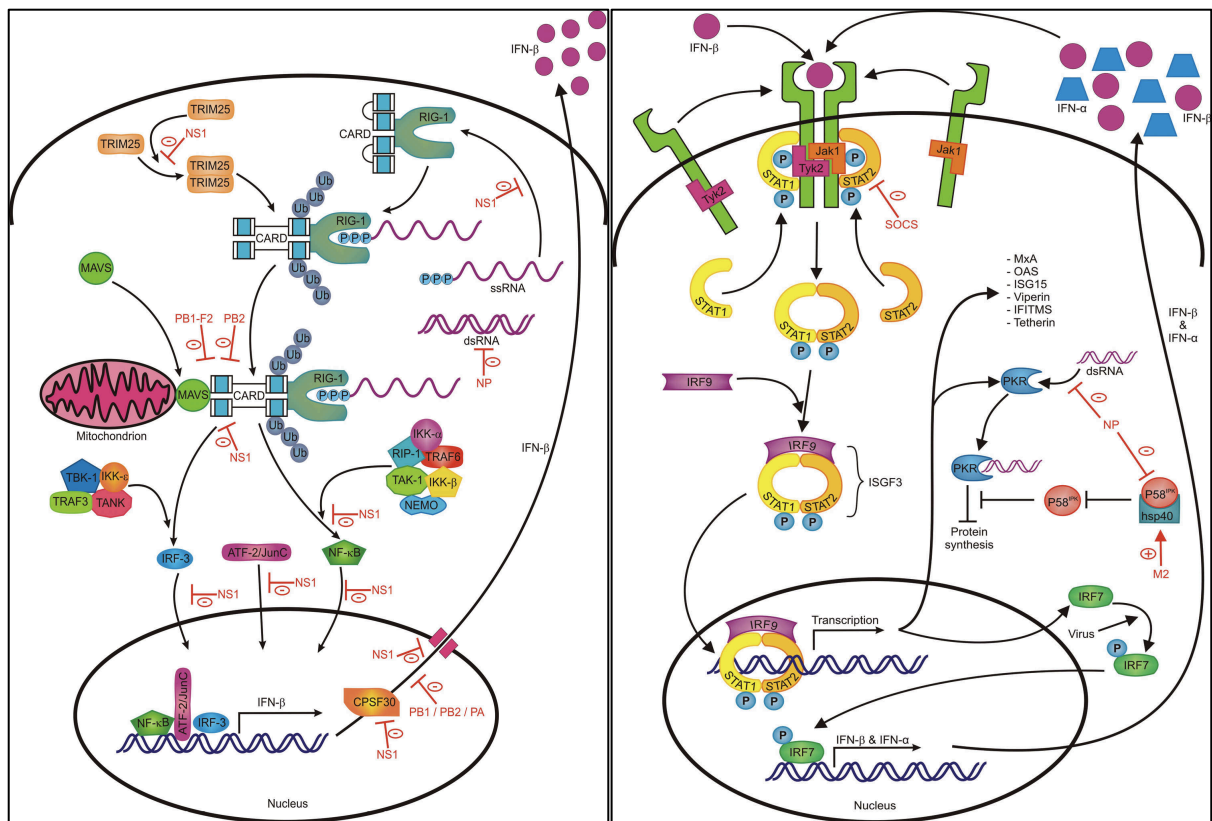


Figure 33. Schémas illustrant les mécanismes d'*Influenzavirus* via l'impact des protéines virales sur la synthèse d'IFN par la cellule infectée pour échapper à l'immunité innée (15).

En plus de limiter la production d'IFN, *Influenzavirus* inhibe la voie de signalisation JAK/STAT activée par IFN en bloquant JAK1 par la stimulation de l'expression de SOCS1 (suppressor of cytokines signaling) (49).

4.5. Recrutement cellulaire

Après infection par différentes souches d'*Influenzavirus*, l'analyse en cytométrie en flux du lysat pulmonaire de souris BALB/C montre une augmentation de la cellularité globale, des macrophages, des PNN et des CD, comme le montre la figure 34. Le chapitre ci-dessous décrira la fonction de chaque type cellulaire recruté après infection par *Influenzavirus* (50).

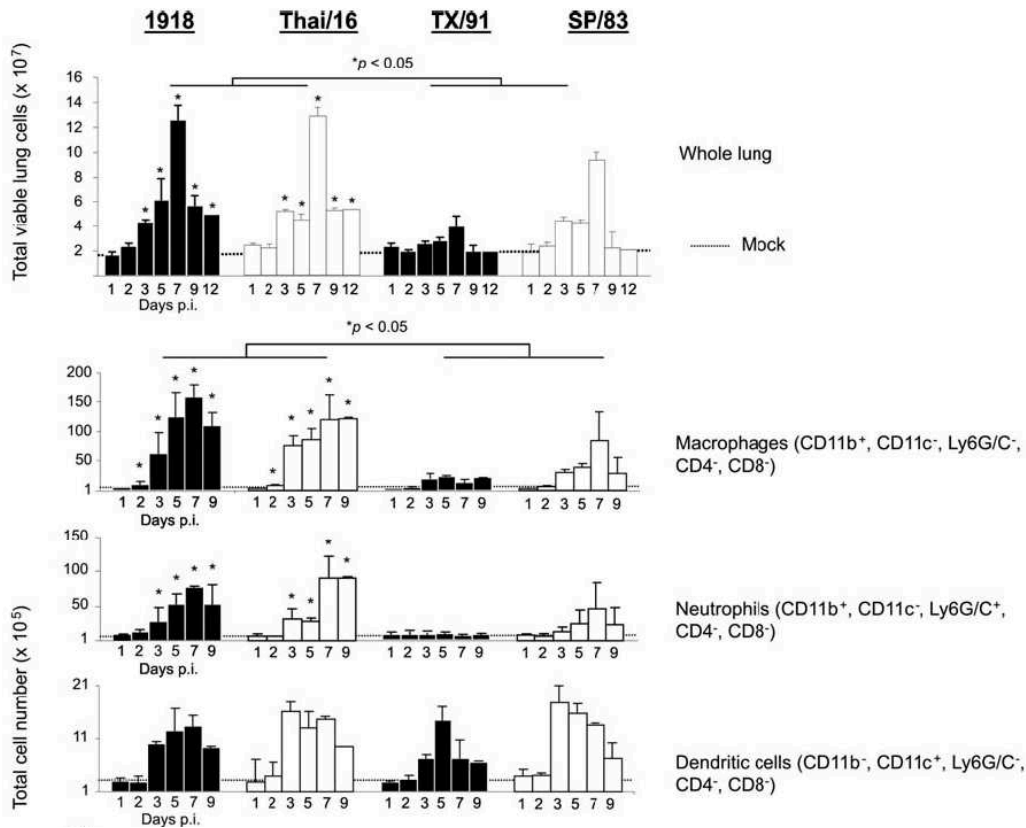


Figure 34. Recrutement cellulaire globale, macrophage, PNN, CD au niveau du poumon de souris infecté par différentes souches virales *Influenzavirus* (50).

4.5.1. Macrophage alvéolaires

Les macrophages alvéolaires (MA) résident dans l'espace alvéolaire. Plus de 90% des cellules présentes au sein du compartiment alvéolaire sont des MA. Ils sont anatomiquement et physiologiquement les premiers acteurs après infection de l'épithélium. Ils sont indispensables au contrôle virologique et à la régulation immunitaire (51,52).

La déplétion préalable à l'infection par *Influenzavirus* de furets entraîne une évolution du score clinique significativement défavorable, comparativement aux furets infectés non déplétés ou non infectés, ainsi qu'une mortalité plus importante (Figure 35) (52). Le MA semble donc avoir un rôle indispensable à la survie des furets infectés par la grippe.

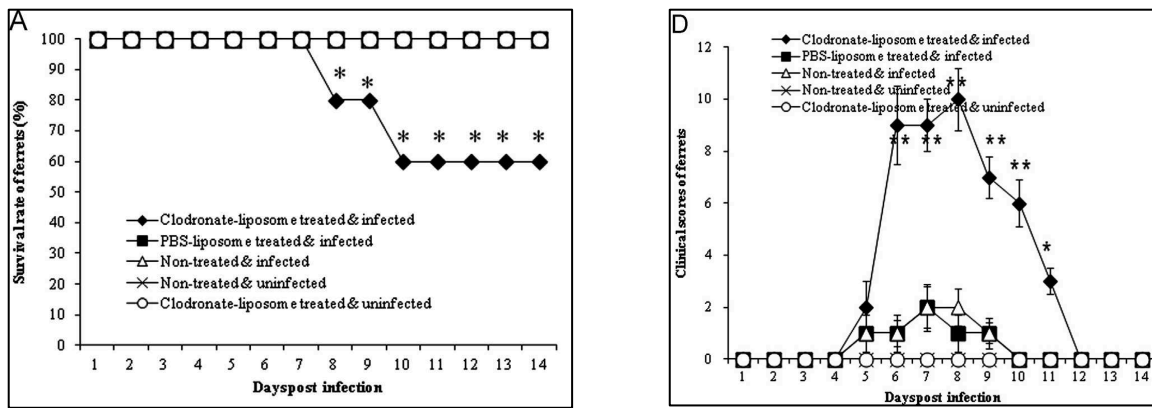


Figure 35. Courbe de survie des furets infectés ou non par A/California/07/2009 H1N1 influenza ou non avec traitement déplétif (Clodronate-liposome) en MA ou non (schéma de gauche). Evolution du score clinique en fonction du temps post-infection des furets.

Le MA semble avoir un rôle régulateur sur le recrutement cellulaire post infectieux. Comme le montre la figure 36, une déplétion en MA est associée à une surreprésentation en lymphocytes et PNN comparativement au lavage broncho-alvéolaire (LBA) de furets infectés ayant subi un traitement déplétif des MA. La déplétion en MA a également un impact sur la clairance virale ; comme l'illustre la figure 37, une déplétion en MA entraîne une moindre clairance virale à J5 post infection (52). Ce rôle de régulateur des MA post-infection grippale est également montré sur la production cytokinique ; plusieurs chimiokines telles que CCL8, CCL11, CCL17, CXCL19, CXCL10, CXCL11 sont produites en quantité significativement plus importante par les furets infectés ayant été traités par Clodronate-liposome (52).

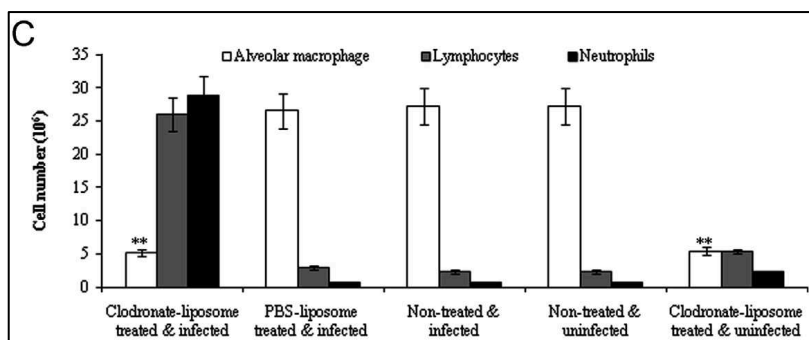


Figure 36. Comparaison des quantifications cellulaires (MA, PNN, Lymphocyte) à J5 post infection selon les modalités expérimentales (furets infectés ou non, avec traitement déplétif en MA ou non).

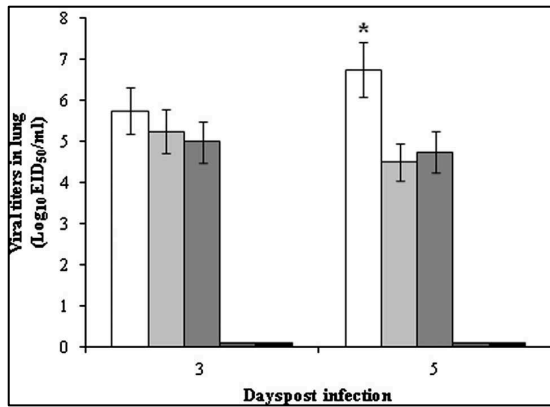


Figure 37. Histogramme illustrant la comparaison des charges virales dosées dans un lysat pulmonaire des furets infectés, ou non, déplétés en MA, ou non, à J1 et J5 post infection.

Comme le montre la figure 38, d'autres études chez la souris ont montré les mêmes résultats sur l'évolution défavorable de la courbe pondérale des souris infectées déplétées en MA, une régulation des PNN déréprimée si absence de MA et une moindre clairance virale à J5 (53). Comme l'illustre la figure 39, la déplétion en MA a une traduction clinique sur l'hématose avec une saturation et une baisse significative de la pression artérielle en oxygène (53) des souris infectées déplétées en MA ; traduisant un rôle régulateur du MA dans le recrutement immunitaire pulmonaire.

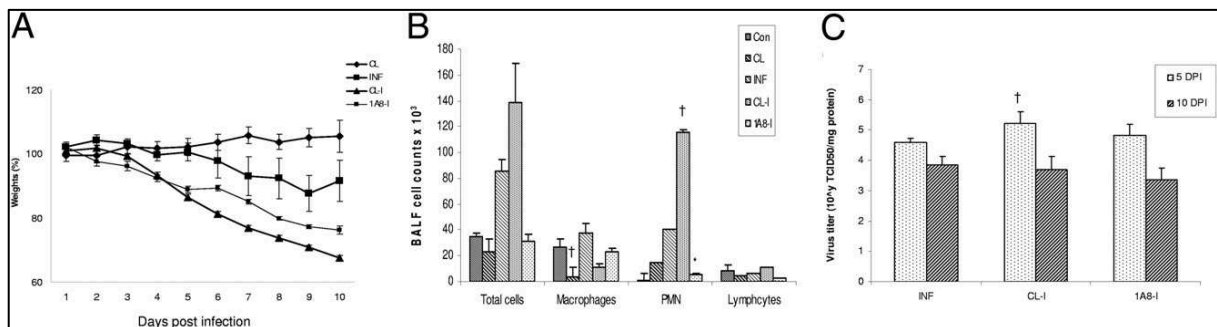


Figure 38. Evolution de la courbe pondérale de souris BALB/C infectées PR8 (Inf) plus ou moins associé à un traitement déplétif des MA (CL (non infectées), CL-I (infectées)) ou déplétif des PNN (1A8-I) (A). Histogramme comparatif des quantifications cellulaires des LBA des souris ayant subi les mêmes conditions expérimentales (B). Histogramme comparatif des charges virales dosées dans les lysats pulmonaires des souris selon les mêmes conditions expérimentales (C) (53).

	pAO ₂ (kPa)	pACO ₂ (kPa)	pH value	sAO ₂ (%)
CL	11.2 ± 0.3	5.9 ± 0.26	7.2 ± 0.1	91 ± 2.7
INF	8.6 ± 0.79	6.2 ± 0.21	7.2 ± 0.1	77 ± 5.1
CL-I	5.5 ± 0.21*	6.8 ± 0.33	7.3 ± 0.2	67 ± 4.6*
1A8-I	8.0 ± 0.9	5.5 ± 1.8	7.2 ± 0.1	87 ± 0.7

Figure 39. Comparaison des résultats de la gazométrie artérielle des souris BALB/C selon les conditions expérimentales de la figure 38. (53)

4.5.2. Monocytes

Les cellules résidentes pulmonaires (MA, CD) ne peuvent pas seules assurer la clairance virale et organiser la défense antivirale de façon prolongée. Il leur faut des renforts issus de la circulation sanguine, qui vont migrer et se différencier dans le poumon, notamment les monocytes (54).

Le recrutement de macrophages est démontré par un modèle de syndrome de détresse respiratoire aiguë induit par LPS ; cela montre le recrutement dès J3 de macrophages (CD11c^{low}, F4/80+). Ces données sont également retrouvées après infection par *Influenzavirus* sur un modèle de souris infectées PR8 montrant le recrutement progressif de macrophages comparativement au MA résidents (Figure 39) (55).

Le recrutement par migration des monocytes est fortement induit par l'infection des cellules épithéliales, comme le montre la figure 40, où l'infection de l'épithélium bronchique en interface air-liquide révèle une migration des monocytes, initialement présents au niveau basal, vers la région apicale. Cette migration semble dépendre d'un chimiotactisme via l'interaction CCL2 (MCP-1) et CCR2 (monocytes) (figure 40). En effet la migration monocyttaire est inhibée si les monocytes du pôle basal sont génétiquement modifiés et KO pour CCR2 (CCR2^{-/-}) ; mais également si dans le milieu où baignent les monocytes « sauvages » (CCR2^{WT}) est ajouté un traitement par anticorps anti-CCL2. La migration monocyttaire transépithéliale est donc induite par l'infection de l'épithélium via la voie CCL2/CCR2 (56,57). Le nombre de monocytes dans les poumons de souris infectées PR8 est significativement réduit chez les souris CCR2^{-/-} comparativement aux souris CCR2^{WT} (figure 42) mais pas celui des MA (58).

Les MA ont un rôle potentialisateur de cette migration monocyttaire (figure 41). Après infection apicale de l'épithélium, la culture basale des monocytes dans du milieu ayant contenu des MA infectés PR8 augmente significativement la migration de ces monocytes. (56)

Les macrophages dérivés des monocytes semblent avoir un effet post-infectieux. Une étude chez la souris C57BL/6 infectées par *Influenzavirus* X31. A distance de la grippe (J28 et J60), les souris semblent avoir une protection antibactérienne plus efficace contre l'infection à *Streptococcus pneumoniae* comparativement aux souris non infestées ; possiblement en lien avec les macrophages résidents provenant des macrophages dérivés de monocytes recrutés durant la phase aiguë de la grippe. Ces macrophages dérivés des monocytes induits par la grippe ont un phénotype de surface similaire aux macrophages résidents, mais un profil transcriptionnel distinct des macrophages résidents des souris non infectées. La grippe semble donc modifier la composition de la population macrophagique résidente avec un impact sur l'immunité future aux infections.(59)

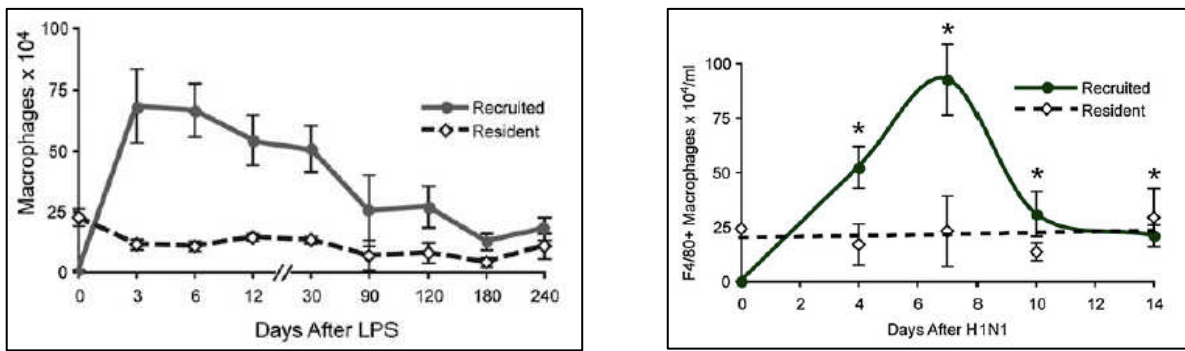


Figure 39. Evolution du nombre de macrophages recrutés vs macrophages résidents dans le LBA de souris avec SDRa induit par LPB (courbe de gauche) ou après infection par PR8 (courbe de droite).(55)

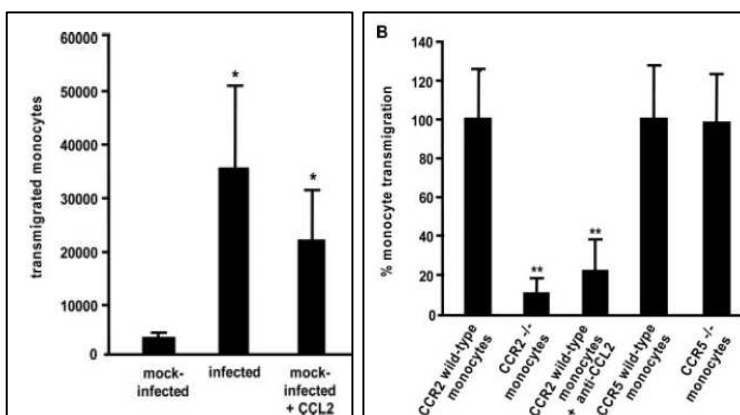


Figure 40. Infection *in vitro* apicale par PR8 d'un épithélium bronchique en interface air-liquide avec mesure de la migration des monocytes de la zone basale vers la zone apicale. Histogramme comparatif entre les inserts non infectés non traités, infectés ou non infectés et ajout au niveau apical de la chimiokine CCL2 (schéma de gauche). Comparaison de la migration

de différents monocytes ($CCR2^{-/-}$, $CCR2^{WT}$ traités ou non par anti-CCL2) vers la zone apicale après infection apicale par PR8 de l'épithélium bronchique (schéma de droite). (56)

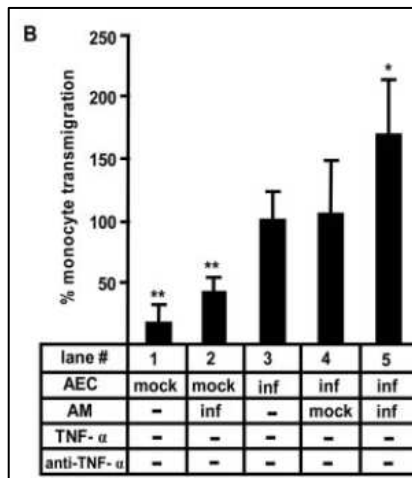


Figure 41. Histogramme comparant la migration monocyttaire après infection *in vitro* ou non au niveau apicale de l'épithélium bronchique (interface air-liquide) avec ajout, ou non, au niveau basal de milieu ayant contenu des MA infectés. (56)

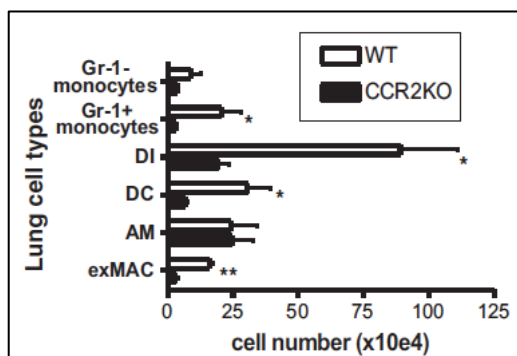


Figure 42. Comparaison du nombre de cellules (MA, monocytes (exMAC), CD...) au niveau des poumons de souris $CCR2^{-/-}$ versus souris $CCR2^{WT}$. (58)

4.5.3. PNN

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) ne sont pas résidents du poumon mais recrutés par diapédèse des vaisseaux pulmonaires. Ils apparaissent au niveau des bronchioles et des alvéoles (figure 43) très précocement avec un pic à J1 en suivant un gradient chimiotactique de chimiokines telles que IL-8, KC ou MIP-2. Leur présence au sein de l'appareil respiratoire est fugace (figure 44).

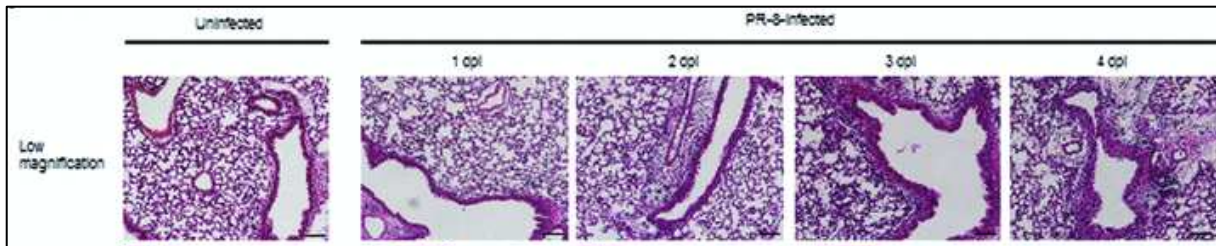


Figure 43. Coupe histologique colorée par HE et MGG de poumons de souris BALB/C infectées par PR8 comparativement à des souris contrôles non infectées en fonction du temps post infection.

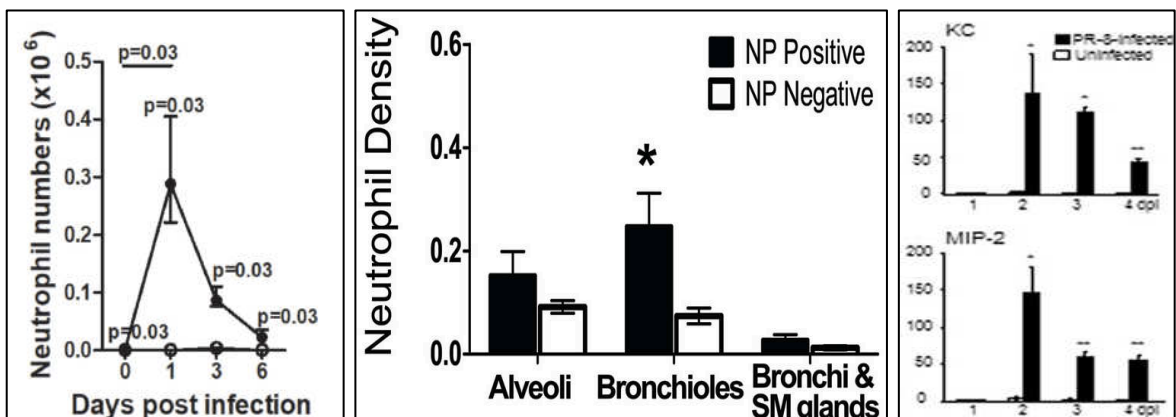


Figure 44. Courbe de l'évolution des PNN de souris BALB/C dans le LBA après infection par PR8 (schéma de gauche)(60). Histogramme représentant la densité en PNN dans différents compartiments anatomique de l'appareil respiratoire de furet infecté par H1N1pdm (schéma du centre)(61). Histogramme représentant l'évolution des concentrations dans le LBA de souris infectées par PR8 des cytokines KC et MCP-1 en fonction du temps post infection (schéma de droite)(62).

A la phase précoce post-infection, les PNN semblent indispensables au contrôle et à l'évolution de l'infection, car la déplétion en PNN par un anticorps spécifique (anti-Ly6G) est associée à une perte pondérale significativement plus importante et une surmortalité plus précoce (figure 45 et 46) (63,64).

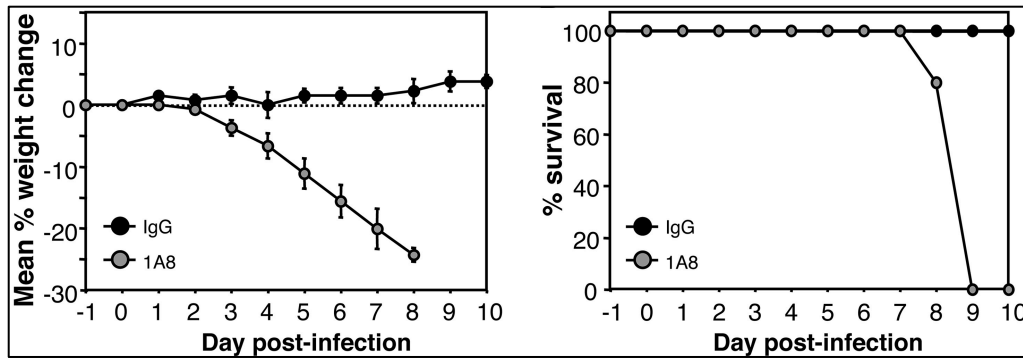


Figure 45. Evolution de la courbe pondérale (courbe de gauche) et de la survie (courbe de droite) de souris C57BL/6 infectée par HKx31 (H3N2) traitée par Ac anti-Ly6G en pré-infection (déplétion des PNN) comparativement aux souris infectées non déplétées en PNN (63).

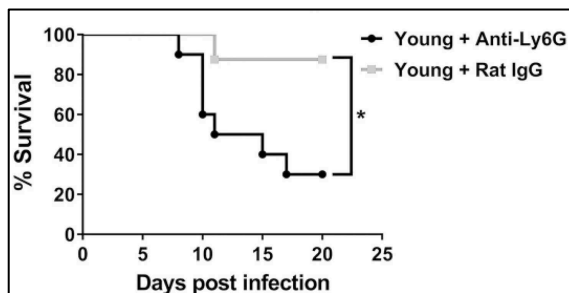


Figure 46. Courbe comparative de survie de souris C57BL/6 infectées par PR8 entre une population traitée en pré-infection par Ac anti-Ly6G (déplétion en PNN) et une population non déplétée (64).

Les PNN recrutés à la phase précoce post-infection semblent avoir un impact sur l'activation de l'immunité adaptative à la phase plus tardive. Le recrutement des lymphocytes T CD8⁺ est diminué quantitativement dans le LBA et le poumon de souris C57BL/6 infectées par HKx31, s'il y a déplétion spécifique des PNN par Ac anti-Ly6G dès J-1 de l'infection. Cette déplétion en PNN semble entraîner également une réduction de la fonction (granzyme B intracellulaire sur culture primaire lymphocyte T CD8⁺ des LBA des mêmes souris)(figure 47) (65).

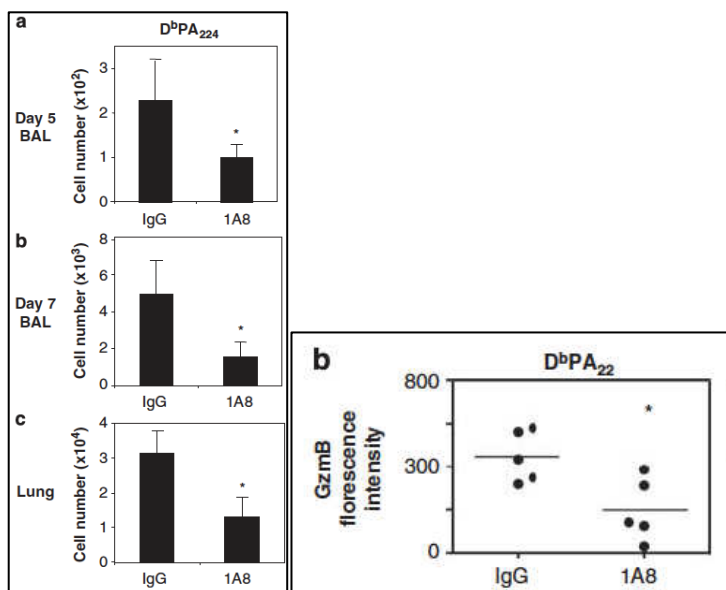


Figure 47. Comparaison dans le LBA et le poumon de souris C57BL/6 infectées HKx31 après traitement déplétif en PNN (Ac anti-Ly6G (1A8)) ou non du nombre de lymphocytes CD8+ (histogramme de gauche). Activité granzyme B intracellulaire sur culture primaire de lymphocytes B CD8+ de LBA des souris ayant suivi le même protocole que décrit précédemment (65).

Si à la phase précoce, les PNN sont indispensables, leur excès semble délétère. En comparant les PNN dans des poumons de souris d'âges différents (jeunes vs âgées) infectées par PR8, on constate que le nombre de PNN est significativement plus important à la phase aiguë chez les souris âgées, or ces dernières ont une survie moins bonne. Cette survie est d'ailleurs identique à celle des souris du même âge, traitées en pré-infection par Ac anti-Ly6G pour déplétion des PNN. L'âge semble donc être un facteur déterminant dans la régulation du recrutement des PNN en lien avec une possible sénescence des pneumocytes sécrétant un excès de cytokines, notamment CXCL1 (Figure 48), aboutissant à un excès délétère de PNN.(64)

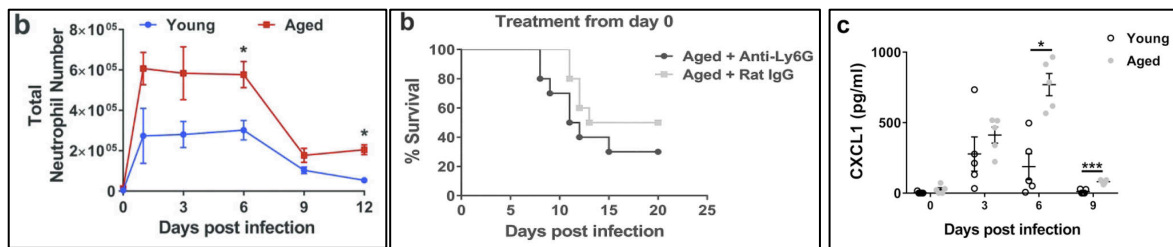


Figure 48. Souris C57BL/6 infectées PR8. Courbe comparative des PNN dans le LBA en fonction du temps post-infection entre souris jeunes et âgées (schéma de gauche). Courbe de survie des souris âgées traitées ou non par Ac anti-Ly6G pour déplétion des PNN (schéma du centre). Evolution comparative entre souris jeunes et âgées, en fonction du temps, de la concentration dans le LBA de la chimiokine CXCL1 (schéma de droite) (64).

La persistance des PNN semble également néfaste. Dans la même expérimentation (64) (figure 49), chez les souris jeunes la déplétion en PNN induite par l'anti-Ly6G (J6 post infection) n'a pas d'impact sur la survie, les PNN ayant été « physiologiquement » régulés. Par contre, chez les souris âgées avec une régulation altérée (comme vu précédemment), la déplétion en PNN avec l'anti-Ly6G (J6 post infection) a un effet bénéfique sur la survie confirmant donc le caractère délétère de la présence au niveau du poumon des PNN à la phase tardive de l'infection.

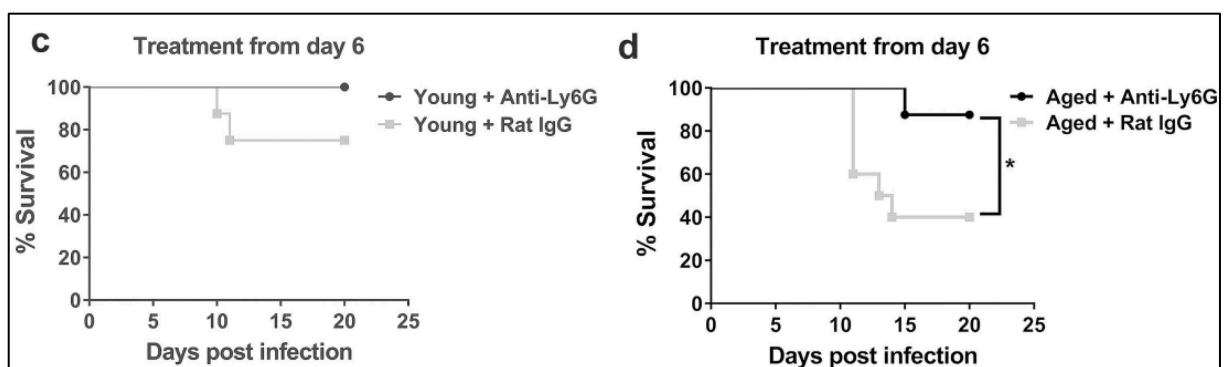


Figure 49. (64) Courbe de survie des souris jeunes/âgées infectées PR8 traitées ou non tardivement (J6 post infection) par Ac anti-Ly6g.

La régulation des PNN dès la phase aiguë est indispensable pour éviter leur persistance. L'absence de régulation négative des PNN via les macrophages entraîne leur persistance dans le poumon aboutissant à des lésions pulmonaires de type dommage alvéolaire diffus (DAD)

(figure 50), non retrouvées chez souris infectées non déplétées en macrophages. Chez ces mêmes souris, la persistance des PNN s'associe à un relargage excessif de NET (53).

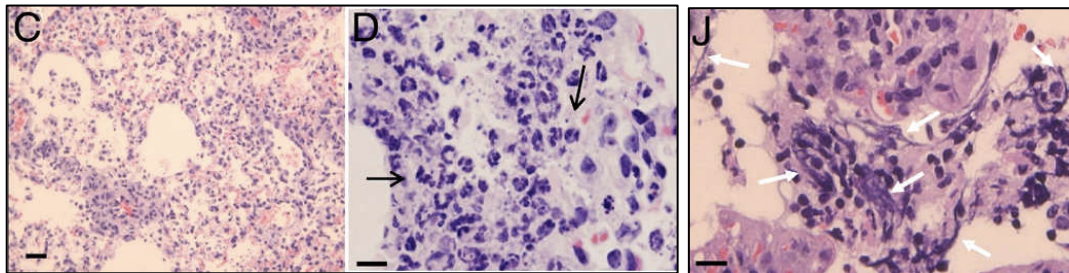


Figure 50. Coupe histologique de poumon de souris BALB/C infectées par PR8 traitées par clodronate-liposomes pour déplétion pulmonaire des macrophages montrant une infiltration en PNN et un aspect de DAD. Coupe histologique révélant de nombreuses NET au niveau d'une bronchiole (53).

4.5.4. CD8

Après infection à *Influenzavirus*, les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires (cibles principales du virus) et les macrophages alvéolaires sont les premiers effecteurs antiviraux. Les CD8 sont également des acteurs précoces de l'organisation de la défense antivirale. Les CD8 sont un ensemble complexe de multiples sous-familles divisées globalement en 2 : plasmacytoïdes (pCD) (CD11c+, Siglec +, Ly6C+) et myéloïdes (CD11b+ ou CD103+, usuellement nommées CD8 conventionnelles (cCD8)) caractérisées par des marqueurs cellulaires, des localisations et des fonctions différentes (figure 51 et 52) (66,67).

Les cCD8 sont en interconnexion cytokinique avec les cellules épithéliales infectées mais elles sont également actives en acquérant l'antigène, qui sera présenté aux lymphocytes T naïfs dans le relai ganglionnaire. Les cCD8 peuvent acquérir cet antigène par 2 mécanismes : soit en phagocytant des cellules infectées apoptotiques, soit en étant directement infectées par *Influenzavirus* (66). La migration des cCD8 vers le relai ganglionnaire dépend également de voies de signalisation cytokiniques. Les cCD8 103+, présentes en contact étroit avec l'épithélium, sont activées par les cellules épithéliales infectées via la production de GM-CSF. Les cCD8 103+ ainsi activées vont migrer au niveau des relais ganglionnaires assurant le recrutement des lymphocytes T CD8+ et accélérant la clairance virale (Figure 53) (68).

Le rôle des pCD après infection à *Influenzavirus* est controversé. En effet, la déplétion expérimentale en pCD ne modifie en rien l'évolution clinique, la production cytokinique, ni la clairance virale mais entraîne une baisse de la production d'anticorps (67).

Une troisième population de CD dérivant de la différenciation de monocytes recrutés au site infectieux ((moCD), CX3CR1+, CD11b+) aurait un rôle antiviral via la production d'IFN. Ils auraient également un rôle dans la réactivation de lymphocytes T CD8+ mémoires. Les moCD interagiraient avec les lymphocytes T CD8+ recrutés au site infectieux mais interviendraient peu dans leur activation au niveau ganglionnaire (67).

Population	Marker							
	CD11c	MHCII	CD45RA	sirpα	CD11b	CD103	Ly6C	CD8
<i>Lymphoid resident DC</i>								
plasmacytoid	int	+	+	-	-	-	-	+/-
CD8 ⁺	hi	+	-	-	-	+/-	-	+
CD8 ⁻	hi	+	-	+	+	-	-	-
<i>Migratory DC</i>								
CD11b	hi	+	-	+	+	-	-	-
CD103	hi	+	-	-	-	+	-	-
Inflammatory DC	hi	+	-	-	+	-	+	-

Figure 51. Résumé des sous-populations de CD selon les marqueurs membranaires (66).

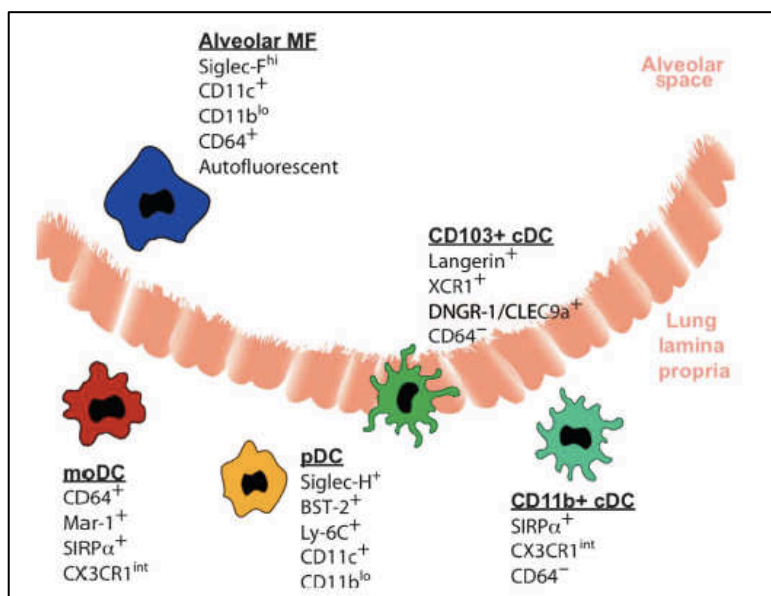


Figure 52. Les différentes populations de CD pulmonaires selon leurs marqueurs membranaires (cCD, pCD, moCD) (67).

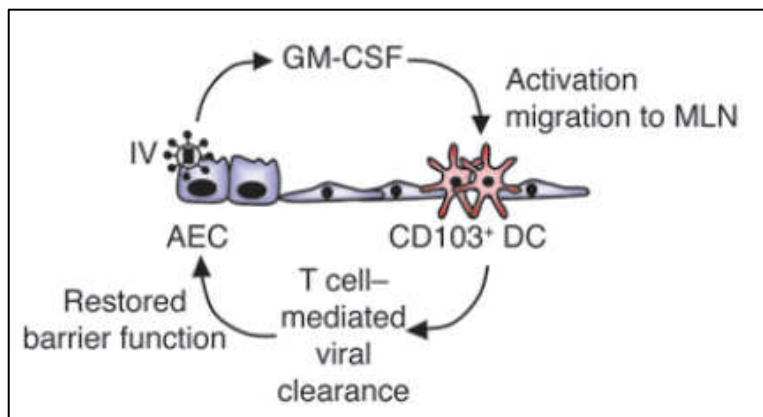


Figure 53. Interactions entre cellules épithéliales et CD 103+ via la voie du GM-CSF (68).

4.6. Conséquences d'une inflammation disproportionnée

Comme vu ci-dessus, le contrôle de l'infection par la mise en action de l'ensemble des acteurs cytokiniques et cellulaires ne doit pas être excessive, car une réaction immune dérégulée et persistante peut avoir pour conséquence des lésions pulmonaires voire le décès du patient.

Les analyses autopsiques des patients décédés de grippe grave révèlent des dommages alvéolaires diffus (DAD) mais le plus souvent sans détection d'ARN viral. Des études précliniques limitant, sans l'abolir, le recrutement des PNN via la voie CXCL2 et/ou CXCL10 sont associées avec une réduction des lésions pulmonaires.(69)

Le PNN semble être un des acteurs principaux dans la survenue de lésions pulmonaires type DAD de par l'importance de son recrutement et surtout la persistance des PNN. En effet, comme décrit précédemment, la régulation des PNN aboutit à leur disparition rapide du poumon. Une série autopsique a comparé la présence des PNN et l'activité élastase entre 3 groupes des patients décédés :

- De grippe grave
- De syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) non viral sans pathologie pulmonaire sous-jacente antérieure
- De cause non respiratoire ni infectieuse (patients contrôles)

La figure 54 montre une densité en PNN et une activité élastase significativement supérieures lors de grippe grave et de SDRA comparativement aux patients contrôles mais sans différence entre ces 2 groupes de patients confirmant le rôle prépondérant du PNN et sa persistance du fait d'une dérégulation immunologique dans la survenue du DAD et donc du décès. (70)

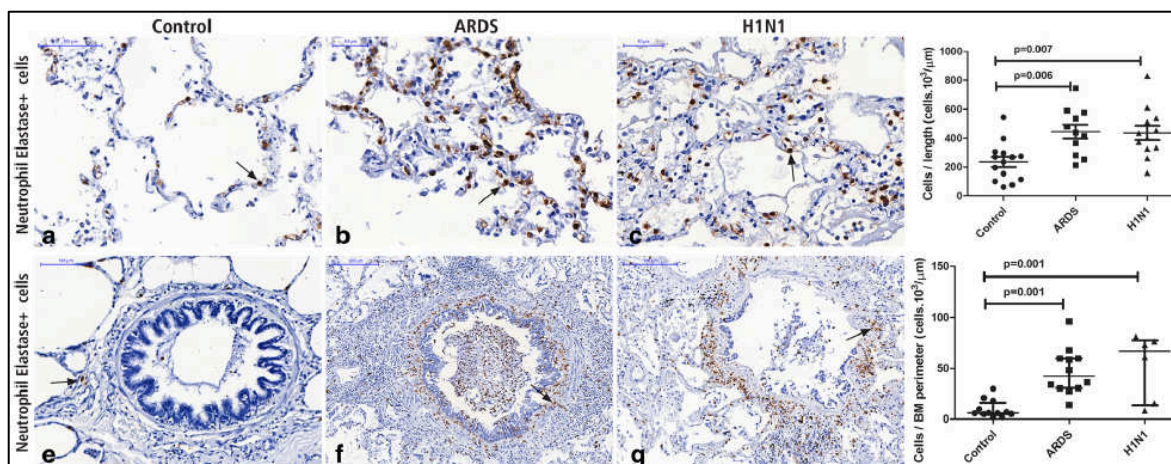


Figure 54. Densité en PNN et activité élastase au niveau du parenchyme pulmonaire (a, b, c) et des bronchioles (e, f, g) entre les 3 groupes de patients décédés de grippe grave H1N1, de SDRA ou patients contrôles.

4.7. Déterminants de l'hôte modulant la réaction immune

La figure 54 liste les facteurs liés à l'hôte associés à une morbidité plus élevée d'une infection à *Influenzavirus*.(16)

<p>Age</p> <ul style="list-style-type: none"> Increased risk of death and hospital admission in individuals older than 65 years Increased risk of mortality from pandemic influenza in young adults (aged 20–40 years) Increased risk of hospital admission in children younger than 5 years (particularly children <2 years of age) <p>Pregnancy</p> <ul style="list-style-type: none"> Highest risk of morbidity in third trimester High mortality observed in 1918 and 1957 pandemics Increased hospital admissions observed in the 2009 pandemic and during interpandemic influenza Poor fetal outcomes in pregnant women admitted to hospital for influenza <p>Immunocompromised state</p> <ul style="list-style-type: none"> Mortality risk increased in individuals undergoing stem cell transplant, solid organ transplant, or chemotherapy Mortality risk increased in individuals with HIV who have a low CD4 cell count and are not on antiretrovirals Mortality risk increased in patients on other immune-modifying medications, but dependent on the degree of immune suppression <p>Medical comorbidity</p> <ul style="list-style-type: none"> Presence of any medical comorbidity—including neuromuscular disease, cognitive dysfunction, pulmonary disease, cardiovascular disease, renal disease, liver disease, diabetes, heavy alcohol use, and obesity—associated with increased mortality risk Individual comorbidities associated with variable risk of admission to hospital and mortality <p>Genetic susceptibility</p> <ul style="list-style-type: none"> Increased risk of hospital admission for influenza in individuals carrying certain alleles of interferon-induced transmembrane protein 3 (<i>IFITM3</i>);²⁹ mechanism is under investigation; <i>IFITM3</i> restricts cellular entry of influenza viruses and is an important interferon-stimulated gene
--

Figure 54. Facteurs liés à l'hôte associés à une augmentation de la morbidité de la grippe.(16)

4.7.1. Données en pratique clinique

Chez l'Homme, l'âge est également le premier facteur associé à la létalité. La mortalité attribuée à la grippe atteint principalement les âges extrêmes de la vie (<1ans et surtout >65 ans) (figure 55). Si les données épidémiologiques ne laissent que peu de doute, les données précliniques sont plus nuancées.



Figure 55. Répartition des décès attribués à la Grippe durant la pandémie de 1968.(71)

L'immunodépression est également un facteur de morbidité confirmé par plusieurs études cliniques. Memoli et Coll. (72) rapportent un étude cas-contrôle de patients pris en charge pour grippe entre une population immunodéprimée (ID) (transplantée organe/CSH et hémopathie maligne) comparativement à une population immunocompétente appariée sur l'âge et le sexe. Les patients ID nécessitent significativement plus fréquemment une hospitalisation ($p : 0,0019$), le plus souvent en unité de soins intensifs et ont recours à la ventilation mécanique ($p : 0,0001$). Le portage viral est significativement plus prolongé dans la population ID ($p : 0,04$). Toutefois la mortalité et les dosages plasmatiques des cytokines ne sont pas différents entre les 2 populations.(72)

Une inégalité de sensibilité génétique explique probablement une proportion du risque de morbidité. En pratique clinique, plusieurs études évoquent des associations possibles entre certains polymorphismes et les formes graves de grippe, tels que rs361525 (polymorphisme du gène codant pour le TNF)(73) ou rs12252 T>C (polymorphisme du gène interféron-inducible transmembrane protein 3)(74). Cependant, les études ne sont pas concordantes et manquent souvent de puissance statistique pour aboutir à des conclusions fiables.

4.7.2. Données précliniques sur modèle animal

Comme nous l'avons évoqué précédemment sur un modèle souris(64), l'âge semble bien être un facteur de risque de mortalité en lien avec une dérégulation cytokinique, aboutissant à un recrutement et une persistance plus importante de PNN. Toutes les études n'aboutissent pas aux mêmes résultats malgré l'utilisation de souris du même âge (souris jeunes entre 2-4 mois vs âgées entre 19-22 mois) avec le même fond génétique (C57BL/6), du même virus (PR8) et le même inoculum (10^4 PFU). La courbe d'évolution pondérale montre une perte de poids significativement plus importante à la phase aigüe pour les souris jeunes et la courbe de survie est favorable aux souris plus âgées. Cette différence de mortalité en défaveur des souris jeunes pourrait être liée à un orage cytokinique beaucoup plus important chez les souris jeunes aboutissant à des lésions pulmonaires fatales (figure 56). (75)

Les conclusions de données précliniques ne sont donc pas univoques mais, en pratique clinique, les données épidémiologiques montrent nettement un risque de mortalité des sujets âgés (>65 ans).

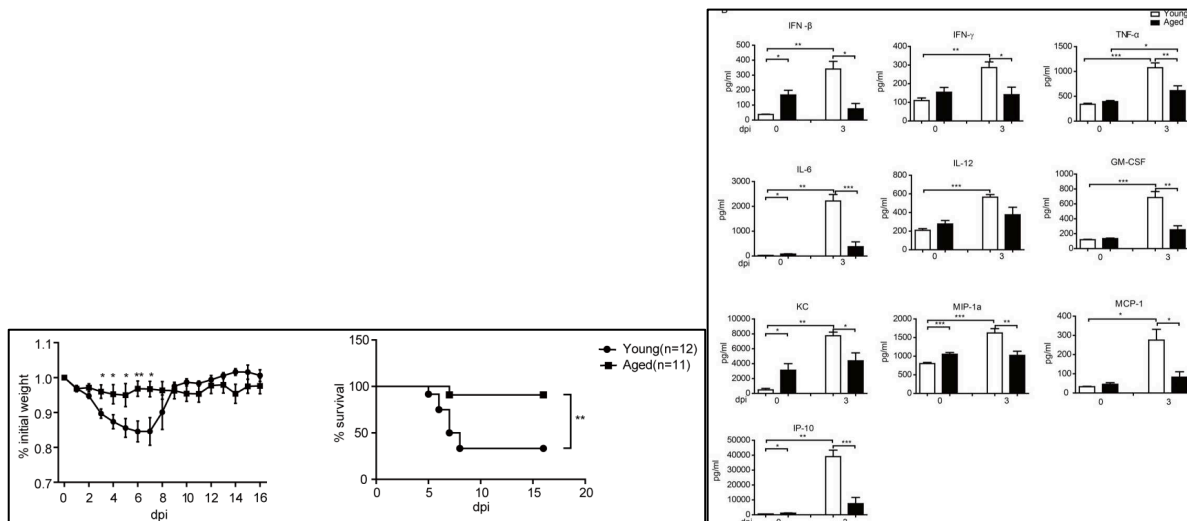


Figure 56. Courbe pondérale comparative entre souris C57BL/6 jeunes et âgées après infection par PR8. Courbe de survie des mêmes populations. Histogramme des concentrations des cytokines dans le lysat pulmonaire.(75)

Des données précliniques chez l'animal sont également disponibles pour étayer cette hypothèse de susceptibilité génétique aux formes graves de grippe en comparant l'évolution post-infection par 4 souches virales (A/Hamburg/05/09 pH1N1 (HH05); A/Hamburg/NY1580/09 pH1N1 (HH15); A/Solomon Island/3/06-like H1N1; A/Thailand/KAN-1/04 H5N1) de souris avec 2 fonds génétiques différents (C57BL/6 et BALB/C). Les résultats (figure 57) montrent que BALB/C est plus sensible que C57BL/6 à une infection par H5N1, aucune différence entre les 2 fonds génétiques pour une infection par H1N1 saisonnier et C57BL/6 est plus permissive à une infection par HH05 et HH15 (pH1N1).⁽⁷⁶⁾ Ces données confirment donc que le fond génétique a bien un impact sur la permissivité et l'évolution de l'infection par le virus de la grippe et nécessite de bien choisir le fond génétique de son modèle animal pour permettre une interprétation adaptée des résultats.

Certaines différences entre données de vraie vie (pratique clinique) et de laboratoire peuvent possiblement être explicables par l'impact des surinfections bactériennes et des comorbidités cardiaques/pulmonaires/rénales non prises en compte dans les études précliniques.

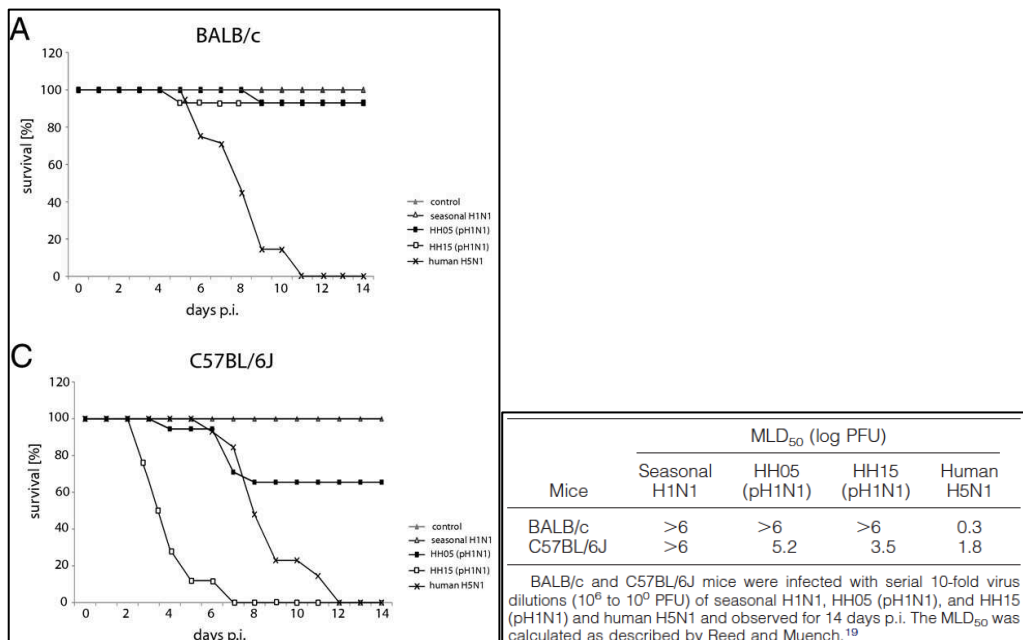


Figure 57. Courbe de survie selon le virus utilisé pour infecter les souris BALB/C et C57BL/6 après infection. Comparaison des doses létales 50 selon le virus utilisé et le fond génétique de la souris (BALB/C ou C57BL/6) (76).

4.8. Perspectives de cibles thérapeutiques

L'infection à *Influenzavirus* déclenche à la phase précoce un orage cytokinique et une cascade de recrutements cellulaires de l'immunité innée aboutissant à une forme sévère d'insuffisance respiratoire aigüe, dite grippe maligne, avec une mise en jeu possible du pronostic vital.

La régulation de l'orage cytokinique semble être une cible thérapeutique intéressante (77). Plusieurs données précliniques ciblant certaines cytokines (macrophage inflammatory protein (MIP)...) montrent une efficacité sur la mortalité. L'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-MIP2 régulant le recrutement des PNN semble significativement associée à une réduction de la courbe pondérale et de la mortalité. (figure 58) (78).

Chez l'Homme, une modulation de l'immunité semble également apporter un bénéfice en survie. Une étude ouverte randomisée ayant inclus une centaine de patients par bras évaluant l'ajout à l'oseltamivir d'un AINS (naproxène) et un macrolide (clarithromycine) semble montrer une efficacité de l'association, avec une réduction significative de la mortalité à 30 jours ($p : 0,01$) (figure 59) et à 90 jours ($p : 0,01$) (23).

Toutes les composantes cellulaires et biochimiques de l'immunité innée peuvent être une cible thérapeutique intéressante pour réduire la mortalité par grippe grave, d'où l'importance de l'étude de cette réaction immune post-infection grippale.

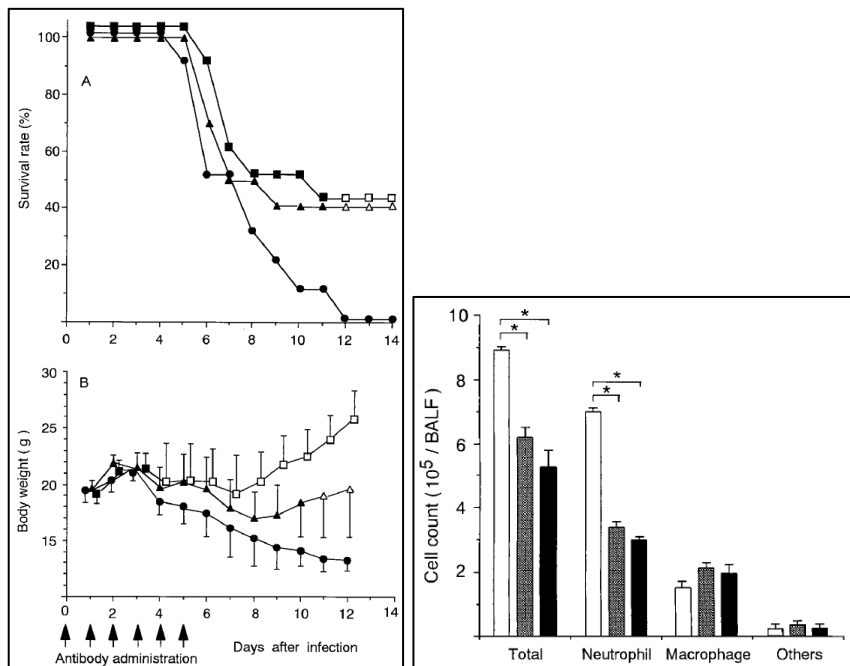


Figure 58. Courbe de survie et d'évolution pondérale de souris infectées par PR8 et traitées par Ac monoclonal anti-MIP2 à 10µg (triangle), 100µg (carré) et contrôle (rond). Le symbole

devient blanc lorsque la différence est significative avec le contrôle ($p < 0.05$). Histogramme de la composition des LBA à J2 post infection PR8 de souris infectées contrôle (blanc), traitées par Ac anti-MIP2 à $10\mu\text{g}$ (gris) et à $100\mu\text{g}$ (noir) montrant une réduction significative ($p < 0,01$) non dose dépendante du recrutement en PNN mais pas en macrophages (78).

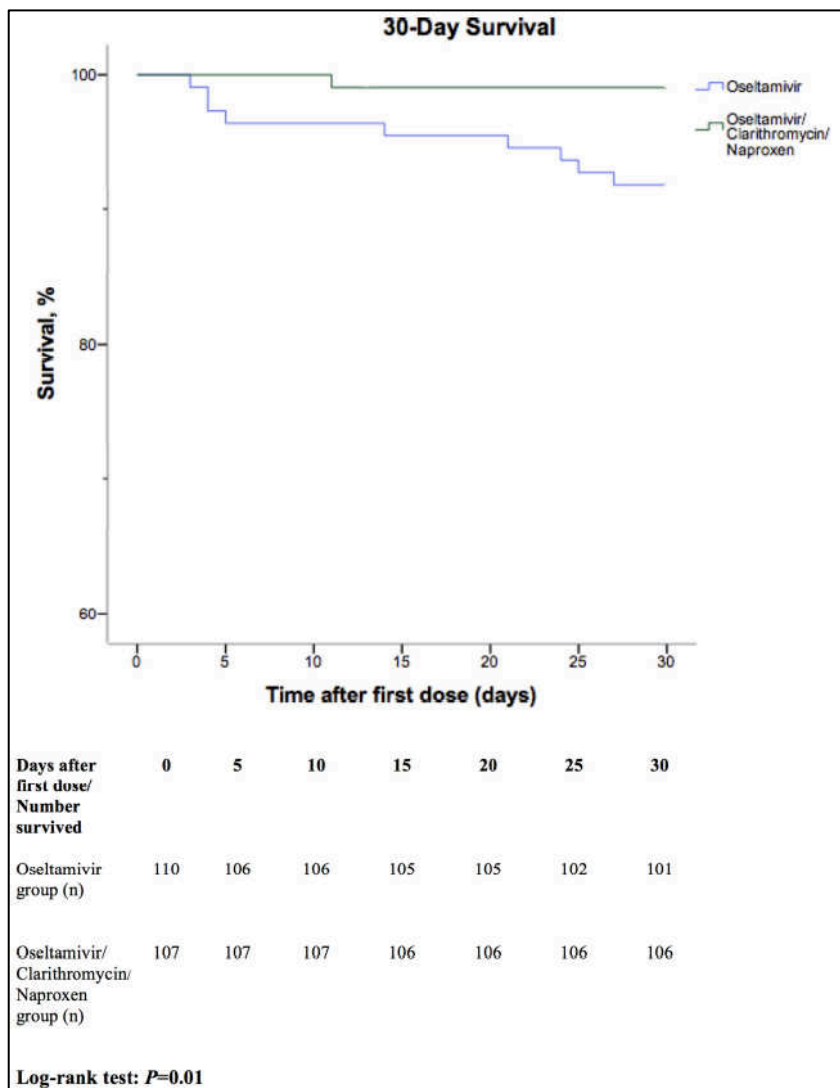


Figure 59. Courbe de survie à 30 jours comparative entre les patients du bras standard oseltamivir versus les patients du bras expérimental (oseltamivir+naproxene+clarithromycine) (23).

5. Microscopie 2-Photon (figure 60)

Depuis quelques années plusieurs techniques d'imagerie en expérimentation animale se sont développées avec des applications et des accessibilités variables (Imagerie par Résonance Magnétique, Tomographie (SPECT et PET), microscopie confocale), la microscopie 2-photons (M2P) fait partie de ces techniques d'imageries innovantes (figure 61) (79). Nous en décrivons les principes généraux, ses avantages/inconvénients et ses applications en infectiologie pulmonaire.

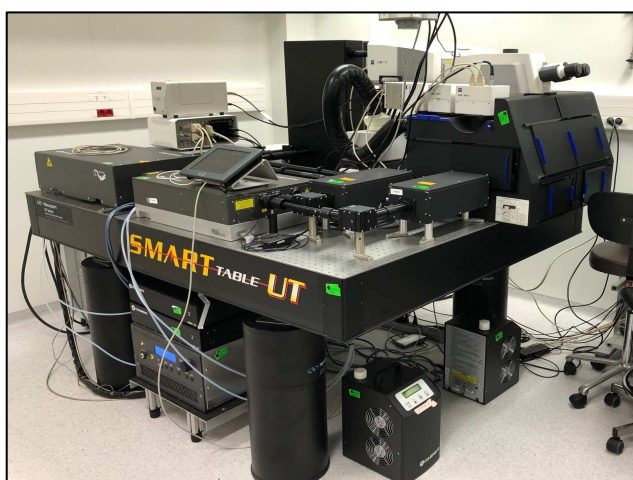


Figure 60. Microscope 2-photon installé dans l'animalerie A2 de l'IRBA.

		Resolution	Application	Imaging depth	Physiological environment	Invasivity
Fluorescence	Lung slices (LLS)	<1 μm	Molecular scale imaging (cells, protein,...)	100 μm (deep layers of the lung accessible)	Ex vivo	Tissue isolated and sectioned
	Perfused Lung (IPL)	<1 μm	Molecular scale imaging (cells, protein,...)	100 μm	Ex vivo- <i>whole organ</i>	Isolated tissue
	Intravital (IVM)	<1 μm	Molecular scale imaging (cells, protein,...)	100 μm	In vivo	Surgery required
Bioluminescence		1 mm	Functional imaging (reporter genes)	Whole body	In vivo	Noninvasive
MRI		100 μm	Lung structure	Whole body	In vivo	Noninvasive
Micro-CT		1 μm	Lung structure	Whole body	In vivo	Noninvasive
PET/SPECT		1 mm	Functional imaging (cell activity)	Whole body	In vivo	Noninvasive

Figure 61. Comparaison de différentes techniques d'imagerie intra vitale en expérimentation animale. (79)

5.1. Principe général de la M2P

5.1.1. Notions historiques de la M2P

La M2P repose sur le principe qu'un atome peut absorber 2 photons ou plus en même temps. Ce phénomène a été théorisé par Maria Göper-Mayer en 1931 et confirmé expérimentalement par Franken puis Kaiser-Garrett en 1963. L'application de cette absorption 2 photons en microscopie laser est proposée par Sheppard et Kompfner en 1978, mais ce n'est qu'en 1990 que Denk lui confère une place majeure dans la recherche par l'utilisation de laser pulsé à haute intensité. (80,81)

5.1.2. Principes physiques de la M2P

Le principe physique réside dans la capacité que possède une molécule d'absorber simultanément 2 photons (d'énergie 2 fois inférieure à celle nécessaire pour passer à l'état d'excitation) dont l'énergie combinée peut induire un état d'excitation ; et avec un retour à son état d'équilibre par l'émission d'un photon par fluorescence. Le premier photon excite la molécule qui passe dans un état virtuel intermédiaire instable de très faible durée de vie. L'absorption du second photon, quasi simultanément, lui apporte finalement l'énergie nécessaire pour accéder à l'état excité. Une telle densité spatio-temporelle de photons ne se produira qu'aux points de focalisation. Pour assurer cette densité, le flux de photons incident très élevé est permis par l'utilisation de sources lasers impulsionnelles ultra-courtes. Une image peut ainsi être reconstruite sur un plan xy en balayant le point focal et une image 3D peut être obtenue en déplaçant le point focal sur différents plans en profondeur (selon l'axe z) (figure 62). (80,81)

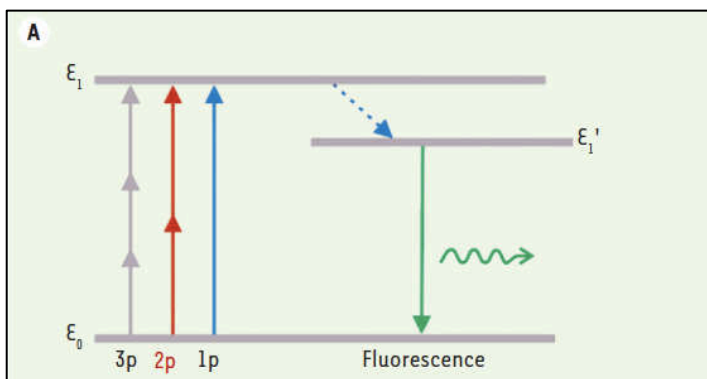


Figure 62. Principe physique de la M2P.(80)

La figure 63 montre que l'intensité lumineuse au point focal est identique entre la microscopie confocale à 450nm et la M2P à 800nm. Toutefois, cette expérimentation ne prend pas en compte l'absorption des tissus en profondeur, cette dernière est beaucoup moins importante à 800nm qu'à 450nm. Cette absorption, étant responsable de l'émission de fluorescence hors du point focal, induit un bruit parasite important, réduisant de fait la résolution en microscopie confocale versus M2P. En microscopie confocale, un sténopé est utilisé pour limiter cette fluorescence émise hors point focal, mais pour un tissu épais, l'intensité incidente doit être augmentée impactant l'intégrité du tissu observé. (80,81)

La M2P permet ainsi l'obtention d'images en conservant une excellente résolution plus en profondeur dans l'organe compte tenu de l'utilisation de longueur d'onde dans l'infra-rouge limitant la diffusion dans le tissu, en réduisant la zone excitée et la survenue de lésions tissulaires photo induites. (80,81)

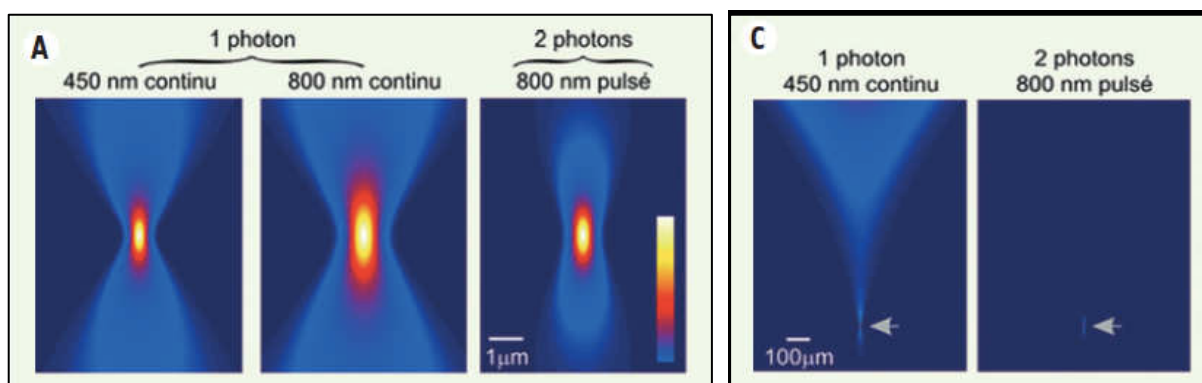


Figure 63. Profil d'intensité lumineuse au point focal comparativement entre microscopie confocal et M2P selon la longueur d'onde (schéma de gauche). Profil d'intensité lumineuse au point focal comparativement entre microscopie confocale et M2P s'il y a prise en compte du coefficient d'absorption du tissu. (80)

5.1.3. Notion de seconde harmonique

La M2P permet également la génération d'une seconde harmonique, dont l'intérêt en pratique sera décrit dans le chapitre suivant. Ce phénomène survient quand le laser interagit avec un tissu polarisable ayant une organisation moléculaire non centrosymétrique. La génération de seconde harmonique est un processus optique non linéaire de doublage de fréquence par lequel deux photons de fréquence donnée sont convertis en un photon unique

à la fréquence double. La longueur d'onde de la seconde harmonique est donc égale à la moitié de la longueur d'onde d'excitation (figure 64). Contrairement à l'émission de la fluorescence nécessitant une excitation par les 2 photons, durant laquelle une partie de l'énergie incidente est perdue lors du retour à l'état d'équilibre, la seconde harmonique n'implique pas d'excitation, elle conserve l'énergie et préserve la cohérence de la lumière laser. Cette seconde harmonique permet donc de visualiser certaines structures (figure 65) sans modification des longueurs d'onde utilisées pour exciter les fluorochromes épargnant ainsi de dommages tissulaires. (82,83)

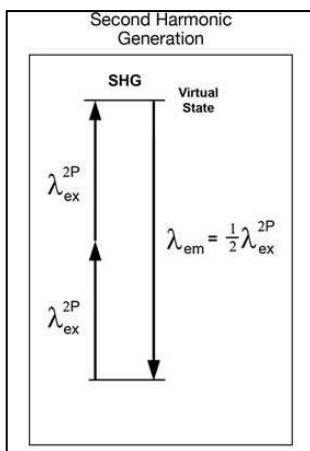


Figure 64. Diagramme de Jablonski illustrant la génération d'une seconde harmonique par un tissu non linéaire.(82)

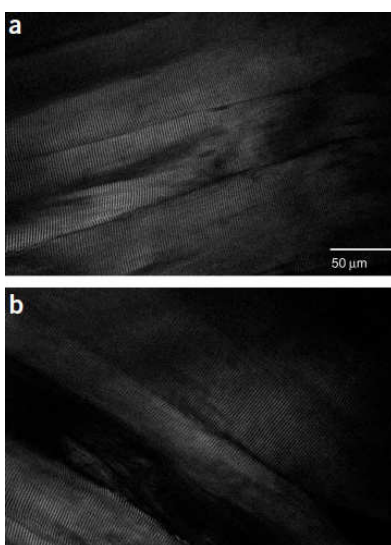


Figure 65. Exemple de seconde harmonique lors de l'imagerie en M2P d'un muscle de la jambe d'une souris.(83)

5.1.4. Fluorescence

En général, en M2P les fluorochromes sont excités à 2 fois leur pic d'absorption monophotonique. Toutefois, le processus d'absorption d'1 ou 2 photons répondant à des lois de la mécanique quantique différentes, cette généralité n'est pas systématique et nécessite d'être modulée lors de la mise au point de l'utilisation pratique du fluorochrome.

Il convient également lors de l'utilisation des fluorochromes endogènes ou exogènes de comparer leur spectre d'absorption pour le réglage de la longueur d'onde des lasers mais surtout de comparer leur spectre d'émission permettant ainsi d'éviter tout chevauchement assurant la pertinence physiologique de la structure visualisée par fluorescence. La figure 66 montre les spectre d'absorption et d'émission des fluorochromes principalement utilisés dans le cadre de cette thèse : Yellow Fluorescent Protein (YFP), Red Fluorescent Protein (RFP) et Brillant Violet 421 (BV421). (84)

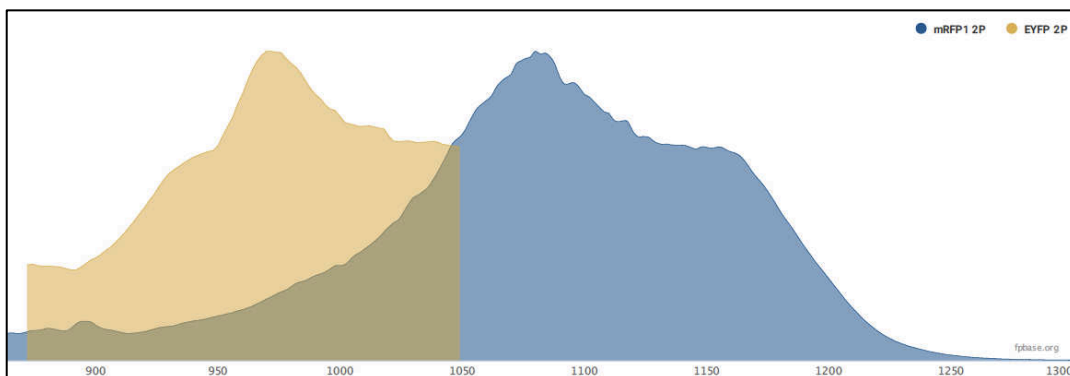


Figure 66. Spectre d'excitation 2-photon de différents fluorochromes (YFP, RFP) (source FPbase).

5.1.5. Résumé de montage d'un M2P

En pratique, comme le montre la figure 67, le laser émet les photons, qui sont orientés vers l'échantillon par un jeu de miroirs dichroïques puis concentrés au point focal par l'objectif, collectant la fluorescence émise, qui sera détectée par un tube photomultiplicateur (PMT).

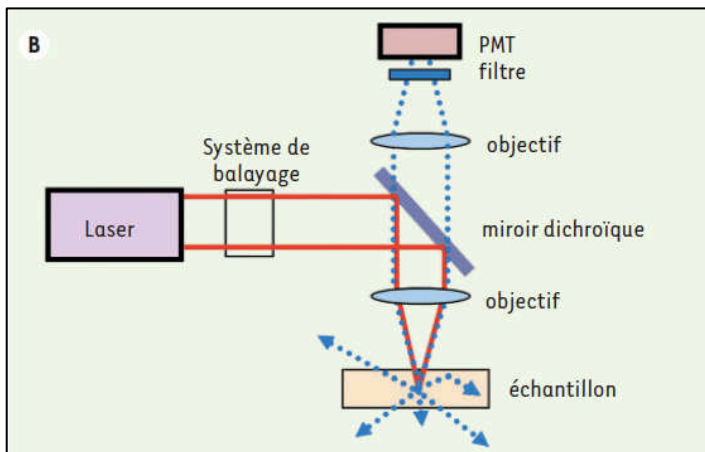


Figure 67. Schéma de montage d'un M2P. (80)

5.2. Avantages et limites

Comparativement aux autres microscopie à fluorescence notamment confocale, la M2P a plusieurs avantages (figure 68).

Tout d'abord, la faible zone d'étalement (figure 63) de la fluorescence rend plus performante la M2P pour l'imagerie en profondeur d'un organe entier. Ce phénomène rend inutile l'utilisation d'un sténopé indispensable en microscopie confocale. De plus, le faible volume tissulaire excité limite la survenue du phénomène de photo-toxicité. (80)

La M2P permet également une pénétration et donc une imagerie plus en profondeur (lumière dans l'infra-rouge) en gardant une excellente résolution ceci est lié au fait qu'en M2P le phénomène de diffusion et d'absorption est nettement moindre qu'en microscopie confocale, il en résulte donc une plus importante pénétrabilité du faisceau excitateur dans le tissu exploré.

En M2P, la plus grande séparation des spectres d'émission et d'absorption permet leur meilleure discrimination évitant l'effet d'atténuation du signal.(81)

Enfin, comme décrit précédemment, la M2P permet l'obtention dans certains tissus d'une seconde harmonique permettant la visualisation de certaine structure non fluorescente. C'est le cas du collagène fibrillaire et des fibres élastiques d'élastine. (83,85)

La M2P a toutefois plusieurs limites. En M2P ne sont visibles que les structures ou cellules fluorescentes soit spontanément (autofluorescence) soit par l'ajout d'un marquage fluorescent : animal génétiquement modifié pour que certaines cellules expriment un fluorochrome ou marquage exogène par anticorps spécifiquement dirigé contre un marqueur cellulaire couplé à un fluorochrome, donc « tout » n'est pas visible. De plus, les possibilités des marquages cellulaires sont nettement moindre qu'en cytométrie en flux compte tenu de disponibilité plus limitée des outils ; ainsi la discrimination des différentes sous population cellulaires est plus difficile en M2P qu'en cytométrie (39,40,86,87). De plus, le chevauchement des spectres des fluorochromes rend difficile la discrimination entre 2 marqueurs de même caractéristique entraînant de possibles erreurs d'interprétation. De plus, les marqueurs cellulaires peuvent se chevaucher entre plusieurs types de cellules (macrophages, cellules dendritiques, monocytes ...) pouvant également aboutir à des erreurs d'interprétation des objets visualisés.

De plus, la nécessité d'une source laser impulsionnelle rend son coût très onéreux et comme visible sur la figure 60, le M2P n'est pas transportable et occupe une place conséquente, nécessitant une pièce dédiée climatisée pour contrer la production de chaleur du laser.

Une limitation importante est également la lenteur de la vitesse du système de balayage (scan) d'où la durée des acquisitions, impactant son utilisation notamment pour l'imagerie intravitale ne permettant pas la visualisation optimale et précis des déplacements rapides.

	Microscopie confocale	Microscopie à deux photons
Sources laser utilisées	Continue, visible UV : 350 nm Argon-ion : 457, 488 et 514 nm Hélium - néon : 543 nm Hélium - néon : 633 nm	Pulsé, proche infrarouge Ti:saphir centré à 800 nm (systèmes commerciaux typiquement accordables de 750-1100 nm ; 100-200 fs à un taux de répétition de 80 MHz)
Système d'acquisition	Balayage laser (galvanomètres, déflecteurs acousto-optiques) Disque rotatif	Balayage laser (galvanomètres, déflecteurs acousto-optiques)
Limite de résolution	Limitée par la diffraction	Limitée par la diffraction
Mode d'excitation	Par absorption d'un photon ; linéaire, ∞ intensité ; volume d'excitation large dans un milieu absorbant	Par absorption de deux photons ; non-linéaire, ∞ (intensité) ² ; volume d'excitation restreint dans un milieu absorbant
Mode de collection	Réflexion (épiscollection)	Réflexion (épiscollection) et transmission (transcollection) avec tranches de tissu
Sténopé	Oui	Non
Limites pratiques de profondeur d'imagerie (sans compromis de résolution)	~100 μ m	~1000 μ m
Avantages	Source de laser multiples et peu coûteuse Compatible avec un <i>disque rotatif</i>	Minimisation du point focal en tissu épais : - meilleure résolution axiale - imagerie plus en profondeur - minimisation de la toxicité - simplification du système - augmentation de la sensibilité (aucune élimination de signal)

Figure 68. Comparaison des caractéristiques entre la M2P et confocale. (80)

5.3. Modalités d'imagerie pulmonaire intravitale

La M2P permet d'effectuer une imagerie intravitale d'organe entier (le poumon par exemple). Plusieurs modalités d'imagerie intravitale ont été décrites soit *in vivo* par imagerie pulmonaire sur animal endormi soit sur poumon isolé-perfusé-ventilé ou sur section de poumon. Nous en décrivons les modalités de réalisation suivi d'une comparaison critique de ces techniques.

5.3.1. Différentes techniques

Pour imager le poumon dans les conditions les plus physiologiques, il semble évident que le poumon doit être exploré *in vivo*. Pour imager le poumon sur animal vivant, il faut donc avoir accès directement au poumon, plusieurs techniques permettent cela.

5.3.1.1. Imagerie intravitale *in vivo stricto sensu*

Une fenêtre thoracique (figure 69) peut être placée sous anesthésie générale environ 2 semaines avant l'expérimentation afin de permettre la résorption de l'œdème post opératoire (79,88,89). Cette fenêtre semble pouvoir être laissée plusieurs semaines. Afin d'éviter la déshydratation, le refroidissement et protéger le poumon ainsi ouvert, une membrane est apposée au fond de la fenètre en contact du poumon : cette membrane peut être en Téflon° associé à une solution réchauffée (Tyrode). Les membranes en verre ou métal sont plus protectrices mais peuvent être responsables de blessures. Cette technique nécessite, pour permettre une image en haute résolution, de limiter les mouvements (cardiaque, respiratoires...) par (figure 70) :

-Apnée ou Ventilation sélective exclusivement du poumon non observé mais exposant au risque d'atélectasie.

-Lier l'acquisition des images à chaque cycle respiratoire en imageant lorsque le poumon ne bouge plus en fin d'expiration. Le rythme respiratoire pouvant être physiologique ou régulier et induit par une ventilation mécanique parfaitement rythmée.

-Suction du poumon à travers la fenètre pour immobiliser la zone à imager.

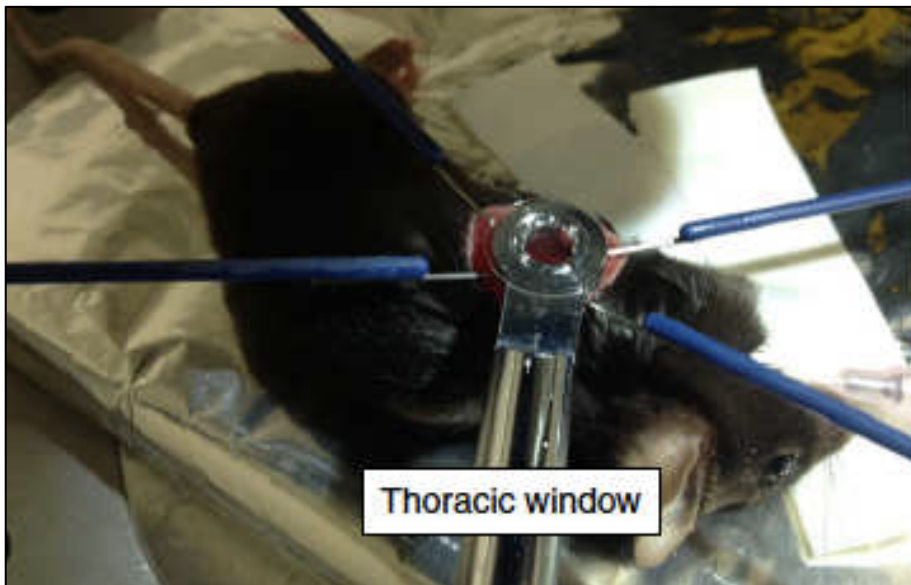


Figure 69. Fenêtre thoracique en place pour imagerie. (90)

Technique	Mechanical stabilization*	Ventilation disruption	Inflammation	z-stack	Scan rate	Motion artifacts
Bronchus clamping	+++	+++	-	Yes	+	+
Glued lung	+++	-	+++	Yes	+	+
Apnea	+	++	-	Yes	+	+
Suction	++	-	-	Yes	+	+
Oversampling	-	-	-	No	+++	++

Figure 70. Différentes techniques de stabilisation du poumon pour obtention d'une imagerie haute résolution.(88)

5.3.1.2. Technique *ex vivo*

5.3.1.2.1. Poumon isolé-perfusé-ventilé

Cette technique permet une imagerie intravitale mais *ex vivo*. Le bloc cœur poumon est explanté. Le poumon est perfusé en continue par du sang autologue ou du sérum salé isotonique après avoir cathétérisé l'artère pulmonaire gauche et le ventricule gauche ; le poumon ainsi perfusé est ventilé mécaniquement par intubation trachéale selon les paramètres ventilatoires requis par les conditions expérimentales. Le poumon ainsi équipé est maintenu dans une chambre fermé à l'abri de la lumière à température et humidité contrôlées et constante (figure 71).(91)



Figure 71. Poumon isolé-perfusé-ventilé.(91)

5.3.1.2.2. Coupe pulmonaire

La troisième méthode d'imagerie « intravitale » est également *ex vivo*. L'objectif consiste à assurer la viabilité tissulaire d'une tranche de poumon par le maintien de condition d'hydratation et de température 37°C continue.

Après anesthésie et dissection, la souris est exsanguinée par perfusion de 20 mL de milieu RPMI sans phénol réchauffée à 37°C. Le poumon est ensuite explanté et placé dans du milieu tempéré à 37°C. Une tranche épaisse du lobe gauche est coupée au vibratome. La section pulmonaire ainsi obtenue est collée sur un dispositif assurant une perfusion continue de milieu RPMI réchauffée à 37°C et maintenue dans la chambre du microscope réchauffée à 37° (figure 72). (79,92)

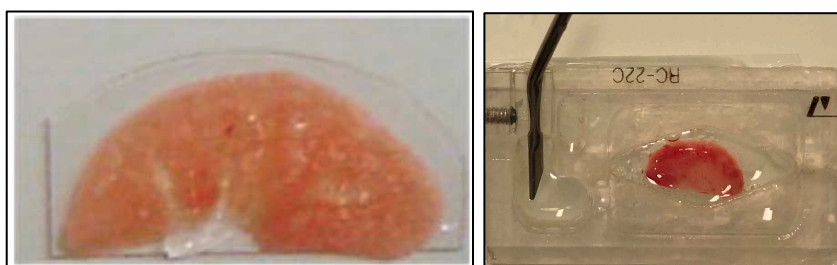


Figure 72. Tranche de poumon et positionnement dans le dispositif d'hydratation continue. (89)

5.3.2. Comparaison critique des différentes techniques d'imageries intravitales (*in vivo* vs *ex vivo*)

La figure 61 résume les caractéristiques globales des 3 techniques décrites ci-dessus.

La méthode *in vivo* est la seule qui assure la préservation des conditions les plus physiologiques en gardant l'ensemble des composantes cellulaires, aériennes, vasculaires en respectant l'anatomie de l'organe. Toutefois, elle nécessite des adaptations pour s'affranchir des mouvements induits par la respiration. L'exploration ne peut être exhaustive car se limite uniquement de la zone du poumon où est placée la fenêtre et est limitée en profondeur à la zone des 100µm sous la plèvre. De plus, on ne peut formellement exclure l'impact physiologique de la réalisation de la thoracotomie pour la mise en place de la fenêtre. Même si, en théorie, la fenêtre devrait permettre des explorations durant plusieurs jours, il semble, en pratique difficile de répéter les acquisitions dans le temps (79).

La méthode du poumon isolé-perfusé-ventilé semble plus physiologique de la section pulmonaire mais beaucoup moins que *l'in vivo* ; toutefois, elle ne permet pas d'étudier la composante vasculaire. Même si elle permet d'explorer plusieurs zones du poumon, seule la périphérie du poumon n'est analysable et l'exploration est limitée en profondeur à la zone des 100µm sous la plèvre (79).

La méthode de la section pulmonaire nécessite peu d'adaptation du plateau technique et pas de compétence chirurgicale spécifique. Par contre, elle n'explore pas le poumon dans aucune condition physiologique et ne permet pas d'analyse de la composante vasculaire. De plus, l'organe étant explanté et tranché, la durée d'expérimentation est limitée à quelques heures. Toutefois, elle permet, comme les autres techniques, l'analyse des interactions cellulaires. En ayant accès de par la section à l'intérieur de l'organe, c'est la seule technique à pouvoir explorer le poumon dans sa globalité anatomique et en profondeur en conservant donc la possibilité de reconstruction 3D (79) ; elle permet également l'ajout de marqueur fluorescent exogène par anticorps couplé à un fluorochrome.

Aucune technique n'est parfaite et le choix dépendra et devra être le meilleur consensus entre la question posée, des considérations éthiques, des possibilités de l'animalerie (le gardiennage plusieurs jours de souris avec fenêtre thoracique nécessite assurément des compétences et adaptations spécifiques), du plateau technique (notamment chirurgical et anesthésique) et des compétences des expérimentateurs.

5.4. Applications de la M2P

5.4.1. Recherche en pathologies pulmonaires

Les applications de la M2P dans le domaine de l'infectiologie s'étoffent depuis plusieurs années, notamment dans l'imagerie intravitale, dont nous avons décrit les techniques/avantages/inconvénients précédemment, permettant d'étudier les interactions et la mobilité cellulaire mais également l'analyse du micro environnement(93).

5.4.1.1. Étude des interactions cellulaires

La M2P peut probablement également avoir un intérêt pour l'analyse histologique d'organe entier. Comme nous le décrivons dans le chapitre 5.5, la M2P pourrait supplanter l'étude

anatomique comparativement à l'histologie « conventionnelle » en permettant l'analyse des lésions structurales, l'utilisation de plusieurs fluorochromes permettant l'analyse précise des types cellulaires et également du fait des acquisitions d'images en profondeur et de la reconstruction 3D l'étude des interactions cellulaires (94–96).

La M2P a surtout été développée pour l'imagerie intravitale et plusieurs études ont exploré son intérêt dans l'observation « in vivo » des migrations et interactions cellulaires (93,97).

De nombreuses équipes ont utilisé la M2P pour étudier les interactions entre cellules immunitaires et cellules tumorales comme l'illustre la figure 73 montrant l'afflux par voie vasculaire de cellules NK au sein d'une tumeur pulmonaire(98).

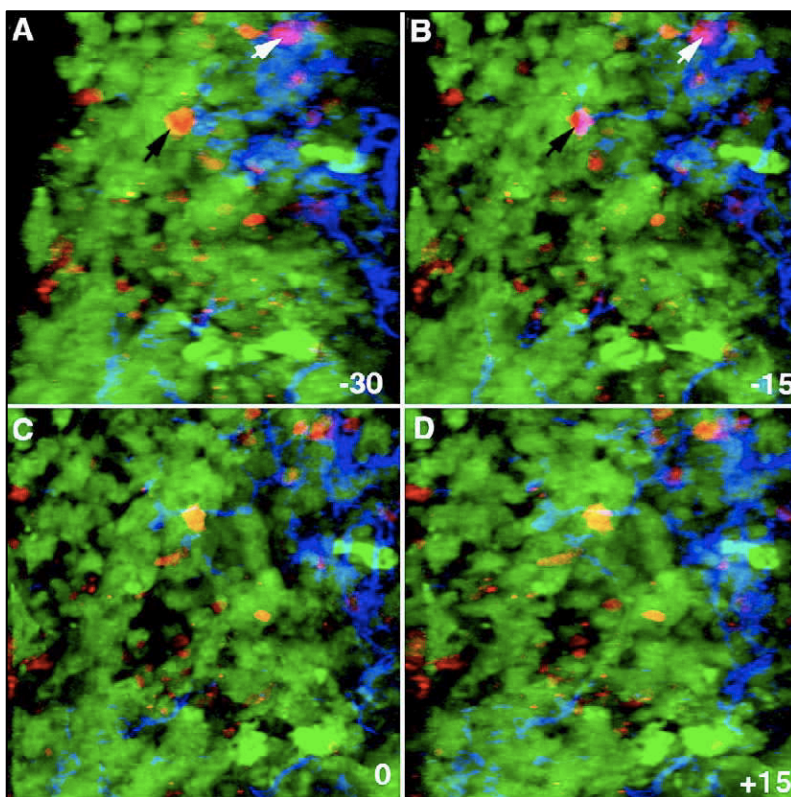


Figure 73. Imagerie intravitale montrant la diffusion par voie vasculaire (bleu) de cellules NK (rouge) au sein d'une tumeur pulmonaire (vert).(98)

German et coll ont étudié les interactions entre les cellules CD11c+ et les lymphocytes T d'une souris C57Bl6/J (CD11c-YFP) ayant été transplantées du lobe gauche du poumon d'une souris BALB/C. La figure 74 illustre les interactions précoces entre ces 2 types cellulaires 4 jours après la transplantation en imagerie intravitale (99).

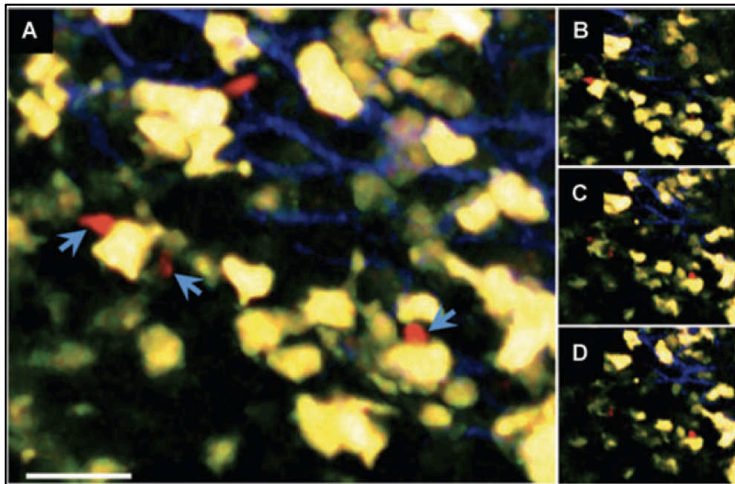


Figure 74. Imagerie intravitale d'un lobe gauche de poumon de souris BALB/C transplanté sur une C57Bl6/J (CD11c-YFP) montrant une infiltration du poumon « donneur » et des interactions précoces (4 jours) et multiples entre les cellules du « receveur » CD11c (jaune) et Lymphocytes T (rouge).(99)

Fiole et coll ont montré les interactions après infection par des spores de *Bacillus anthracis* entre les cellules dendritiques CX3CR1-GFP et les macrophages alvéolaires marqués par la Rhodamine inhalée (figure 75)(88,100,101).

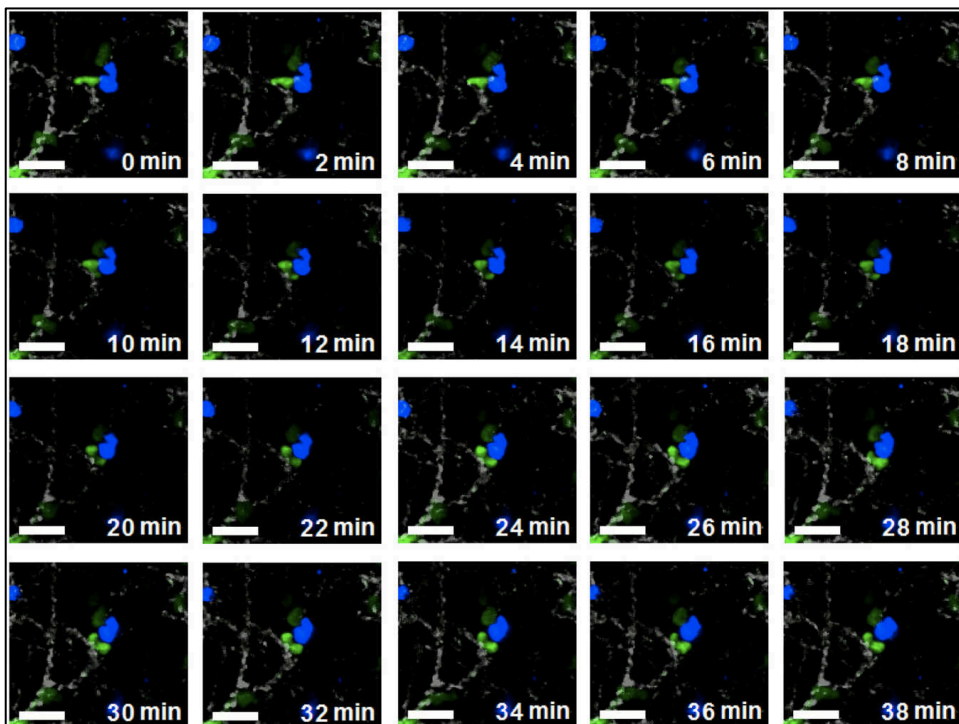


Figure 75. M2P intravitale montrant l'interaction après infection par des spores de *Bacillus anthracis* entre une cellule dendritique CX3CR1-GFP (vert) avec un macrophage alvéolaire (bleu).(100)

Ueki et coll ont utilisé 2 souches virales (H5N1 et PR8) couplées à une protéine fluorescente afin d'étudier *in vivo* l'évolution de l'infection au niveau pulmonaire et analyser le recrutement en PNN et l'évolution de leur mobilité post-infection. Ils ont montré une augmentation de la perméabilité vasculaire avec H5N1 versus PR8 ainsi qu'un pic précoce et fugace de PNN rapides au site infecté suivi d'une diminution rapide du recrutement de PNN avec un « phénotype » lent (figure 76) (102). Ueki et col en décrivant leur protocole d'imagerie intravitale a permis la visualisation de l'infection par H5N1 ou PR8 (couplés au fluorochrome Venus) et la possibilité de mise en évidence de co-infection d'une même souche virale couplée à des fluorochromes différents (venus et cerulean-H5N1 ou venus et cerulean-PR8) (figure 77) (90).

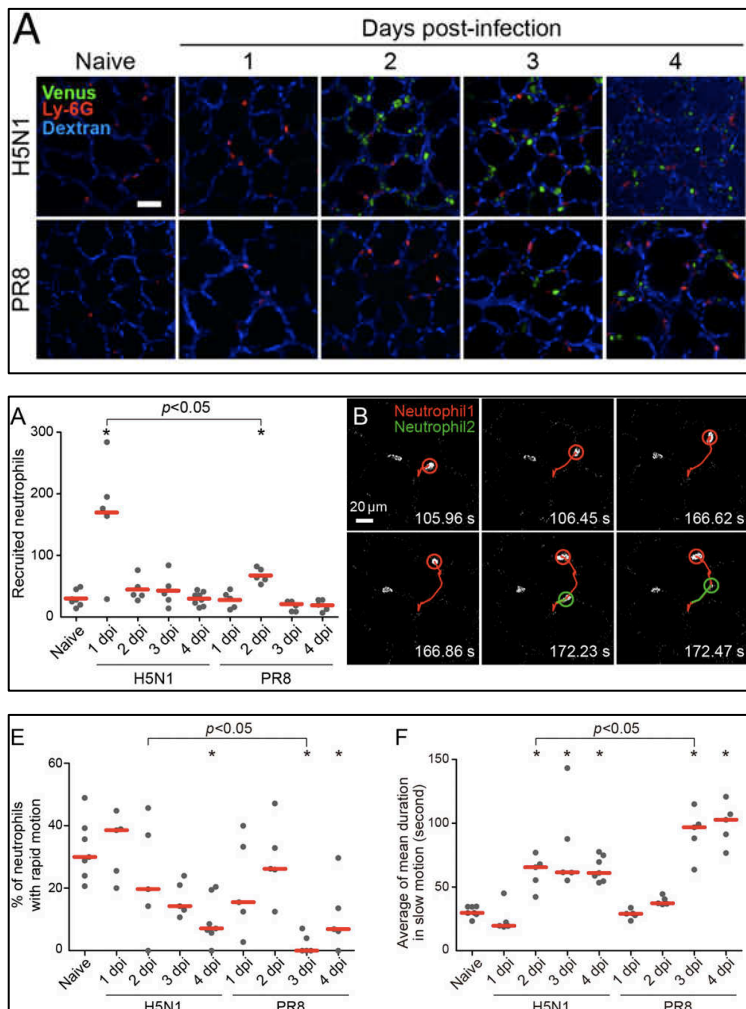


Figure 76. Evolution comparative de l'infection à 2 souches d'*Influenzavirus* (PR8, H5N1) et du recrutement en polynucléaires neutrophiles (schéma du haut). Analyse comparative de la mobilité des polynucléaires neutrophiles post-infection à *Influenzavirus* (PR8, H5N1) (schéma du centre). Comparaison en fonction du temps post-infection de l'évolution des PNN à

déplacement rapide et lent ne montrant aucune différence entre les 2 souches avec des PNN rapides à la phase très précoce (J1) et des PNN lents dès J2 (schéma du bas). (102)

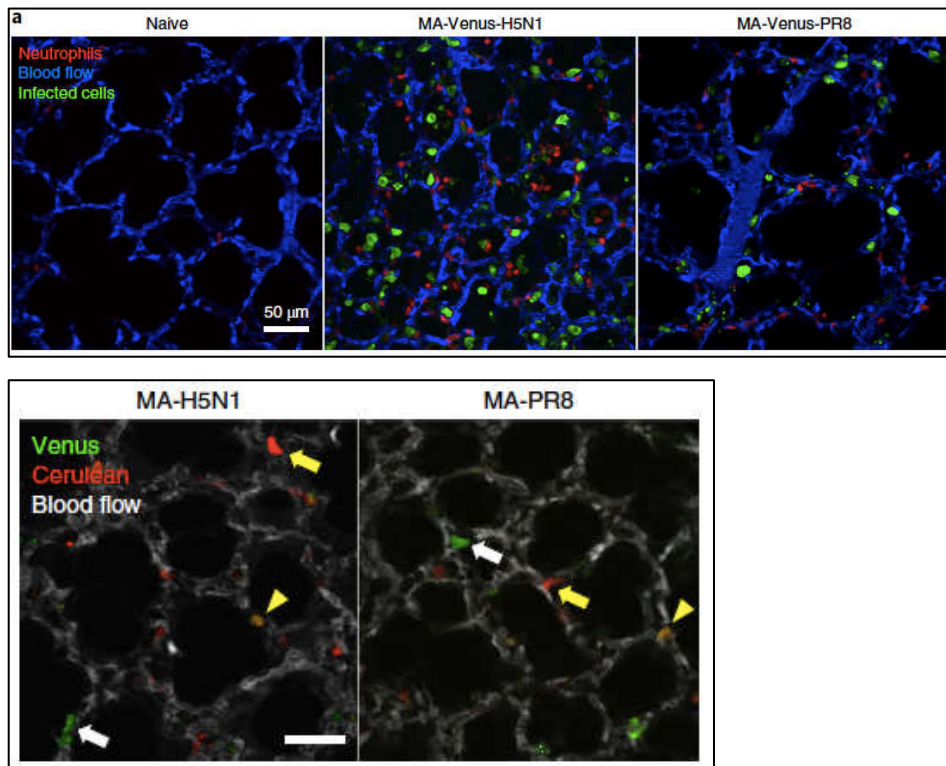


Figure 77. Imagerie intravitale visualisant l'infection à H5N1 ou PR8 couplés au fluorochrome venus (vert) et le recrutement en PNN (rouge) (photo du haut). Co-infection à H5N1 ou PR8 couplés à 2 fluorochromes différents (venus (vert) et cerulean (rouge)) (photo du bas).(90)

5.4.1.2. Étude du microenvironnement

Les techniques *in vivo* et poumon isolé-perfusé-ventilé en assurant la circulation sanguine « physiologique » permettent l'analyse de la vascularisation via le développement de fluorochromes spécifiques (organisation anatomique de la vascularisation de l'organe, régulation du flux...) et avec diverses conditions expérimentales (impact sur la vascularisation de l'hypoxie...) (figure 78) (98).

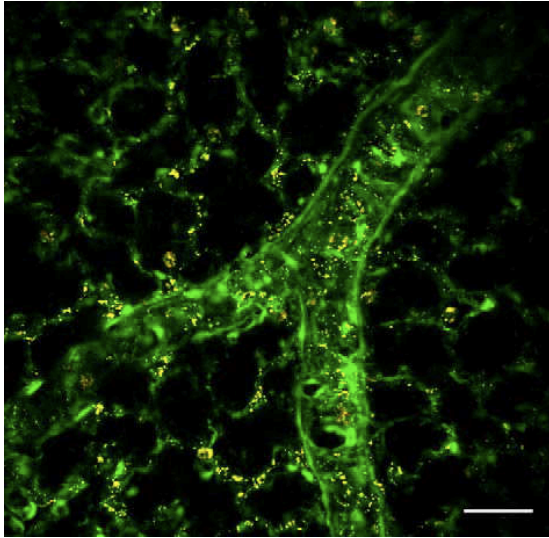


Figure 78. Reconstruction 3D d'un vaisseau de poumon isolé-perfusé-ventilé de souris Tie-2-GFP. (98)

Dans le modèle murin à la bléomycine de fibrose pulmonaire, la détection du collagène par la seconde harmonique générée en M2P permet une quantification de la fibrose avec l'observation de l'accumulation de matrice extracellulaire et de foyer fibroblastique (figure 79) (103).

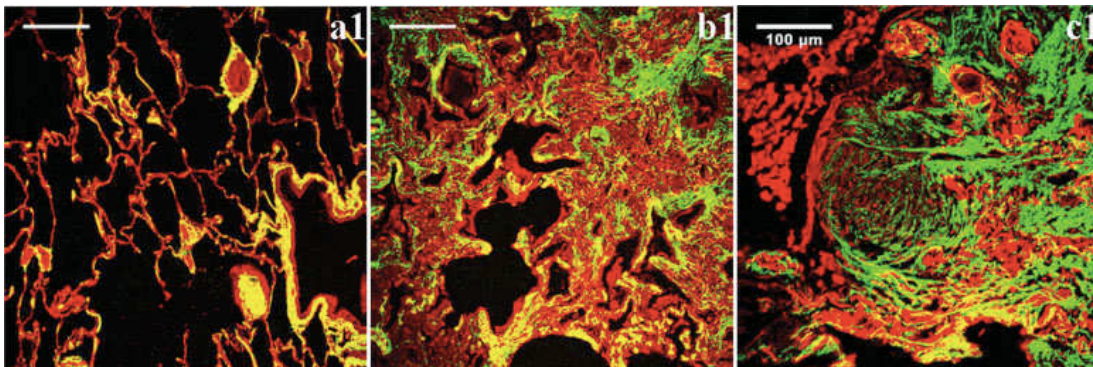


Figure 79. Seconde harmonique en M2P permettant l'observation de l'accumulation de matrice extracellulaire, distorsion architecturale pulmonaire (b1) et foyer fibroblastique (c1) dans un poumon d'un modèle murin de fibrose pulmonaire à la bléomycine comparativement aux souris contrôles. (103)

5.4.2. Focus sur les critères de choix du modèle animal

Comme vu précédemment, de nombreux critères concourent aux choix de la meilleure méthode d'imagerie intravivale. Mais il convient également, en M2P, de bien choisir son modèle animal. De nombreux modèles animaux transgéniques ont été développés pour application en M2P en couplant un fluorochrome aux gènes de protéines spécifiques d'un type cellulaire (figure 80) (90,104).

Le choix du modèle doit donc être un compromis entre le(s) type(s) cellulaire(s) étudié(s) par la problématique de recherche, la comparaison des spectres d'absorption/émission du fluorochrome endogène couplé, de la possible autofluorescence de certaines cellules de l'organe observé et des éventuels autres fluorochromes exogènes utilisés.

Reporter	Notes
<i>T cells</i>	
GFP, CFP, DsRed	Requires adoptive cell transfer
PA-GFP	Photoactivatable fluorescent reporter useful for cell tracking; requires adoptive cell transfer
DPE-GFP	A pan T cell marker; can also label pDCs
NFAT-GFP, NFAT-YFP;H2B-mCherry	Readout of TCR signaling
IFN- γ -YFP	Subset of activated T cells; can also be produced by NK cells
IL-10-GFP	Subset of T cells; can also be expressed by macrophages
FOXP3-GFP, FOXP3-mRFP	Labels T _{reg} cells; FOXP3 is on the X chromosome, be aware of X chromosome inactivation in females
Nur77-GFP	Labels T cells and also B cells upon antigen receptor engagement
Granzyme B-TdTomato	A marker of granule exocytosis in cytolytic T cells and NK cells
Tbx21-ZsGreen	For assessing T _H 1 responses in T cells
CD2-eGFP	Labels peripheral T cells and some NK subsets
IL-17F-Cre ^{YFP}	Many variants exist for studying T _H 17 cells in vivo
IL-4-eGFP	Used to assess T _H 2 immunity
IL-21-GFP	Used to study the role of T _H cells
<i>B cells</i>	
GFP, CFP, DsRed	Requires adoptive cell transfer
PA-GFP	Photoactivatable fluorescent reporter useful for cell tracking; requires adoptive cell transfer
CD19-tdRFP	Expressed by numerous B cells, adoptive transfer may be necessary if tissues are densely infiltrated by B cells
Bcl6-YFP	A B cell marker already validated for two-photon microscopy; also labels T _{FH} cells
Blimp-1-YFP	Expressed by B cells and highly expressed in plasma cells
Activation-induced cytidine deaminase (AID)-GFP	Subset of B cells
<i>DCs</i>	
CD11c(ITGAX)-YFP, CD11c-mCherry	Cells other than DCs can express CD11c
XCR1-Venus/+	Homozygous mice are null for XCR1
XCR1-KIKGR/+	Xcr1 replaced with photoconvertible fluorescent protein Kikume Green-Red (KIKGR)
CXCL9-RFP, CXCL10-BFP	These chemokines can also be expressed by other cell types, including monocytes, macrophages, granulocytes, and nonimmune cells
SIGLEC-H-GFP	Expressed by pDCs
Flt3-BFP2	This construct has also been incorporated into a genetic model used to visualize DCs, macrophages, and CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells simultaneously (Flt3-BFP2, Mertk-GFP-diphtheria toxin receptor, Cd4-tdTomato, Cd8a-tdTomato)
Zbtb46-GFP	A cDC marker that may be expressed in erythroid and endothelial populations
<i>Monocytes/macrophages</i>	
CX3CR1-GFP/+	This chemokine receptor can also be expressed by T cells, NK, DC, and macrophages. Homozygous mice are null for CX3CR1
CCR2-RFP/+	Homozygous mice are null for CCR2
CX3CR1-GFP/+;CCR2-RFP/+	Homozygous mice are null for CX3CR1 and/or CCR2
Mertk-GFP-DTR	Homozygous mice are null for Mertk

Figure 80. Exemples de modèles animaux dont certains types cellulaires spécifiques expriment un fluorochrome. (90,104)

Si nous prenons l'exemple du système phagocytaire mononucléé composé des macrophages résidents tissulaires, des monocytes circulants et des sous-populations de cellules dendritiques, comme l'illustre la figure 81, aucun marqueur n'est spécifique d'une seule sous population spécifique pouvant conduire à des erreurs d'interprétation sur le sous-type cellulaire en cause dans la physiopathologie. Le modèle animal choisi peut parfois nécessiter soit des croisements d'espèces soit l'ajout d'un marqueur exogène (anticorps spécifique) couplé à un fluorochrome (38,100).

	MacBlue	MacGreen	Cx3cr1-EGFP	LyzM-GFP	Nr4a1-GFP	CD11c-YFP	MacApple	CCR2-RFP
Ly6Chi Mo	+++	++	+	++	+	-	++	++
Ly6Clow Mo	+++	+++	+++	++/-	+++	-	+++	-
Neutrophils	+/-	++	-	+++	-	-	++	?
AM	+++	+++	-	+++	-	+/-	+++	-
cDC1	-	+/-	-	-	-	+++	+/-	?
cDC2	+++	+/-	+/-	+/-	-	+++	+/-	?
Other reported subsets	Microglia, Langherans, some B cells	All tissue mac, eosino, some B cells	Microglia, Osteoclast, Langherans, some NK, T cells	Some tissue mac	Activated T cells	Langherans some T, B cells	All tissue mac, eosino, some B cells	NK cells, some T cells

Figure 81. Tableau résumant les sous-populations du système phagocytaire mononucléé (monocytes, cellules dendritiques, macrophages) étudiées par les différents modèles animaux transgéniques. (86)

5.4.3. Applications en pratique clinique

La M2P, jusqu'alors réservée à la recherche, tente d'élargir son champ d'utilisation à la pratique clinique, même si la disponibilité et le coût pondéreront son usage face à des techniques peut-être moins performantes mais plus accessibles.

König rapporte une méta-analyse montrant un intérêt pour l'utilisation de la M2P en remplacement de l'histologie « conventionnelle » notamment extemporanée des biopsies effectuées pour suspicion de pathologies néoplasiques (figure 86) (94).

Bergmann et coll rapporte leurs travaux sur l'utilisation de la M2P pour une meilleure catégorisation de l'arthrose du genou. Ils ont imagé en M2P 31 cartilages de genoux (930 images) récupérés lors de prothèse totale de genou (imagerie < 6h post opératoire), et classé

les observations selon la classification Outerbridge (figure 82), permettant ainsi l'élaboration d'un algorithme de classification du niveau de sévérité de l'arthrose. Avec une sensibilité à 88% et une spécificité à 93% malgré un échantillon de petite taille, la technique semble très prometteuse et une application en microscopie endoscopique articulaire permettrait de mieux classer les atteintes et les indications opératoires (105).

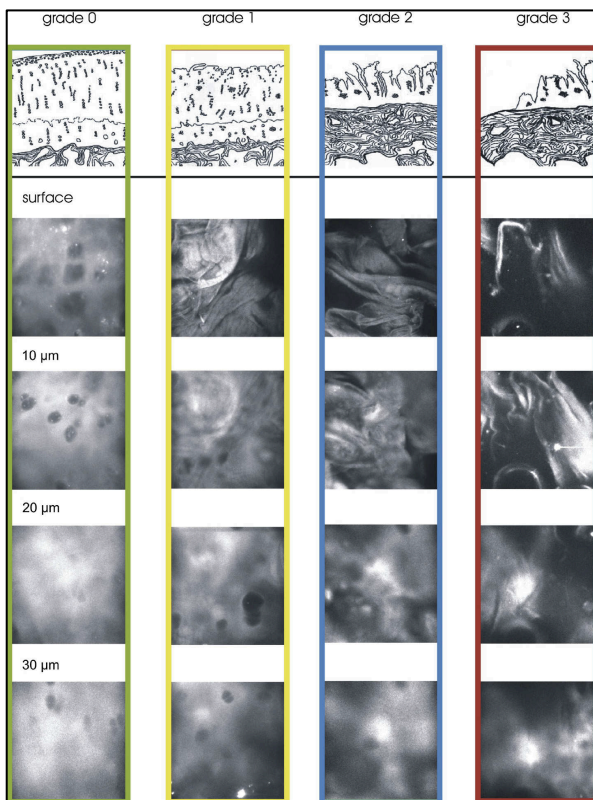


Figure 82. Mise en adéquation des images de M2P de cartilages de genoux (arthrose) avec la gradation de la classification Outerbridge. (105)

Safdarian et col ont appliqué la M2P à la recherche d'éosinophile dans des prélèvements nasaux comparativement à la technique standard dans le cadre du bilan de rhinite chronique. La M2P offre une nouvelle technique prometteuse avec une excellente sensibilité/spécificité (figure 83) pour identifier les éosinophiles nasaux à partir de l'autofluorescence de la flavine adénine dinucléotide présente dans les granules des éosinophiles (106).

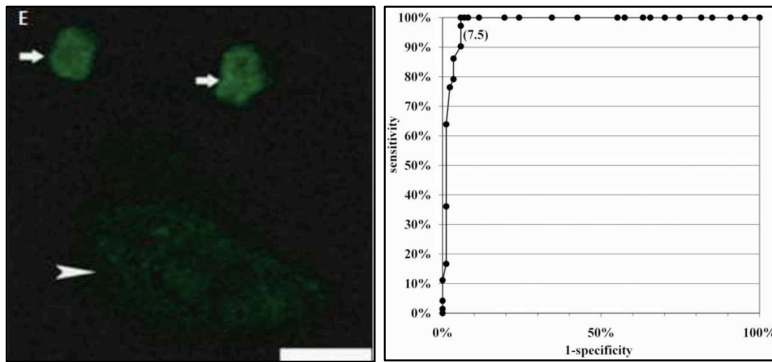


Figure 83. Polynucléaires éosinophiles en M2P (autofluorescence) (photo de gauche). Courbe ROC de la M2P pour la détection des polynucléaires éosinophiles dans les sécrétions nasales. (106)

5.5. Comparaison avec l'analyse histologique en microscopie optique «conventionnelle»

L'analyse anatomique pourrait reposer sur une lecture histologique en microscopie optique « classique » après coloration. Toutefois, cette technique présente quelques inconvénients et limites.

Après prélèvement tissulaire (explant, biopsie...), le prélèvement doit être fixé le plus souvent dans du formaldéhyde ou équivalent (AFA, Bouin...). Le prélèvement fixé va subir un traitement modifiant sa composition chimique (remplacement de l'eau par l'alcool, remplacé par un solvant puis par la paraffine). Le prélèvement ainsi préparé va être coulé dans une bloc de paraffine. Le bloc de paraffine contenant le tissu sera coupé au microtome permettant d'obtenir une coupe de 2-5µm d'épaisseur. Cette fine coupe d'échantillon est posée sur une lame. Afin d'être coloré, les lames sont réhydratées dans des bains d'alcool puis dans de l'eau distillée. Ainsi, elle pourra être colorée le plus souvent par Hématéine-Éosine. Elle peut enfin être visualisée. Elles pourront également à ce stade bénéficier d'un marquage par un anticorps spécifique d'une structure ou d'une cellule puis d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome permettant une analyse plus précise des types cellulaires que la simple morphologie. Cette technique d'immuno-marquage ne peut étudier qu'une structure par coupe rendant impossible l'analyse des interactions intercellulaires. Cet écueil peut être résolu par l'imagerie multispectrale permettant par immunofluorescence d'obtenir un marquage de plusieurs types cellulaires. Cette technique à toutefois quelques limites : peu de fluorochromes disponible avec un risque de chevauchement des spectres d'émission,

nécessité de l'appareil spécifique et sur coupe histologique micrométrique donc ne permettant pas d'imagerie en volume ni de reconstruction 3D (figure 84). A notre connaissance, aucune donnée sur cette technique n'a été publiée en contexte infectieux pulmonaire (107,108).

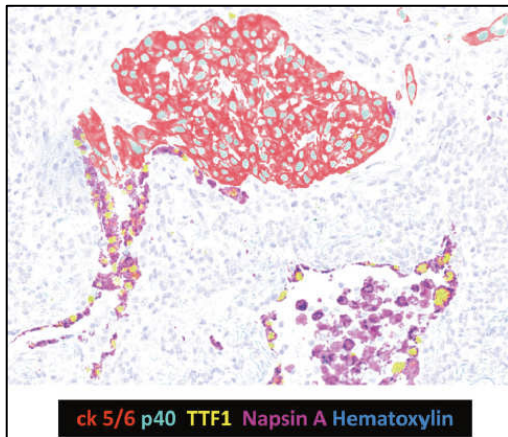


Figure 84. Représentation visuelle en fond clair par l'addition des images non mélangées de chaque biomarqueur et de l'hématoxyline d'une biopsie de carcinome pulmonaire. (108)

Ce procédé de préparation nécessite des modifications physico-chimiques du prélèvement. De plus, les coupes de peuvent excéder 5 μ m d'épaisseur ne permettant pas d'acquisition selon l'axe z et donc pas de reconstruction 3D limitant l'étude de interactions cellulaires. De plus, l'analyse histologique de tissu fixé ne permet pas de possibilité d'imagerie intra vitale, donc aucune analyse d'interactions cellulaires dynamiques.

Même si la technique de préparation est longue, l'acquisition des images en histologie conventionnelle est immédiate, ce qui n'est pas le cas de celles obtenue en M2P, qui nécessitent plusieurs heures d'acquisition par zones explorées.

Medina et col. ont rapporté leurs résultats sur l'aspect du tissu via une analyse histologique conventionnelle après préparation du prélèvement comme décrit ci-dessus ou via la M2P après une coloration d'une biopsie épaisse non coupée de peau de cochon. La figure 85 montre une image exploitable de qualité équivalente et identique en structure (96). Les structures et l'anatomie sont parfaitement bien respectées en M2P.

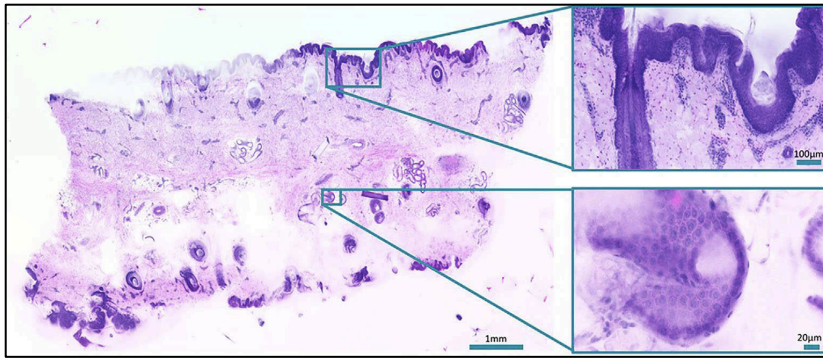


Figure 85. Image acquise par M2P après coloration extemporané d'une biopsie épaisse de peau de cochon. (96)

En pratique clinique, la question de la place de la M2P en remplacement de l'histologie « conventionnelle » est posée. König et coll. rapportent une méta-analyse des études ayant comparé la M2P à l'histologie « conventionnelle » dans le cadre du bilan de tumeurs néoplasiques ou non. Comme le montre la figure 86, l'aspect morphologique est totalement respecté avec une identification parfaite des structures. Ils concluent à, au minimum, une équivalence de performance diagnostique morphologique (figure 87) car même si l'exploration des anomalies nucléaires est meilleure en histologie « conventionnelle », l'analyse des modifications du microenvironnement notamment du tissu conjonctif est facilité par la seconde harmonique.

La M2P permet une imagerie extemporanée (impossible en histologie conventionnelle) sur tissu « frais » avec imagerie en profondeur et reconstruction 3D. Le manque d'études en aveugle dans cette méta-analyse altère la puissance des résultats ne permettant pas d'établir une sensibilité et spécificité fiable scientifiquement (sensibilité : 94%, spécificité : 96%, concordance : 95%) mais fait de la M2P un outil très prometteur en remplacement de l'histologie conventionnelle » (94).

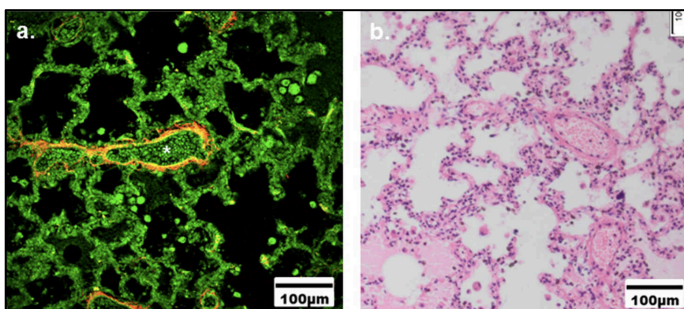


Figure 86. Comparaison d'images acquise par M2P (gauche) et microscopie « classique » (droite).(94)

		HE goldstandard	
MPM	malignant	malignant	benign
	benign	285	10

Figure 87. Comparaison des diagnostics obtenus par M2P et histologie « conventionnelle ».
(94)

Au total, la M2P offre donc de nombreux avantages comparativement à la microscopie optique « conventionnelle » :

- Pas de nécessité de préparation longue au préalable
- Conservation de l'architecture des tissus
- Visualisation de structures via la seconde harmonique sans adaptation du laser, ni marquages supplémentaires, ou altération du tissu (photo toxicité) (exemple du tissu conjonctif ...)
- Exploration en profondeur sur organe entier et possibilité de reconstruction 3D
- Possibilité de colorations multiples dans la limite des chevauchements de spectre d'excitation et d'émission
- Analyse des interactions cellulaires
- Exploration *in vivo* permettant d'évaluer le trafficking et les interactions cellulaires

6. Problématiques posées dans la thèse

La grippe qu'elle soit saisonnière ou pandémique est un excellent modèle d'infection à tropisme respiratoire. Les mécanismes immunitaires à la phase aigüe de l'infection grippale conditionnent la clairance virale et la guérison mais leur dérégulation aboutit à la survenue de syndrome de détresse respiratoire aigüe (atteinte respiratoire de grippe pouvant mettre en jeu le pronostic vital). Le contexte actuel renforce la nécessité de compléter nos connaissances de ces mécanismes pouvant être des cibles thérapeutiques.

Les explorations habituellement utilisées dans les études telle que la cytométrie en flux et dosage biochimique (dosage enzymatique, cytokines ...) permettent une excellente approche quantitative et fonctionnelle mais excluent l'étude des localisations anatomiques et des interactions inter cellulaires. Les analyses histologiques ont également de nombreuses limites dans l'exploration anatomique, comme décrits dans le paragraphe précédent, et ne permettent pas l'analyse précise de plusieurs types cellulaires ni des interactions d'où la question de cette thèse d'évaluer l'apport de la M2P dans l'exploration des conséquences pulmonaires à la phase aigüe après infection d'un modèle murin par *Influenzavirus*.

Pour ce faire, nous étudierons :

1. Les données « histologiques » apportées par la M2P, en complément des données de cytométrie en flux et des dosages des cytokines, sur poumon entier fixé après infection par virus de la grippe adapté au modèle murin et leur évolution dans le temps post infection.
2. La faisabilité de la méthode d'imagerie intravitale ex vivo sur coupe de poumon d'un modèle murin infecté par *Influenzavirus* et les données apportées par cette imagerie en M2P sur poumon entier après infection par virus de la grippe adapté au modèle murin et l'évolution dans le temps post infection.
3. Notre thèse ayant été temporellement très impactée par la pandémie COVID, il nous a semblé intéressant d'intégrer les données acquises en M2P post-infection au *SARS-Cov2* en parallèle de celles acquises post-infection à *Influenzavirus* permettant ainsi la comparaison de 2 virus à tropisme respiratoire.

7. Travaux expérimentaux

7.1. Intérêt de la M2P pour l'exploration des conséquences pulmonaires après infection par *Influenzavirus* sur poumon fixé

7.1.1. Introduction

La grippe peut être considérée comme un excellent modèle d'étude des virus respiratoires de par l'étendue de la sévérité des atteintes qu'elle occasionne. Les conséquences pulmonaires de la grippe en termes de structure et immunitaire font l'objet de nombreuses études depuis longtemps mais sont essentiellement évaluées quantitativement (cytométrie en flux) et fonctionnellement (dosage biochimiques, cytokines...) alors que la composante anatomique est quasiment absente et repose uniquement sur l'observation en microscopie des coupes histologiques fixées inclus en paraffine et colorées (HES). Comme décrit précédemment, ces coupes histologiques ont plusieurs inconvénients : pas de distinction spécifique des types cellulaires, pas d'analyse d'interaction cellulaire, coupe de quelques μm ne permettant pas d'analyse en profondeur ni de reconstruction 3D. L'objectif de cette première partie expérimentale est d'analyser la pertinence de la M2P dans l'exploration anatomique (lésion, recrutements et interactions cellulaires, évolution dans le temps ...) au niveau pulmonaire après infection d'un modèle murin par *Influenzavirus*.

7.1.2. Two-photon microscopy for the exploration of lung in a murine model of infection with *Influenzavirus* reveals distinct waves of cell recruitment (article soumis).

Two-photon microscopy for the exploration of lung in a murine model of infection with Influenzavirus reveals distinct waves of cell recruitment.

Rivière Frédéric^{1, 2, 3}, Burger Julien¹, Lefèvre François⁴, Garnier Annabelle¹, Tournier Jean Nicolas^{1, 3, 5}, Billon-Denis Emmanuelle^{1, 5}

¹Immunity and Pathogen unit, Microbiology and infectious diseases department, IRBA, Bretigny-sur-Orge, France.

²Respiratory department, Percy military Teaching hospital, Clamart, France.

³Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France

⁴INRAE, UR 0892 Virology and Molecular Immunology Unit. Centre de recherche Ile-de-France-Jouy-en-Josas, Jouy-en-Josas, France.

⁵Innovative vaccine laboratory, Institut Pasteur, Paris, France

Corresponding author:

Rivière Frédéric, M.D, PhD student
Microbiology and Infectious Diseases Department
Institut de Recherche Biomédicale des Armées
Place Générale Valérie André
91220 Brétigny-sur-Orge
France

frdriviere@orange.fr

Running Head (title): Influenza and 2-photon microscopy

Contributors:

Concept: EB, FR

Data collection: FR, JB, AG

Analysis: FR, EB

Writer: FR

Critical review and approval: EB, JB, FL, AG, JNT

Funding: Biomedef NBC-4-B-4116

Competing interests: None declared.

Conflicts of interest: None.

The images have not been previously published.

Word count (max 3500) = 3250 words

Abstract

Rationale. Influenza is a potentially fatal infectious disease that is difficult to both treat and prevent due to the natural range, and unpredictable nature of host immune responses. Studies evaluate immune reaction on quantitative and functional data, but anatomical in only a few cases with histological analysis.

Objectives. Could two-photon excitation microscopy (TPEM) improve anatomical description at the cell level of pulmonary *Influenzavirus* infection?

Methods. Pulmonary sections from transgenic C57BL/6 mice that had CD11c+ cells expressing yellow fluorescent protein were examined following experimental infection with a red fluorescent protein-expressing *Influenza A* virus.

Measurements. Two-photon lung micrographs were taken on days 1, 2, 3 and 4 post-infections. Flow cytometry analysis and whole-lung cytokine assays were also performed at the same post-infections time points.

Results. TPEM showed how the infection resulted in bronchial and bronchiolar epithelial destruction. Initially located in the bronchial and bronchiolar epithelium, virus diffused homogeneously into the alveolar compartment. In response, the host secreted proinflammatory cytokines and rapidly recruited macrophages into the lungs from the perivascular compartment. On day 4 post infection, macrophages were homogeneously distributed throughout the entire pulmonary parenchyma, starting to scavenge cellular debris. Three-dimensional reconstructions of TPEM images provided quantifiable map that traced infection through the lungs.

Conclusions. This study demonstrated the added value of using TPEM to map pulmonary viral infections, epithelial lesions, macrophages recruitment and cellular interactions with more precision than histological analysis. Finally, TPEM coupled to cytometry could provide a more precise picture of the cell interactions after a lung infection by influenza virus.

Word count (max 250) = 237

Key words:

2-photon microscopy, Influenza, immune response, flow cytometry, cytokines

I. Introduction

Influenza is a respiratory disease caused by infection with a segmented negative-sense RNA virus from one of the seven genera (all of which only contain one single species) in the family Orthomyxoviridae (1-3). In humans, influenza is caused by viruses from four genera known as influenza types A, B, C and D. It is not always possible to predict the severity outcome following infection, which presents a challenge for both disease prevention and treatment of infected patients. Influenza ('flu') symptoms range from the asymptomatic to fatal, and it has estimated between 300.000 and 650.000 deaths per annum in the world(109). The most severe forms of influenza are associated with pulmonary oedema as consequence of immunological cytokine storm, and the development of secondary bacterial infections (1,3). The use of anti-viral treatments for severe forms remains controversial (4).

A recent meta-analysis indicated that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) were effective in reducing mortality following influenza infection (5). The treatment of inflammation *per se*, and targeting mechanisms of innate immunity following an infection, may offer interesting new therapeutic targets for humans. Data from animal studies have shown that post-infection cytokine storms, followed by an influx of macrophages and neutrophils, negatively affect survival if alveolar macrophages have been depleted (6,7).

The methods used for most studies to date are conventional cytological, biochemical and histological analysis techniques. A more recently developed microscopy technique called two-photon excitation microscopy (TPEM) has the potential to improve study outcomes (8). TPEM has previously been used in studies of pulmonary infections (12,13) and its principle is the same as conventional fluorescence microscopy; the main difference is that the sample is excited by two photons instead of one. This method is interesting because it can provide both two-, and three-, dimensional, images. TPEM allows tissue visualisation at greater depths than has previously been possible as it excites molecules deep within the sample, without damaging it, and while keeping the excitation volume low. Digital recombination of the individual TPEM scans allows a detailed, three-dimensional reconstructions of the tissues in question to be created (10). Another advantage of TPEM is that the use of excitation with two, rather than one, photons make non-centrosymmetric tissues, such as collagen, appear

without the need for additional labelling due to the generation of a second harmonic signal (9-11).

The aim of this study, therefore, was to promote TPEM as a future standard technique for infectious research with the example of *Influenzavirus* infection of murine model. To this end, we wished to demonstrate the importance of describing anatomical data of pulmonary lesion and mapping cellular recruitment with TPEM complementing and supporting findings from established methods such as flow cytometry and cytokines concentration assays.

II. Methods

a. Animal models

Wild type C57BL/6 mice were chosen as the animal model for this investigation into the pathophysiology of influenza type A (Rockefeller University, New York, USA). In total, n=36 male mice were used, divided into three groups of n=12 animals, one group for each of the three measurement methods for flow cytometry, cytokine concentrations and TPEM. All animals were handled and housed under specific pathogen-free conditions. Bodyweights were recorded daily.

For the two groups measuring flow cytometry and cytokine concentrations, n=12 mice were used with an average age of 6 months \pm 2 weeks. For the TPEM group, the n=12 transgenic CD11c^{YFP} with C57BL/6 genetic background mice were six-to 8-weeks old (Rockefeller University, New York, USA) (14). They were also C57BL/6 mice that had been bred to express yellow fluorescent protein (YFP) in lung macrophages under the control of the CD11c promoter.

b. *Influenza A* virus strains

For the cytometry and cytokine measurements the influenza strains A/Puerto Rico/8/34/H1N1 (PR8) was used. For the TPEM measurements, the viral strain was an A/Puerto Rico/8/34/H1N1 subtype created using reverse genetics that expressed a red

fluorescent protein (RFP) fused to the NS1 protein (RFP-NS1-PR8) (F. Lefèvre, non-published data) (15, 16, 17, 18).

c. Infection with the influenza virus

Prior to experimental infection at day 0, all mice were anaesthetized with 5% isoflurane. They were then intranasally injected with 30 μ L of phosphate buffered saline (PBS) containing either 10^5 plaque-forming units of RFP-NS1-PR8 (TPEM group), or PR8 (flow cytometry and cytokine groups). From each group of n=12, n=3 animals were uninfected controls: they underwent the same procedures but received only PBS solution. Control and experimental animals were housed in separated isolators were monitored and had their bodyweights recorded daily at day 1, 2, 3 and 4.

d. Tissue preparation

At days 1, 2, 3 and 4 post-infections one mouse from each of the three groups (flow cytometry, cytokine and TPEM) were euthanized by cervical dislocation. Tissue samples were prepared with an intracardiac perfusion of 10 ml PBS with unfractionated heparin (10 UI/ml). For the flow cytometry and cytokine samples, this was followed by 10 ml PBS. In the TPEM group, 10 ml 4% paraformaldehyde (PFA) solution was perfused instead.

e. TPEM imaging

In the TPEM group, the left lobe from each set of harvested lungs was glued onto a Vibratome[®] stage (Leica, Wetzlar, Germany) and immersed in PBS. In order to achieve smooth lung section, it was cut into two 10 μ m/s-thick slices using a razor blade with a vibration amplitude of 3 mm. The lower section (4 mm thick) was glued onto an 83mm petri dish and immersed in PBS before imaging.

TPEM was performed using an LSM 710 NLO microscope (Carl Zeiss) equipped with an infrared laser coupled with OPO (Chameleon; Coherent). The wavelength of the first laser was set to 850 nm for excitation of the murine YFP, second harmonic and blue BV421 ('Brilliant Violet', Bio Legend[®]) markers. The wavelength of the second laser was set to 1100 nm, for the viral

RFP. Each infected and control lung section was fully explored in order to map the entire sample.

To stain the macrophages, the lung sections were incubated in PBS with Fc Block (1/300^e) for 30 minutes at room temperature. They were then incubated in PBS containing F4/80 antibodies coupled with BV421 fluorescent marker (1/100^e) for 2 hours, at room temperature.

f. Flow cytometric analysis

The mouse lung monocyte and macrophage populations are divided into several subpopulations: alveolar macrophages (CD11c^{high}, F4/80+), interstitial macrophages (CD11c^{low}, F4/80+), and resident monocytes (CD11c^{low}, F4/80+) (6,26). CD11c is a common dendritic cell marker but it is not expressed on all monocytes and macrophages. Since our aim was to explore all macrophage populations, including resident and interstitial, as well as migratory macrophages, the F4/80 marker, which is common to all macrophage subpopulations, was used.

In the cytometry group, both lungs were harvested and homogenised using a gentleMACS™ dissociator before being incubated with type IV collagenase at 37°C for 10 minutes. Remaining red blood cells were lysed using 1X red blood cell lysis buffer BD (Bioscience®). The cells were stained with blue Fixable Viability Dye eFluor™ 455 (eBioscience™). Anti-mouse immunophenotyping antibodies were diluted in FACS buffer to 5µg/mL along with Fc Block before the cells were stained for 30 minutes on ice using the following cytokine/antibody/marker solutions: CD45 (BD Biosciences®), NK1.1 (BD Biosciences®), CD11C (BD Biosciences®), F4/80 (Bio Legend®), CD3 (BD Biosciences®), CD4 (Bio Legend®), CD8 (BD Biosciences®), Ly6G (Bio Legend®), CD103 (BD Biosciences®). After staining, the cells were washed twice with buffer and then fixed in 4% paraformaldehyde in FACS buffer for 15 minutes. Cell numbers were collected using an LSR II flow cytometer (BD Bioscience®, Franklin Lakes, NJ) and the data were interpreted using FlowJo software (Treestar, Ashland, OR). All interpretations were performed after doublet and dead cell exclusion.

g. Cytokine concentration quantification

Cytokine concentrations were measured using multiplexed sandwich ELISA-based quantitative array platforms of whole lung lysates. For each mouse in this group, both lungs were removed and homogenised using a gentleMACS™ Dissociator (as above). Each whole lung lysate was prepared according to the array kit proprietary protocol (Tebu-Bio, Quantibody® Mouse Inflammation Array Kit, Manufacturer REF). Each sample was plated in duplicate and incubated with a standard cytokine mix, an antibody detection cocktail, and finally Cy3 equivalent dye-conjugated streptavidin, before the plate was dried and sent for reading.

h. Ethical approval

All animal care and experiments conformed to the requirements of the Animal Research Committee of Armed Forces Biomedical Research Institute (IRBA, authorized project with number 2020-11) as well as the European Parliament directive 2010/63/EU guidelines for the protection of animals used for scientific purposes.

i. Statistical analysis

The results of the quantitative variables are expressed using the mean and the standard deviation. Data were collected and described using Excel (Microsoft Corp., Washington, USA). Statistical analyses were performed with R software (The R Foundation, version 3.1.3). Comparisons between control and experimental data were performed with a two-tailed Student's test for the quantitative variables; results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

III. Results

a. Clinical data

Following infection with influenza A (PR8), the n=30 experimental mice lost 25 % of their bodyweight whereas the weight of the control group (n=6) remained stable over the same 4-day period (Figure 1).

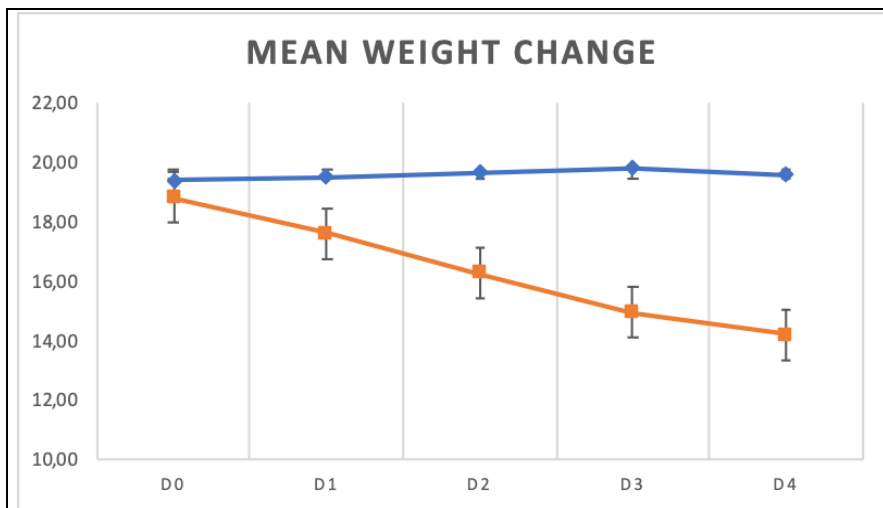


Figure 1. Changes in the average (mean \pm standard deviation) bodyweight (grams) of mice (n=30) experimentally infected with influenza A (PR8) at day 0 compared to six mock-infected animals (no infection) for each time point over a 4-day study.

Key: controls (mock-infected) = u; infected with PR8 = n

b. Post-infection pulmonary cells recruitment

Three immune cell types were phenotyped by using flow cytometry: macrophages (F4/80+), CD11c+ cells and granulocytes (Ly6G+), as depicted in Figure 2.

Following infection with *Influenzavirus* PR8 at day 0, the first cells recruited in the lung were the granulocytes rapidly increased significantly in the infected group over the first day post-infection ($p > 0.05$), peaking at day 2 and quickly decreasing on days 3 and 4 to the baseline (Figure 2D). A second wave of cell recruited were the CD11c+ cells mostly constituted by monocytes with peak delayed at day 3 (Figure 2A). A third wave of myeloid cells of pulmonary macrophage (F4/80+) recruitment significantly increased between days 1 and 2 ($p < 0.05$) and was nearly four times higher by day 4. Over the same period, control values remained

consistently low (Figure 2B). In the F4/80+ population, CD11c+ cells were stable over time post infection without significant difference with mock-infected. Then CD11c- cells progressively and significantly increased day 1 to day 4 comparatively to mock-infected and more significantly between day 3 and day 4 (Figure 2C).

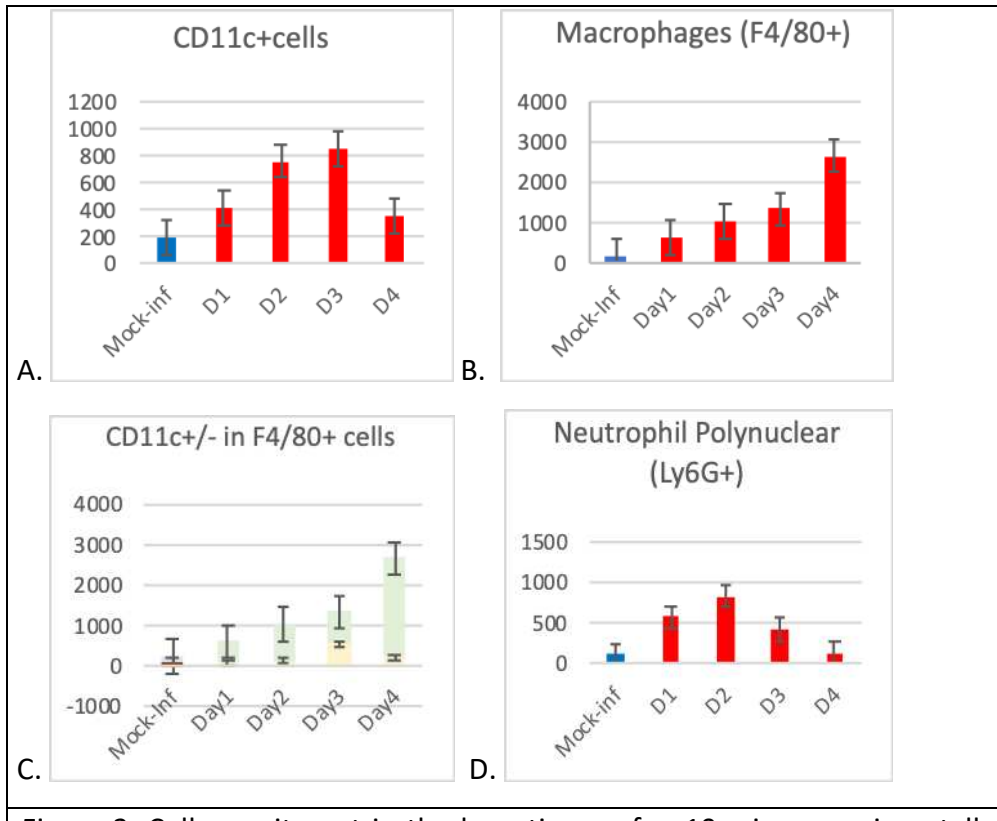


Figure 2. Cell recruitment in the lung tissue of n=10 mice experimentally infected at day 0 with influenza A (PR8) versus n=2 control animal(s) who did not receive any virus over a 4-day experiment (mock-inf=mock-infected). Four types of cells were measured by flow cytometry: (A) CD11c+ cells; (B) macrophages (F4/80+); (C) repartition in F4/80+ cells between CD11c+ (infected with PR8 = n ; mock-infected n) and CD11c- (infected with PR8 = n ; mock-infected n); (D) neutrophil polynuclear (Ly6G+). Key: controls (mock-infected = n ; infected with PR8 = n).

c. Post-infection, whole-lung cytokine concentrations

Nine proinflammatory cytokines and chemokines (GM-CSF, IL-1a, IL-6, IL-7, IL-18, CCL2 (MCP-1), CCL12 (MCP-5), CXCL9 (MIG), CCL3 (MIP-1a), and CCL5 (RANTES)) were measured in the whole lung samples from both control and experimental mice; all are shown individually in

Figure 3. GM-CSF and IL-1 α , usually secreted in the early phase of an infection by epithelial cells and macrophages, and then promoting the recruitment of innate immune cells (mainly granulocytes and macrophages), peaked on day 1 ($p < 0.05$ vs. control) before decreasing on day 2. This early secretion could explain the early recruitment of granulocytes. IL-6 peaked at D3 before decreasing at D4.

The chemokines CCL2, CCL12, CCL3 and CXCL9 activate macrophages, differentiating monocytes into macrophages, migration and tissue diffusion of monocytes/macrophages. The concentration of these chemokines peaked at day 1 for CCL5 ($p < 0.05$ vs mock-infected), peaked at day 3 ($p < 0.05$ vs mock-infected) before the concentrations of CCL5, CCL2, CCL12 ($p < 0.05$ vs mock-infected) plateaued and peaked at day 4 for CCL3, CXCL9 ($p < 0.05$ vs control). These chemokines most probably could report for the recruitment of the later wave of CD11c⁺ dendritic cells and macrophages. The cytokines IL-7 and IL-18, which also play a role in the recruitment and migration of innate immune cells, reached their peak by day 2 post infection ($p < 0.05$ vs control) before their concentrations remained the same.

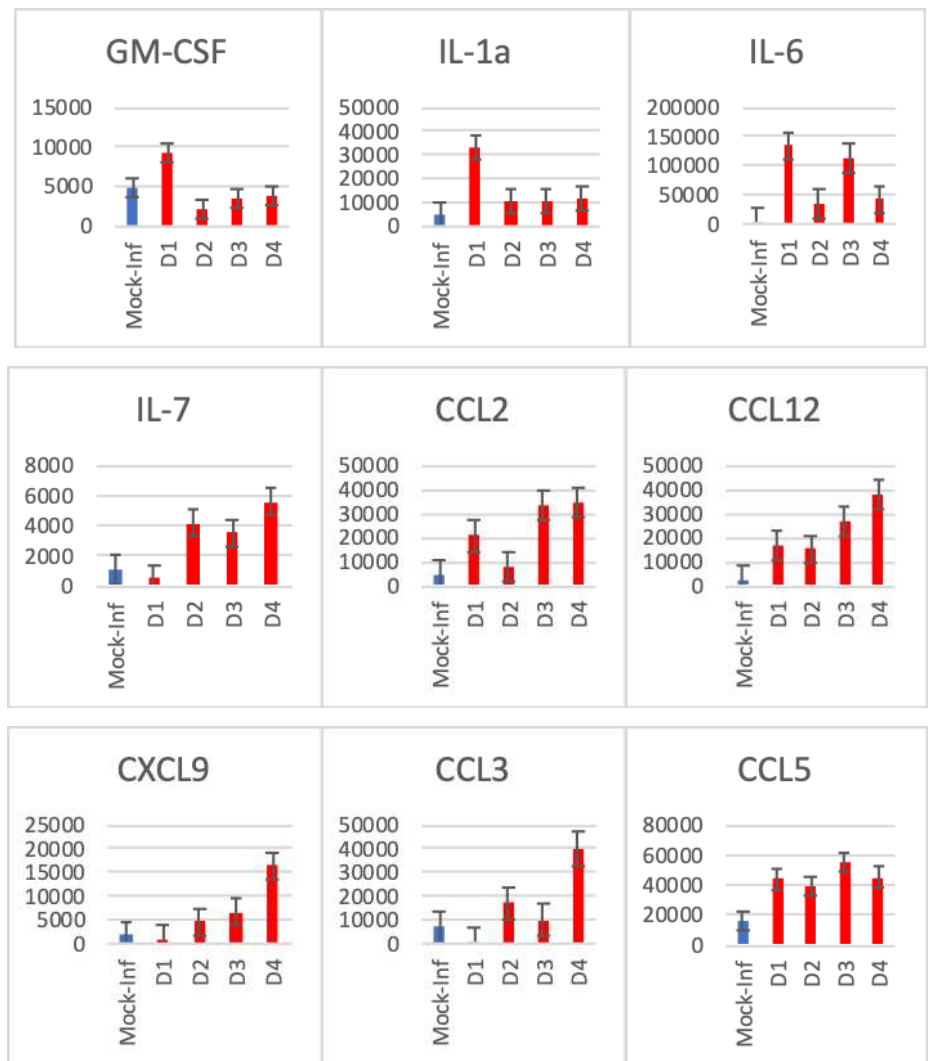


Figure 3. Changes in the concentration (pg / mL) of eight proinflammatory cytokines in whole-lung samples from n=10 mice experimentally infected at day 0 with influenza A (PR8) versus a/n=2 control animal(s) who did not receive any infection over a 4-day experiment. GM-CSF, IL-1a, IL-6, IL-7, CCL2, CCL12, CXCL9, CCL3 and CCL5.

Key: mock-infected = n; Infected with PR8 = n

d. TPEM observations

The micrographs from the TPEM control group mice, shown in figure 4, revealed that they had healthy lungs with intact bronchial and alveolar epithelia (shown in green) and connective tissue (in blue).

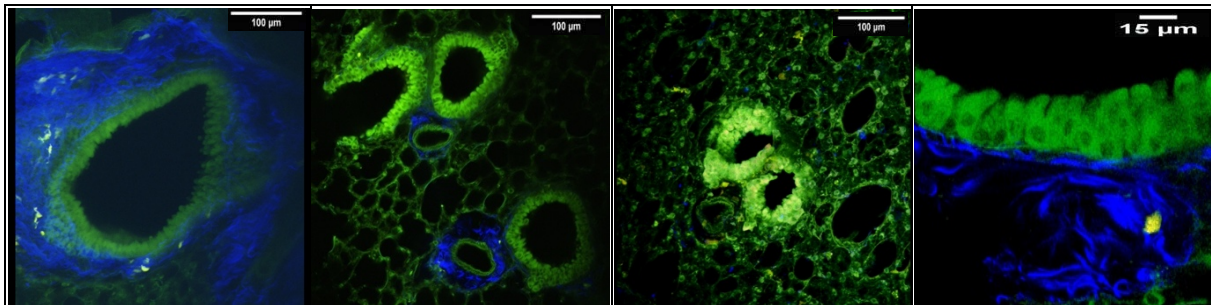


Figure 4. Two-photon excitation micrographs showing healthy left pulmonary lobe tissue from control CD11c-YFP mice. The bronchial epithelium is autofluorescent in green, and the connective tissue is blue, and CD11C+ cells in yellow.

In contrast to the images in figure 4, the micrographs in figure 5 show lungs from mice infected with the RFP-expressing influenza A. Over three days, the virus (shown in red) replicated first into the bronchial epithelium, followed by the alveolar epithelium. These epithelial infections led to a destruction of the bronchial and bronchiolar epithelium; by day 4, macrophages (shown as blue cells) were also visible in the basement membrane.

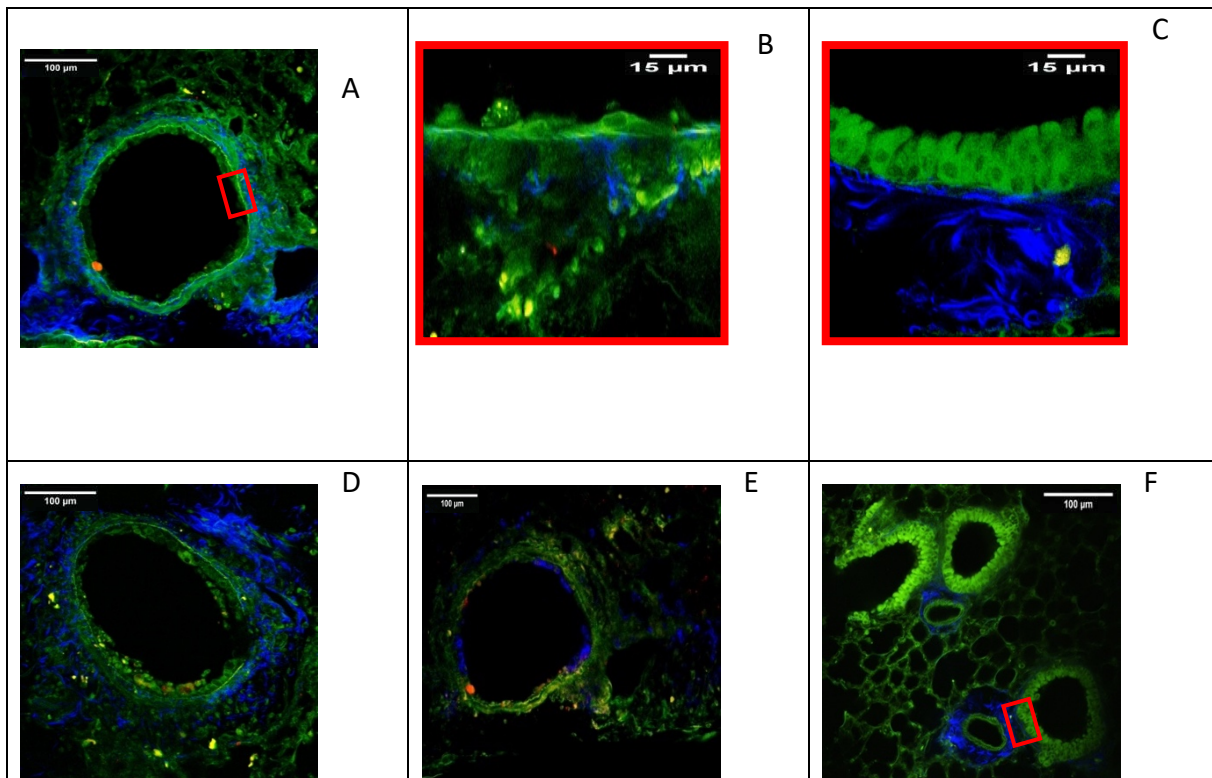
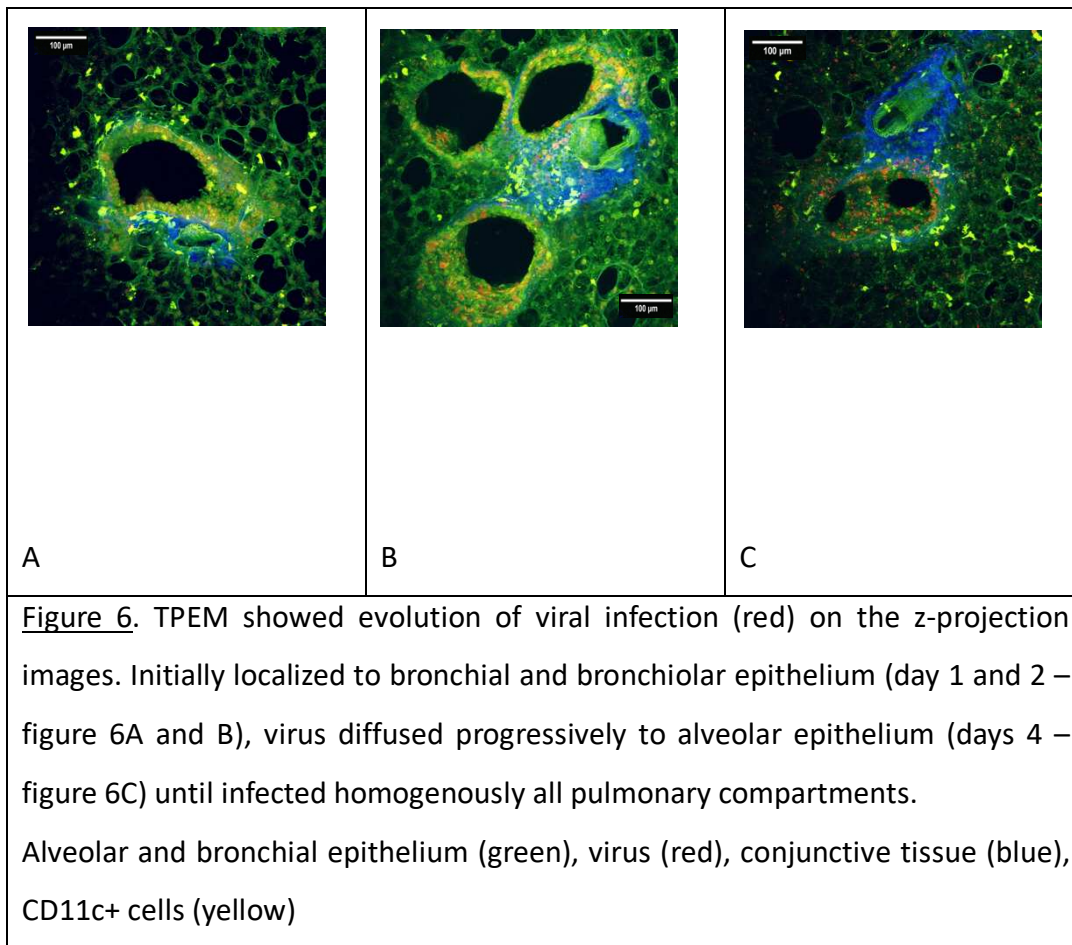


Figure 5. Two-photon excitation micrographs showing murine pulmonary bronchial epithelium three days after experimental infection with a modified influenza A/Puerto Rico/8/34/H1N1 strain that expressed red fluorescent proteins (A, D, E). The replicating virus is shown in red, and the epithelial cells are green (A, D, E). One picture showing normal bronchiolar epithelium of mock-infected mice (F) and zoom of normal epithelium (C) comparatively with zoom of infected bronchiolar epithelium (B). Conjunctive tissue (fiber in blue), macrophages (round cells in blue), CD11C+ cells (yellow).

With the red fluorescent virus, TPEM allowed us to follow viral replication localization beginning on bronchial and bronchiolar epithelium at day 1 (figure 6A) and 2 (figure 6B) then diffusing to alveolar epithelium at day 4 (figure 6C).



The addition of an anti-F4/80 antibody coupled to the fluorochrome BV421 allowed the recruitment over time of F4/80+ macrophages, shown in blue, to be visualised (figure 7). In the early phase of the infection (days 1 and 2), more F4/80+ macrophages were visible than in control lungs where they were homogeneously distributed within the parenchyma (figure 7A) but not in the perivascular zones (figure 7B). On day 3, however, a high density of F4/80+ macrophages was observed in the perivascular regions (figures 7C and 7D). By day 4, F4/80+ macrophages were densely, and homogeneously, disseminated throughout the entire lung tissue (figures 7E and 7F).

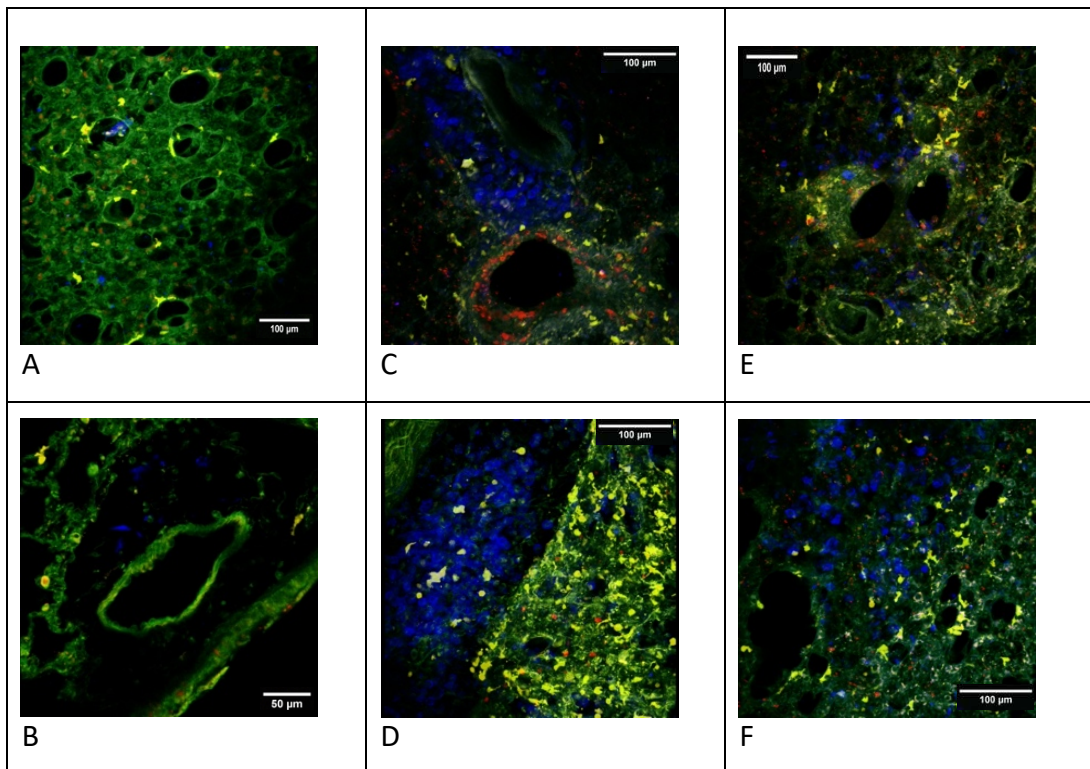
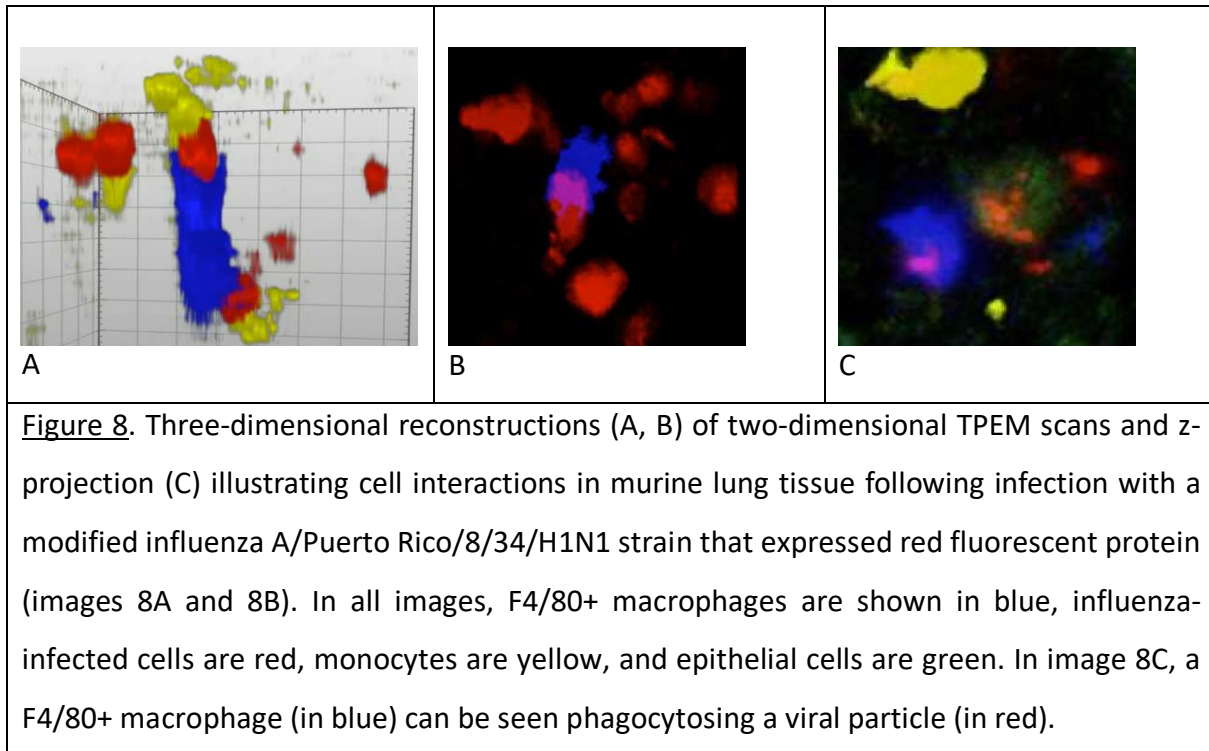


Figure 7. Two-photon excitation micrographs showing macrophage recruitment in mouse lung cells over four days following infection with a modified influenza A/Puerto Rico/8/34/H1N1 strain expressing red fluorescent protein. At day 1 post-infection, resident macrophages can be seen (shown in blue) in the lung parenchyma (7A). At day 2 (7B) the macrophages have not yet moved into the perivascular areas. By day 3, (7D) they can be seen in the perivascular area, near to the infected (red) bronchial epithelium (7C). Finally, on day 4 (7E) and (7F) the macrophages have become distributed homogeneously and diffusely throughout the whole lung section. CD11c⁺ cells (yellow), bronchial and alveolar epithelium (green).

Another advantage of TPEM is its possibility imaging lung in depth which allows 3D reconstruction cell interactions as illustrated on Figures 8A and 8B detailing the same F4/80⁺ macrophage, CD11c⁺ monocytes and an infected epithelial cell from Figure 5 on day 4 post-infection. This 3D reconstruction of TPEM scans showed tight contacts and probable interactions between CD11c⁺ and F4/80⁺ macrophages and infected epithelial cells. We also observed the scavenger role of F4/80⁺ macrophages as they could phagocytosed virus infected cells or subparticles (Figure 8C). This suggest that F4/80⁺ macrophages recruited in the lung first in the perivascular spaces and peribronchiolar area and then more generally in the lung

parenchyma at late time point participate in the lung homeostasis by scavenging infected cells and cellular debris.



IV. Discussion

We demonstrated that the use of TPEM technology can adequately complete quantitative, cellular and biochemical data obtained by flow cytometry and cytokine quantification. The murine model used in the current study produced the expected immunological response to influenza A (19-21). A significant increase in macrophage numbers (F4/80+) was observed at day 2 post infection (16), in addition to a rapid, and transient increase of neutrophils (Ly6G+) which peaked at day 2, before returning to day 1 levels by day 3 (19). Such cells recruitment is known to be associated with proinflammatory cytokine secretion. Levels of IL-1a and IL-6 were raised at day 1. This early secretion by infected epithelial cells would have stimulated the recruitment of innate immune cells, particularly macrophages, but also neutrophils. Macrophages provide positive feedback to escalate the local immune response since the release of pro-inflammatory cytokines, such as MCP-1, MCP-5, MIG, and MIP-1a, also upregulates the influx of immune cells to the infected area (20, 21).

Previously published quantitative descriptions of the immune response to influenza A infection, however, do not usually also contain such in-depth anatomical visualisations and correlation of the virus diffusion and the immune cell movements within the host tissue. The inclusion of two-photon excitation microscopy (TPEM) in this study precisely identified the site of virus replication as limited to the bronchial epithelial cells. TPEM allowed the infection progression to be followed over time as it moved from the bronchial to the alveolar epithelium. This viral infectious site evolution has only been previously suggested with fluorescent stereomicroscope in showing fluorescence of bronchial tree at day 3 post infection then lung diffuse fluorescence at day 5 post infection(22). The clarity of TPEM micrographs permitted early, post-infection lesions, such as the destruction of the bronchial epithelium, to be examined in detail and once the epithelial cells had been destroyed, the macrophages that remained *in situ* could be observed too. Taken together our results suggest that the recruited F4/80+ macrophages play a great role in the homeostasis of the lung tissue, by scavenging apoptotic and necrotic infected epithelial cells. They could also play a role in a defensive response by protecting the basal membrane and secreting anti-inflammatory cytokines.

TPEM therefore provided important, additional data regarding the innate immune response. In the current studies using influenza A, such detailed anatomical data complemented the standard biochemical, and cytometric analyses. These standard measures provided quantitative results confirming pro-inflammatory cytokine storms and the resultant increase in immune cells, particularly macrophages. TPEM, however, permitted observation of the perivascular macrophagic infiltration, charted the migration of blood monocytes and their differentiation which occurred as concentrations of proinflammatory cytokines such as CCL2, CCL12, CXCL9, and CCL3 increased. The homogeneous diffusion of these macrophages throughout the pulmonary parenchyma was clearly seen and was recorded independently of the quantification of macrophage recruitment made using flow cytometry. Our results, like previous published studies showed a stability of resident macrophages (F4/80+ and CD11c+) and an increase of monocyte-derived macrophages (F4/80+ and CD11c-), TPEM added an important anatomical data of macrophages recruitment and diffusion in the lung tissue.

An additional benefit from TPEM was the ability to create three-dimensional images using multiple scans. This provided novel insights, revealing cell/tissue volumes, the depth of cell

penetration, and interactions both between infected cells, macrophages and dendritic cells (CD11c+, F4/80-), as well as individual immune cell activities, such as the phagocytosis of a viral particle by a macrophage.

Dysregulation of the innate immune response and cytokine storms are known to be important factors in severe influenza cases (2,3,23). A recent meta-analysis found that NSAIDs had a beneficial effect on survival (5). Clarification of this role of NSAIDs on influenza pathophysiology could help to refine and optimise their use. TPEM also offers a promising method for the extra pathophysiological exploration of influenza *in vivo* needed for preclinical studies into other innate and inflammatory immune responses to therapeutic and vaccination strategies. We believe that TPEM could be valuable for studying other respiratory pathogens (12,13). At present, antibiotics are commonly prescribed to treat secondary bacterial sequelae following viral respiratory infections, but if the consequences of immune dysregulation could be better controlled and reduced through the use of antivirals or NSAIDs, then the use of antibiotics could be reduced.

This work has demonstrated that TPEM provides practical and valuable technique that complements and enriches data obtained from the methods already used as standard (flow cytometry and cytokines concentration measurements) to study the pathophysiology in a lung murine model of infection. Three-dimensional reconstruction of TPEM scans does enable the visualisation and exploration of pulmonary lesions and allows accurate mapping of immune cells recruitment patterns the days after an influenza infection.

TPEM allows, in addition to quantitative and functional methods, an almost exhaustive anatomical analysis of lesion, viral localization and cell recruitment by providing in particular explanatory elements on the waves of macrophage recruitment induced after infection by *Influenzavirus*.

TPEM was developed for *in vivo* or *ex vivo* lung intravital imaging but also seemed to be useful on fixed lung and provided a more precise and detailed information than conventional microscopy. We believe that TPEM should not only be a primordial tool for preclinical studies of influenza physiopathology, but that it should also be considered as a standard for work into other respiratory infections. With different fluorochrome, TPEM could be a promising tool to explore viral coinfection and bacterial complications after viral infections.

Acknowledgements:

We would like to thank Dr F. Lefèvre of the Molecular Immunology and Virology Unit at the Institut National de la Recherche Agronomique in Jouy-en-Josas, France, for their kind gift of A/Puerto Rico/8/34/H1N1 subtype created using reverse genetics that expressed a red fluorescent protein (RFP) fused to the NS1 protein. The authors also gratefully acknowledge the Direction Générale de l'Armement (DGA) and Service de Santé des Armées (SSA) of the French Ministry of Armed Forces for sustained financial support (grant NBC-4-B-4116).

References

1. Ghebrehewet S, MacPherson P, Ho A. Influenza. *BMJ*. 7 déc 2016;i6258.
2. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primer*. déc 2018;4(1):3.
3. Paules C, Subbarao K. Influenza. *The Lancet*. août 2017;390(10095):697-708.
4. Lytras T, Mouratidou E, Andreopoulou A, Bonovas S, Tsiodras S. Effect of Early Oseltamivir Treatment on Mortality in Critically Ill Patients With Different Types of Influenza: A Multiseason Cohort Study. *Clin Infect Dis*. 13 nov 2019;69(11):1896-902.
5. Lim VW, Tudor Car L, Leo Y, Chen MI, Young B. Passive immune therapy and other immunomodulatory agents for the treatment of severe influenza: Systematic review and meta-analysis. *Influenza Other Respir Viruses*. mars 2020;14(2):226-36.
6. Duan M. The contributions of lung macrophage and monocyte heterogeneity to influenza pathogenesis. 2016;49.
7. Kim HM. The severe pathogenicity of alveolar macrophage-depleted ferrets infected with 2009 pandemic H1N1 influenza virus. 2013;10.
8. So PTC, Dong CY, Masters BR, Berland KM. Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy. 2000;42.
9. Dufour P, Dufour S, Castonguay A, McCarthy N, De Koninck Y. Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle : avantages et enjeux ou Un photon c'est bien... mais deux c'est mieux ! *médecine/sciences*. oct 2006;22(10):837-44.
10. Nava RG, Li W, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ, Kreisel D. Two-photon microscopy in pulmonary research. 2015;15.
11. Chen X, Nadiarynkh O, Plotnikov S, Campagnola PJ. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nat Protoc*. avr

2012;7(4):654-69.

12. Fiole D, Deman P, Trescos Y, Mayol J-F, Mathieu J, Vial J-C, et al. Two-Photon Intravital Imaging of Lungs during Anthrax Infection Reveals Long-Lasting Macrophage-Dendritic Cell Contacts. *Infect Immun*. 2014;82(2):9.
13. Frédéric R, François L, Julien B, Guilherme D de M, Nicolas TJ, Emmanuelle B-D. Two-photon microscopy analysis reveals different pulmonary damage after infection by influenza or SARS-CoV-2. *Respir Med Res*. nov 2021;80:100862.
14. Lindquist R, Shakhar G, Dudziak D, Wardemann H, Eisenreich T, Dustin M, Nussenzweig M. Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol*. 2004 Dec;5(12):1243-50.
15. Manicassamy B, Manicassamy S, Belicha-Villanueva A, Pisanelli G, Pulendran B, García-Sastre A. Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. :11.
16. Merzlyak EM, Goedhart J, Shcherbo D, Bulina ME, Shcheglov AS, Fradkov AF, et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods*. juill 2007;4(7):555-7.
17. Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci*. 15 déc 2007;120(24):4247-60.
18. Breen M, Nogales A, Baker SF, Perez DR, Martínez-Sobrido L. Replication-Competent Influenza A and B Viruses Expressing a Fluorescent Dynamic Timer Protein for In Vitro and In Vivo Studies. Bouvier NM, éditeur. *PLOS ONE*. 25 janv 2016;11(1):e0147723.
19. Lin KL, Suzuki Y, Nakano H, Ramsburg E, Gunn MD. CCR2⁺ Monocyte-Derived Dendritic Cells and Exudate Macrophages Produce Influenza-Induced Pulmonary Immune Pathology and Mortality. *J Immunol*. 15 févr 2008;180(4):2562-72.
20. Tate MD, Brooks AG, Reading PC. The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice. *Respir Res*. 2008;13.
21. Kim HM, Kang YM, Ku KB, Park EH, Yum J, Kim JC, et al. The severe pathogenicity of alveolar macrophage-depleted ferrets infected with 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *Virology*. sept 2013;444(1-2):394-403.
22. Wang J, Nikrad MP, Travanty EA, Zhou B, Phang T, Gao B, et al. Innate Immune Response of Human Alveolar Macrophages during Influenza A Infection. *PLoS ONE*. 2012;7(3):12.
23. Reeth KV. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet Microbiol*. 2000;8.

24. Fukuyama S, Katsura H, Zhao D, Ozawa M, Ando T, Shoemaker JE, et al. Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for in vivo studies. *Nat Commun.* 5 mai 2015;6(1):6600.
25. Yu WCL, Chan RWY, Wang J, Travanty EA, Nicholls JM, Peiris JSM, et al. Viral Replication and Innate Host Responses in Primary Human Alveolar Epithelial Cells and Alveolar Macrophages Infected with Influenza H5N1 and H1N1 Viruses. *J Virol.* 15 juill 2011;85(14):6844-55.
26. Hou X, Gao Y, Yang S, Wang C, Ma Z, Xia X. Role of macrophage migration inhibitory factor in influenza H5N1 virus pneumonia. *Acta Virol.* déc 2009;53(4):225-31.

7.1.3. Synthèse

La M2P est un outil complémentaire indispensable à la compréhension des mécanismes physiopathologiques post infection grippale. J'espère vous avoir démontré son apport important dans l'exploration « histologique » avec la mise en évidence des lésions épithéliales, des sites infectés et l'évolution virologique et l'observation des interactions cellulaires impossibles en histologie conventionnelle. Elle est également complémentaire des techniques habituellement utilisées (cytométrie en flux, dosages biochimiques ...) en apportant des données anatomiques évolutives du recrutement cellulaire. Le choix du meilleur modèle animal disponible et la possibilité d'ajout exogène de marqueurs couplés à des fluorochromes permettent d'optimiser l'outil. Son application peut être d'autant plus pertinent dans l'exploration des co-infections et surinfections.

Nous avons choisi de ne pas intégrer d'analyse histologique dans notre travail pour deux raisons :

-Les colorations traditionnellement utilisées, telles que l'hématoxyline-éosine-safran (HES), ne montrent que la présence (ou l'absence) d'infiltration inflammatoire sans préciser les types cellulaires ; cette précision nécessite un marquage anticorps pour immunohistochimie mais limitée à un anticorps par lame ne permettant pas d'étude de co-marquage ni d'interactions cellulaires.

-Compte tenu de la finesse d'épaisseur des coupes histologiques (quelques μm), aucune exploration en profondeur de l'organe n'est possible, donc pas d'analyse en volume (46,112). Ces limites restreignent l'application de l'histologie dans notre travail, d'autant plus quand l'échantillon est petit, une coupe ne pouvant usuellement être réutilisée qu'avec une seule coloration nécessitant de multiplier les coupes. En utilisant des fluorochromes couplés à des anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques et avec les acquisitions en profondeur de l'organe, M2P permet de visualiser plusieurs types cellulaires au sein d'un volume autorisant donc l'analyse des interactions cellulaires.

Beaucoup de données quantitatives reposent sur les lavages broncho alvéolaires (LBA), que nous n'avons pas effectué dans notre travail. Nous voulions avoir une analyse basée sur l'ensemble du poumon à l'exception du contenu du compartiment vasculaire. Les données du LBA n'explorant que le compartiment alvéolaire, il était de fait intégré dans notre analyse globale.

La M2P permet donc, en complément des méthodes quantitatives et fonctionnelles, une analyse anatomique quasi exhaustive sur le plan lésionnel, de localisation virale et de recrutement cellulaire en apportant notamment des éléments explicatifs sur les vagues de recrutement macrophagique induites après infection par *Influenzavirus*.

7.2. Microscopie intravitale *ex vivo*

La M2P doit devenir un outil important sur poumon fixé mais a surtout été développée pour faire de l'imagerie intravitale dynamique. Comme décrit dans le chapitre 5.3.1, différentes techniques d'imagerie intravitale ont été publiées. La méthode *in vivo* est la plus utilisée ; elle est la plus physiologique mais a plusieurs limites : problème de compétence chirurgicale et de plateau technique mais surtout elle se limite à l'exploration d'une seule zone du poumon (en regard de la fenêtre thoracique) et uniquement en pleural sans accès possible à la région plus proximale du poumon (76). La technique *ex vivo* du « live lung slice », même si hors conditions physiologiques, semble être toutefois une excellente alternative car elle est plus accessible techniquement, permet une exploration de la totalité de la surface de la section pulmonaire et en profondeur. Cette exploration plus exhaustive est indispensable quand le sujet d'étude est un virus à tropisme initialement bronchique comme décrit dans le chapitre précédent (76). La méthode est bien décrite mais peu de publications rapportent son utilisation et aucune en contexte d'infection pulmonaire.

Notre objectif a donc été de valider la faisabilité de cette technique en contexte infectieux pulmonaire après infection d'un modèle murin par Influenzavirus et d'évaluer la mobilité cellulaire en fonction du temps post infection.

7.2.1. Méthodologie

Animaux. Souris C57BL6/J transgénique CD11c-EYFP (C57/BL6JCD11c-EYFP) mâle âgées de 10-12 semaines. Les souris sont hébergées selon les règles édictées par les directives européennes avec température et humidité contrôlées et les alternances jours/nuit au sein de l'animalerie A2 de l'INRAe (Jouy en Josas). Les souris sont examinées quotidiennement cliniquement (prostration, pilosité, poids) en accord avec la demande d'autorisation de projet concernant les points limites.

Virus et infection. Les souris ont été infectées avec le virus adapté à la souris : A/Puerto Rico/8/34/H1N1 (PR8) modifié par l'ajout d'une protéine fluorescente RFP par génétique inverse au gène codant pour la protéine non structurale virale NS1.

Les animaux ont tous été infectés par voie intranasale après anesthésie (Kétamine-Xylazine) par 10^6 PFU/mL de PR8 dans 50 μ L. La dose a volontairement été choisie supérieure aux doses habituellement utilisées car le couplage de la RFP diminue la virulence de la souche nécessitant une dose infectieuse supérieure pour avoir les mêmes effets infectieux (105) et nous voulions avoir un inoculum viral permettant de mimer le développement d'une forme pulmonaire « sévère ».

Les souris contrôles subiront le même protocole avec instillation intranasale de 50 μ L de PBS.

Considérations éthiques. Tous les soins et expérimentations animales étaient conformes aux lignes directrices pour les expérimentations animales de la législation européenne sur l'expérimentation animale, et ont été approuvés par le comité de recherche animale de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées.

Préparation de la coupe.

La technique employée décrite ci-dessous est légèrement différente de la technique habituellement publiée (nous tenterons de la justifier dans la discussion) (87).

1. Euthanasie des souris par dislocation cervicale.
2. Ouverture de la cavité abdominale, incision et dissection prudente du diaphragme
3. Dissection des parois thoraciques latérales droite et gauche et exclusion du capot thoracique.
4. Incision de l'oreillette droite et instillation intracardiaque de 2 fois 10mL de DMEM sans rouge phénol à 37°C.
5. Dissection de la trachée, de la veine cave inférieure et libération du poumon qui sera immergé dans du DMEM sans rouge phénol et transporté à 37°C.
6. Le lobe gauche étant le plus volumineux, il sera utilisé pour l'expérimentation. Il est collé sur la platine du vibratome (Leica, Nussloch, Germany) et le lobe est tranché en 2 parties à 10 μ m/s d'amplitude de vibration d'une lame de rasoir.

Marquage de la section de poumon.

1. La section pulmonaire sera incubée avec un anticorps Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™ - BD biosciences°) dilué au 1/300^{ème} pendant 30 minutes.

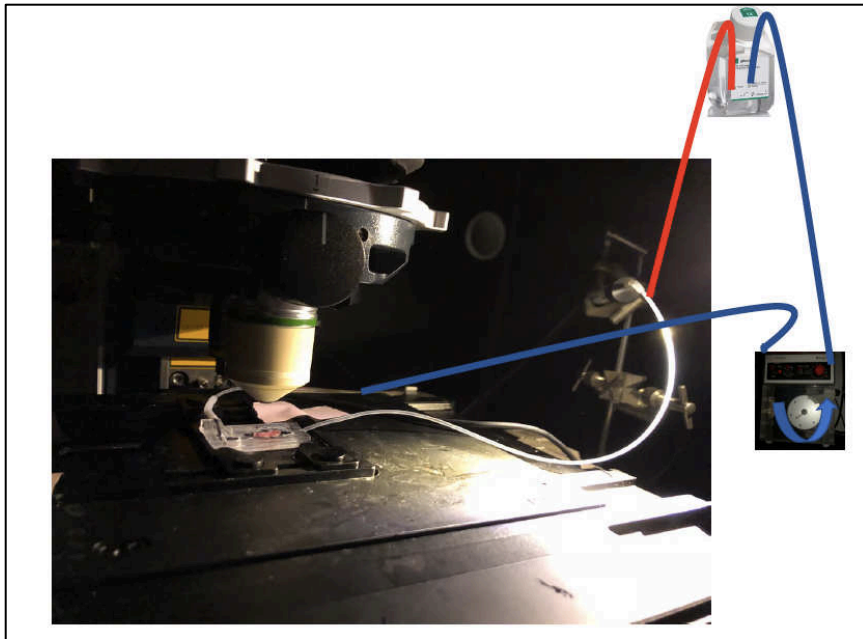
2. 3 lavages avec DMEM sans rouge phénol à 37°C de 5 minutes chacun en agitation douce.
3. Incubation avec anticorps Rat Anti-Mouse F4/80-Like Receptor couplé BV421 (BD Biosciences°) dilué au 1/50^{ème} pendant 1 heure.
4. 3 lavages avec DMEM sans rouge phénol à 37°C de 5 minutes chacun en agitation douce.
5. La section sera ensuite collée sur une lame collée sous le dispositif de perfusion pour imagerie (Figure ci-dessous). Les lames et le réceptacle ont été maintenus à l'étuve à 37°C jusqu'à utilisation.



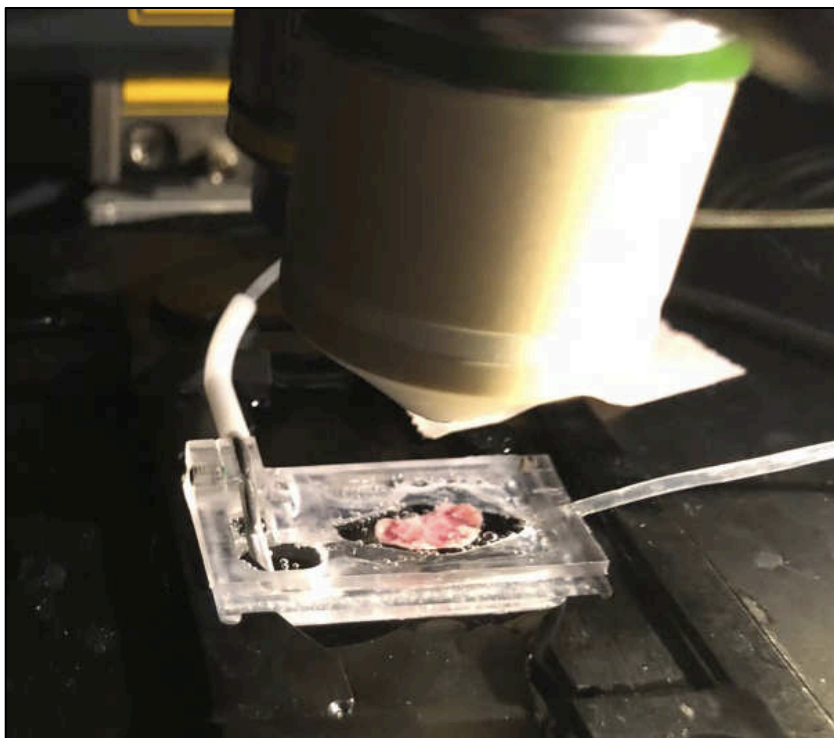
Dispositif de conditionnement de la tranche de poumon pour imagerie. Tranche de poumon collée au centre permettant une irrigation (hydratation-oxygénation) continue via la perfusion de DMEM sans rouge phénol à 37°C.

Microscopie 2-photon.

1. Comme le montrent les 2 photographies du dispositif ci-dessous, la section de poumon collée sur la platine est irriguée en continu par une perfusion de DMEM sans rouge phénol à 37°C par un système de perfusion-aspiration par pompe péristaltique du DMEM sans rouge phénol à 37°C. Le DMEM est conservé en aliquot de 50mL jusqu'à utilisation à l'étuve à 37°C, la tubulure passe dans un réchauffeur réglé et contrôlé à 37°C et la chambre d'observation du microscope est maintenue à 37°C (mesure contrôlée en continue).



Photographie du dispositif d'irrigation continue de la section de poumon à l'aide d'une pompe péristaltique assurant la perfusion de DMEM sans rouge phénol (rouge) et l'aspiration continue (bleu).



Photographie montrant le dispositif fixé sur la platine du microscope incluant la section de poumon collé, le système de perfusion-aspiration en place sous l'objectif.

2. Microscopie. L'imagerie intravitale a été réalisée en utilisant le LSM 780 NLO (Carl Zeiss) équipé d'un laser infrarouge accordable (Chameleon ; Coherent). Pour l'acquisition des images, la longueur d'onde du premier laser a été fixée à 850 nm pour permettre l'excitation de l'YFP, de BV421 et l'obtention de la seconde harmonique et celle du deuxième laser (OPO ; Coherent) a été fixée à 1100 nm pour permettre l'excitation de la RFP. La surface de chaque section de poumon d'animaux infectés et contrôles a été entièrement explorée par microscopie pour cartographier les zones d'intérêt. Les cinétiques étaient obtenues par acquisitions d'un volume composé d'images de 450 μm de côté avec une profondeur de 70-100 μm (images séparées en z de 5 μm) successives dans le temps avec un temps total d'acquisition de 45-60 minutes par zone explorée. Nous avons exploré plusieurs territoires permettant ainsi d'obtenir une cartographie de chaque poumon.

3. Chaque volume a ensuite été retraité informatiquement pour obtenir une projection 2D des différents plans z animée sur la période d'acquisition continue permettant l'obtention de vidéo d'une projection 2D des z en fonction du temps.

Le poumon n'ayant pas été instillé par l'agarose, il a conservé son élasticité et une légère dérive du tissu a été observé durant les longues durée d'acquisition des images. Le poumon étant riche en collagène émettrice d'une seconde harmonique, cette dernière a facilité la correction de cette dérive par un post traitement à l'aide du logiciel ImageJ°, qui a également permis l'analyse manuelle du tracking cellulaire pour mesurer la moyenne des vitesses de déplacement d'un maximum de cellules. Les cellules étaient séparées en 2 catégories :

-Cellule dendritique probable définie comme une cellule d'aspect dendritique CD11c+ « jaune intense».

-Macrophage probable défini comme une cellule arrondie mobile CD11c+ « jaune intense » (+ sur l'image ci-dessous) ou CD11c low « jaune faible » (● sur l'image ci-dessous).

Chaque cellule a été considérée comme exploitable si elle pouvait être suivie durant au moins la moitié du temps de l'acquisition.

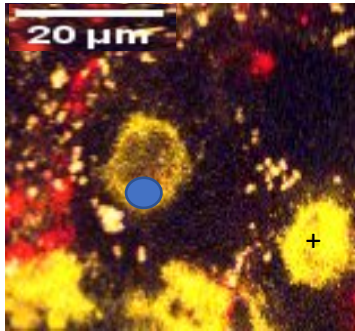


Illustration de la définition des cellules mobiles sélectionnées comme macrophage probable (RSC) : macroscopiquement CD11C+ (+) ou macroscopiquement CD11c low (*).

Statistiques. Les variables quantitatives sont exprimées par la moyenne et l'écart-type. Les données ont été recueillies et décrites à l'aide du logiciel Excel® (Microsoft Corp., Washington, États-Unis). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (The R Foundation, version 3.1.3). Les comparaisons entre les données « contrôle » et les données « expérimentales » ont été effectuées avec un test de Student bilatéral pour les variables quantitatives ; les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs lorsque $p < 0,05$.

7.2.2. Résultats

7.2.2.1. Cinétique de déplacement cellulaire

7.2.2.1.1. Distance parcourue

La mesure de la distance parcourue par les cellules d'aspect dendritique (Dendritic-Shaped Cells (DSC)) des poumons infectés est significativement plus importante à tous les temps post-infection (J1, J2, J3 et J4) comparativement aux cellules des poumons contrôles ($p < 10^{-4}$ pour tous les temps post infection). Cette distance parcourue mesurée est stable sans différence selon les jours post infection ($p > 0,05$).

Pour les cellules arrondies (Round-Shaped Cells (RSC)), la distance parcourue à tous les temps post-infection (J1, J2, J3 et J4) sont également significativement ($p < 10^{-4}$ pour tous les temps) supérieure à la distance de ces mêmes cellules du poumon « contrôle ». Hormis à J2, où la distance parcourue est significativement inférieure aux autres jours post-infection, cette

distance demeure stable entre J1, J3 et J4 sans différence ($p>0,05$) selon les jours post infection.

La comparaison de ces distances parcourues par les cellules DSC et RSC pour un temps donné post infection ne montre aucune différence pour le poumon « contrôle » et une distance significativement supérieure des RSC comparativement au DSC pour chaque temps post infection, comme l'illustre le tableau ci-dessous.

Distance (moyenne, μm)		DSC	RSC	p
Jour 1 (N)		5,33±2,65 (22)	26,47±10,54 (14)	<10 ⁻⁵
Jour 2 (N)		5,03±3,69 (18)	9,76±4,57 (15)	0,002
Jour 3 (N)		7,69±4,14 (17)	23,37±11,42 (16)	0,001
Jour 4 (N)		5,69±5,59 (22)	22,04±11,94 (26)	<10 ⁻⁵
Mock-infected (N)		1,54±1,03 (5)	2,8126±1,76 (5)	0,105

Tableau 1. Distance moyenne parcourue par les DSC et RSC selon le temps post infection. Significativité si $p<0,05$ (test de student). J : jour ; Post inf : post-infection ; Mock-Inf : souris non infectées ; DSC : Dendritic-shaped cell (cellules d'aspect dendritique), RSC : Rounded-shaped cell (cellules arrondies) ; N : nombre de cellules exploitables pour le calcul.

7.2.2.1.2. Vitesse de déplacement

La mesure de la vitesse de déplacement des DSC des poumons infectés montre une accélération de leur déplacement à tous les temps post-infection (J1, J2, J3 et J4) comparativement aux cellules des poumons contrôles ($p<0,003$ pour tous les temps post infection). Par contre, aucune différence de ces vitesses n'est observée entre les temps post-infection ($p>0,05$).

Pour les RSC, leurs vitesses de déplacement à tous les temps post-infection (J1, J2, J3 et J4) sont également significativement ($p<0,004$ pour tous les temps) supérieures à la vitesse de ces mêmes cellules du poumon « contrôle ». On observe une accélération précoce de leurs vitesses dès J1 (vs contrôle, $p<10^{-5}$), puis une stabilité entre J2, J3 et J4 (sans différence significative entre J1, J2, J3 et J4).

La comparaison des vitesses de cellules DSC et RSC pour un temps post infection donné ne montre aucune différence pour le poumon « contrôle » et une vitesse de déplacement significativement supérieure des RSC comparativement au DSC pour chaque temps post-infection, comme l'illustre le tableau ci-dessous.

	DSC	RSC	p
Vitesse (moyenne, $\mu\text{m}/\text{min}$)			
Mock-Inf	0,045±0,031	0,09±0,081	0,138
J1 post inf	0,14±0,098	0,62±0,227	<10 ⁻⁴
J2 post inf	0,11±0,055	0,3±0,145	0,0012
J3 post inf	0,12±0,085	0,37±0,156	<10 ⁻⁴
J4 post inf	0,10±0,0488	0,62±0,211	<10 ⁻⁵

Tableau 2. Vitesse de déplacement des cellules d'aspect dendritique et des cellules d'aspect arrondie en fonction du temps post infection PR8. Significativité si $p < 0,05$ (test de student). J : jour ; Post inf : post infection ; Mock-Inf : souris non infectées ; DSC : Dendritic-shaped cell (cellules d'aspect dendritique), RSC : Rounded-shaped cell (cellules arrondies). Le nombre de cellules exploitables pour le calcul est identique (N) à celui du tableau 1.

7.2.2.2. Interactions cellulaires

Le format papier ne permettant pas la diffusion de vidéos, les films résultant de l'animation des acquisitions volumiques ont été fragmentés à plusieurs images fixes correspondant à différents temps de l'acquisition.

Les vidéos illustrées par les figures 91 à 98 permettent la visualisation des interactions des cellules arrondies mobiles CD11c⁺ ou CD11c^{low} (probable macrophages) et des cellules infectées (figures 94, 95 - phagocytose), de migration cellulaire d'un probable macrophage après contact avec cellules infectées (figure 97), d'interaction directe entre probable macrophages (figure 93). La figure 91 montre le positionnement sous épithéliale des cellules CD11c⁺ peu mobiles dans le cadre de la veille immunologique leur permettant rapidement d'interagir avec les cellules épithéliales infectées (figure 92) multipliant au cours de temps post-infectieux les interactions cellulaires (figure 96 et 98).

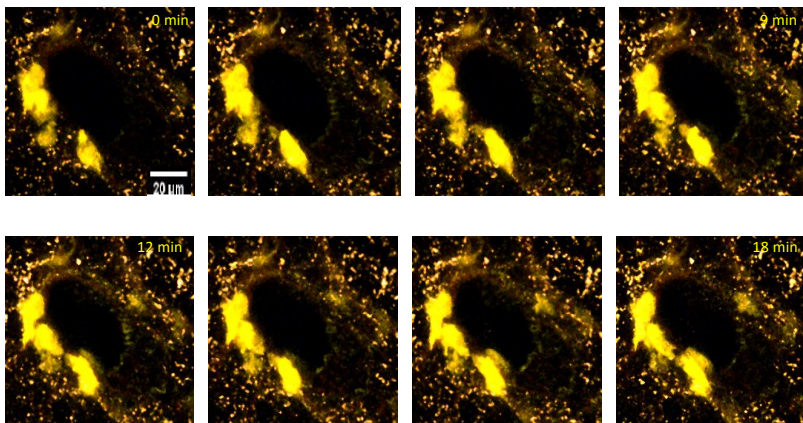


Figure 91 (vidéo 1). Images acquises en continue successivement en M2P *ex vivo* d'un poumon de souris non infectée (contrôle). Cellules CD11c sous épithéliale en veille immunologique.

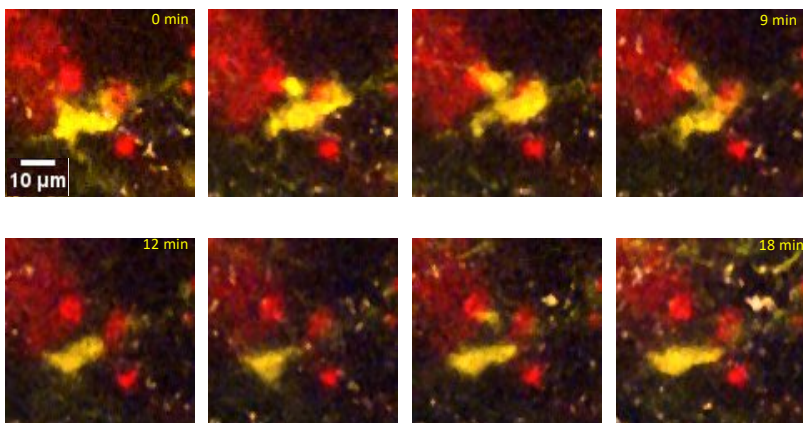


Figure 92 (vidéo 2). Images acquises en continue successivement en M2P *ex vivo* d'un poumon de souris à J1 post-infection. Mobilité d'une cellule CD11c+ avec dendrites (CD probable) interagissant à proximité avec de multiples cellules infectées

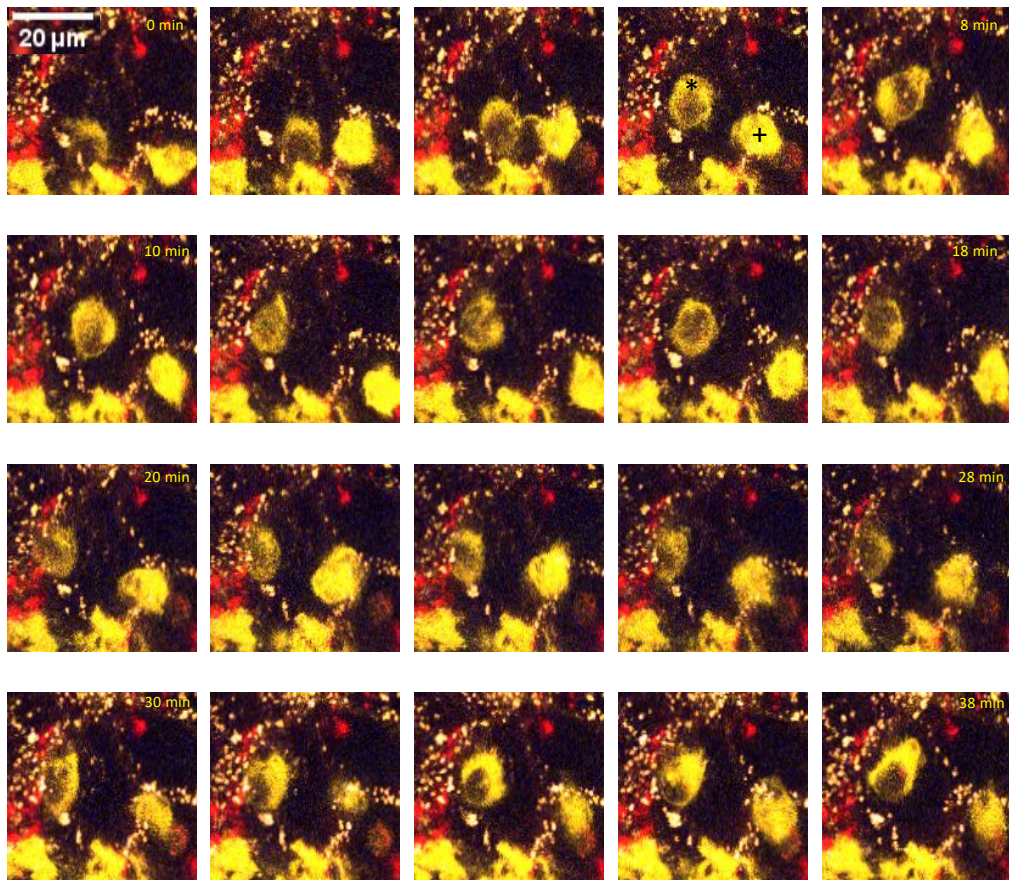


Figure 93 (vidéo 3). Images acquises en continue successivement en M2P *ex vivo* d'un poumon de souris à J1 post-infection. Mobilité inter alvéolaire de 2 cellules arrondies (macrophages), une macroscopiquement CD11c+ (+ image 4), l'autre CD11c low (* image 4), interagissant entre elles avec contact direct.

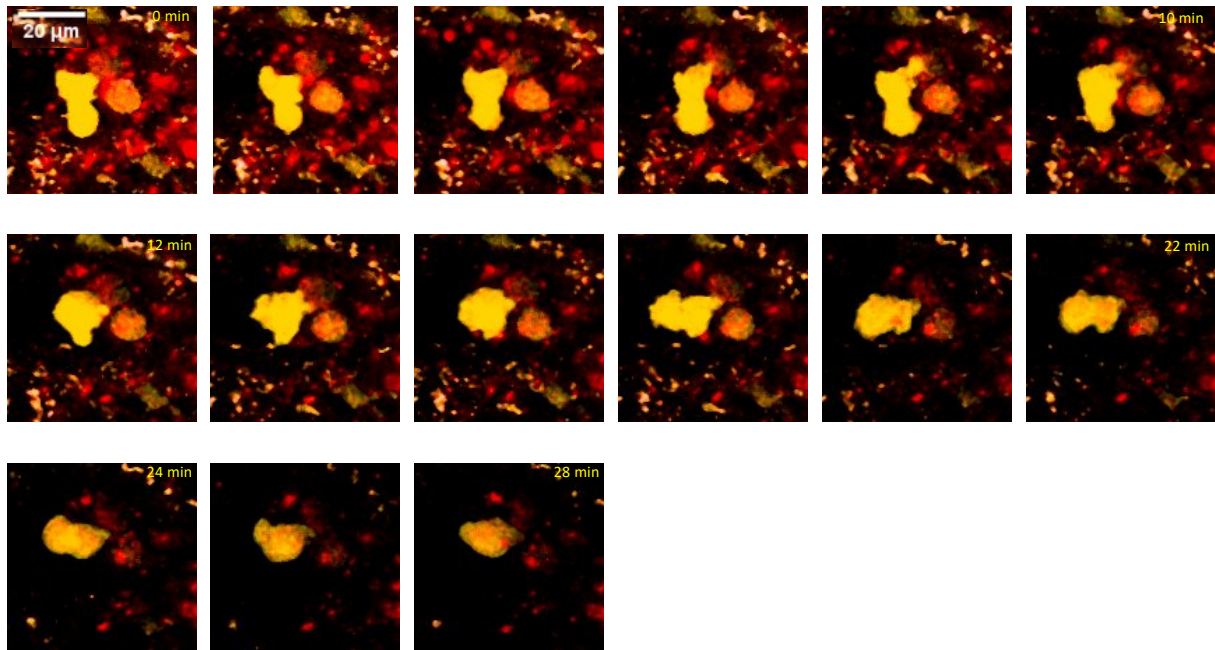


Figure 94 (vidéo 4). Images acquises en continue successivement en M2P *ex vivo* d'un poumon de souris à J2 post-infection. Phagocytose par une cellule CD11c arrondies (macrophage) interagissant avec une cellule infectée (fluorescence rouge apparaissant en intracellulaire au cours du temps).

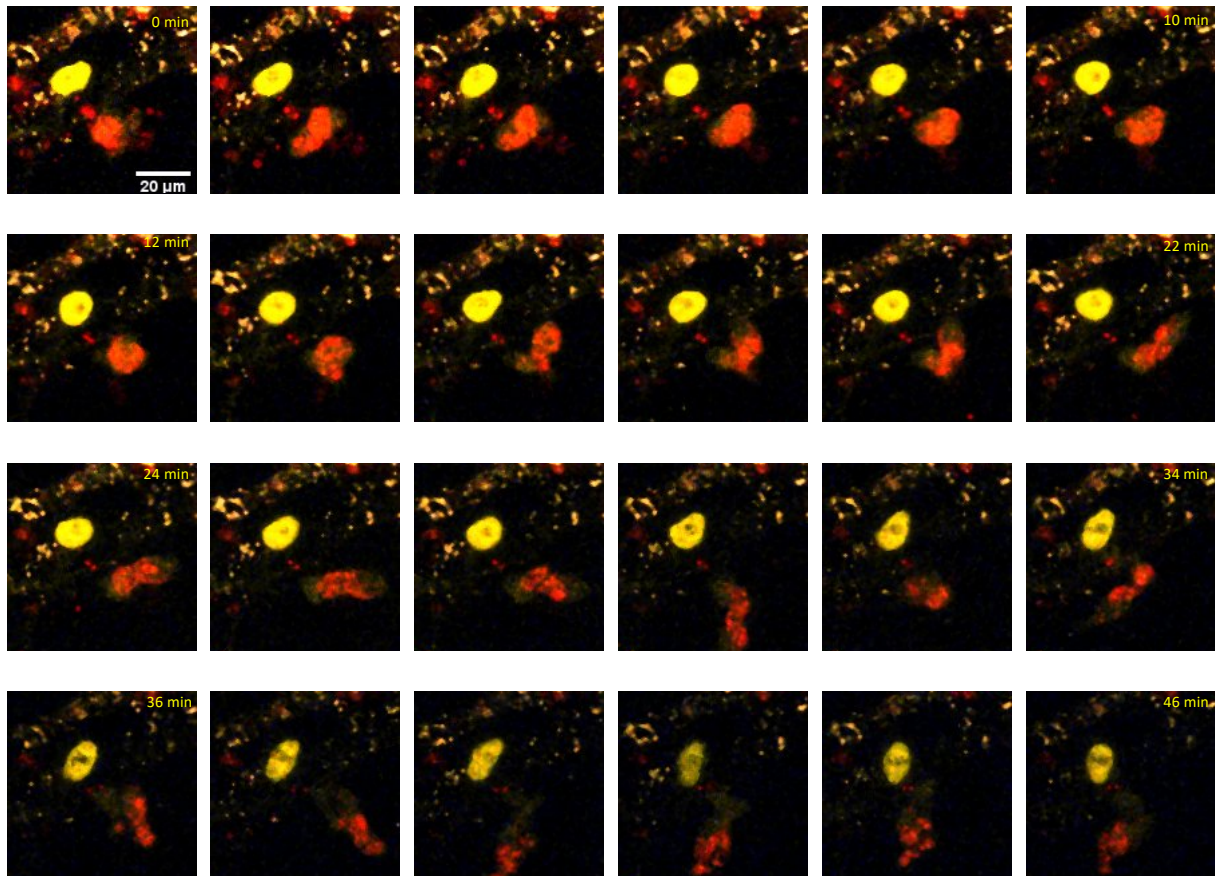


Figure 95 (vidéo 5). Images acquises en continue successivement en M2P *ex vivo* d'un poumon de souris à J3 post-infection. Morcellement progressive de la fluorescence rouge en intracellulaire sans argument pour une phototoxicité (préservation de l'intégrité cellulaire) : dégradation intracellulaire du phagosome ou mort cellulaire?

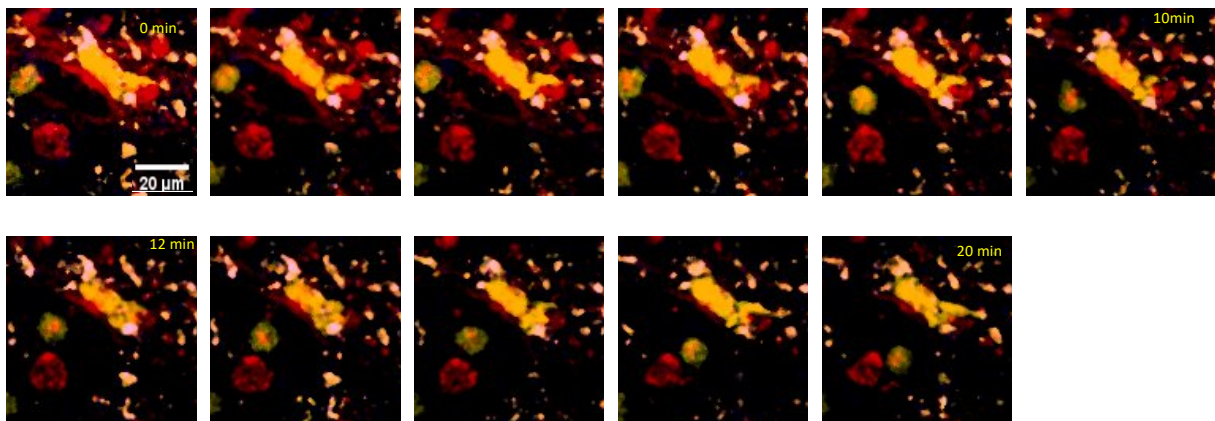


Figure 96 (vidéo 6). Images acquises en continue successivement en M2P *ex vivo* d'un poumon de souris à J4 post-infection. Cellules CD11c (CD probable) en interaction avec de multiples cellules infectées et une cellule CD11c low (macrophages probable)

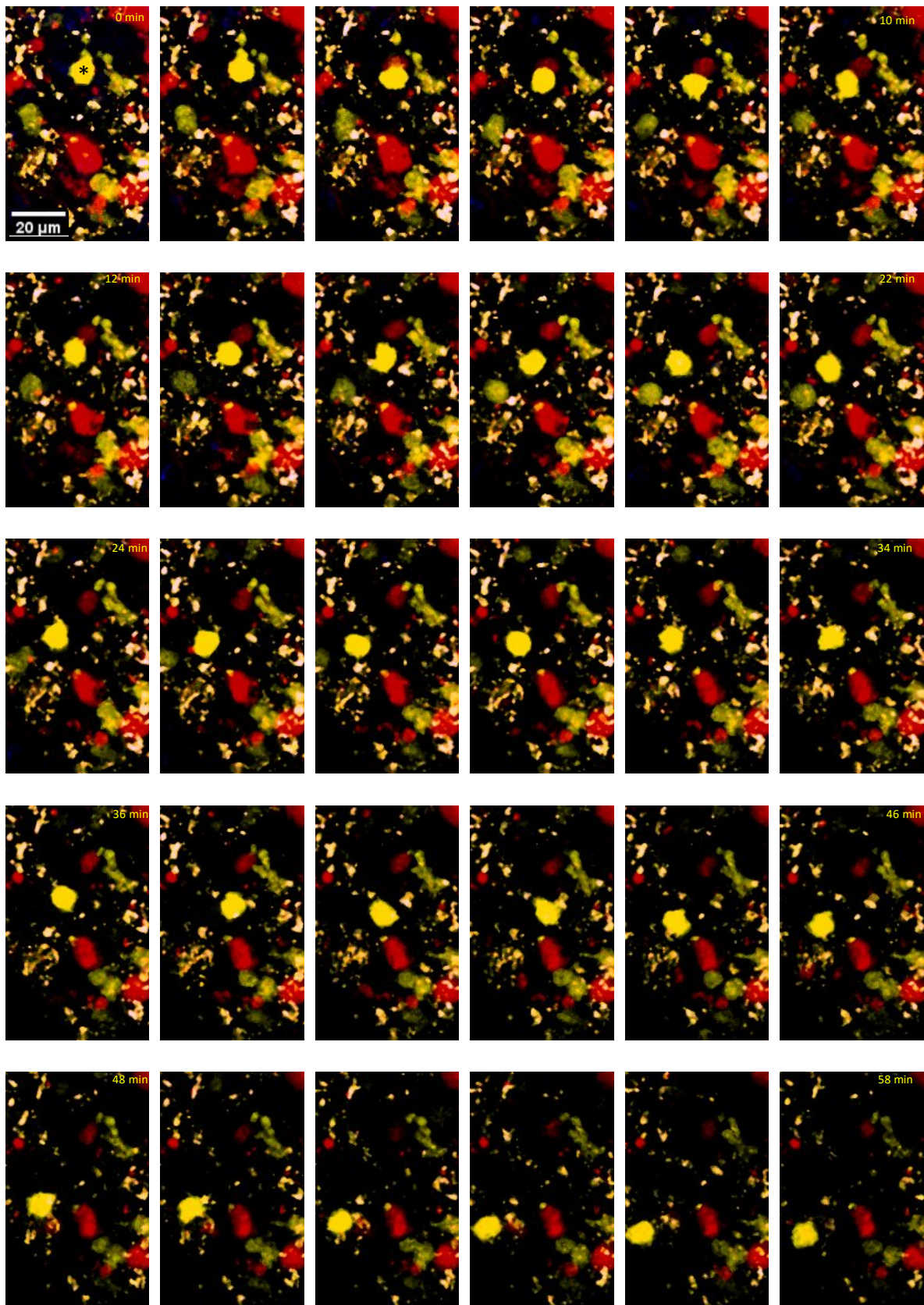


Figure 97 (vidéo 7). Images acquises en continue successivement en M2P *ex vivo* d'un poumon de souris à J4 post-infection. Migration d'une cellule CD11c arrondie (*macrophage probable) après interaction avec une cellule infectée.

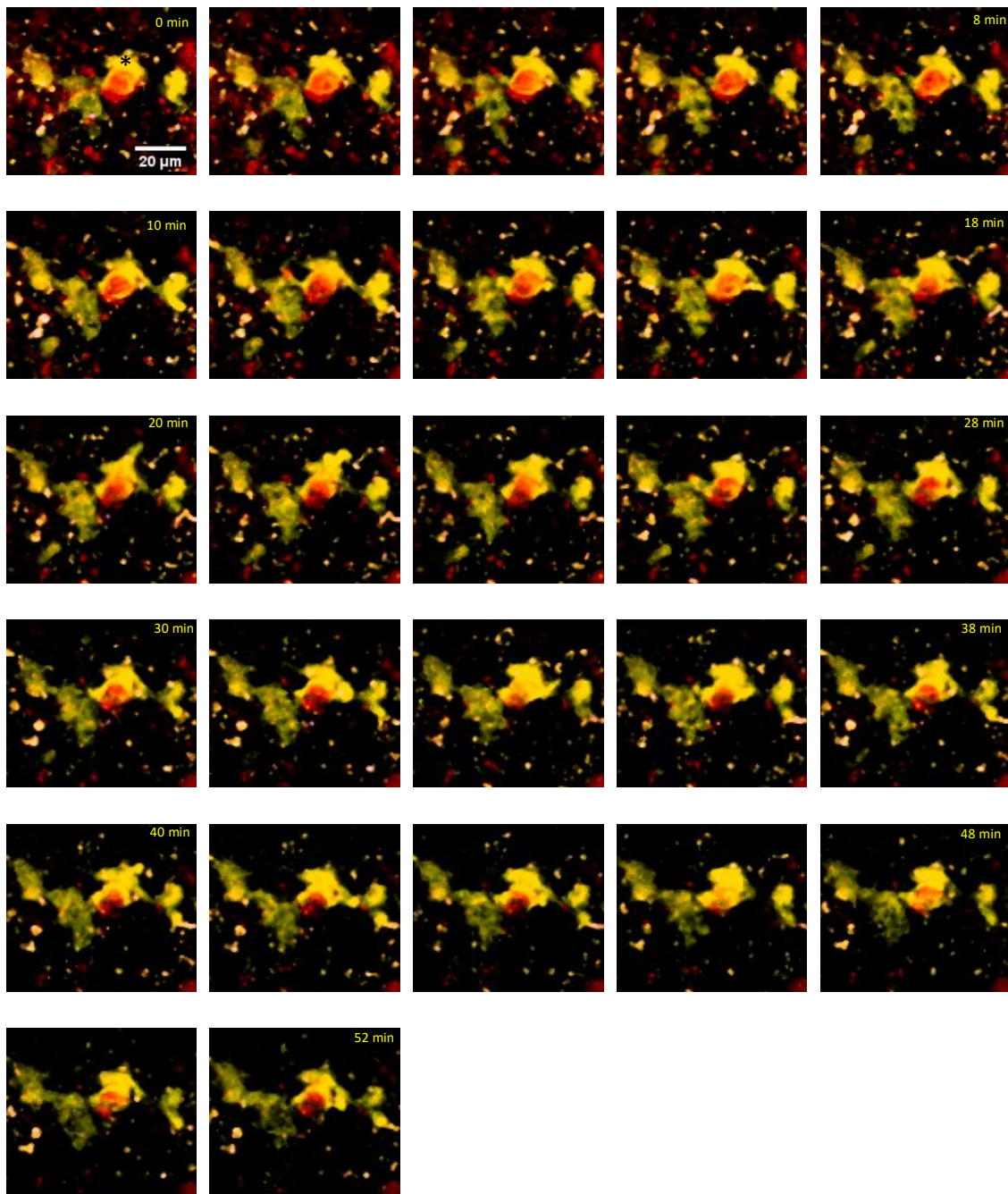


Figure 98 (vidéo 8). Images acquises en continue successivement en M2P *ex vivo* d'un poumon de souris à J4 post-infection. Cellules infectées englobées dans les pseudopodes (phagocytose) d'une cellule CD11c (*CD probable) interagissant avec les cellules de l'environnement.

7.2.3. Discussion

Dans le processus de préparation de la section de poumon, il est habituellement instillé en intra-trachéale en post dissection de l'agarose liquide afin de rigidifier le poumon et permettre la coupe au vibratome. Pour observer un organe le plus « physiologique », nous avons décidé de ne pas instiller d'agarose. En effet, l'agarose est utilisée pour rendre le poumon plus

« rigide » et faciliter sa coupe au vibratome. Mais il s'agit d'un agent non physiologique instillé dans le voix aériennes, nous ne pouvons exclure qu'il induise une réaction sur les cellules immunitaires notamment macrophagique non lié à l'infection, nous avons donc privilégié le maintien de nos poumons dans des conditions les plus physiologiques possibles afin de ne pas perturber les résultats expérimentaux (87, 106).

L'instillation intra trachéale d'agarose pouvait toutefois être pertinente après infection surtout pour les derniers jours (J3, J4) le poumon atteint pouvant être plus friable donc plus difficile à couper sans traitement préalable. Par souci de reproductibilité, d'homogénéité des techniques et de comparabilité des résultats de la cinétique dans le temps post infection, il était primordial que la technique employée soit identique quel que soit le temps post infection. Nous avons donc décidé d'homogénéiser la technique sans agarose d'autant plus qu'elle avait déjà été utilisée dans le laboratoire immédiatement après inhalation de spores de *Bacillus anthracis* (107), il y avait donc un rationnel d'efficacité de cette technique mais une réelle incertitude sur la possibilité de couper au vibratome un poumon 3-4 jours après l'infection virale. Nos résultats valident la faisabilité de la technique de préparation de la coupe sans agarose sur poumon de souris infecté par *Influenzavirus*.

A notre connaissance, il s'agit des premiers résultats de l'application de cette technique *ex vivo* au cours du temps après infection par *Influenzavirus*. En contexte infectieux, cette technique *ex vivo* semble donc tout à fait pertinente pour explorer la mobilité et les interactions cellulaires en montrant les interactions entre cellules infectées et macrophages ou cellules dendritiques.

Les études ayant appliqué antérieurement cette méthode dans un modèle infectieux ont utilisé la section comme un support anatomique d'infection *ex vivo*, l'agent infectieux ayant été instillé dans le puit où était contenu un fragment de la tranche de poumon. Ces études ont démontré la possibilité de visualisation des sites infectés et d'étudier les modifications de la mobilité cellulaire après incubation *ex vivo* avec des virus respiratoires (Paramyxovirus, H3N2) ou stimulation par LPS des fragments de poumons obtenus par cette technique *ex vivo* en application humaine (116–120). Même si très intéressantes, ces études ont exclu trop de caractéristiques physiologiques de contamination, de diffusion virale et de recrutement cellulaire.

D'autres études ont antérieurement utilisé cette technique en contexte infectieux et ont démontré des différences de mobilité cellulaire après infection entre les cellules dendritiques et les macrophages toutefois il s'agissait exclusivement d'infection à *Bacillus anthracis*, dont la physiopathologie et les conséquences cellulaires sont différentes de la grippe (100,101,121). De plus, l'imagerie *ex vivo* était effectuée quelques minutes/heures après l'inhalation des spores et pas sur un temps long post infection (J1-J4).

En M2P, la question scientifique guide le choix du modèle animal, en partant du postulat qu'aucun modèle n'est idéal car aucun marqueur n'est totalement spécifique d'un type cellulaire. Le choix résulte donc d'un consensus entre le(s) type(s) cellulaires(s) étudiés, la disponibilité du modèle et les habitudes des expérimentateurs, le chevauchement des spectres d'absorption/émission des différents fluorochromes. La fluorescence peut être exogène via un anticorps spécifique d'un marqueur cellulaire couplé à un fluorochrome ou endogène via un animal transgénique plus spécifique, plus fiable et moins sensible à la photo toxicité du laser (99). Plusieurs modèles animaux transgéniques ont été développés pour explorer principalement les cellules dendritiques (CD11c-YFP, CD11c-mCherry...), principalement les macrophages résidents et dérivés des monocytes (CCR2-RFP, CX3CR1-GFP...) et parfois les 2 populations (MacBlue, Macgreen...); des croisements entre ces modèles pourraient permettre plus de spécificités cellulaires (100). Nous souhaitons garder une homogénéité et une cohérence du modèle pour toutes nos expérimentations. Dès lors, compte tenu de l'autofluorescence importante de l'épithélium du tissu fixé, nous avons écarté les modèles avec fluorescence endogène dans le vert (GFP, McGreen...); le virus étant fluorescent dans le rouge, cela écartait de fait les modèles RFP et mCherry. Le modèle CD11c-YFP nous semblait *a priori* acceptable car permettait la visualisation des cellules dendritiques, de certains macrophages résidents et l'ajout d'un marquage exogène pan macrophage par Ac anti F4/80 couplé au fluorochrome BV421 permettait de visualiser les macrophages résidents et les macrophages dérivés des monocytes.

Même si la spécificité des marqueurs cellulaires, donc du type cellulaire, reste la pierre angulaire du choix du modèle animal transgénique en imagerie (37, 100), cette technique permet également de discriminer certains types cellulaires ayant des marqueurs communs (CD11c, CX3CR1,) notamment les cellules dendritiques et les macrophages selon leur

morphologie et leur mobilité, comme Fiole et col. et Veres et col. l'ont démontré antérieurement, après respectivement simulation bactérienne par lipopolysaccharide (LPS) ou allergique par ovalbumine (113, 114).

Cette reconnaissance morphologique est d'autant plus intéressante qu'une des limites de notre expérimentation a malheureusement été la dégradation rapide du fluorochrome B421 au cours des acquisitions d'imagerie *ex vivo*. En effet, afin de différencier les macrophages résidents des cellules dendritiques, les 2 populations étant porteurs du marquage CD11c, nous avons décidé d'ajouter un marquage F4/80 permettant de différencier ces 2 types cellulaires et de visualiser en plus les macrophages dérivés des monocytes (CD11c low mais F4/80 positif). Malheureusement, la durée d'acquisition des images permettant d'étudier la mobilité cellulaires (acquisition de 45 à 60 minutes) ne semble pas compatible avec la stabilité de la fluorescence induite par le BV421 très vite dégradé par les multiples périodes d'excitation et la puissance du laser, faisant rapidement disparaître cette fluorescence ne permettant pas son analyse. Cette dégradation du signal BV421 n'avait pas été observée lors de l'imagerie du poumon fixé probablement du fait de la durée plus courte des acquisitions de chaque image. Il était toutefois difficile d'envisager un autre fluorochrome compte tenu des chevauchements des spectres d'absorption et d'émission des fluorochromes endogènes, de l'autofluorescence... De plus, voulant rester homogène, reproductible et comparatif entre nos différentes expérimentations, nous avons décidé de conserver le même modèle animal transgénique (CD11c-YFP).

Nous avons également intégré cette approche morphologique dans ce modèle animal (CD11c-YFP) pour analyser la distance parcourue et la vitesse de déplacement des cellules. La distance et la vitesse sont significativement plus importantes des RSC (comparativement au DSC), cela nous permet 3 remarques :

1. Après infection, on observe une distance parcourue augmentée dès J1 et stable durant l'expérimentation (hormis à J2 que nous discuterons ultérieurement) ainsi qu'une accélération des RSC (probables macrophages) progressivement jusqu'à J2 puis maintien de la vitesse de déplacement, alors que les DSC augmentent leur distance qui se stabilise dès J1 et accélèrent leur vitesse également très précocement et la stabilisent jusqu'à J4. Cette différence significative en termes de distance et de vitesse entre RSC et DSC tendrait à confirmer la pertinence de différencier ces 2 types cellulaires par leur morphologie comme déjà décrit dans la littérature (113, 114) et

confirmerait *in situ* la place centrale des macrophages de par leur expansion quantitative et fonctionnelle (cytokines, distance et vitesse de déplacement).

2. L'augmentation de la distance parcourue et l'accélération de la vitesse de déplacement des macrophages (RSC) après infection par la grippe sont en accord avec des données antérieurement publiées sur ce même modèle animal après stimulation par LPS comparativement au groupe « contrôle » (113, 114). Fiore et col (113) n'avaient observé aucune différence sur les vitesses de déplacement des RSC entre les phases considérées comme précoces (1h30) et tardives (6h) post exposition LPS. La distance parcourue et la vitesse de déplacement étant augmentées dès J1 évoquerait une activation rapide et progressive des macrophages. Sur un modèle *in vivo*, Ueki et col ont montré, après infection par PR8, que peu de neutrophiles étaient recrutés (comparativement à H3N1) ; mais également une accélération des polynucléaires neutrophiles rapide et fugace J1 et J2 avant une baisse brutale du nombre de polynucléaires neutrophiles et un important ralentissement de leur vitesse de déplacement (97). Ces données tendent à confirmer l'importance d'intégrer la M2P dans les études de physiopathologie des infections respiratoires.
3. La distance parcourue par les RSC à J2 post-infection significativement inférieure aux autres J (1, 3, 4) pose question. Nous pouvons faire l'hypothèse que cette distance inférieure correspondrait à une période de transition où après le recrutement des macrophages résidents rapidement disponibles au sites infectés, les macrophages étant arrivés sur site se déplacent moins mais pas moins vite. La réascension de la distance de déplacement des RSC à partir de J3 correspondrait au déplacement des macrophages dérivés des monocytes migrant au site infecté recrutés via la circulation sanguine par chimiotactisme (CCL2 ...).

Même si cette technique *ex vivo* a de nombreux inconvénients, ces avantages techniques et l'intérêt des résultats obtenus semblent toutefois démontrer qu'elle ait toute légitimité dans la recherche sur la physiopathologie pulmonaire des infections respiratoires en apportant des informations dynamiques et fonctionnelles (vitesse de déplacement, distance, interactions intercellulaires ...) *a priori* indispensables à la bonne compréhension des mécanismes mis en jeu post-infection.

7.3. Apport de la M2P pour la comparaison de virus à tropisme respiratoire

7.3.1. Comparaisons entre 2 souches virales d'*Influenzavirus* (PR8 et WSN)

7.3.1.1. Introduction

Compte tenu de la disponibilité d'une autre souche H1N1 (A/WSN/33 H1N1 (WSN)) avec une fluorescence endogène (NS1-RFP), nous avons pu comparer les conséquences cliniques, recrutements cellulaires et observations microscopique en M2P après infection par 2 souches virales d'*Influenzavirus* adaptées au modèle murin : PR8 ou WSN.

Les études montrent qu'après infection par WSN, sont observés une perte pondérale significative, une production de cytokines (dosées sur LBA) pro-inflammatoires (MCP-1, MIP-1a, IL6) et un recrutement significatif de macrophages comparativement aux souris non infectées. Très peu d'études comparatives entre ces 2 souches ont été publiées et aucune intégrant une analyse histologique et encore moins microscopique.

7.3.1.2. Méthodes

Pour se faire, nous avons infecté les espèces de souris identiques à celles décrites ci-dessus (C57BL6/J pour la cytométrie en flux et C57BL6/J transgéniques avec cellules CD11c+ exprimant une protéine fluorescente jaune (YFP) pour la M2P) selon le protocole décrit précédemment (chapitre 7.1) en terme de suivi clinique, cytométrie en flux et M2P.

Les souris ont été infectées par instillation intranasale de 30µL contenant 10⁵ PFU/mL A/WSN/33 H1N1 (WSN) pour la cytométrie en flux (N=3) et WSN modifié génétiquement par l'ajout d'un gène codant pour une protéine fluorescente rouge (RFP) au gène de la protéine non structurale virale NS1 pour la M2P (N=3). Les souris contrôles (N=2) ont suivi le même protocole avec instillation de 30µL de PBS.

7.3.1.3. Résultats

Le suivi clinique montre une perte pondérale significative quelle que soit la souche virale (figure 99) comparativement aux souris contrôles mais aucune différence entre les souches.

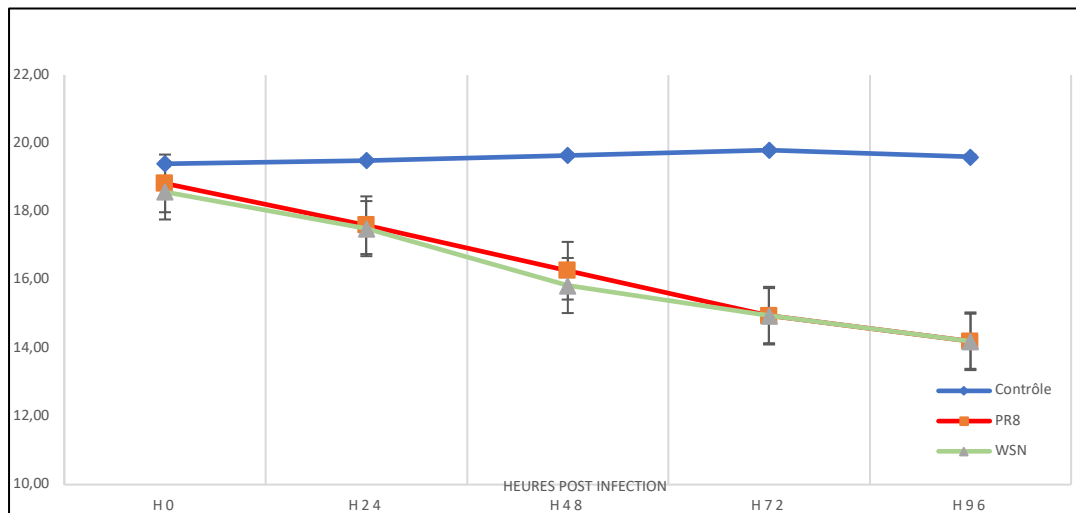


Figure 99. Evolution comparative de la courbe pondérale après infection par PR8/WSN/contrôle ($p < 0.05$ à partir de H48 entre souris infectées et non infectées).

Le recrutement cellulaire quantifié au niveau du poumon entier a le même profil cellulaire entre les 2 souches virales. Si nous n'avons observé aucune différence sur le recrutement macrophagique, nous notons un recrutement précoce et court en polynucléaires neutrophiles significativement supérieur pour PR8 à J2 ($p < 0.05$) (figure 100).

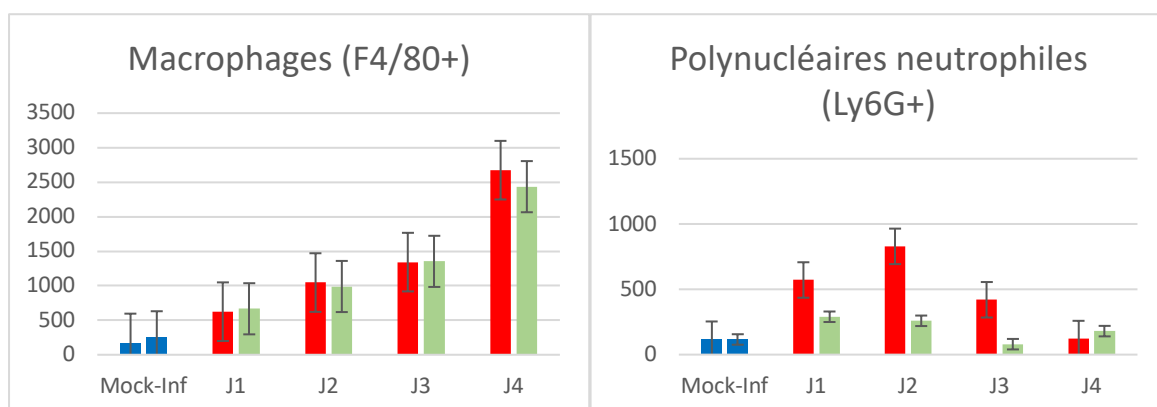


Figure 100. Evolution quantitative en fonction du temps post-infection (J1, 2, 3, 4) par cytométrie en flux des macrophages et polynucléaires neutrophiles pulmonaires après infection par PR8 ; WSN ; contrôle (Mock-Inf).

Aucune différence n'a été observée entre PR8 et WSN en terme de localisation et de diffusion virale dans le temps, de lésions épithéliales ou de recrutement macrophagique. L'ensemble des observations a été identique à celles décrites dans le chapitre 7.1 (figure 101).

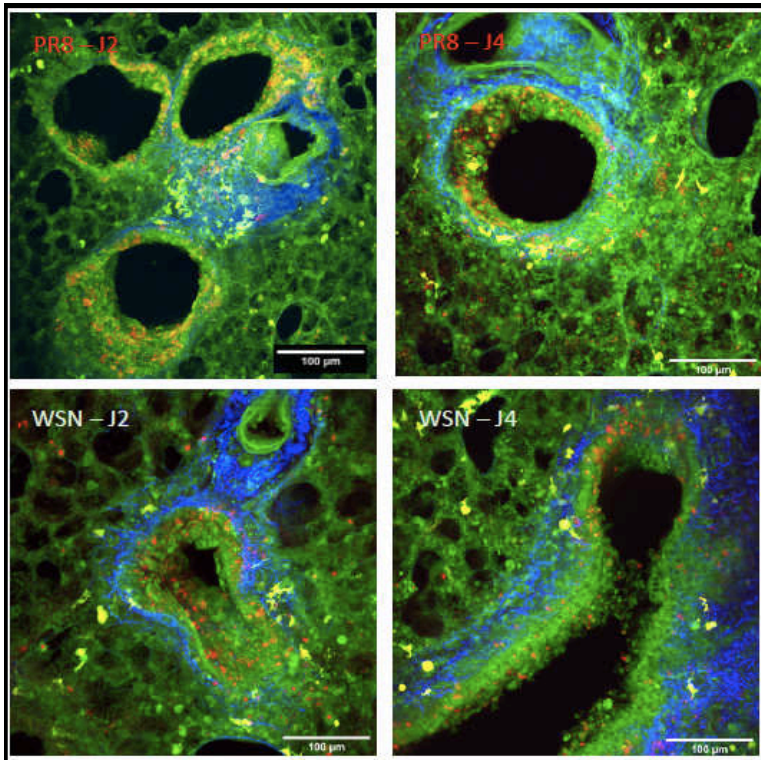


Figure 101. Comparaison des observations en M2P (z-projection) des poumons de souris infectées par PR8 ou WSN aux mêmes temps post-infection (J2 et J4).

7.3.1.4. Discussion

Peu de différences ont été identifiées au niveau pulmonaire après infection par WSN ou PR8 :

-Aucune différence clinique de l'évolution de la courbe pondérale entre WSN et PR8, avec une baisse significative comparativement aux souris contrôles pour les 2 souches.

-Pas de différence du recrutement des macrophages, mais un recrutement significativement moindre de polynucléaires neutrophiles comparativement à PR8.

-Les constatations microscopiques sont identiques entre WSN et PR8 que ce soit pour les structures infectées et son évolution, les lésions épithéliales et le recrutement macrophagique.

Les quelques études ayant comparé les 2 souches virales (PR8 et WSN) n'ont mis en évidence aucune différence en terme clinique (perte pondérale, survie), de concentrations de cytokines (IL6, IFN-I) ni de recrutement cellulaire après infection par voie intra nasale (126,127).

La comparaison des 2 souches virales d'*Influenzavirus* a montré une parfaite analogie physiopathologique nous interrogeant, d'ailleurs, sur la pertinence de poursuivre certaines expérimentations initialement envisagées avec les 2 souches virales. Compte tenu de la similitude des premiers résultats entre PR8 et WSN, nous avons décidé pour des raisons éthiques de réduction (règle des 3R de la directive européenne sur l'expérimentation animale) de ne poursuivre les expérimentations qu'avec PR8, notamment pour le dosage des cytokines et la microscopie intravitale.

7.3.2. Comparaisons entre 2 virus de familles différentes (*SARS-Cov2 / Influenzavirus*)

7.3.2.1. Introduction

La pandémie *SARS-Cov2* qui a déferlé sur le monde début 2020 et les vagues successives ont fortement impacté le déroulement de notre thèse avec une pause des expérimentations durant au moins 8 mois ayant dû reprendre à temps-plein mes activités cliniques hospitalières. Nous avons pu obtenir des poumons fixés (PF1 4%) de hamsters infectés par *SARS-Cov2* (mis à mort au 3^{ème} jour de l'infection) via une collaboration avec l'équipe d'Hervé Bourhy à l'institut Pasteur. Cette collaboration de circonstance a donc permis d'étudier un autre virus à tropisme respiratoire via la M2P. *Influenzavirus* et *SARS-Cov2* ayant un tropisme respiratoire et une présentation clinique proche, les données anatomiques étaient également exclusivement histologiques avec les mêmes limites évoquées précédemment. Nous avons pu étudier les localisations des sites infectés, les altérations structurales et le recrutement cellulaire comparativement à la grippe.

Ce travail a fait l'objet d'une publication

“Two-photon microscopy analysis reveals different pulmonary damage after infection by influenza or SARS-CoV-2. Rivière Frédéric, Lefèvre François, Burger Julien, Dias de Melo Guilherme, Tournier Jean Nicolas, Billon-Denis Emmanuelle. *Respir Med Res.* 2021 Nov;80:100862.”



Available online at
ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
 www.em-consulte.com



Letter to the Editor

Two-photon microscopy analysis reveals different pulmonary damage after infection by influenza or SARS-CoV-2

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 August 2021

Accepted 21 September 2021

Available online 2 October 2021

Keywords:

2-photon microscopy

Influenza

COVID-19

Dear Editors,—COVID-19 and influenza have different epidemiology and clinical features [1–3] but histological data has indicated that both cause same epithelial lesions and diffuse alveolar damage [4]. To investigate these pandemic respiratory system viruses we used 2-photon microscopy (2PM) on animal model to compare structural lung damage, viral localization and macrophage recruitment in pulmonary epithelial tissue 72 h after infection with either the *A/PR8 Influenza* strain infection in mice or *SARS-Cov-2* infection in hamsters. The use of 2PM enabled the visualization of a thick section of an entire lung while maintaining excellent resolution.

Methods

The method section has been divided into sub-parts describing animals, viruses, infection modalities and antibodies used for each virus.

For *Influenzavirus* infection,

Mice. Six- to 8-week old male transgenic mice (C57BL/6 background) expressing yellow fluorescent protein (YFP) under the control of the CD11c promoter (a kind gift of Dr. Lefevre F., Molecular Immunology and Virology Unit, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy en Josas, France) called CD11c-YFP mice. Mice were handled under specific pathogen-free conditions.

Influenzavirus

A/Puerto Rico/8/34/H1N1, which express a fluorescent protein (Red Fluorescent Protein (RFP)) fused to the NS1 protein (RFP-NS1-PR8), were generated previously by using reverse genetics.

For *SARS-Cov2* infection,

Hamster. Male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) of 5–6 weeks of age were purchased from Janvier Laboratories and handled under specific patho-gen-free conditions (a kind gift of Dr. Dias de

Melo G., Lyssavirus Epidemiology and Neuropathology Unit, Institut Pasteur, Paris, France).

SARS-Cov2

The strain 2019-nCoV/IDF0372/2020 (EVAg collection, Ref-SKU: 014V-03890) was provided by Pr. Van der Werf S. (Institut Pasteur, Paris).

Infection protocol

Three mice were anesthetized with 5% isoflurane and were intranasally infected with 10^5 PFUs (plaque-forming units) of RFP-NS1-PR8. Three hamsters were anesthetized with 5% isoflurane and were intranasally infected with 6.104 PFUs of SARS-CoV-2. For both species, 1 Mock-infected animals received the physiological solution only with the same procedure. Infected and mock-infected animals were housed in separated isolators for each species and all animals were followed-up daily with body weight and clinical score.

At day 3 post infection, mice and hamsters (infected and mock) were euthanized by cervical dislocation, prepared with intracardiac perfusion of 10 ml PBS then 10 ml 4% Paraformaldehyde (PFA) solution. After lung harvesting, left lobe was glued on Vibratome® stage (Leica, Wetzlar, Germany) and immersed in PBS. In order to achieve smooth sectioning of lung, lung was cut in two parts at 10 μ m/s with vibration amplitude of razor blade of 3 mm. Lower section (4 mm thick) was glued on 83mm Petri dish and immersed in PBS for imaging.

We chose day 3 post infection because hamsters had lost 25% weight (ethical endpoint), so we compared with mice infected at the same day post infection.

Immunofluorescence staining protocol was described in legend of each figure.

For both species, infected and mock-infected lung sections have followed the same experimental protocol.

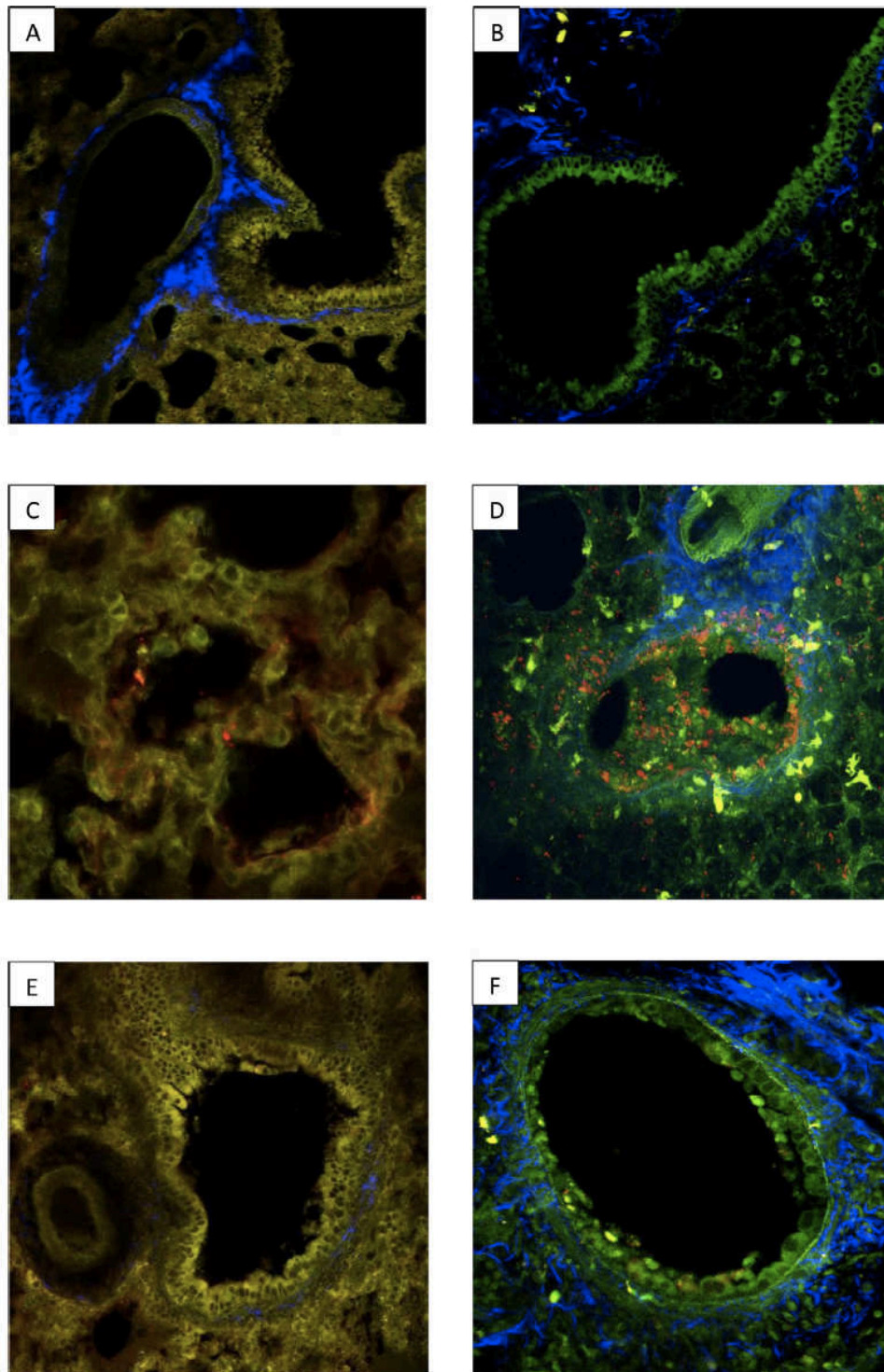


Fig. 1. Comparative analysis with 2MP of lung injury after infection with SARS-Cov2 or *Influenzavirus*. The images above show two 2-photon micrographs (2PM) of normal hamster (A) and mouse (B) lung parenchyma. Alveolar/bronchial epithelium tissue is shown in yellow (A) or green (B) and connective tissue (in both micrographs) is blue. Two 2PM micrographs of pulmonary parenchyma showing the distribution of SARS-Cov-2 (C) or the A/PR8 influenza (D) virus 72 h after infection. In (C) the hamster tissue was stained with the SARS-Cov-2 Spike antibody and a secondary antibody coupled with AF568, an orange-red dye. In (D) the mouse tissue was stained with an endogen fluorescence NS1 coupled with a red fluorescent marker (RFP). The images show that SARS-CoV-2 was localized exclusively on the alveolar epithelium whereas the influenza virus was predominantly localized the on bronchial and alveolar epithelia. Two 2PM micrographs of pulmonary bronchial epithelia 72 h after infection with either SARS-Cov-2 (E) or A/PR8 influenza (F) virus. In (E) the hamster tissue was stained with the SARS-Cov-2 Spike antibody and a secondary antibody coupled with AF568, an orange-red dye. In (F) the mouse tissue was stained with an endogen fluorescence NS1 coupled with a red fluorescent marker (RFP) to visualise the influenza virus. The bronchial epithelium (E) had a normal structure 72 h following infection with Sars-Cov-2 in contrast to the epithelium (F) which showed signs of severe injury following infection with *Influenzavirus*.

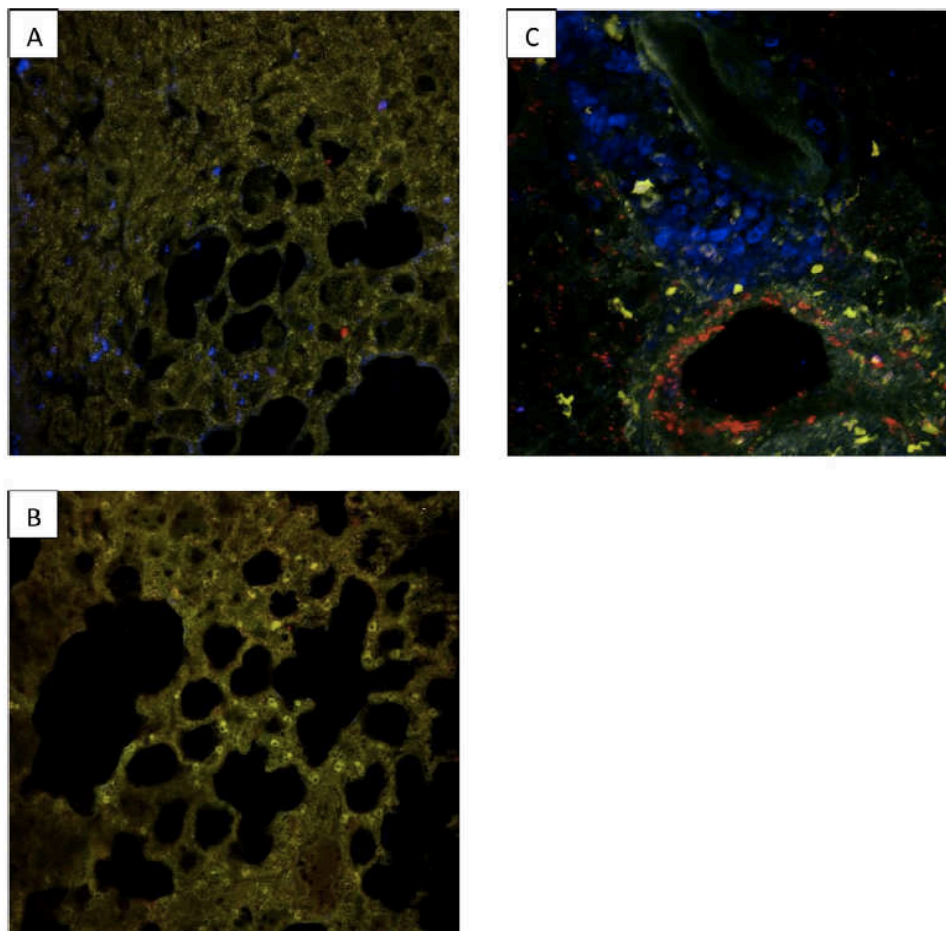


Fig. 2. Comparison of three 2PM images showing localized macrophage recruitment in pulmonary epithelial tissue 72 h after infection with either SARS-Cov-2 virus (A) and (B), or A/PR8 influenza (C). In all slides an F4/80 antibody coupled with a blue BV421 fluorescent marker was used to stain the macrophages. In slides (A) and (B) the SARS-Cov-2 Spike antibody and a secondary antibody coupled with AF568 (an orange-red dye) were used to stain the SARS-Cov-2 virus and in slide (C) an endogenous, fluorescent NS1 coupled with a red fluorescent marker (RFP) were used to visualise the influenza virus. Macrophage recruitment in SARS-Cov-2 infected lungs was heterogeneous, with diseased (A) and healthy areas (B) in the same organ. This variation in macrophage distribution differed from the general, diffuse macrophage recruitment from the perivascular area observed in lung tissue after infection with influenza (C).

Ethics

All animal care and experiments conformed to the guidelines for animal experiments of the European legislation about animal experimentation, and were approved by the animal research committee of Institut de Recherche Biomédicale des Armées.

Two-photon microscopy

The intravital imaging was performed by using an LSM 780 NLO (Carl Zeiss) equipped with an infrared laser (Chameleon; Coherent). To acquire images, the wavelength of the first laser was set to 1100 nm for excitation of RFP and AF568. The wavelength of the second laser was set to 850 nm for excitation to YFP, second harmonic and BV421. Each lung section of infected and mock-infected animals of both species was fully explored by microscopy to map of affected areas.

Results

The results have been illustrated and described on Figs. 1 and 2 and their legends (above). M2P has clearly highlighted several differences between 2 viruses about viral localization, repartition and localization of pulmonary damage and macrophage recruitment.

To have physiological references, the Fig. 1 showed normal lung parenchyma without infection of mock-infected hamster (A) and mock-infected mice (B).

After infection, the Fig. 1 showed that SARS-Cov2 was localized within alveolar epithelium (C) while *Influenzavirus* was mainly bronchial (D). This figure also showed bronchial epithelium integrity was preserved during a SARS-CoV-2 infection (E) but destroyed by *Influenzavirus* (F).

The Fig. 2 showed that infection with SARS-CoV-2 induced focal damage and focal macrophage infiltration, resulting patches of healthy (B) and diseased tissue (A). While infection with *Influenzavirus* caused diffuse, homogenous lung damage and diffuse macrophage recruitment from the perivascular area (C).

In conclusion, SARS-Cov-2 and Influenzavirus are both respiratory viruses with microscopic pathophysiological differences. This could help to explain their observed clinical differences and the need for different therapeutic approaches. M2P could explain some pathophysiological difference: bronchial integrity after SARS-Cov2 infection could be one of explanation of less risk of bacterial infectious complication comparatively with important risk due to epithelium damage after influenza infection. 2MP appears to be promising tool for exploring viral pathophysiology, comparing respiratory viruses and testing therapeutic strategies in preclinical stage.

Declaration of Competing Interest

None.

The images have not been previously published.

CRedit authorship contribution statement

Rivière Frédéric: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing – original draft. **Lefèvre François:** Writing – review & editing. **Burger Julien:** Writing – review & editing. **Dias de Melo Guilherme:** Writing – review & editing. **Tournier Jean Nicolas:** Writing – review & editing. **Billon-Denis Emmanuelle:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing – review & editing.

Funding

None.

References

- [1] Salata C, Calistri A, Parolin C, Palù G. Coronaviruses: a paradigm of new emerging zoonotic diseases. *Pathog Dis* 2019;77:ftaa006. 1 déc.
- [2] Piroth L, Cottenet J, Mariet AS, Bonniaud P, Blot M, Tubert-Bitter P, et al. Comparison of the characteristics, morbidity, and mortality of COVID-19 and seasonal influenza: a nationwide, population-based retrospective cohort study. *Lancet Respir Med* 2021;9:251–9 mars.
- [3] Erich P, Mario K, Theresa M, Sara O, Hasan K, Sebastian B, et al. COVID-19 is not “just another flu”: a real-life comparison of severe COVID-19 and influenza in hospitalized patients in Vienna, Austria. *Infection* 2021;49(5):907–16. doi:10.1007/s15010-021-01610-z.
- [4] Hariri LP, North CM, Shih AR, Israel RA, Maley JH, Villalba JA, et al. Lung histopathology in coronavirus disease 2019 as compared with severe acute respiratory syndrome and H1N1 influenza. *Chest* 2021;159:73–84 janv.

Rivière Frédéric*

Lefèvre François

Burger Julien

Dias de Melo Guilherme

Tournier Jean Nicolas

Billon-Denis Emmanuelle

Microbiology and Infectious Diseases Department, Institut de Recherche

Biomédicale des Armées, Place Générale Valérie André, Brétigny-sur-

Orge 91220, France

Respiratory Department, Hôpital d’Instruction des Armées Percy,

Clamart 92140, France

Molecular Immunology and Virology Unit, Institut National de la

Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas Cedex

78352, France

Lyssavirus Epidemiology and Neuropathology Unit, Institut Pasteur,

Paris 75015, France

*Corresponding author at: Microbiology and Infectious Diseases Department, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Place Générale Valérie André, Brétigny-sur-Orge 91220, France.

E-mail address: frdriviere@orange.fr (R. Frédéric).

Received 23 August 2021

Revised 15 September 2021

Accepted 21 September 2021

Available online 2 October 2021

7.3.2.2. Conclusion comparaison SARS-Cov2/Influenzavirus

La M2P a révélé des différences importantes en termes de lésions épithéliales, de localisation virale et de recrutements cellulaires entre 2 virus à tropisme respiratoire de familles différentes (*Orthomyxoviridae* et *Coronaviridae*) ; confirmant ainsi l'intérêt de cette technique de microscopie dans l'analyse comparative des conséquences pulmonaires après infection par des virus à tropisme respiratoire de familles différentes. Elle confirme donc l'apport que pourrait avoir la M2P pour l'exploration de poumon explanté d'animaux après co-infection, notamment virale, mais également l'exploration de surinfection bactériennes ou fongiques après infection virale.

7.3.3. Synthèse études comparatives entre virus

La M2P semble être l'outil complémentaire pour fournir les données anatomiques en complément des analyses quantitatives et surclasse les analyses histologiques « conventionnelles ». Elle apporte des données sur les structures lésées (épithélium bronchique et bronchiolaire), des données de localisation de l'infection et son évolution, ainsi qu'une analyse anatomique du recrutement cellulaire quantitatif apporté par la cytométrie en flux. Elle est donc totalement additive et complémentaire des techniques utilisées. De plus, les acquisitions en profondeur et leur reconstruction 3D permettent de visualiser les interactions cellulaires entre cellules infectées et immunité innée (CD et macrophages). Elle permet également d'apporter des données anatomiques comparatives entre les souches virales d'une même famille (PR8 – WSN). Les perspectives d'application de la M2P semblent multiples et permettent d'envisager de nombreuses études ultérieures : co-infections virales, surinfections bactériennes ou fongiques post infection virale...

8. Discussion générale et perspectives

8.1. Discussion générale

Le virus de la grippe a été abondamment étudié au cours des dernières décennies et pourtant la mortalité reste stable autour de 10-15.000 décès par saison en France et la pandémie de SARS-Cov2 a montré l'importance de mieux connaître la physiopathologie des virus respiratoires. Il est tentant en pratique clinique devant un patient en insuffisance respiratoire aiguë oxygène-dépendant en lien avec une grippe maligne et après élimination d'une surinfection bactérienne ou fongique, d'envisager un traitement immunomodulateur. La modulation de l'inflammation et de la réaction immune post-infection semble être un axe thérapeutique intéressant, d'où l'importance de bien connaître ces mécanismes et leur intrication avec la physiologie et l'anatomie de l'organe infectée. Dans cette quête de connaissance, les techniques quantitatives (cytométrie en flux) ou fonctionnelles (transcriptomie, biochimie ...) ont été prépondérantes mais insuffisantes car elles délaissent l'organe en intégrant peu la composante anatomique, qui ne repose que sur l'analyse histologique. Cette dernière ayant de nombreuses limites exposées précédemment, il fallait assurément lui trouver une alternative, d'où le questionnement sur l'apport de la M2P dans l'exploration des conséquences pulmonaires après infection par *Influenzavirus* : apport sur tissu fixé ? La M2P a surtout été développée dans un but d'imagerie intravitale *in vivo*, dont les inconvénients, déjà exposés, imposent une réflexion sur l'utilisation de techniques alternatives d'où la question de la faisabilité et l'apport d'une technique *ex vivo*. Enfin, la pandémie nous ayant permis d'obtenir des poumons de hamsters infectés par le SARS-Cov2, nous avons pu étudier l'apport de la M2P dans la comparaison des conséquences pulmonaires après infection par différents virus respiratoires (*SARS-Cov2* et *Influenzavirus* ou 2 souches d'*Influenzavirus*).

Dans les études pré-cliniques traitant de la grippe, les données histologiques ne se résument le plus souvent qu'à un visuel global de l'infiltration cellulaire du poumon comparativement au poumon non infecté. Or, les approches quantitatives, biochimiques même transcriptomiques manquent cruellement de données anatomiques. La M2P permet cette approche localisatrice et s'intègre donc dans une approche holistique des conséquences

pulmonaires post-infection (lésions épithéliales bronchiques et bronchiolaires mais également le recrutement macrophagique sur poumon fixé).

L'étude en M2P de l'évolution des sites infectés montre un virus infectant initialement les cellules épithéliales bronchiques et bronchiolaires (J1) avant de diffuser vers l'épithélium alvéolaire à partir de J3. Ceci permet d'expliquer l'évolution et l'aggravation respiratoire dans un second temps vers l'insuffisance respiratoire aiguë.

L'observation des lésions épithéliales n'est pas anodine car elles traduisent la virulence du virus sur les structures infectées (épithélium bronchique et bronchiolaire) et apportent également une explication anatomique à la symptomatologie bronchitique (toux, sifflement, wheezing, exacerbation de bronchopathies sous-jacentes...) (16). Elle est assurément un des mécanismes expliquant la fréquence des surinfections bactériennes par la perte de la barrière mécanique de l'épithélium et du tapis mucociliaire. Cette description lésionnelle est assez rare en dehors de modèles ex vivo (culture en interface air liquide, culture cellulaire de cellules bronchiques primaires ...)(56). Nous avons également observé à J4 la présence de cellules F4/80+ (probablement des MDM) format un aspect de tapis cellulaire au niveau de la membrane basale de l'épithélium lésé : rôle d'« éboueur » des MDM phagocytant les cellules épithéliales apoptotiques ? sans pouvoir exclure la possibilité d'une fonction de protection de la membrane basale « mise à nu » afin de restaurer un substitut de barrière mécanique dans l'attente de la régénération de l'épithélium ? Les 2 hypothèses pourraient s'envisager comme le début du processus de réparation cellulaire et/ou un mécanisme de protection contre la surinfection bactérienne. Les questions découlant de cette observation mériteront d'être étudiées spécifiquement.

De plus, les observations d'interactions cellulaires statiques permises par les reconstructions en 3D possibles par l'acquisition d'images en profondeur du poumon sont des informations indisponibles en histologie conventionnelle.

Comme décrit dans la littérature, nous avons observé un recrutement quantitatif de macrophages (F4/80+) (55). Les macrophages résidents (F4/80+ et CD11c+) restent stables quantitativement (cytométrie en flux) au cours du temps post infection, par contre le recrutement est composé de cellules F4/80+ CD11c- (cytométrie en flux) correspondant donc probablement à la différenciation de monocytes circulants en macrophages migrant dans le

poumon au site infecté (macrophages dérivés des monocytes (MDM)). Nous pouvons donc conclure que l'afflux de cellules F4/80+ visibles en M2P correspondent à ces MDM. Toutefois, leur recrutement semble très rapide et trop précoce pour correspondre à la conséquence du chimiotactisme via CCL2 (MCP-1), d'autant plus que les dosages ne montrent une élévation de sa concentration dans le poumon qu'à partir de J2. Nous pouvons donc envisager que ces MDM proviennent de monocytes « sentinelles » circulant au niveau pulmonaire à l'état stable, décrit par Rodero et col (39), mais non différenciés (donc F4/80-), qui sous l'action du GM-CSF se différencient en MDM (F4/80+ CD11c-). Secondairement les monocytes suivant un gradient de chimiokines (MCP-1 (CCL2) et également MCP-5, MIG, MIP-1a ...) vont migrer dans le poumon et se différencier en MDM. Ce phénomène est illustré par nos observations en M2P dès J3 post-infection, avec l'observation d'une infiltration péri vasculaire de cellules F4/80+, qui traduisent la migration intra-pulmonaire, via la circulation sanguine de ces monocytes différenciés en MDM (données de cytométrie F4/80+ CD11c-). Ces MDM migreront ensuite dans l'ensemble du parenchyme pulmonaire (observation M2P de J4).

Les informations physiopathologiques apportées par la M2P surpassent donc bien l'apport de l'histologie conventionnelle. La M2P fait bien mieux que cela en apportant des données anatomiques évolutives additives et complémentaires des analyses quantitatives (cytométrie en flux ...).

La M2P nécessite toutefois quelques précautions d'usage notamment dans le choix des fluorochromes. Selon le modèle animal, l'autofluorescence des structures étudiées, les ajouts éventuels de marqueurs couplés à un fluorochrome exogène, il faut absolument prendre en compte les spectres d'absorption et d'émission des différents fluorochromes (84) pour éviter les erreurs d'interprétation. De plus, la M2P ne rend visible que les éléments fluorescents soit en autofluorescence, soit avec des fluorochromes endogènes ou exogènes, et n'observe donc que ce que l'on cherche. L'absence d'éléments visibles n'est pas synonyme d'absence d'élément, mais d'absence de visibilité de l'élément car non rendu fluorescent.

Même si j'espère avoir démontré que la M2P est utile sur poumon fixé. Sa caractéristique la plus reconnue est la possibilité d'imagerie intravitale. La méthode *in vivo* est la plus utilisée car la plus physiologique permettant l'analyse de toute les composantes anatomiques notamment vasculaires. Cependant, elle nécessite des compétences anesthésiques et chirurgicales sur le petit animal, une plateau technique adéquat, ainsi qu'un système de

blocage des mouvements respiratoires (collage, apnée, aspiration ...); mais elle n'explore qu'une seule zone du poumon (limitée à la fenêtre thoracique) et uniquement en sous pleurale (environ 100µm en profondeur) (79,89). D'autres techniques *ex vivo* ont donc été développées, notamment la méthode du « Live Lung Slice » (88). Cette technique est la plus souvent utilisée en culture après fragmentation de la tranche du lobe pulmonaire (92,117,118). En infectiologie pulmonaire, l'agent infectant était déposé dans le puit où est le fragment de tranche pulmonaire ne prenant donc pas en compte la réaction physiologique induite par la contamination puis l'infection. De plus, la méthodologie de préparation de la tranche du poumon prévoyait l'instillation d'agarose liquéfié en intra-trachéale pour solidifier l'organe afin de faciliter sa coupe au vibratome. Afin d'être le plus physiologique possible nous avons éliminé cette étape, ce qui n'a pas impacté la facilité de réalisation des coupes au vibratome. La méthode que nous avons utilisée nous a permis d'étudier l'infection à *Influenzavirus* dans les conditions naturelles jusqu'au moment de la mise à mort de l'animal et de la préparation de l'organe pour l'imagerie. La viabilité cellulaire a été conservée par le maintien de l'organe dans du milieu réchauffé (DMEM sans phénol) à 37°C durant toute la procédure de préparation et d'imagerie (dispositif recevant la tranche de poumon, milieu, tubulure, enceinte du microscope maintenu en température à 37°C (monitorage en continu)) et perfusion constante de milieu durant l'acquisition des images pour assurer le pH, l'hydratation et l'oxygénation. Nos résultats confirment ainsi la faisabilité et la pertinence de cette technique sans agarose pour l'imagerie *ex vivo* d'infection par *Influenzavirus*. Elle nous a permis d'analyser l'évolution de la mobilité et des interactions cellulaires en post-infection. Nous avons, par ce protocole, pu mesurer la mobilité cellulaire tant sur le plan de la distance parcourue que de la vitesse de déplacement. Pour se faire et compte tenu de l'échec du marquage par Ac anti F4/80 couplé au fluorochrome BV421, nous avons utilisé une analyse basée sur la morphologie des cellules comme publiée antérieurement (121,122) en séparant les cellules CD11c+ avec projections dendritiques multiples nommées DSC (cellules dendritiques) et les cellules arrondies CD11c+ ou CD11c low en microscopie nommées RSC (macrophages résidents et dérivés des monocytes). Si aucune différence n'est retrouvée tant en vitesse qu'en distance entre ces 2 types cellulaires à l'état basal (contrôle), les DSC se déplacent significativement plus et plus rapidement après infection qu'à l'état basal ainsi que le RSC. Après infection, la distance et la vitesse de déplacement significativement plus importantes des RSC comparativement aux DSC semblent valider la séparation de ces types

cellulaires sur leur différence morphologique. Elle apporte des données fonctionnelles de mobilité au recrutement cellulaire post-infection. La mobilité de ces cellules induites post infection engendre des interactions entre les cellules du système macrophagique (macrophages, CD, MDM) et les cellules infectées observables en M2P.

En compilant les données de cytométrie, des dosages cytokiniques, M2P sur poumon fixé et d'imagerie *ex vivo*, nous pouvons proposer le mécanisme suivant (figure 103):

-A l'état basal, les macrophages résidents et CD sont en veille immunologique quantitative et fonctionnelle (via la cytométrie, cytokines et M2P des souris « contrôle »).

-Après infection, durant une première phase précoce (J1, J2), les cellules épithéliales infectées sécrètent du GM-CSF (via dosage des cytokines) activant rapidement les macrophages résidents et la différenciation des monocytes sentinelles (39) en macrophages (MDM) (via la cytométrie en flux). Cette activation va entraîner une levée de la phase de veille immunologique se traduisant par la mobilité accrue des macrophages résidents, des MDM et dans une moindre importance les CD, ainsi qu'une accélération de leur vitesse de déplacement leur permettant de multiplier les interactions cellulaires (phagocytose, ...) (via la M2P *ex vivo*).

J2 peut possiblement être considérée comme une période de transition durant laquelle la production de cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF, IL-1a ...) amorcent une décroissance au profit des chimiokines (CCL2, CCL5, CCL12, CXCL9 ...) participant à une deuxième vague de recrutement macrophagique ; ceci explique possiblement la moindre distance parcourue des 1ers macrophages recrutés positionnés au site infecté.

S'en suit une deuxième phase à partir de J3, où par chimiotactisme via MCP-1 (58,99) (via dosage des cytokines), les monocytes circulants vont affluer par voie vasculaire (via la M2P), se différencier en MDM (via la cytométrie en flux) puis migrer et diffuser au niveau pulmonaire (via la M2P); cette activation est auto-entretenu par les macrophages eux-mêmes sécrétant les cytokines pro-inflammatoires (MCP-5, MIP-1a, MIG, ...) (via dosage des cytokines) nécessaires à leur stimulation leur conférant une mobilité accrue (via la M2P *ex vivo*). La migration au site infecté des MDM recrutés explique probablement la réascension de la distance parcourue par les RSC en conservant une vitesse de déplacement élevée.

Le tableau ci-dessous (figure 102) résume l'importance et l'évolution de la concentration pulmonaire des principales cytokines pro-inflammatoires et régulatrices après infection par *Influenzavirus*. L'évolution des cytokines permet une meilleure compréhension des recrutements cellulaires quantitatifs (cytométrie en flux) et observés en M2P. Les cytokines produites à la phase très précoce (J1) (GM-CSF et IL-1a) vont assurer l'activation des CD et macrophages en veille immunologique. Dans un second temps (J3), MCP-1, MCP-5, MIG, MIP-1a et RANTES, produites notamment par les macrophages activés, induiront la poursuite du recrutement cellulaire, en particulier, la différenciation des MDM. Enfin, à la phase plus tardive (J4), débute la production des cytokines activatrices de l'immunité innée (lymphocytes T et B) et régulatrices induisant l'inhibition des macrophages et CD (IL-13, IL-4 ...).

	J1	J2	J3	J4
GM-CSF	+++	-	-	-
IL-1a	+++	++	+	-
MCP-1	+	+	+++	+++
MCP-5	+	+	++	+++
MIG	-	-	++	+++
MIP-1a	-	-	-	+++
RANTES	++	++	++	++
IL-13	-	-	-	++
IL-4	-	-	-	++

Figure 102. Tableau récapitulatif des cytokines **pro-inflammatoires** et **régulatrices** produites au cours du temps après infection par *Influenzavirus* sous forme semi quantitative (-, +, ++, +++) selon leur concentration et les différences statistiquement significatives (- si aucune différence avec le contrôle).

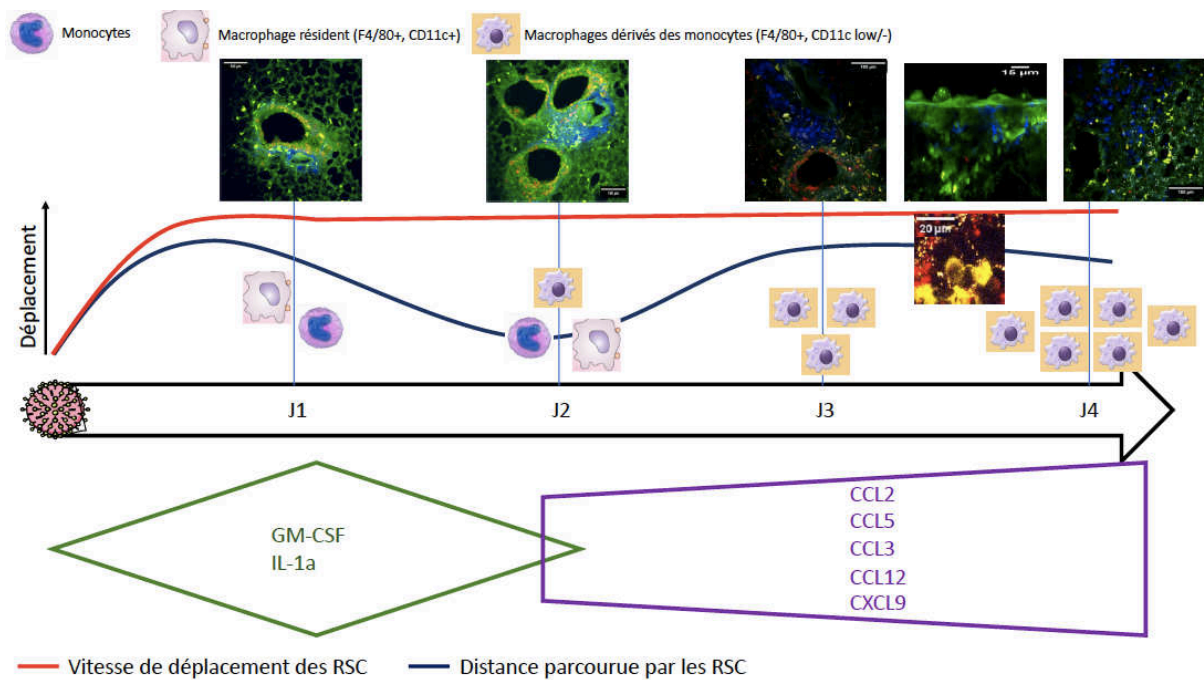


Figure 103. Schéma de synthèse des conséquences pulmonaires après infection par *Influenzavirus* d'un modèle murin en compilant les données de cytométrie en flux, dosages des cytokines, M2P sur poumon fixé et *ex vivo*.

Cette synthèse me semble être une excellente démonstration de l'importante nécessité de la M2P dans l'exploration des conséquences pulmonaires après infection par *Influenzavirus* apportant des données anatomiques et fonctionnelles complétant les données quantitatives et biochimiques indispensables mais insuffisantes pour une compréhension exhaustive des mécanismes post-infection.

La méthode « Live Lung Slice » a pour but d'accéder à l'organe en profondeur, mais nécessite une section du dit organe. En effet, la problématique de l'exploration en profondeur des organes pleins entiers (poumons, rein, cerveau ...) se pose régulièrement. Plusieurs possibilités apparaissent depuis quelques années en terme d'imagerie : scanner, tomographie par émission de positons ... permettant une approche iconographique ne remplaçant pas l'analyse directe *in vivo*, d'où l'essor de techniques de transparençation de l'organe pour optimiser la pénétration dans l'organe de la lumière permettant ainsi de l'imager en entier (microscopie à feuilles de lumière ...). De notre côté, nous avons également tenté plusieurs techniques (CUBIC, eCI, CLARITY ...) (128–130) avec succès sur la transparençation (figure 104)

mais perte de la visibilité des marquages, limitant alors la pertinence de son utilisation. De plus, le projet était basé sur la M2P. Or, les techniques de transparençation sont peu compatibles avec la M2P car la préservation de la transparence de l'organe nécessite de réaliser les images dans le solvant utilisé pour la technique de transparençation, ce qui altérerait l'objectif du microscope, qui nécessite d'être immergé dans un milieu aqueux (sérum physiologique, eau ...) uniquement et ce qui est incompatible avec les techniques de dessiccation de l'organe par l'alcool (eCI), car les milieux aqueux dénatureraient la transparence de l'organe. Ces techniques intéressantes mériteront d'être explorées à l'avenir. Mais nous nous sommes recentrés sur le projet initial.



Figure 104. Poumon rendu transparent après technique eCI.

8.2. Perspectives

La morbi mortalité liée à la grippe évolue est stable depuis de nombreuses années et même si le terrain du patient (âge, comorbidités respiratoires, cardiaques, rénales, ...) infecté est une explication à cette mortalité (14,16), l'impact des lésions pulmonaires et du recrutement cellulaire suite à l'orage cytokinique en sont une autre(69). Médicalement, à l'instant T où survient l'infection grippale, nous ne pouvons agir ni sur l'âge, ni sur les comorbidités, il faut donc optimiser la prise en charge de ces patients. Sur les formes sévères, la réaction immune innée et l'inflammation au sens large semblent être des cibles thérapeutiques très intéressantes. L'utilisation des AINS étant légèrement contre-intuitif en pratique clinique d'infectiologie respiratoire (21,23), leur mécanismes et effets sur l'évolution de l'infection par

Influenzavirus pourraient être étudiés en pré clinique par la M2P en évaluant le timing du recrutement (poumon fixé), l'impact sur la mobilité et les interactions cellulaires (*ex vivo*). Ceci permettrait de valider en pré clinique leur utilisation et les modalités de prise (préventif, curatif avec prise précoce ou plus tardive ...), idem pour les stratégies vaccinales en vérifiant dans l'organe cible, sur les mêmes paramètres, l'efficacité vaccinale.

Depuis plusieurs années, la biologie moléculaire s'est imposée pour le diagnostic microbiologique des infections respiratoires notamment virales (131). La sensibilité de ces techniques, en permettant la détection synchrone de nombreux virus, a multiplié la découverte de virus et surtout les cas de co-infections virales sans que leur pertinence clinique soit toujours avérée. En effet, s'il y a peu de doute sur la pathogénicité d'*Influenzavirus*, du virus respiratoire syncytiale (VRS) ..., c'est plus délicat pour un *Rhinovirus*, *Polyomavirus KI/WU*.... Cette incertitude est un réel problème en médecine car seules 50-60% des infections respiratoires basses sont documentées malgré la multiplication des prélèvements, y compris semi-invasif (endoscopie bronchique avec LBA) (132), la problématique étant : quelle responsabilité clinique a(ont) ce(s) virus dans l'infection du patient ?

Par l'infection d'animaux différents, nous avons vu l'intérêt de la M2P pour la comparaison des conséquences pulmonaires entre 2 souches virales de même famille ou de familles différentes. La perspective serait d'intégrer la M2P via des fluorescences spécifiques pour étudier en préclinique les conséquences pulmonaires de co-infections virales et des surinfections bactériennes/fongiques post infection virale.

De plus, nous avons mis en évidence les lésions épithéliales induites à la phase précoce de l'infection grippale. En diminuant l'inoculum pour diminuer l'impact clinique de l'infection et donc conserver nos souris sur une durée plus longue (dans la tolérance éthique des points-limites), la M2P permettrait l'étude de la « réparation » tissulaire mais aussi d'éventuelles conséquences fibrosantes en intégrant l'étude du dépôt de matrice extracellulaire via l'analyse de la seconde harmonique.

9. Conclusion

La morbi mortalité des pandémies grippales du 20^{ème} siècle, celle de 2009 (H1N1_{pdm2009}) et l'actualité (SARS-CoV2) nous confirme l'importance de mieux connaître la physiopathologie des virus respiratoires, dont la grippe peut être considérée comme un excellent chef de file. Toutes les technologies, qui optimiseraient ces connaissances, doivent donc être évaluées. La M2P semble avoir démontré son intérêt dans cette quête de savoir en apportant des données anatomiques ciblées sur certains types cellulaires et plus informative que l'histologie conventionnelle sur poumon fixé, en complétant les données quantitatives et en explicitant les interactions cellulaires (reconstruction 3D), qui ont surtout été investiguées par l'imagerie intravitale.

Pour obtenir des données les plus physiologique, l'imagerie intravitale idéale doit être réalisée *in vivo*, toutefois plusieurs limites de cette dernière nous ont fait mettre au point une méthode *ex vivo* sur sections de poumon permettant de conserver la viabilité cellulaire et de mettre en évidence les interactions entre macrophages, cellules dendritiques et cellules infectée dès J1 et leur évolution dans le temps post-infection. En étudiant plus spécifiquement les cellules dendritiques (CD11c+) et les macrophages (F4/80+), nous avons confirmé en M2P la place centrale de ces cellules dans l'évolution au cours du temps de la réaction immunitaire innée post-infection grippale par la dynamique de leur recrutement au site infectée, les interactions cellulaires et les modifications de leur mobilité.

La M2P a donc toute sa place dans l'exploration des conséquences pulmonaires après infection par *Influenzavirus* (lésionnelles, recrutement immunitaire, interaction cellulaires, mobilité cellulaire) que ce soit sur poumon fixé en lieu et place de l'histologie conventionnelle ou en intravitale par technique *ex vivo*.

10. Références

1. Peteranderl C, Herold S, Schmoldt C. Human Influenza Virus Infections. *Semin Respir Crit Care Med.* 3 août 2016;37(04):487-500.
2. Newton AH, Cardani A, Braciale TJ. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin Immunopathol.* juill 2016;38(4):471-82.
3. Kilbourne ED. Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerg Infect Dis.* janv 2006;12(1):9-14.
4. Fineberg HV. Pandemic Preparedness and Response — Lessons from the H1N1 Influenza of 2009. *N Engl J Med.* 3 avr 2014;370(14):1335-42.
5. Iyer K, Pola S. Probable Bioweapon: Influenza Type A Virus – A Short Case Report. 2014;5(1):5.
6. Beigel JH, Manosuthi W, Beeler J, Bao Y, Hoppers M, Ruxrungtham K, et al. Effect of Oral Oseltamivir on Virological Outcomes in Low-risk Adults With Influenza: A Randomized Clinical Trial. *Clin Infect Dis.* 23 mai 2020;70(11):2317-24.
7. Lytras T, Mouratidou E, Andreopoulou A, Bonovas S, Tsiodras S. Effect of Early Oseltamivir Treatment on Mortality in Critically Ill Patients With Different Types of Influenza: A Multiseason Cohort Study. *Clin Infect Dis.* 13 nov 2019;69(11):1896-902.
8. Li L, Liu J, Qin K. Comparison of double-dose vs standard-dose oseltamivir in the treatment of influenza: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Pharm Ther.* oct 2020;45(5):918-26.
9. Hartshorn KL. Innate Immunity and Influenza A Virus Pathogenesis: Lessons for COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol.* 22 oct 2020;10:563850.
10. Guo XJ, Thomas PG. New fronts emerge in the influenza cytokine storm. 2018;17.
11. Pleschka S. Overview of Influenza Viruses. In: Richt JA, Webby RJ, éditeurs. *Swine Influenza* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012 [cité 29 nov 2021]. p. 1-20. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 370). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/82_2012_272
12. Paul Glezen W, Schmier JK, Kuehn CM, Ryan KJ, Oxford J. The Burden of Influenza B: A Structured Literature Review. *Am J Public Health.* mars 2013;103(3):e43-51.
13. Schrauwen EJA, Graaf M, Herfst S, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Determinants of virulence of influenza A virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2014;33(4):479-90.
14. Ghebrehewet S, MacPherson P, Ho A. Influenza. *BMJ.* 7 déc 2016;i6258.
15. van de Sandt CE, Kreijtz JHCM, Rimmelzwaan GF. Evasion of Influenza A Viruses from Innate and Adaptive Immune Responses. *Viruses.* 3 sept 2012;4(9):1438-76.
16. Paules C, Subbarao K. Influenza. *The Lancet.* août 2017;390(10095):697-708.
17. Okoli GN, Otete HE, Beck CR, Nguyen-Van-Tam JS. Use of Neuraminidase Inhibitors for Rapid Containment of Influenza: A Systematic Review and Meta-Analysis of Individual and Household Transmission Studies. Schmidt RL, éditeur. *PLoS ONE.* 9 déc 2014;9(12):e113633.
18. Jones M, Jefferson T, Doshi P, Del Mar C, Heneghan C, Onakpoya I. Commentary on Cochrane review of neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Clin Microbiol Infect.* mars 2015;21(3):217-21.
19. Jefferson T, Jones M, Doshi P, Spencer EA, Onakpoya I, Heneghan CJ. Oseltamivir for influenza in adults and children: systematic review of clinical study reports and summary of regulatory comments. *BMJ.* 9 avr 2014;348(apr09 2):g2545-g2545.

20. Jefferson T, Jones MA, Doshi P, Del Mar CB, Hama R, Thompson MJ, et al. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in adults and children. Cochrane Acute Respiratory Infections Group, éditeur. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 10 avr 2014 [cité 1 déc 2021]; Disponible sur: <https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD008965.pub4>
21. Lim VW, Tudor Car L, Leo Y, Chen MI, Young B. Passive immune therapy and other immunomodulatory agents for the treatment of severe influenza: Systematic review and meta-analysis. *Influenza Other Respir Viruses*. mars 2020;14(2):226-36.
22. Rodrigo C, Leonardi-Bee J, Nguyen-Van-Tam JS, Lim WS. Effect of Corticosteroid Therapy on Influenza-Related Mortality: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Infect Dis*. 15 juill 2015;212(2):183-94.
23. Hung IFN, To KKW, Chan JFW, Cheng VCC, Liu KSH, Tam A, et al. Efficacy of Clarithromycin-Naproxen-Oseltamivir Combination in the Treatment of Patients Hospitalized for Influenza A(H3N2) Infection. *Chest*. mai 2017;151(5):1069-80.
24. Saunders-Hastings P, Crispo JAG, Sikora L, Krewski D. Effectiveness of personal protective measures in reducing pandemic influenza transmission: A systematic review and meta-analysis. *Epidemics*. sept 2017;20:1-20.
25. Liang M, Gao L, Cheng C, Zhou Q, Uy JP, Heiner K, et al. Efficacy of face mask in preventing respiratory virus transmission: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis*. juill 2020;36:101751.
26. Adam D, Perotin J-M, Lebargy F, Birembaut P, Deslée G, Coraux C. Régénération de l'épithélium des voies aériennes. *Rev Mal Respir*. avr 2014;31(4):300-11.
27. Weibel ER. How Does Lung Structure Affect Gas Exchange? *Chest*. avr 1983;83(4):657-65.
28. Whittsett JA. Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Ann Am Thorac Soc*. nov 2018;15(Supplement_3):S143-8.
29. Kojima T, Go M, Takano K, Kurose M, Ohkuni T, Koizumi J, et al. Regulation of Tight Junctions in Upper Airway Epithelium. *BioMed Res Int*. 2013;2013:1-11.
30. Riches DWH, Martin TR. Overview of Innate Lung Immunity and Inflammation. In: Alper S, Janssen WJ, éditeurs. *Lung Innate Immunity and Inflammation* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2018 [cité 13 déc 2021]. p. 17-30. (Methods in Molecular Biology; vol. 1809). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8570-8_2
31. Kumar V. Pulmonary Innate Immune Response Determines the Outcome of Inflammation During Pneumonia and Sepsis-Associated Acute Lung Injury. *Front Immunol*. 4 août 2020;11:1722.
32. Hartl D, Tirouvanziam R, Laval J, Greene CM, Habel D, Sharma L, et al. Innate Immunity of the Lung: From Basic Mechanisms to Translational Medicine. *J Innate Immun*. 2018;10(5-6):487-501.
33. Gibbins SL, Thomas SM, Atif SM, McCubbrey AL, Desch AN, Danhorn T, et al. Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am J Respir Cell Mol Biol*. juill 2017;57(1):66-76.
34. Joshi N, Walter JM, Misharin AV. Alveolar Macrophages. *Cell Immunol*. août 2018;330:86-90.
35. Divangahi M. Alveolar macrophages and type I IFN in airway homeostasis and immunity. :8.
36. Plantinga M, de Haar C, Nierkens S. Dendritic Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., éditeurs. *The Impact of Food Bioactives on Health* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cité 13 déc 2021]. p. 181-96. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16104-4_17
37. Langlois RA, Legge KL. Respiratory dendritic cells: mediators of tolerance and

- immunity. *Immunol Res.* 29 sept 2007;39(1-3):128-45.
38. Immunology taught by lung dendritic cells. *Swiss Med Wkly.* 2009;9.
 39. Rodero MP, Poupel L, Loyher P-L, Hamon P, Licata F, Pessel C, et al. Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *eLife.* 13 juill 2015;4:e07847.
 40. Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, et al. Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity.* sept 2013;39(3):599-610.
 41. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GRS, Perlman H. Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Dendritic Cell Subsets in the Mouse Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* oct 2013;49(4):503-10.
 42. Tripp RA, Tompkins SM. Animal Models for Evaluation of Influenza Vaccines. :16.
 43. Thangavel RR, Bouvier NM. Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology. *J Immunol Methods.* août 2014;410:60-79.
 44. Margine I, Krammer F. Animal Models for Influenza Viruses: Implications for Universal Vaccine Development. *Pathogens.* 21 oct 2014;3(4):845-74.
 45. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. Longo DL, éditeur. *N Engl J Med.* 3 déc 2020;383(23):2255-73.
 46. Yu WCL, Chan RWY, Wang J, Travanty EA, Nicholls JM, Peiris JSM, et al. Viral Replication and Innate Host Responses in Primary Human Alveolar Epithelial Cells and Alveolar Macrophages Infected with Influenza H5N1 and H1N1 Viruses. *J Virol.* 15 juill 2011;85(14):6844-55.
 47. Reeth KV. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet Microbiol.* 2000;8.
 48. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol.* 1 mai 2008;180(9):5771-7.
 49. Du Y, Yang F, Wang Q, Xu N, Xie Y, Chen S, et al. Influenza a virus antagonizes type I and type II interferon responses via SOCS1-dependent ubiquitination and degradation of JAK1. *Virol J.* déc 2020;17(1):74.
 50. Perrone LA, Plowden JK, Garcia-Sastre A, Katz JM. H5N1 and 1918 Pandemic Influenza Virus Infection Results in Early and Excessive Infiltration of Macrophages and Neutrophils in the Lungs of Mice. *PLoS Pathog.* 2008;4(8):11.
 51. Duan M. The contributions of lung macrophage and monocyte heterogeneity to influenza pathogenesis. 2016;49.
 52. Kim HM, Kang YM, Ku KB, Park EH, Yum J, Kim JC, et al. The severe pathogenicity of alveolar macrophage-depleted ferrets infected with 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *Virology.* sept 2013;444(1-2):394-403.
 53. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew A-A, et al. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. *Am J Pathol.* juill 2011;179(1):199-210.
 54. Gwyer Findlay E, Hussell T. Macrophage-Mediated Inflammation and Disease: A Focus on the Lung. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:1-6.
 55. Janssen WJ, Barthel L, Muldrow A, Oberley-Deegan RE, Kearns MT, Jakubzick C, et al. Fas Determines Differential Fates of Resident and Recruited Macrophages during Resolution of Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* sept 2011;184(5):547-60.
 56. Herold S, von Wulffen W, Steinmueller M, Pleschka S, Kuziel WA, Mack M, et al. Alveolar Epithelial Cells Direct Monocyte Transepithelial Migration upon Influenza Virus Infection: Impact of Chemokines and Adhesion Molecules. *J Immunol.* 1 août 2006;177(3):1817-24.
 57. Kaufmann A. Defense against Influenza A Virus Infection: Essential Role of the Chemokine System. *Immunobiology.* 2001;204(5):603-13.
 58. Lin KL, Suzuki Y, Nakano H, Ramsburg E, Gunn MD. CCR2⁺ Monocyte-Derived

- Dendritic Cells and Exudate Macrophages Produce Influenza-Induced Pulmonary Immune Pathology and Mortality. *J Immunol.* 15 févr 2008;180(4):2562-72.
59. Aegerter H, Kulikauskaite J, Crotta S, Patel H, Kelly G, Hessel EM, et al. Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection. *Nat Immunol.* févr 2020;21(2):145-57.
 60. Peiró T, Patel DF, Akthar S, Gregory LG, Pyle CJ, Harker JA, et al. Neutrophils drive alveolar macrophage IL-1 β release during respiratory viral infection. :11.
 61. Camp JV, Bagci U, Chu Y-K, Squier B, Fraig M, Uriarte SM, et al. Lower Respiratory Tract Infection of the Ferret by 2009 H1N1 Pandemic Influenza A Virus Triggers Biphasic, Systemic, and Local Recruitment of Neutrophils. Lyles DS, éditeur. *J Virol.* 1 sept 2015;89(17):8733-48.
 62. Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Yamamoto K, Nakajima N, Sato Y, et al. Contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection: R. Sugamata et al. *Microbiol Immunol.* mars 2012;56(3):171-82.
 63. Tate MD, Deng Y-M, Jones JE, Brooks AG, Reading PC. Neutrophils Ameliorate Lung Injury and the Development of Severe Disease during Influenza Infection. :11.
 64. Kulkarni U, Zemans RL, Smith CA, Wood SC, Deng JC, Goldstein DR. Excessive neutrophil levels in the lung underlie the age-associated increase in influenza mortality. *Mucosal Immunol.* mars 2019;12(2):545-54.
 65. Tate MD, Brooks AG, Reading PC, Mintern JD. Neutrophils sustain effective CD8+ T-cell responses in the respiratory tract following influenza infection. *Immunol Cell Biol.* :9.
 66. Waithman J, Mintern JD. Dendritic cells and influenza A virus infection. *Virulence.* 15 nov 2012;3(7):603-8.
 67. Guilliams M, Lambrecht BN, Hammad H. Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal Immunol.* mai 2013;6(3):464-73.
 68. Unkel B, Hoegner K, Clausen BE, Lewe-Schlosser P, Bodner J, Gattenloehner S, et al. Alveolar epithelial cells orchestrate DC function in murine viral pneumonia. *J Clin Invest.* 1 oct 2012;122(10):3652-64.
 69. Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GRS. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *Eur Respir J.* mai 2015;45(5):1463-78.
 70. Buttignol M. Airway and parenchyma immune cells in influenza A(H1N1)pdm09 viral and non-viral diffuse alveolar damage. 2017;10.
 71. Luk J, Gross P, Thompson WW. Observations on Mortality during the 1918 Influenza Pandemic. *Clin Infect Dis.* 15 oct 2001;33(8):1375-8.
 72. Memoli MJ, Athota R, Reed S, Czajkowski L, Bristol T, Proudfoot K, et al. The Natural History of Influenza Infection in the Severely Immunocompromised vs Nonimmunocompromised Hosts. *Clin Infect Dis.* 15 janv 2014;58(2):214-24.
 73. Horby P, Nguyen NY, Dunstan SJ, Kenneth Baillie J. An updated systematic review of the role of host genetics in susceptibility to influenza. *Influenza Other Respir Viruses.* sept 2013;7:37-41.
 74. Xuan Y, Wang LN, Li W, Zi HR, Guo Y, Yan WJ, et al. *IFITM3* rs12252 T>C polymorphism is associated with the risk of severe influenza: a meta-analysis. *Epidemiol Infect.* oct 2015;143(14):2975-84.
 75. Lu J, Duan X, Zhao W, Wang J, Wang H, Zhou K. Aged Mice are More Resistant to Influenza Virus Infection due to Reduced Inflammation and Lung Pathology. *Aging Dis.* 2018;9(3):16.
 76. Otte A. Differential Host Determinants Contribute to the Pathogenesis of 2009 Pandemic H1N1 and Human H5N1 Influenza A Viruses in Experimental Mouse Models.

2011;179(1):10.

77. Liu Q, Zhou Y, Yang Z. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol.* janv 2016;13(1):3-10.
78. Sakai S, Kawamata H, Mantani N, Kogure T, Shimada Y, Terasawa K, et al. Therapeutic Effect of Anti-Macrophage Inflammatory Protein 2 Antibody on Influenza Virus-Induced Pneumonia in Mice. *J Virol.* mars 2000;74(5):2472-6.
79. Lefran E. Lung Imaging in Animal Models. :27.
80. Dufour P, Dufour S, Castonguay A, McCarthy N, De Koninck Y. Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle : avantages et enjeux ou Un photon c'est bien... mais deux c'est mieux ! *médecine/sciences.* oct 2006;22(10):837-44.
81. So PTC, Dong CY, Masters BR, Berland KM. Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy. 2000;42.
82. Provenzano PP, Eliceiri KW, Keely PJ. Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to monitor metastasis and the tumor microenvironment. *Clin Exp Metastasis.* avr 2009;26(4):357-70.
83. Campagnola PJ, Loew LM. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nat Biotechnol.* nov 2003;21(11):1356-60.
84. Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci.* 15 déc 2007;120(24):4247-60.
85. Chen X, Nadiarynk O, Plotnikov S, Campagnola PJ. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. 2015;43.
86. Laviron M, Combadière C, Boissonnas A. Tracking Monocytes and Macrophages in Tumors With Live Imaging. *Front Immunol.* 31 mai 2019;10:1201.
87. Chakarov S, Lim HY, Tan L, Lim SY, See P, Lum J, et al. Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science.* 15 mars 2019;363(6432):eaau0964.
88. Fiore D, Tournier J-N. Intravital microscopy of the lung: minimizing invasiveness. *J Biophotonics.* 2016;11.
89. Brzoska T, Kaminski TW, Bennewitz MF, Sundd P. Live Imaging of the Lung. *Curr Protoc Cytom.* :26.
90. Ueki H, Wang I-H, Zhao D, Gunzer M, Kawaoka Y. Multicolor two-photon imaging of in vivo cellular pathophysiology upon influenza virus infection using the two-photon IMPRESS. *Nat Protoc.* mars 2020;15(3):1041-65.
91. Nelson K, Bobba C, Eren E, Spata T, Tadres M, Hayes, D, et al. Method of Isolated Ex Vivo Lung Perfusion in a Rat Model: Lessons Learned from Developing a Rat EVLP Program. *J Vis Exp.* 25 févr 2015;(96):52309.
92. Lyons-Cohen MR, Thomas SY, Cook DN, Nakano H. Precision-cut Mouse Lung Slices to Visualize Live Pulmonary Dendritic Cells. *J Vis Exp.* 2017;9.
93. Germain RN, Robey EA, Cahalan MD, Germain RN. A Decade of Imaging Cellular Motility and Interaction Dynamics in the Immune System. 2012;16.
94. König TT, Goedeke J, Muensterer OJ. Multiphoton microscopy in surgical oncology- a systematic review and guide for clinical translatability. *Surg Oncol.* déc 2019;31:119-31.
95. Frédéric R, François L, Julien B, Guilherme D de M, Nicolas TJ, Emmanuelle B-D. Two-photon microscopy analysis reveals different pulmonary damage after infection by influenza or SARS-CoV-2. *Respir Med Res.* nov 2021;80:100862.
96. Peñate Medina T, Kolb JP, Hüttmann G, Huber R, Peñate Medina O, Ha L, et al. Imaging Inflammation – From Whole Body Imaging to Cellular Resolution. *Front Immunol.* 24 juin 2021;12:692222.
97. Kim YM, Jeong S, Choe YH, Hyun Y-M. Two-photon intravital imaging of leukocyte

- migration during inflammation in the respiratory system. *Acute Crit Care*. 31 mai 2019;34(2):101-7.
98. St. Croix CM, Leelavanichkul K, Watkins SC. Intravital fluorescence microscopy in pulmonary research. *Adv Drug Deliv Rev*. oct 2006;58(7):834-40.
 99. Gelman AE, Okazaki M, Sugimoto S, Li W, Kornfeld CG, Lai J, et al. CCR2 Regulates Monocyte Recruitment As Well As CD4⁺ T_H1 Allorecognition After Lung Transplantation. *Am J Transplant*. mai 2010;10(5):1189-99.
 100. Fiore D, Deman P, Trescos Y, Mayol J-F, Mathieu J, Vial J-C, et al. Two-Photon Intravital Imaging of Lungs during Anthrax Infection Reveals Long-Lasting Macrophage-Dendritic Cell Contacts. *Infect Immun*. 2014;82(2):9.
 101. Fiore D, Douady J, Cleret A, Garraud K, Mathieu J, Quesnel A, et al. Multimodal 4D imaging of cell-pathogen interactions in the lungs provides new insights into pulmonary infections. :8.
 102. Ueki H, Wang I-H, Fukuyama S, Katsura H, Neumann G, Kawaoka Y. In vivo imaging of the pathophysiological changes and neutrophil dynamics in influenza virus-infected mouse lungs. :8.
 103. Pena A-M, Fabre A, Débarre D, Marchal-Somme J, Crestani B, Martin J-L, et al. Three-dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy. *Microsc Res Tech*. févr 2007;70(2):162-70.
 104. Pittet MJ, Garris CS, Arlauckas SP, Weissleder R. Recording the wild lives of immune cells. *Sci Immunol*. 2018;13.
 105. Bergmann T, Maeder U, Fiebich M, Dickob M, Nattkemper TW, Anselmetti D. Categorization of two-photon microscopy images of human cartilage into states of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1 août 2013;21(8):1074-82.
 106. Safdarian N, Liu Z, Wang TD, Wang ET. Identification of nasal eosinophils using two-photon excited fluorescence. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1 mai 2011;106(5):394-400.
 107. Zhou L, El-Deiry WS. Multispectral Fluorescence Imaging. *J Nucl Med*. 1 oct 2009;50(10):1563.
 108. Morrison LE, Lefever MR, Behman LJ, Leibold T, Roberts EA, Horchner UB, et al. Brightfield multiplex immunohistochemistry with multispectral imaging. *Lab Invest*. 1 août 2020;100(8):1124-36.
 109. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*. mars 2018;391(10127):1285-300.
 110. Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, Wardemann H, Eisenreich T, Dustin ML, et al. Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol*. déc 2004;5(12):1243-50.
 111. Fukuyama S, Katsura H, Zhao D, Ozawa M, Ando T, Shoemaker JE, et al. Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for in vivo studies. *Nat Commun*. 5 mai 2015;6(1):6600.
 112. Hou X, Gao Y, Yang S, Wang C, Ma Z, Xia X. Role of macrophage migration inhibitory factor in influenza H5N1 virus pneumonia. *Acta Virol*. déc 2009;53(4):225-31.
 113. Katsura H, Fukuyama S, Watanabe S, Ozawa M, Neumann G, Kawaoka Y. Amino acid changes in PB2 and HA affect the growth of a recombinant influenza virus expressing a fluorescent reporter protein. *Sci Rep*. avr 2016;6(1):19933.
 114. Lyons-Cohen MR, Nakano H, Thomas SY, Cook DN. Imaging Precision-Cut Lung Slices to Visualize Leukocyte Localization and Trafficking. :10.
 115. Fiore D, Tournier J-N. Dynamic multiphoton six-color imaging of the mouse lung: new insights into the infection. :8.
 116. Viana F, O'Kane CM, Schroeder GN. Precision-cut lung slices: A powerful ex vivo model to investigate respiratory infectious diseases. *Mol Microbiol*. 31 oct 2021;mmi.14817.

117. de Vries R, Rennick L, Duprex W, de Swart R. Paramyxovirus Infections in Ex Vivo Lung Slice Cultures of Different Host Species. *Methods Protoc.* 27 mars 2018;1(2):12.
118. Nguyen DT, de Vries RD, Ludlow M, van den Hoogen BG, Lemon K, van Amerongen G, et al. Paramyxovirus infections in ex vivo lung slice cultures of different host species. *J Virol Methods.* oct 2013;193(1):159-65.
119. Delgado-Ortega M, Melo S, Punyadarsaniya D, Ramé C, Olivier M, Soubieux D, et al. Innate immune response to a H3N2 subtype swine influenza virus in newborn porcine trachea cells, alveolar macrophages, and precision-cut lung slices. *Vet Res.* déc 2014;45(1):42.
120. Henjakovic M, Sewald K, Switalla S, Kaiser D, Müller M, Veres TZ, et al. Ex vivo testing of immune responses in precision-cut lung slices. *Toxicol Appl Pharmacol.* août 2008;231(1):68-76.
121. Fiore D. Shape-Based Tracking Allows Functional Discrimination of Two Immune Cell Subsets Expressing the Same Fluorescent Tag in Mouse Lung Explant. *PLoS ONE.* 2012;7(6):9.
122. Veres TZ. Spatiotemporal and Functional Behavior of Airway Dendritic Cells Visualized by Two-Photon Microscopy. 2011;179(2):7.
123. Chan RWY, Leung CYH, Nicholls JM, Peiris JSM, Chan MCW. Proinflammatory Cytokine Response and Viral Replication in Mouse Bone Marrow Derived Macrophages Infected with Influenza H1N1 and H5N1 Viruses. *Chamaillard M, éditeur. PLoS ONE.* 30 nov 2012;7(11):e51057.
124. Nagaoka Y, Nosaka N, Yamada M, Yashiro M, Washio Y, Baba K, et al. Local and Systemic Immune Responses to Influenza A Virus Infection in Pneumonia and Encephalitis Mouse Models. *Dis Markers.* 2017;2017:1-7.
125. Hofer CC, Woods PS, Davis IC. Infection of mice with influenza A/WSN/33 (H1N1) virus alters alveolar type II cell phenotype. :11.
126. Quan F-S, Huang C, Compans RW, Kang S-M. Virus-Like Particle Vaccine Induces Protective Immunity against Homologous and Heterologous Strains of Influenza Virus. *J Virol.* avr 2007;81(7):3514-24.
127. García-Sastre A, Durbin RK, Zheng H, Palese P, Gertner R, Levy DE, et al. The Role of Interferon in Influenza Virus Tissue Tropism. *J Virol.* 1 nov 1998;72(11):8550-8.
128. Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying Tissue Clearing. *Cell.* juill 2015;162(2):246-57.
129. Togami K, Kitayama A, Daisho T, Wang R, Tada H, Chono S. Tissue-Clearing Techniques Enable Three-Dimensional Visualization of Aerosolized Model Compound and Lung Structure at the Alveolar Scale. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(1):24-8.
130. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Yukinaga H, Kuno A, Ueda HR. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat Protoc.* nov 2015;10(11):1709-27.
131. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* oct 2018;24(10):1055-63.
132. Rañó A, Agustí C, Jimenez P, Angrill J, Benito N, Danés C, et al. Pulmonary infiltrates in non-HIV immunocompromised patients: a diagnostic approach using non-invasive and bronchoscopic procedures. :9.