



**HAL**  
open science

# Caractérisation et modulation de la réponse immunitaire innée au cours de l'infection par le Virus Respiratoire Syncytial en période néonatale

Carole Drajac

## ► To cite this version:

Carole Drajac. Caractérisation et modulation de la réponse immunitaire innée au cours de l'infection par le Virus Respiratoire Syncytial en période néonatale. Immunologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLA014 . tel-02122664

**HAL Id: tel-02122664**

**<https://theses.hal.science/tel-02122664>**

Submitted on 7 May 2019

**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.

# Caractérisation et modulation de la Réponse immunitaire innée Au cours de l'infection par le Virus Respiratoire Syncytial En période néonatale

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
Préparée à AgroParisTech

École doctorale n°581 : agriculture, alimentation, biologie,  
environnement et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Immunologie

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 4 juillet 2018, par

**Carole Drajac**

## Composition du Jury :

Pr Karim Benihoud Professeur, Université Paris-Sud (UMR8203)	Président
Dr Sonia Lacroix-Lamandé Chargée de Recherche, INRA (UMR1282)	Rapporteur
Dr Mustapha Si-Tahar Directeur de Recherche, INSERM (U1100)	Rapporteur
Dr Pierre-Olivier Vidalain Directeur de Recherche, CNRS (UMR8601)	Examineur
Dr Sabine Riffault Directrice de Recherche, INRA (UR0892)	Directrice de thèse
Dr Delphyne Descamps Chargée de Recherche, INRA (UR0892)	Co-encadrante de thèse
Dr Loredana Saveanu Chargée de Recherche, INSERM (U1149)	Co-encadrante de thèse



## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	1
REMERCIEMENTS .....	5
LISTES.....	7
Abréviations .....	7
Figures.....	9
Tableaux.....	11
A.INTRODUCTION.....	13
1. La bronchiolite, pathologie associée à l'infection par le VRS chez le jeune.....	13
1.1. L'épidémiologie de la bronchiolite du nourrisson .....	13
1.2. La physiopathologie de l'infection .....	15
1.3. Les facteurs favorisant la survenue d'une bronchiolite au décours d'une primo-infection par le VRS.....	16
1.4. Le diagnostic et l'évolution de la maladie .....	18
1.5. La prise en charge thérapeutique de la bronchiolite en période néonatale.....	19
2. Le VRS et son cycle infectieux .....	22
2.1. La description des protéines virales et du cycle de réplication.....	22
2.2. Les récepteurs cellulaires impliqués dans l'entrée virale.....	25
3. La pathogénèse de l'infection par le VRS .....	26
3.1. Un recrutement cellulaire abondant .....	27
3.2. Une polarisation lymphocytaire T CD4 <sup>+</sup> de type Th2.....	29
3.3. Un rôle discuté des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> dans l'immunopathologie .....	30
3.4. Une réponse anticorps non protectrice.....	32
3.5. Le modèle murin dans l'étude de la pathogénèse .....	33
4. L'initiation de la réponse immunitaire anti-VRS .....	35
4.1. La localisation des récepteurs de l'immunité innée impliqués dans la détection du VRS et l'initiation de la réponse antivirale.....	36
4.1.1. Les TLRs localisés à la membrane plasmique des cellules .....	37
4.1.2. Les TLRs localisés à la membrane endosomale .....	37
4.1.3. La localisation cytosolique des RLRs et des NLRs .....	38
4.1.4. Le rôle des interférons dans la réponse antivirale.....	39
4.2. La régulation de l'activation des TLRs endosomaux et de RIG-I .....	41
4.3. IRAP, un acteur majeur de la régulation du trafic intracellulaire des TLRs.....	42
4.3.1. La découverte de IRAP.....	42

4.3.2.	La place de IRAP dans le système immunitaire .....	44
4.3.3.	Le rôle de la protéine IRAP dans le contrôle de l'activation des TLRs endosomaux .....	45
5.	L'environnement pulmonaire en période néonatale : un facteur de sensibilité à l'infection par le VRS .....	47
5.1.	Le développement de l'arbre respiratoire .....	47
5.2.	La maturation immunitaire du poumon néonatal : mise place d'un environnement immunitaire de type 2 et sensibilité à l'infection par le VRS.....	49
5.2.1.	Le macrophage alvéolaire, première cellule de l'immunité innée à rencontrer les pathogènes de l'environnement extérieur .....	50
5.2.2.	Le rôle des cellules lymphoïdes innées dans la sensibilité à l'infection par le VRS .....	51
5.2.3.	Les cellules dendritiques, un lien essentiel entre immunité innée et adaptative .....	53
5.2.4.	Le développement de l'immunité adaptative .....	54
5.2.5.	Le développement de l'environnement pulmonaire est en lien avec l'acquisition d'un microbiote respiratoire.....	57
a.	<i>L'acquisition et la diversification progressive du microbiote pulmonaire commensal.</i> 57	
b.	<i>L'influence du microbiote respiratoire sur la composition et la maturation fonctionnelle des cellules pulmonaires</i> .....	58
6.	Les stratégies d'immunomodulation potentielles pour combattre l'infection par le VRS au cours de la période néonatale .....	59
6.1.	Contrecarrer le défaut de production d'IFN-I dans les poumons .....	62
6.1.1.	L'augmentation du nombre et/ou de l'activation des populations cellulaires productrices d'IFN-I .....	62
6.1.2.	Le boost de la signalisation IFN-I via des agonistes des TLRs et des RLRs.....	62
6.2.	La modulation de l'activation des cellules respiratoires favorisant un environnement pulmonaire de type 2 .....	63
6.2.1.	Le blocage des cytokines impliquées dans l'immunité de type 2 .....	63
6.2.2.	Le blocage des voies de signalisation impliquées dans l'immunité de type 2.....	64
6.2.3.	L'activation des MAs néonataux .....	64
6.3.	La maturation du système immunitaire pulmonaire par la modulation du microbiote respiratoire.....	65
B.	OBJECTIFS DE LA THESE .....	66
C.	RESULTATS EXPERIMENTAUX .....	67
1.	Rôle de IRAP dans le contrôle de la réponse immunitaire innée à l'infection par le VRS .....	67
1.1.	Introduction.....	67
1.2.	Article : Control of IFN-I responses by the aminopeptidase IRAP in neonatal alveolar macrophages upon RSV infection.....	68
1.3.	Résultats supplémentaires non publiés .....	99

1.3.1.	Le rôle de la protéine IRAP dans la régulation de la réponse innée des cellules épithéliales pulmonaires infectées par le VRS.....	99
1.3.2.	La caractérisation du compartiment des endosomes IRAP <sup>+</sup> dans les MAs.....	101
1.3.3.	L'autophagie comme mécanisme de régulation de la réponse IFN-I par la protéine IRAP au cours de l'infection par le VRS dans les MAs en période néonatale .....	102
1.4.	Conclusion et discussion.....	107
2.	Modulation de la réponse immunitaire à l'infection VRS par des bactéries primocolonisatrices des poumons au cours de la période néonatale .....	112
2.1.	Introduction.....	112
2.2.	Matériel et méthode .....	113
2.2.1.	Animaux utilisés et préparation des explants de poumons .....	113
2.2.2.	Préparation des bactéries .....	114
2.2.3.	Stimulation par les ligands de TLRs, pré-exposition bactérienne et infection des explants de poumons.....	114
	<i>a. Stimulation par les ligands de TLRs.....</i>	114
	<i>b. Pré-exposition bactérienne et infection des explants pulmonaires .....</i>	115
	<i>c. Détermination de la cytotoxicité tissulaire .....</i>	115
	<i>d. Détermination des concentrations protéiques dans les broyats d'explants de poumons ..</i>	116
2.2.4.	Infections in vivo et administration des bactéries.....	116
	<i>a. Analyse des cellules des LBA chez les souriceaux et les adultes.....</i>	117
	<i>b. Analyses par cytométrie en flux des populations cellulaires des poumons chez les souriceaux .....</i>	117
	<i>c. Dosage des anticorps sériques chez les souris adultes .....</i>	118
2.2.5.	Quantification de la réplication du VRS-luciférase .....	119
	<i>a. Dans les broyats d'explants, de poumons et de fosses nasales .....</i>	119
	<i>b. Quantification de la réplication du VRS-luciférase in vivo.....</i>	119
2.2.6.	Dosages cytokiniques .....	119
2.2.7.	Western blot.....	120
2.2.8.	Tests statistiques .....	121
2.3.	Résultats.....	121
2.3.1.	Influence du microbiote pulmonaire sur la réponse immunitaire innée locale au cours de stimulations des TLRs .....	121
2.3.2.	Influence du microbiote sur la réponse pulmonaire à l'infection par le VRS.....	123
2.3.3.	Influence du microbiote pulmonaire sur l'expression des récepteurs de l'immunité innée à l'homéostasie .....	125
2.3.4.	Microbiote pulmonaire néonatal et réponse immunitaire innée au cours de stimulations des TLRs.....	126

2.3.5. Orientation de la réponse immunitaire à l'infection par le VRS par l'administration de souches bactériennes primo-colonisatrices des poumons au cours de la période néonatale.....	127
2.4. Conclusion et discussion.....	133
D.DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	134
1. La réponse immunitaire innée au VRS en période néonatale .....	135
1.1. Le MA, une des cellules immunitaires innées responsables du défaut d'IFN-I au cours de l'infection par le VRS .....	135
1.2. L'autophagie dans les MAs au cours de la période néonatale .....	136
1.3. Les MAs et le microbiote commensal des poumons.....	137
1.4. Existe-t-il un lien entre les bactéries commensales des poumons et l'autophagie ?.....	137
2. Modulation de l'immunité innée néonatale pour lutter contre l'infection par le VRS .....	138
E. BIBLIOGRAPHIE .....	141
ANNEXE .....	165
Congrès et formations suivis pendant le doctorat & Revue publiée.....	165

## REMERCIEMENTS

Je remercie grandement mes encadrantes de thèse *Sabine Riffault* et *Delphyne Descamps* pour m'avoir fait confiance et formée avec attention au cours de ces quatre années de recherche passées au sein de la VIM.

Je suis très reconnaissante envers l'ensemble de mon comité de thèse pour leur soutien scientifique tout au long de ce doctorat : *Loredana Saveanu*, *Marie-Anne Rameix-Welti*, *Michel Chignard* et *Richard Lo-Man*.

Je remercie également les membres de mon jury de soutenance de thèse, *Karim Benihoud*, *Sonia Lacroix-Lamandé*, *Mustapha Si-Tahar*, *Pierre-Olivier Vidalain* et *Loredana Saveanu* pour me faire l'honneur d'évaluer ce travail de doctorat.

*Irina Vassileva* et *Alexandre Péry* de l'Ecole Doctorale ABIES, un grand merci pour votre discrète mais perceptible implication dans le bon déroulement de cette thèse, vos sourires et votre générosité.

Un très grand merci à mes collègues de travail. *Daphné*, tu m'as beaucoup appris tant sur le plan technique qu'intellectuel, tu as été un soutien exceptionnel au cours de ces années de recherche. *Isabelle* et *Nicolas*, merci pour les discussions scientifiques et vos petits mots d'encouragement. *Tiphany*, *Elise*, *Céline*, *Vincent*, *Pauline*, *Pierre-Louis*, *Charlotte*, *Cindy*, *Edwige*, vous avez été de merveilleux collègues ne changez pas.

Un grand merci à l'ensemble des membres de la VIM et plus particulièrement aux équipes BMP, VMP et Influenza pour les échanges scientifiques et votre sympathie à mon égard. *Marie* et *Sarah* votre entrain et votre gentillesse m'ont comblée au cours des quelques expériences murines réalisées en votre compagnie. *Léa* et *Tiphany*, je suis heureuse d'avoir été votre collègue de bureau pendant ces quelques années, nos discussions scientifiques et votre bonne humeur vont me manquer. *Joëlle* et *Linda*, je suis bien contente d'avoir fait votre connaissance, j'espère que nous garderons le contact pour encore quelques années. *Elise* et *Aline*, j'ai hâte d'aller porter un toast à notre avenir et de festoyer en votre compagnie.

Merci *Loredana* pour ton accueil toujours si agréable à Bichat, le temps que tu as consacré à m'expliquer le fonctionnement de IRAP, les belles images de microscopie que tu as réalisées et tes précieux conseils scientifiques. *Samira*, *Cézère* et *Marcelle* ce fut un plaisir de vous rencontrer et de discuter de vos projets.

*Muriel, Elliot et Marie-Louise* merci pour vos sourires, votre dynamisme et votre motivation à toute épreuve qui ont rendu notre collaboration très agréable.

Encore un grand merci à mes collègues et maintenant formidables amies présentes sur tous les fronts avec qui j'ai partagé des kilomètres de course, des piscines de boue, des courbatures intenses après l'escalade et des bières exceptionnelles, *Emilie, Céline, Laury et Louison*, je suis heureuse d'avoir partagé ces moments avec vous.

*Gwen et Marion*, mes plus anciennes amies et pas des moindres, toujours un plaisir cette schnakafacht, vivement l'année prochaine. *Jérémy et Antoine* on ne se voit pas souvent mais j'espère que nos discussions et votre amitié continueront encore longtemps. Mes amies pharmaciennes *Floriane, Marie D, Marie J, Marie Bu et Eza* qui me suivent et me soutiennent depuis mes débuts universitaires et avec qui je passe toujours d'excellentes vacances.

J'ai beaucoup de reconnaissance et d'affection pour *mon beau macrophage* à la démarche chaloupée qui fait l'objet d'une troisième thèse dont la durée est je l'espère illimitée.

Pour finir, je remercie l'ensemble de ma famille et surtout *mes parents et ma grand-mère* pour leur soutien thèse après thèse.

## LISTES

### Abréviations

AAMs : *Alternatively activated macrophages*

AMM : Autorisation de mise sur le marché

CAMs : *Classically activated macrophages*

CDc : Cellule dendritique conventionnelle

CDp : Cellule dendritique plasmacytoïde

CDmo : Cellule dendritique dérivée de monocyte

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPAs : Cellules présentatrices d'antigène

FHOD : *Formin-homology-domain-containing protein*

FIVRS : Vaccin VRS inactivé au formaldéhyde

GAGs : Glycosaminoglycanes

GM-CSF : *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

GSV : *GLUT4 storage vesicles*

GWAS : *Gene wide association studies*

HAS : Haute autorité de santé

IFITM3 : *Interferon-induced transmembrane protein 3*

IFN : *Interferon*

IFNAR : *Interferon- $\alpha/\beta$  receptor*

IFNGR : *IFN- $\gamma$  receptor*

IFNLR : *IFN- $\lambda$  receptor*

IL-4R $\alpha$  : *Interleukin-4 receptor  $\alpha$  chain*

ILC : *Innate lymphoid cells*

IRAP : *Insulin responsive aminopeptidase*

IRF-3 : *Interferon regulatory factor 3*

ISGs : *IFN-stimulated genes*

ISG15 : *IFN-stimulated gene 15*

ISGF3 : *IFN-stimulated gene factor 3*

LPS : Lipopolysaccharide bactérien

LTfh : Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires folliculaires

LTh : Lymphocytes T auxiliaires ou *helper*

MAs : Macrophages alvéolaires

MAM : *Mitochondrial-associated ER membrane*

MAVS : *Mitochondrial antiviral-signaling protein*

MDA5 : *Melanoma differentiation associated gene 5*

MyD88 : *Myeloid differentiation primary response 88 protein*

Mx : *Myxovirus resistance gene*

NETs : *Neutrophil extracellular traps*

NF-κB : *Nuclear factor-κ B*

NK : *Natural killer*

NLRs : *Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing proteins*

NOD2 : *Nucleotide-binding oligomerization domain 2*

NS1/NS2 : *Nonstructural protein 1/2*

OAS : *2',5'-oligoadenylate synthase*

OMS : Organisme Mondiale pour la Santé

PAMPs : *Pathogen-associated molecular patterns*

PKR : *Protein kinase R*

PRRs : *Pattern Recognition Receptors*

RIG-I : *Retinoic acid inducible gene I*

RLRs : *Retinoic acid-inducible protein I (RIG-I)-like receptors*

RNP : *Ribonucleoprotein complex*

STAT6 : *Signal transducer and activator of transcription 6*

TLR : *Toll-like receptor*

TRIF : *TIR domain-containing adapter inducing interferon β*

TSLP : *Thymic stromal lymphopoietin*

VRS : Virus respiratoire syncytial

## Figures

Figure 1. Proportion de cas de bronchiolite parmi les consultations aux urgences en métropole chez les enfants de moins de 2 ans, 2015-2018. Source : Institut de Veille Sanitaire (InVS)

Figure 2. Représentation schématique du Virus Respiratoire Syncytial

Figure 3. Visualisation des filaments viraux en microscopie électronique.

Figure 4. Formation d'un syncytia par fusion des membranes cellulaires après infection de cellules épithéliales humaines par le Virus Respiratoire Syncytial VRS-mCherry

Figure 5. Cycle de réplication du VRS

Figure 6. L'âge de la primo-infection par le VRS est un déterminant majeur de sévérité

Figure 7. Voies de signalisation activées lors de la détection du VRS par les PRRs membranaires et cytosoliques

Figure 8. Représentation schématique de la protéine IRAP

Figure 9. Modèle d'activation du TLR9 proposé par l'équipe de Loredana Saveanu.

Figure 10. Développement pulmonaire au cours du temps

Figure 11. Colonisation des poumons par les cellules immunitaires pendant la période post-natale

Figure 12. Réponses immunitaires innées des cellules résidentes pulmonaires à l'infection par le VRS au cours de la période néonatale

Figure 13 : Le rôle de IRAP dans la réponse de cellules épithéliales pulmonaires primaires infectées par le VRS.

Figure 14. La protéine IRAP co-localise en partie avec EEA1 dans les MAs de souris WT à l'état basal.

Figure 15. L'expression de beclin est réduite dans les MAs néonataux infectés par le VRS.

Figure 16. Le blocage de l'autophagie inhibe la réponse IFN-I et la production d'IL-6 dans les MAs déficients pour l'expression de IRAP infectés par le VRS.

Figure 17. Les réponses cytokiniques au cours de stimulations des TLRs sont exacerbées en l'absence de microbiote pulmonaire.

Figure 18. Les réponses cytokiniques au cours de l'exposition au VRS sont exacerbées en l'absence de microbiote pulmonaire.

Figure 19. Le TLR4 est plus abondant dans les poumons dépourvu de microbiote commensal.

Figure 20. La réponse inflammatoire pulmonaire néonatale est similaire ou réduite au cours de stimulations TLRs ou de l'infection par le VRS par comparaison à l'adulte.

Figure 21. La pré-exposition des explants de poumons de souris adultes à CNCM 4969 et CNCM 4970 réduit la réplication du VRS.

Figure 22. L'administration répétée de CNCM 4969 ou de CNCM 4970 au cours de la période néonatale n'influence pas significativement la réplication du VRS-luciférase dans les poumons ni l'orientation de la réponse immunitaire innée à l'infection in vivo.

Figure 23. L'administration répétée de CNCM 4969 ou de CNCM 4970 au cours de la période néonatale n'influence pas la réponse à l'infection par le VRS à l'âge adulte.

Figure 24. Proposition d'un mécanisme d'inhibition de la réponse IFN-I des MAs à l'infection par le VRS au cours de la période néonatale.

## **Tableaux**

Tableau 1. Facteurs favorisant la survenue d'une bronchiolite au décours d'une primo-infection par le Virus Respiratoire Syncytial.

Tableau 2. Stratégie de prise en charge de la première bronchiolite chez le nourrisson et mesures préventives recommandées.

Tableau 3. Mécanismes d'action antivirale identifiés de PKR, OAS, IFITM3, ISG15 et Mx.

Tableau 4. Stratégies de modulation de l'immunité innée néonatale à potentiel anti-VRS



## A. INTRODUCTION

### 1. La bronchiolite, pathologie associée à l'infection par le VRS chez le jeune

L'infection par le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) est problématique aux âges extrêmes de la vie et particulièrement chez les enfants en bas âge. Sur la base de l'incidence des infections sévères à VRS et des taux de mortalités estimés dans les pays à faible et moyen revenus, l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) insiste sur l'importance de développer une stratégie vaccinale à destination de la population pédiatrique [1]. Selon les statistiques publiées par l'OMS, les infections des voies respiratoires inférieures sont la deuxième cause de décès prématurés dans le monde entre 2000 et 2013 [1]. Les infections par le VRS représenteraient 3 à 9 % des cas de mort précoce chez les enfants de moins de cinq ans soit environ 55 000 à 199 000 décès en 2005 [2,3]. Environ 45 % des cas d'hospitalisation pour infection sévère à VRS surviendraient chez des enfants de moins de six mois [3]. De plus, il a été montré que les bronchiolites sévères chez le jeune enfant augmentent le risque d'asthme chronique tout au long de la vie (pour revue [4]). Les mécanismes immunopathologiques et virologiques mis en œuvre lors de l'infection par le VRS ne sont pas encore complètement élucidés. Ainsi, les recherches pour un vaccin efficace reposent sur une meilleure compréhension de la pathogénèse.

#### 1.1. L'épidémiologie de la bronchiolite du nourrisson

Le VRS a tout d'abord été isolé en 1956 chez le chimpanzé [5]. L'équipe de Chanock l'a ensuite identifié pour la première fois en 1957 chez des enfants présentant une bronchiolite [6,7].

Avant l'âge de deux ans, on considère que 95 % des enfants ont été infectés par le VRS et que 30 % déclareront une bronchiolite, soit environ 460 000 enfants par an en France [8,9]. Les hospitalisations représentent en moyenne 5 % des cas de bronchiolites et sont plus fréquentes entre six semaines et six mois, avec un pic d'incidence entre un et deux mois [10,11]. Une étude épidémiologique française à partir de données de réseaux hospitaliers principalement d'Ile-de-France, conclue que le nombre d'enfants atteints de bronchiolite augmente régulièrement depuis 1992 [12].

En Europe, les infections évoluent sous forme d'épidémies hivernales annuelles. Les cas initiaux apparaissent durant les mois d'octobre ou de novembre. L'épidémie présente son acmé en décembre ou janvier, pendant environ quatre semaines, et s'étend sur une durée

moyenne de trois à cinq mois [13] (figure 1). Deux sérotypes, les VRS A et VRS B, co-circulent durant les épidémies mais l'un des deux sérotypes est parfois dominant [14]. Après un premier contact avec le VRS, les réinfections restent courantes tout au long de la vie [15]. Les enfants et les adultes sont infectés tous les trois à dix ans, mais la plupart du temps, la maladie est bénigne (limitée aux voies aériennes supérieures) ou asymptomatique, mis à part si le patient est immunodéprimé [16–18].

Dans les pays à hauts revenus, la mortalité des enfants de moins de deux ans hospitalisés suite à l'infection par le VRS des voies respiratoires basses, est inférieure à 0,1 %. En France, Che *et al.* (2012) rapportent sur un ensemble de 26 518 enfants de moins de un an hospitalisés en 2009 pour une bronchiolite, une mortalité de 0,08 % [19]. Ce taux est inférieur à celui d'une autre étude française (2,9 %) ou encore d'études internationales menées en Espagne et en Israël (respectivement 3,6 % et 4,8 %) entre 1994 et 2006 [20–22]. Toutefois, ces études ont été essentiellement réalisées chez des enfants à risque d'infections sévères. *A contrario*, la mortalité dans les pays en voie de développement est beaucoup plus élevée. Bien qu'il soit difficile d'obtenir des chiffres exacts, un exemple extrême est le taux de mortalité de 7 % qui a été rapporté par Cherian *et al* (1990) dans les années 1990 en Inde [23]. Récemment Shi *et al* (2017) rapportent que 99 % des cas de décès liés à l'infection par le VRS en 2005 chez les enfants de moins de cinq ans surviennent dans des pays faiblement développés [3]. La dernière et très grande étude rétrospective réalisée sur cette même population avec des cas identifiés entre 1995 et 2005 (cohorte « RSV GOLD ») n'en rapporte que 33 %. Les auteurs soulignent que les décès sont globalement dus à une limitation d'accès à des soins de qualité comme l'accès aux soins intensifs et à la ventilation mécanique [24].

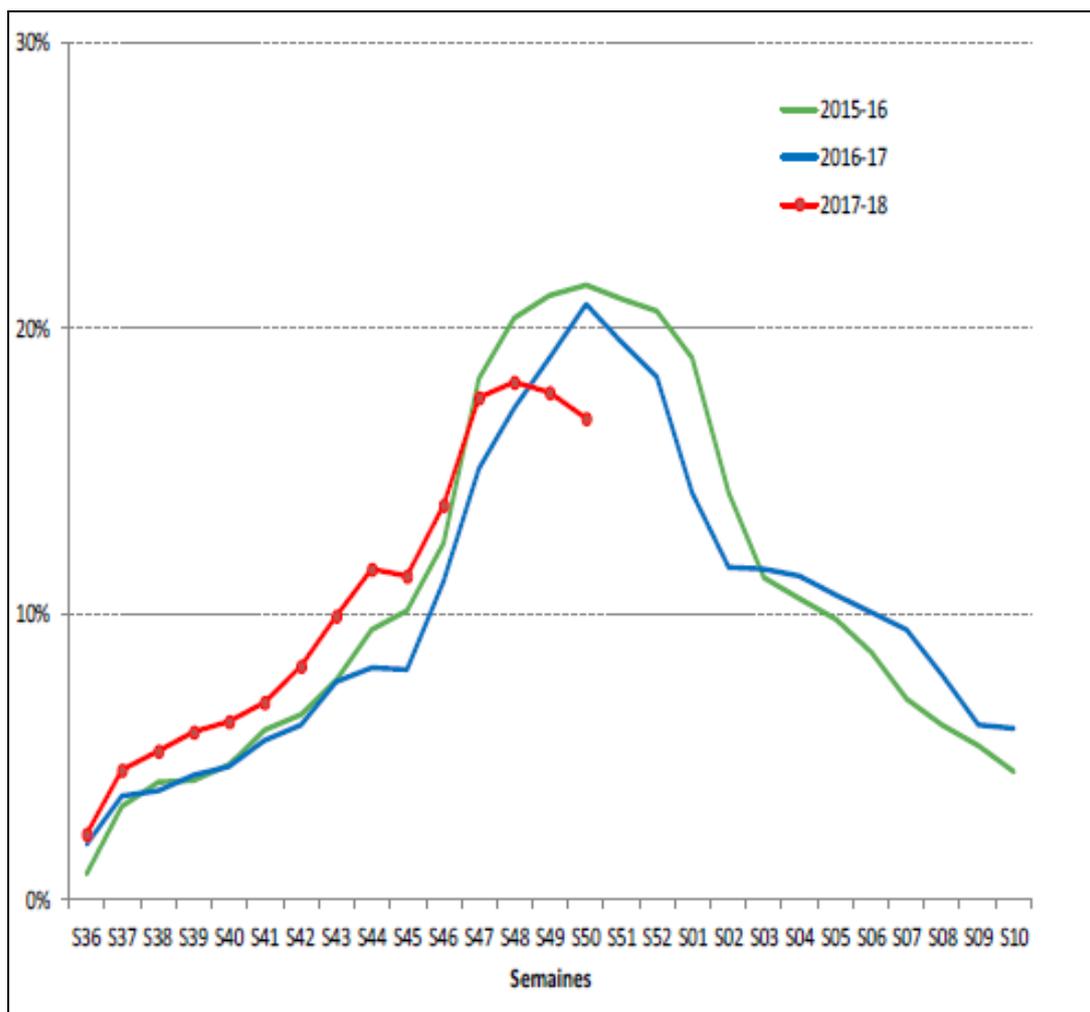


Figure 1. Proportion de cas de bronchiolite parmi les consultations aux urgences en métropole chez les enfants de moins de 2 ans, 2015-2018. Source : Institut de Veille Sanitaire (InVS)

## 1.2. La physiopathologie de l'infection

Le VRS se transmet le plus souvent par voie aérienne à cause de sécrétions contaminées, ou indirectement par les mains ou le matériel souillé. Le virus survit 30 minutes sur la peau et de six à sept heures sur les objets ou le linge. La période d'incubation est de quatre à cinq jours. Les muqueuses nasales et conjonctivales représentent la porte d'entrée habituelle de l'infection. Pendant la période d'incubation, le virus se multiplie tout d'abord dans les cellules épithéliales du nasopharynx, pour ensuite descendre au niveau du tractus respiratoire inférieur et atteindre les poumons, probablement par diffusion de cellules à cellules. Lorsque le virus détruit les cellules épithéliales respiratoires, l'organisme répond par une infiltration de cellules immunitaires (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes, macrophages...), et par la production excessive de mucus. L'obstruction des

voies aériennes est alors provoquée par l'inflammation pariétale, avec formation d'un œdème, et par la constitution d'un bouchon muqueux (accumulation de mucus et de débris cellulaires). Ces évènements sont responsables de l'obstruction des bronchioles, particulièrement petites chez l'enfant, et donc de la survenue d'une bronchiolite dont la sévérité varie d'un patient à l'autre. Le VRS présente un fort tropisme pour les cellules épithéliales respiratoires mais peut aussi infecter les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques pulmonaires [25–27]. Le virus est éliminé en moyenne au bout de sept jours, mais l'infection peut se prolonger pendant plusieurs mois en cas d'immunodépression (co-infection par le VIH par exemple) [28–30]. La guérison est le plus souvent spontanée mais nécessite cependant un délai de trois à quatre semaines pour qu'il y ait rétablissement de l'activité mucociliaire. Durant cette période, l'épithélium respiratoire est particulièrement sensible aux infections. Les co-infections bactériennes à *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ou *Moraxella catarrhalis* avoisinent les 40 % au cours des bronchiolites aiguës sévères [31–33]. D'après Avadhanula *et al* (2006), le VRS serait responsable de l'augmentation de l'expression de certains récepteurs d'adhérence cellulaire comme ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*) et CEACAM-1 (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*), ce qui prédisposerait à des infections bactériennes secondaires [34].

### **1.3. Les facteurs favorisant la survenue d'une bronchiolite au décours d'une primo-infection par le VRS**

Les mécanismes impliqués dans la sévérité de la bronchiolite à VRS ne sont pas encore entièrement compris. La symptomatologie et l'évolution de la maladie sont variables d'un individu à l'autre. Les facteurs concourant à l'apparition de la bronchiolite sont discutés, et notamment ceux participant à la survenue d'une forme sévère de la maladie. Ces facteurs sont résumés dans le Tableau 1.

Les cardiopathies congénitales, la dysplasie broncho-pulmonaire, une naissance avant terme font partie des critères retenus pour l'administration très sélective du traitement préventif des infections sévères à VRS, palivizumab Synagis (voir partie 1.5) [9]. Le faible poids à la naissance (< 2,5 kg), avoir une fratrie, fumer pendant la grossesse, l'existence d'antécédent familiaux d'asthme ou d'atopie, l'absence d'allaitement maternel, la vie en communauté (plus de sept personnes vivant ensemble) et l'existence d'un syndrome de Down (trisomie 21) sont aussi des facteurs de risque importants [35,36]. L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine est aussi un facteur de risque à prendre en compte tout

comme un tabagisme passif, la fréquentation des garderies, la pollution de l'air intérieur, la malnutrition et le niveau socioéducatif de la famille [36,37].

Néanmoins, la plupart des enfants devant être hospitalisés à cause d'une bronchiolite ne présentent pas les facteurs de risque précédemment cités et étaient globalement en bonne santé avant leur infection. De nombreux travaux montrent que le polymorphisme génétique doit être pris en compte dans l'évaluation du risque de survenue de formes sévères de la maladie. Ainsi, Thomsen *et al* (2009) ont estimé en analysant l'occurrence des bronchiolites causées par le VRS chez des jumeaux que la contribution génétique dans la sévérité de la maladie est comprise entre 16 à 20 % [38]. Un nombre grandissant d'études portant sur l'association entre des gènes de l'immunité et des cas de bronchiolites sévères, souligne l'importance de la réponse immunitaire innée au cours de l'infection par le VRS. Le lien entre un polymorphisme au niveau de gène de l'immunité innée et le degré de sévérité de l'infection est établi par des méthodes statistiques de type GWAS (*gene wide association studies*). Ainsi, Janssen *et al* (2007) ont mis en évidence un lien entre une mutation de IFNA5 qui code pour un sous-type d'interféron (IFN) de type I (IFN-I) et la survenue de bronchiolites [39]. Alvarez *et al* (2017) ont quant à eux montré l'existence de polymorphismes mononucléotidiques dans des gènes codant des médiateurs de l'inflammation et des récepteurs Toll (TLRs, *toll-like receptors*) qui sont essentiels pour l'induction de la réponse immunitaire innée lors de l'infection par le VRS. Des mutations au niveau des gènes codant CCL5/RANTES, à l'origine de l'attraction de cellules immunitaires innées au niveau du site infectieux, et des TLR2 et TLR4 sont associées à la survenue de la bronchiolite et à un accroissement de la sévérité de la maladie [40]. D'après Caballero *et al* (2015), certains facteurs environnementaux tel que le cadre de vie de l'enfant influence la survenue de la bronchiolite en association avec un terrain génétique favorable. Dans ce travail, les auteurs ont montré que deux polymorphismes mononucléotidiques (Asp299Gly et Thr399Ile) codant des substitutions dans l'ectodomaine du TLR4, à l'origine d'une altération de la fixation du ligand, sont impliqués dans la survenue de la bronchiolite du nourrisson s'ils sont associés à une exposition réduite au lipopolysaccharide bactérien (LPS) [41]. Cette étude suppose que l'expression du TLR4 est régulée par l'exposition au LPS durant l'enfance et que, selon le niveau d'exposition et le patrimoine génétique, cela génère un terrain favorable à la survenue d'infections respiratoires graves. L'ensemble de ces études valide l'hypothèse d'un impact de l'immunité innée sur la gravité des bronchiolites du nouveau-né. Cependant, les liens fonctionnels entre le polymorphisme génétique de TLRs, associés à des facteurs de risques environnementaux et l'infection par le VRS ne sont pas élucidés.

Tableau 1. Facteurs favorisant la survenue d'une bronchiolite au décours d'une primo-infection par le Virus Respiratoire Syncytial. VIH, Virus de l'Immunodéficience Humaine. Adapté de [35–37,40,41] et d'après les données de [9].

<b>Facteurs individuels et familiaux</b>	<b>Prématurité</b> Naissance inférieure à 36 semaines d'aménorrhée
	<b>Prédispositions génétiques</b> Polymorphisme dans des gènes codant pour des protéines de l'immunité innée : IFNA5, TLR4...
	<b>Maladies pulmonaires chroniques</b> Dysplasie broncho-pulmonaire et fibrose kystique
	<b>Cardiopathies congénitales</b>
	<b>Immunodépression</b> Chimiothérapie, transplantation, infection par le VIH, déficits immunitaires congénitaux et acquis, syndrome de Down
	<b>Malnutrition</b>
	<b>Conditions socio-économiques de la famille défavorables</b>
<b>Facteurs environnementaux</b>	<b>Fréquence d'exposition au virus</b> Vie en collectivité, mode de garde et fratrie
	<b>Exposition à des toxiques</b> Tabagisme passif et pollution atmosphérique

#### 1.4. Le diagnostic et l'évolution de la maladie

Le diagnostic de la bronchiolite à VRS est avant tout clinique. L'infection commence en général par une atteinte des voies respiratoires supérieures et se limite le plus souvent à une rhino-pharyngite peu fébrile (écoulement nasal et toux). Elle est le plus souvent isolée, mais dans 30 % des cas, lorsque l'infection s'étend aux voies aériennes inférieures, des signes pulmonaires et extra-pulmonaires apparaissent. Parmi les signes les plus évidents, sont constatés des difficultés respiratoires avec une augmentation de la fréquence respiratoire et des sifflements à l'expiration. On parlera de bronchiolite aigue lors d'un premier épisode de détresse respiratoire fébrile avec sifflements survenant chez un enfant âgé de moins de deux ans (d'après les données de [42]).

Une fois sur cinq, les sifflements persistent au-delà des deux à trois semaines habituelles (syndrome du bébé siffleur) sans pour autant être gênants pour le nourrisson. Chez

certaines enfants, les épisodes de bronchiolite se répètent durant les deux premières années. Ces rechutes concerneraient 23 à 60 % des enfants hospitalisés. A partir du troisième épisode obstructif, on peut parler de crise d'asthme et non plus de bronchiolite, et il est alors d'usage d'utiliser le terme d'« asthme du nourrisson ». L'évolution de l'asthme du nourrisson vers celui du grand enfant concerne seulement 20 à 25 % des patients. L'existence d'un terrain atopique est le principal facteur de risque d'une telle évolution [9,42].

### **1.5. La prise en charge thérapeutique de la bronchiolite en période néonatale**

L'analyse des différentes pratiques cliniques de prise en charge de la première bronchiolite laisse apparaître de grandes variations d'un pays à l'autre, mais également au sein d'un même pays et entre les praticiens (pour revues [43–45] et d'après les données de [9]). Le traitement médicamenteux de la première bronchiolite est rarement efficace (d'après les données de [9]). Aucun médicament n'a d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) dans cette indication, et pourtant, à titre d'exemple, la corticothérapie était largement employée dans les années 1990 [44]. Lors de la conférence consensus (2000) de la Haute Autorité de Santé (HAS), plusieurs recommandations ont été émises [9]. La prise en charge repose essentiellement sur des mesures thérapeutiques générales, réalisées en ambulatoire, et adaptées aux mécanismes physiopathologiques de la maladie. Les moyens de prévention de la maladie ont été également explicités (d'après les données de [9]). La stratégie de prise en charge de la première bronchiolite en France est résumée dans le Tableau 2.

Tableau 2. Stratégie de prise en charge de la première bronchiolite chez le nourrisson et mesures préventives recommandées. HAS, Haute Autorité de Santé ; AMM, Autorisation de Mise sur le Marché ; IV, Intraveineux ; IM, Intramusculaire [9].

<b>Mesures thérapeutiques générales de prise en charge à la phase aiguë</b>	
Instillation nasale de sérum physiologique	
Kinésithérapie respiratoire	
Hydratation et nutrition adaptées	
Mesures environnementales	
Couchage en position proclive dorsale à 30°	
Oxygénothérapie si saturation artérielle transcutanée en O <sub>2</sub> ≤ 94%	
<b>Mesures générales de prévention de l'infection</b>	
Education de l'entourage	
Lavage des mains (savon ou solution hydro-alcoolique)	
Décontamination des surfaces et des objets	
Absence d'exposition à des individus infectés	
Eviter les lieux publics à promiscuité élevée	
Eviter une exposition passive à la fumée de cigarette	
Aérer les pièces et y maintenir une température inférieure à 19 °C	
Encourager l'allaitement maternel	
Informersur les modes d'évolution de la maladie	
Faire évaluer l'état du nourrisson par un médecin de ville avant de l'adresser à l'hôpital	
<b>Place des traitements médicamenteux</b>	
<b>A visée symptomatique</b>	<b>Avis HAS</b>
Bronchodilatateurs	Non recommandés
Corticoïdes	Non recommandés
Antitussifs, mucolytiques et mucorégulateurs	Non recommandés
<b>A visée curative</b>	
Ribavirine	Non recommandée
<b>A visée préventive</b>	
Palivizumab SYNAGIS® (IV ou IM)	AMM en France
<b>Antibiothérapie</b>	Si infection bactérienne associée : otites ou foyer pulmonaire

La stratégie de prise en charge de la première bronchiolite comprend essentiellement des mesures symptomatiques non médicamenteuses. A ce jour, les traitements médicamenteux à visée symptomatique ou curative de la bronchiolite à VRS n'ont pas prouvé leur efficacité (d'après les données de [9]). Ces traitements ne sont pas recommandés pour la prise en charge d'un premier épisode de bronchiolite (Tableau 2). Toutefois, l'administration de médicaments est envisagée selon la gravité de la maladie. De nos jours, malgré la conférence consensus de 2000, il reste difficile de s'accorder sur une prise en charge uniforme

de la première bronchiolite [45,46]. En France, il n'existe donc pas de traitement curatif et la prophylaxie médicamenteuse est onéreuse.

Il existe cependant un traitement préventif coûteux réservé aux nouveau-nés prématurés à fort risque d'infections respiratoires sévères. Il s'agit du médicament palivizumab SYNAGIS®, un anticorps monoclonal humanisé ciblant la glycoprotéine F du VRS. Les indications citées dans la base de données en ligne « Vidal » sont les suivantes :

*« Synagis est indiqué pour la prévention des infections respiratoires basses graves dues au VRS, nécessitant une hospitalisation chez les enfants à risque élevé d'infection à VRS :*

- *Enfants nés à 35 semaines d'âge gestationnel ou moins et âgés de moins de six mois au début de l'épidémie saisonnière à VRS.*
- *Enfants de moins de deux ans qui ont nécessité un traitement pour dysplasie bronchopulmonaire au cours des six derniers mois.*
- *Enfants de moins de deux ans atteints d'une cardiopathie congénitale avec retentissement hémodynamique »*

Actuellement, aucun vaccin contre le VRS n'est disponible. L'élaboration d'un vaccin serait la plus favorable des solutions préventives en termes de rapport coût-efficacité. La prévention de l'infection serait alors accessible aux pays en voie de développement. Un vaccin contre le VRS est d'ailleurs une priorité de l'OMS (d'après les données de [47]). La vaccination protégerait à l'échelle individuelle et induirait également une immunité de groupe, en étendant la protection aux individus non vaccinés, lorsque la couverture vaccinale serait suffisante. La recherche vaccinale à l'encontre de ce virus a pris beaucoup de retard en raison de l'échec vaccinal survenu dans les années 1960. Un vaccin inactivé au formaldéhyde destiné à prévenir l'infection par le VRS (FIVRS) a été administré à une cohorte d'enfants âgés de deux à sept mois. Quatre-vingt pourcents des enfants vaccinés ont dû être hospitalisés (5 % dans le groupe contrôle) en raison de manifestations cliniques exacerbées après l'infection naturelle par le VRS. Deux nourrissons sont décédés. Dix-huit enfants présentaient une bronchiolite et/ou une pneumonie, caractérisées notamment par un excès de cellules inflammatoires (éosinophiles) dans leurs poumons [48]. Cette dramatique exacerbation de la pathologie par la vaccination a conduit à un moratoire sur les vaccins VRS, tant que les mécanismes conduisant à ces réactions pathologiques n'étaient pas élucidés. La recherche vaccinale dans le cadre de la prévention de l'infection par le VRS est actuellement en plein essor notamment grâce aux nombreuses avancées dans le domaine de la caractérisation moléculaire du virus.

## 2. Le VRS et son cycle infectieux

### 2.1. La description des protéines virales et du cycle de réplication

Le VRS est un *Mononegavirales* faisant partie de la famille des *Pneumoviridae* et du genre *Orthopneumovirus* [49]. Le génome du virus (15,2 kb) est sous la forme d'un ARN simple brin, linéaire et de polarité négative. Il comprend dix gènes, codant pour onze protéines. Les neuf protéines structurales sont : N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 et L et les deux protéines non structurales sont *nonstructural protein 1* (NS1) et *nonstructural protein 2* (NS2). Les protéines G, F et SH composent l'enveloppe virale tandis que M forme la matrice. Les protéines formant la nucléocapside virale sont au nombre de quatre (N, P, L et M2-1). Les virions présentent un aspect sphérique (environ 200 nm de diamètre) ou filamenteux (2-8 µm) [50,51] (figures 2 et 3).

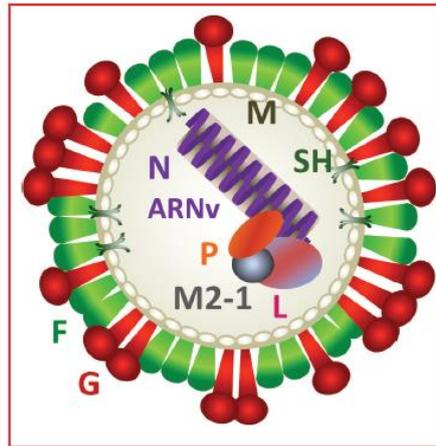
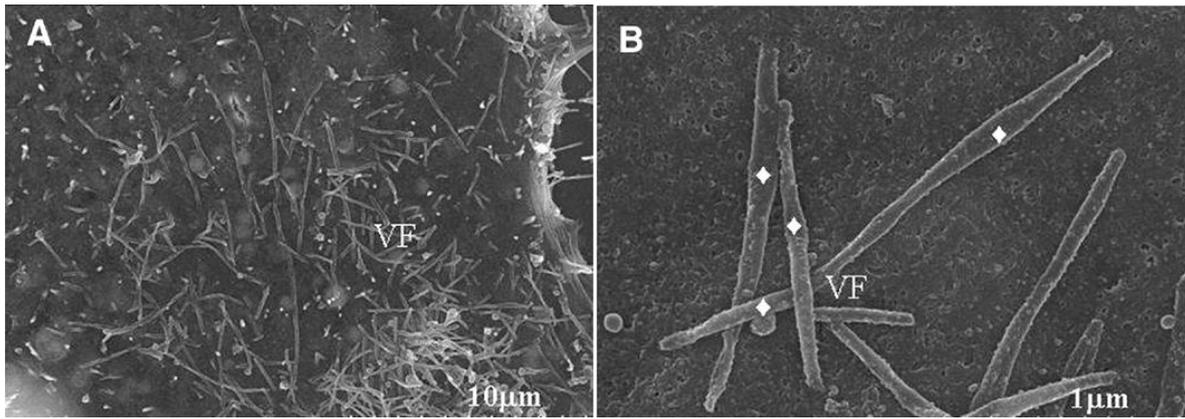
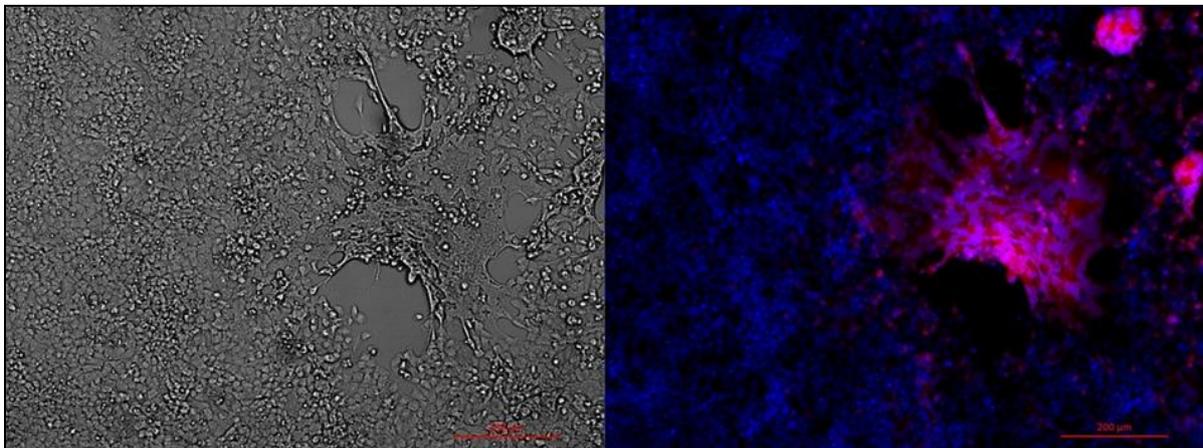


Figure 2. Représentation schématique du Virus Respiratoire Syncytial. Parmi les trois glycoprotéines d'enveloppe (G, F et SH), la glycoprotéine G permet l'attachement du virion à la cellule hôte, F permet la fusion entre la membrane du virus. La protéine de matrice M permet l'assemblage, la maturation et le bourgeonnement du virion. La nucléoprotéine N encapside l'ARN du virus qui va être répliqué et transcrit par la protéine L (large fragment), une ARN polymérase, accompagnée de ses cofacteurs P (phosphoprotéine) et M2-1 [52].



*Figure 3. Visualisation des filaments viraux en microscopie électronique. A, image à faible grossissement ( $\times 3000$ ) de filaments viraux (VF) à la surface des cellules infectées ; B, image d'agrandissement supérieur ( $\times 25000$ ) des filaments viraux qui révèle qu'ils ne sont pas d'épaisseur uniforme mais semblent avoir une base plus large (mise en évidence par le symbol  $\diamond$  sur l'image) [53].*

Le VRS cible principalement les cellules épithéliales ciliées qui vont produire de nouvelles particules virales, dont la forme filamenteuse favorise la propagation de cellule à cellule [51]. L'attachement des particules virales aux cellules est médié par la glycoprotéine d'enveloppe G puis, la glycoprotéine F permet la fusion des membranes virale et cellulaire. La protéine F provoque également la fusion des membranes des cellules infectées et adjacentes conduisant à la formation de *syncytia* [54] (figure 4).



*Figure 4. Formation d'un syncytia par fusion des membranes cellulaires après infection de cellules épithéliales humaines par le Virus Respiratoire Syncytial VRS-mCherry. Images prises au microscope à fluorescence (grossissement  $\times 5$ ) après titration par plaque de lyse sur cellules Hep-2 lors de la production du virus (données non publiées).*

Après la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, le matériel génomique est transféré dans la cellule (figure 5). La pénétration du virus est dépendante du réseau d'actine intracellulaire [55–58]. Dans des lignées de cellules épithéliales humaines, le

virus entre par endocytose de façon soit dépendante de la clathrine soit indépendante par macropinocytose [56–58]. L'entrée du virus permet de libérer dans le cytosol la nucléocapside et le génome sont libérés. La polymérase L (L pour large sous-unité) réalise une transcription séquentielle du génome viral par un mécanisme d'arrêt/démarrage dont l'activité est dépendante du réseau d'actine [59,60]. Il n'existe qu'un seul promoteur transcriptionnel pour tous les gènes situés à l'extrémité 3' du génome et chevauchant le début du premier gène. Les gènes situés en amont sont alors transcrits plus fréquemment (NS1 et NS2) que les gènes situés en aval (L) créant ainsi un gradient de transcription virale. Le gène codant pour le cofacteur M2-2 de la polymérase virale régit la transition de la transcription à la synthèse d'ARN génomique (pour revues [61,62]). La réplication du virus génère un brin d'ARN positif appelé brin antigénomique permettant alors la synthèse du génome viral, tous les deux étant protégé par la nucléoprotéine N. Le génome nouvellement synthétisé est associé à la nucléocapside formée de la nucléoprotéine N, de la phosphoprotéine P, de L et de son cofacteur M2-1 générant alors le complexe ribonucléoprotéique (RNP) [63]. L'interaction de la protéine de matrice M avec le cytosquelette permettrait de réguler l'assemblage et le transport à la membrane plasmique des protéines d'enveloppe avec le complexe RNP [63]. Les virions matures bourgeonnent à la membrane plasmique puis, après scission membranaire, vont infecter les cellules voisines. Dans des cellules épithéliales humaines (cellules Hep2), le complexe RNP est formé dans des corps d'inclusion qui co-localisent avec l'actine lors de l'exposition au VRS [53,64]. Ces vésicules cytoplasmiques contiennent aussi la forme filamenteuse du VRS [65]. Les corps d'inclusion sont également présents dans les macrophages alvéolaires (MAs) murins exposés au VRS mais la réplication virale y est abortive [26]. Ces données suggèrent que les filaments viraux, en interaction avec le cytosquelette d'actine, seraient un moyen efficace pour une seule particule virale de transférer plusieurs copies du génome viral dans une cellule adjacente non infectée.

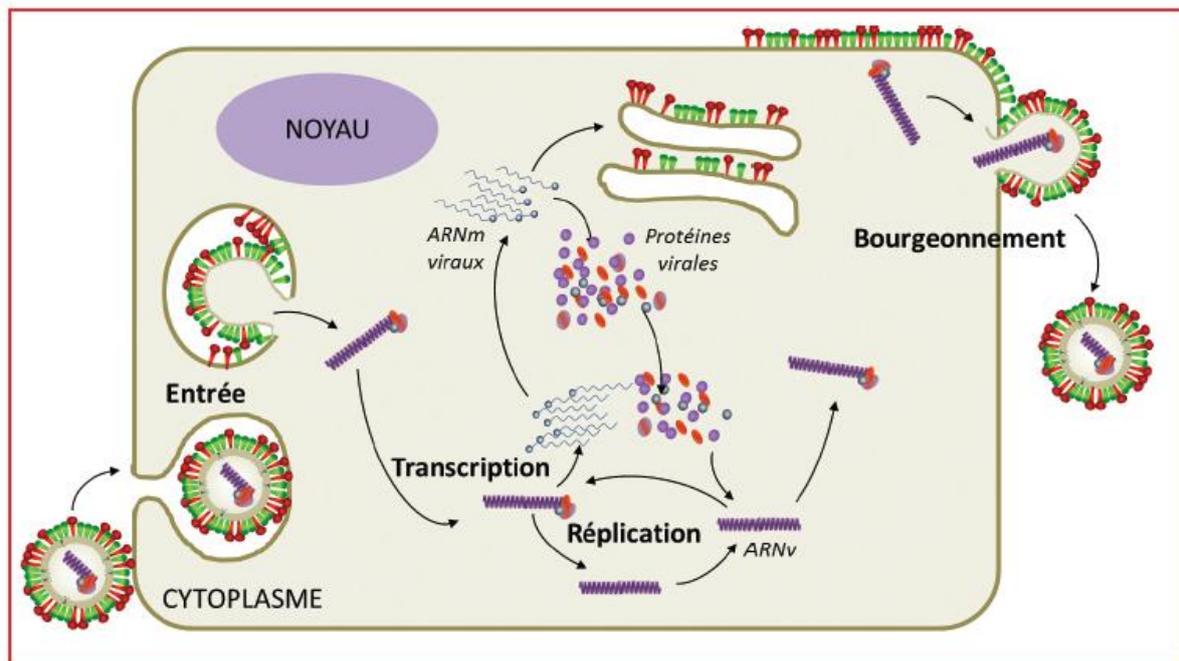


Figure 5. Cycle de réplication du VRS. La particule virale s'attache à la cellule hôte par l'intermédiaire de la glycoprotéine de surface G. Le VRS entre dans la cellule après fusion des membranes virale et cellulaire grâce à la protéine F. La transcription et la réplication du génome viral se déroulent dans le cytoplasme. Le complexe polymérase composé des protéines L, P et M2-1 utilise pour matrice l'ARN encapsidé par la nucléoprotéine et assure la synthèse d'ARN messagers viraux. Le complexe polymérase réalise aussi la synthèse d'ARN antigénomiques complets : ils sont encapsidés par la protéine N et servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes viraux. Les ARN viraux génomiques néo-synthétisés forment alors avec les protéines N, L, P et M2-1 le complexe ribonucléoprotéique qui est exporté vers les sites d'assemblage du virus. Les virions bourgeonnent à la membrane plasmique de la cellule hôte, emportant une enveloppe lipidique contenant les glycoprotéines virale [52].

## 2.2. Les récepteurs cellulaires impliqués dans l'entrée virale

L'entrée virale est médiée par plusieurs types de récepteurs cellulaires. L'interaction entre les glycoprotéines G ou F et les héparanes sulfates favorise l'attachement et l'infectivité virale [66–68]. Ces glycosaminoglycanes (GAGs) sont des sucres complexes exprimés à la membrane plasmique de la plupart des cellules de mammifères (hépatocytes, cellules endothéliales, cellules ovariennes de hamster, cellules épithéliales, fibroblastes, MAs, cellules *natural killer* (NK), lymphocytes, cellules dendritiques) [69–74]. Dès lors, étant donné le fort tropisme pour l'appareil respiratoire, un co-récepteur ou co-facteur est certainement également impliqué dans l'entrée virale [75].

L'équipe de Richard Hegele a découvert en 2011 que la protéine F interagit avec une protéine ubiquitairement exprimée et étroitement associée à l'actine intracellulaire, la

nucléoline [75,76]. Tayyari *et al* (2011) ont montré son implication dans l'entrée du VRS dans des cellules épithéliales humaines et ils ont confirmé son rôle lors de l'infection *in vivo* de souris adultes par administration d'un siRNA (*short interfering RNA*) interférant spécifiquement avec l'ARN messager de la nucléoline [75]. La nucléoline est particulièrement exprimée à la surface de l'épithélium respiratoire (cellules épithéliales ciliées et alvéolaires) et des cellules du système hématopoïétique comme les MAs (Shakeri et al., 2015).

Une particularité de la glycoprotéine G est de posséder des motifs moléculaires similaires à la chimiokine appelée fractalkine (ou CX3CR1-Ligand) qui lui permettent de se lier au récepteur CX3CR1 [77,78]. D'après l'équipe de Larry Anderson, cette interaction facilite l'infection et induit le recrutement de leucocytes *in vitro*. Le VRS entre dans les cellules épithéliales grâce à l'interaction de sa protéine virale G avec les GAGs mais aussi *via* l'interaction de la protéine G avec CX3CR1 expliquant que certaines cellules peuvent être infectées de manière indépendante de l'expression des héparanes sulfates [78]. L'ensemble de ces travaux montre que le VRS bénéficie de plusieurs moyens d'entrée et de dissémination dans les cellules du tractus respiratoire susceptibles de se compenser ou d'agir en synergie.

### **3. La pathogénèse de l'infection par le VRS**

La sévérité de l'infection par le VRS chez le nourrisson résulte d'une intense réplication virale, d'une importante inflammation pulmonaire et d'une altération de l'intégrité du parenchyme pulmonaire aboutissant à l'obstruction des conduits aériens [79–81]. Cette atteinte du poumon profond dépend des capacités de défenses innées de l'organisme mais aussi de l'immunité adaptative dite « mémoire » (figure 6). Dès 1965, il a pu être identifié à partir de décès liés à une bronchiolite sévère que le VRS infecte les cellules épithéliales ciliées et non ciliées des bronchioles et des alvéoles pulmonaires [81,82]. Le détachement, la nécrose et la perte de la fonction de clairance des cellules épithéliales ciliées positives pour les antigènes du VRS semblent contribuer à l'obstruction des conduits aériens et à l'inflammation pulmonaire [83–85]. Une étude a mis en évidence la présence d'antigènes du VRS dans les MAs de biopsies pulmonaires d'enfants décédés de bronchiolites [83]. Cependant, ni la production de nouveaux virions par ces cellules ni leur rôle dans la survenue de la pathologie n'ont été prouvés [83].

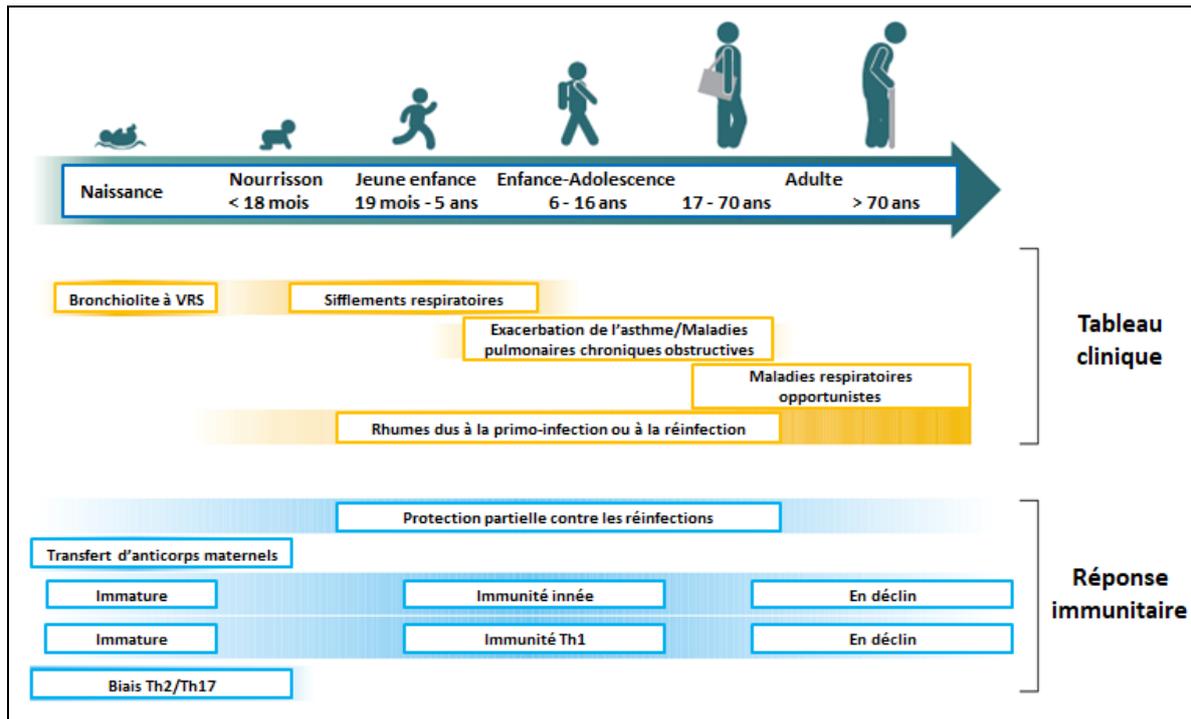


Figure 6. L'âge de la primo-infection par le VRS est un déterminant majeur de sévérité de la bronchiolite. Les premières infections apparaissent lorsque les anticorps d'origine maternelle ont quasiment disparu et que le système immunitaire n'est pas encore mature. Entre un et deux ans, l'immunité innée se renforce, l'immunité protectrice Th1 s'acquière et les réponses Th2 et Th17 déclinent. Les infections par le VRS se répètent tout au long de la vie. Les manifestations cliniques de l'infection chez des adultes en bonne santé sont quasiment inexistantes. Cependant, la maladie est exacerbée lorsque qu'une pathologie respiratoire chronique pré-existe (asthme et maladie chronique pulmonaire obstructive). Avec l'âge, le système immunitaire s'affaiblit, la mortalité due au VRS étant majoritairement plus importante chez les patients âgés. Adapté de [86].

### 3.1. Un recrutement cellulaire abondant

L'examen de biopsies pulmonaires d'enfants décédés à la suite de bronchiolites a démontré l'accumulation de neutrophiles, de monocytes/macrophages et de lymphocytes B dans les poumons avec une infiltration très faible voire inexistante de cellules NK et de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [83–85,87]. La production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL10/IP-10, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 et CCL3/MIP-1 $\alpha$ ) par les cellules épithéliales et les MAs conduit au recrutement de cellules immunitaires innées au cours de l'infection néonatale par le VRS [79,80]. Les polynucléaires neutrophiles sont particulièrement présents dans les lavages bronchoalvéolaires de nourrissons hospitalisés pour une bronchiolite [88,89]. Les neutrophiles sécrètent des protéines et des peptides antimicrobiens ( $\alpha$ -défensines, cathélicidines, pentraxine 3 et myéloperoxydase) en réponse

aux pathogènes et sont capables de phagocytose et de NETose (NETs : *neutrophil extracellular traps*) afin de limiter la propagation virale. En contrepartie, les neutrophiles peuvent altérer le tissu pulmonaire en relarguant de fortes quantités d'enzymes protéolytiques et de radicaux libres et en formant des NETs en excès (pour revue [90]). Néanmoins, aucun lien direct entre les manifestations cliniques de la bronchiolite et l'accumulation de neutrophiles dans les voies respiratoires n'a été mis en évidence.

A l'interface entre l'immunité innée et adaptative, les cellules dendritiques sont également recrutées au cours de l'infection par le VRS. Ces cellules ont été identifiées dans les sécrétions nasales d'enfants hospitalisés pour une bronchiolite [91]. À l'homéostasie, les cellules dendritiques conventionnelles (CDc) CD103<sup>+</sup>, les CDc CD11b<sup>+</sup> et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp) constituent la première ligne de défense antivirale des poumons avec les MAs. Au cours de l'inflammation, les cellules dendritiques dérivées de monocytes (CDmo) sont recrutées dans les poumons. Les cellules dendritiques sont considérées comme des sources d'IFN-I majeures en réponse aux infections virales. Néanmoins, l'IFN-I n'est quasiment pas détecté dans les sécrétions nasales de nourrissons hospitalisés pour bronchiolite contrairement à des nourrissons infectés par le virus Influenza [92,93]. Ces données suggèrent que les nourrissons sont capables de générer une réponse IFN-I (contexte infection par le virus Influenza) mais qui est soit trop précoce pour être détectée soit qui est inhibée lors de l'infection par le VRS. Le rôle des cellules dendritiques dans la réponse immunitaire innée néonatale à l'infection par le VRS dans les poumons est décrit dans la partie 5.2.3.

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène (CPAs) professionnelles qui appréhendent grâce au protéasome les antigènes extra- et intracellulaires afin de les présenter sous forme de peptides associés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) ou de classe II (CMH-II) aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup>, respectivement. Ces sentinelles forment un réseau de reconnaissance sous la couche de cellules épithéliales où elles détectent et capturent les antigènes étrangers. Dès que ces CPA professionnelles reconnaissent la présence d'un pathogène par la détection de signaux moléculaires de danger, elles enclenchent un processus de maturation permettant leur migration aux ganglions lymphatiques. Les cellules dendritiques guident alors la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

### 3.2. Une polarisation lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> de type Th2

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs deviennent des lymphocytes T auxiliaires ou *helper* (LTh) lorsqu'une cellule dendritique mature leur présente un peptide apprêté au sein du CMH-II. Selon l'environnement cytokinique ou la présence de facteurs de croissance, le profil de LTh généré est différent. La nature de l'inflammation observée dans les cas de bronchiolites sévères suggère que l'exacerbation de la maladie chez les nourrissons est associée à une orientation délétère de la réponse immunitaire au cours de l'infection. Il existe au moins quatre sous-populations distinctes de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> : Th1, Th2, Th17 et T régulateurs (Treg). Différents facteurs de transcription gouvernent la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs : T-bet/Stat4 pour les LTh1, GATA-3/Stat5 pour les LTh2, RORγt/Stat3 pour les LTh17 et Foxp3/Stat5 pour les Treg (pour revue [94]).

Au cours d'une infection virale, de fortes quantités d'IL-12, d'IFN-γ (IFN de type II) voire d'IFN-I et d'IL-18 sont sécrétés par les cellules innées favorisant ainsi la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en LTh1. Les LTh1 générés produisent massivement de l'IFN-γ qui va induire l'apoptose des cellules cibles et augmenter les capacités de présentation antigénique des cellules dendritiques, des lymphocytes B et des macrophages. L'IFN-γ est également un puissant inducteur de l'activité cytotoxique des macrophages (production d'oxyde nitrique ou NO). La stimulation *in vitro* de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de nouveau-nés ou d'adultes, issus de sang de cordon ou de sang périphérique respectivement, par l'IFN-α augmente la production d'IFN-γ et inhibe les productions d'IL-4 et d'IL-5 par ces cellules [95,96]. Les LTh1 produisent aussi l'IL-2 utile à l'expansion clonale des lymphocytes T. Les LTh1 sont particulièrement importants dans la défense de l'hôte contre les virus, certaines bactéries intra- et extracellulaires pathogènes des poumons et lors d'infections fongiques (pour revue [97]).

L'IL-4 et l'IL-2 participent à la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en LTh2. Les cellules Th2 sont capables de produire l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10, l'IL-13, l'IL-25 et l'amphiréguline. Les LTh2 interviennent dans la défense de l'hôte contre les parasites extracellulaires et sont aussi très impliqués dans l'induction et la persistance de l'asthme et autres phénomènes allergiques.

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs se différencient en cellules Th17 principalement sous l'action du TGF-β. Les Th17 interviennent lors des réponses immunitaires contre les bactéries extracellulaires et les champignons et participent à l'induction de nombreuses maladies auto-immunes. Ces cellules produisent l'IL-17a, l'IL-17f, l'IL-21 et l'IL-22.

Les cellules Treg jouent un rôle essentiel dans le maintien de la tolérance de soi ainsi que dans la régulation des réponses immunitaires. Elles se différencient sous l'action du TGF- $\beta$  et de l'IL-2 pour ensuite produire l'IL-10, le TGF- $\beta$ , et l'IL-35. Les lymphocytes B régulateurs (Breg) produisent aussi ces cytokines immunosuppressives et orientent la différenciation des lymphocytes T en faveur d'un phénotype régulateur à la fois chez la souris et l'Homme [98,99]. Carter *et al* (2011 et 2012) ont montré chez la souris que l'incapacité des cellules B à produire de l'IL-10 induit une déficience en cellules Treg, associée à une augmentation des lymphocytes Th1 et Th17 dans le cas d'une maladie autoimmune (arthrite rhumatoïde) [98,100]. Les cellules Breg existent également chez les nouveau-nés et contribuent à la sévérité de l'infection par le VRS en période néonatale (voir partie 5.2.4).

Au cours de la période néonatale, la bronchiolite est associée à une réponse immunitaire de type 2 et la réponse de type 1 est faible. L'infection par le VRS ou la stimulation par différents ligands de TLRs de cellules mononucléées de sang de cordon tend à promouvoir une polarisation Th2 de la réponse immunitaire [101–103]. De plus, les sécrétions nasopharyngées des nourrissons infectés par le VRS contiennent plus d'IL-4 que d'IFN- $\gamma$  et le facteur de transcription Gata3 est plus exprimé que Tbet. Un trop faible niveau d'IFN- $\gamma$  dans les sécrétions nasopharyngées de nourrissons infectés par le VRS est associé à une bronchiolite sévère [104,105]. Par ailleurs, Stoppelenburg *et al* (2013 et 2014) ont mis en évidence des réponses Th17 élevées dans les voies respiratoires et les cellules du sang de nourrissons pendant l'infection par le VRS. Ils suggèrent que l'IL-17 potentialiserait le recrutement des neutrophiles lors de l'infection participant alors aux dommages respiratoires constatés au cours de la bronchiolite [106,107]. Pour finir, Christiaansen *et al* (2016) ont montré que les Tregs activés sont significativement moins nombreux dans le sang périphérique de nourrissons infectés par le VRS par rapport aux nourrissons non infectés et des polymorphismes dans le gène de l'IL-10 ont été associés à une sévérité accrue de l'infection [108]. Ces résultats suggèrent qu'un défaut de régulation de la réponse immunitaire participerait à l'excès d'inflammation constaté chez certains nourrissons atteints de bronchiolite. Ainsi, l'infection par le VRS génère majoritairement une réponse immunitaire polarisée Th2/Th17 et faiblement Th1.

### **3.3. Un rôle discuté des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans l'immunopathologie**

La réponse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> à l'infection par le VRS est généralement associée à une immunité de type 1 protectrice [109,110]. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (souvent appelés lymphocytes T cytotoxiques, ou CTL) disposent de trois mécanismes d'action

majeurs après activation pour tuer les cibles infectées : la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et antivirales, principalement le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ , la production et la libération de granules cytotoxiques contenant la perforine et des granzymes et l'interaction Fas/FasL aboutissant à l'apoptose de la cellule cible. Lors de la phase de convalescence, la population de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> se contracte pour former un pool de cellules mémoires locales et circulantes qui peuvent répondre rapidement à une infection ultérieure. Les cellules T mémoires résidentes (LT<sub>RM</sub>, lymphocyte T *tissue-resident memory*) constituent une sous-population de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> présentant des fonctions de type inné, telles que la détection précoce de l'infection et la modulation de l'environnement inflammatoire [111]. Les cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices sont abondantes dans les poumons des adultes à la phase aiguë de l'infection par le VRS [111]. En revanche, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs sont quasiment absents dans les voies respiratoires et dans le sang périphérique lorsque la symptomatologie est à son paroxysme chez les nourrissons. Ils atteignent un nombre maximal lors de la convalescence (9-14 jours après l'apparition des symptômes) [88,112]. Ils ne contribuent donc probablement pas à la résolution de la primo-infection chez les nourrissons et ne sont pas à l'origine de l'immunopathologie dans les cas de bronchiolites sévères. Dans le modèle murin, le rôle des lymphocytes T CD8 au cours de l'infection par le VRS n'est pas clairement défini. Hussel *et al* (1997) ont montré que la déplétion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez des souris adultes et, préalablement immunisé avec le virus recombinant de la vaccine exprimant la protéine F du VRS, conduit à une réponse immunitaire de type 2 (recrutement d'éosinophiles et production d'IL-4 et d'IL-5 dans les poumons) lors de l'infection par le VRS [113]. D'autres équipes ont montré que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> participent à l'élimination virale pulmonaire mais contribuent à la sévérité de l'infection par le VRS (évaluée par la perte de poids) en recourant à des expériences de déplétion ou de transfert passif de lymphocytes T CD8 [114–116]. Cependant, des infections expérimentales réalisées chez le veau avec le VRS bovin ont montré que les T CD8<sup>+</sup> sont indispensables à la résolution de l'infection. En effet, la déplétion *in vivo* des T CD8<sup>+</sup> par des anticorps spécifiques retarde la clairance du virus dans les voies respiratoires et entraîne des lésions pulmonaires plus sévères [117]. L'ensemble de ces données indique que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> jouent probablement un rôle important dans la résolution de l'infection par le VRS et suggèrent que ce rôle est dépendant de la population de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> considérée (LTC, T<sub>RM</sub>) et des peptides viraux reconnus lors de l'infection par le VRS [118,119].

### 3.4. Une réponse anticorps non protectrice

Les signaux fournis par une sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires folliculaires (LTfh), localisés dans les organes lymphoïdes secondaires au sein de centres germinatifs, sont nécessaires aux fonctions des lymphocytes B. Les LTfh reconnaissent l'antigène présenté par les cellules B *via* le CMH-II et permettent une différenciation optimale des cellules B mémoires et des plasmocytes. Les LTfh expriment le ligand de CD40 (CD40L) et produisent des cytokines telles que l'IL-4, l'IFN- $\gamma$  et le TGF- $\beta$  permettant la commutation de classe des immunoglobulines : les plasmocytes générés produisent alors des IgG ou IgA et non plus des IgM [120]. Les anticorps sériques spécifiquement dirigés contre les protéines du VRS sont quasiment présents chez tous les enfants et tous les adultes, ce qui reflète l'universalité de l'infection par le VRS. Les glycoprotéines G et F sont les cibles antigéniques majeures pour la réponse immunitaire adaptative (production d'anticorps neutralisants). Toutefois, les réinfections par le VRS sont nombreuses au cours de la vie et s'accompagnent de réponses anticorps locales et systémiques qui ne sont que partiellement protectrices et de durée limitée. Le transfert passif d'immunoglobulines (en particulier le palivizumab) montre que l'administration systémique d'anticorps peut protéger contre les formes cliniques sévères de l'infection par le VRS. Cependant, l'infection naturelle par le VRS permet rarement d'atteindre des niveaux d'anticorps équivalents à ceux atteints avec le palivizumab. L'administration d'anticorps ne présente aucun avantage pendant une infection aiguë par le VRS et n'est efficace qu'en prophylaxie [121–125]. Les nourrissons nés à terme et en bonne santé sont protégés de l'infection par le VRS jusqu'à environ trois mois tant que les taux en IgG d'origine maternelle ne descendent pas en dessous d'un certain seuil de protection [126]. L'infection par le VRS chez les nourrissons peut entraîner la production d'IgG et IgA [93,127]. Néanmoins, la réponse anticorps primaire néonatale est relativement faible et de courte durée chez des nourrissons de moins de quatre mois [128]. Les IgA n'apparaissent dans les sécrétions nasales que vers le cinquième ou le sixième jour d'hospitalisation et les titres d'anticorps neutralisants atteignent un pic pendant la convalescence plutôt qu'à la phase aiguë de l'infection [93,127,129]. La raison pour laquelle l'infection par le VRS n'induit pas de taux très élevés d'anticorps protecteurs est inconnue. Néanmoins, sur la base de données obtenues chez des nourrissons et des souriceaux infectés par le VRS, McNamara *et al* (2013) ont montré que l'épithélium respiratoire produit les facteurs de survie des lymphocytes B, BAFF (*B cell activating factor of the TNF family*) et APRIL (*A proliferation inducing ligand*), en réponse à l'IFN- $\beta$  [130]. De plus Jans *et al* (2017) ont mis en évidence que l'IFN- $\beta$  induit

l'activation des lymphocytes B de nouveau-nés (induction de l'expression de CD69 et CD86) contrairement à l'exposition au VRS [131]. L'IFN-I n'est pas détecté en grande quantité dans les sécrétions nasales de nouveau-nés hospitalisés pour une infection sévère à VRS [93]. Ces données suggèrent qu'améliorer la production néonatale d'IFN-I mènerait à une meilleure production d'anticorps protecteurs contre le VRS.

### **3.5. Le modèle murin dans l'étude de la pathogénèse**

Il existe des *Orthopneumovirus* humains (VRSh) tels que les VRS-A2, VRS Long et VRS Memphis M37 mais aussi des *Orthopneumovirus* non humains comme le VRS bovin (VRSb) ou le virus de la pneumonie murine. La souris, les primates non-humains, le rat du cotonnier et le mouton sont les mammifères non-humains utilisés pour étudier l'infection par le VRSh. A part le chimpanzé, tous les animaux modèles sont semi-permissifs à l'infection par le VRSh, c'est-à-dire que la réplication et la symptomatologie clinique ne sont pas aussi fortes que lors de l'infection par les *Orthopneumovirus* propres de l'espèce. Le VRSb et le virus de la pneumonie murine sont particulièrement utilisés pour étudier la pathogénèse puisque l'infection de leur hôtes naturels (respectivement le bovin et la souris) reflète assez bien la symptomatologie de la bronchiolite du nourrisson (pour revue [132]). Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé le modèle murin pour les raisons suivantes.

L'infection expérimentale de souris BALB/c adultes par le virus de la pneumonie murine se traduit par une importante réplication virale causant une grave perte de poids (marqueur de sévérité), d'importantes difficultés respiratoires et la mort de toutes les souris infectées. Néanmoins, la symptomatologie dépend de la souche virale utilisée, des doses d'inoculum administrées, du fond génétique des souris et de l'âge au moment de l'infection [133–135]. La réplication virale débute initialement dans les cellules alvéolaires et se poursuit dans les cellules épithéliales bronchiolaires [136,137]. Rapidement, des polynucléaires éosinophiles sont détectés dans les liquides de lavages bronchoalvéolaires puis les cellules neutrophiles deviennent majoritaires [138]. De plus, les dommages pulmonaires sont sévères. En outre, les cellules épithéliales alvéolaires entrent en apoptose et l'épithélium bronchique est nécrosé. L'infection par le virus de la pneumonie murine induit une réponse pro-inflammatoire similaire à l'infection par le VRSh dans le modèle souris. Les chimiokines MIP1a, MIP2 (orthologue de l'IL-8 humaine) et MCP-1 sont détectées en grande quantité dans les lysats pulmonaires infectés [139]. Ces médiateurs de l'inflammation semblent impliqués dans les formes sévères de bronchiolite du nourrisson [140,141].

Bien que peu permissif à l'infection par le VRSh, le modèle murin a permis d'élucider les mécanismes immunitaires qui ont conduit à l'immunopathologie exacerbée lors de la vaccination avec le FIVRS de nourrissons dans les années 60. Si l'on compare la réponse immunologique des enfants vaccinés par le FIVRS à celle de souris adultes, la vaccination a conduit à une production de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) ainsi qu'à une infiltration d'éosinophiles dans le poumon [142,143]. Les souris vaccinées par le FIVRS développent également une réponse anticorps qui ne protège pas d'une infection ultérieure par le VRS [142,143]. Delgado *et al* (2009) ont montré que le manque de protection après l'administration du FIVRS n'était pas dû uniquement à une altération des épitopes viraux protecteurs (F et G) par le traitement chimique mais aussi, à une insuffisance de stimulation de TLRs (des cellules dendritiques et des lymphocytes B) par le vaccin conduisant alors à la production d'anticorps de faible avidité, non protecteurs et, participant à l'exacerbation de la maladie [144]. Par ailleurs, sur la base de nombreuses études rétrospectives et prospectives, il est maintenant reconnu que les infections sévères du nourrisson par le VRS avec atteinte du tractus respiratoire profond sont un facteur de risque pour l'apparition d'asthme plus tard dans la vie de l'enfant (pour revue [145]). Dans le modèle murin, une infection durant les premiers jours de vie conduit lors d'une réinfection à l'âge adulte, aux bouleversements physiopathologiques rencontrés au cours de l'asthme mais aussi lors d'infections sévères par le VRS (bronchoconstriction, éosinophilie pulmonaire, hypersécrétion de mucus, sécrétion d'IL-13...). Si l'on recule l'âge de la primo-infection du souriceau à trois semaines de vie (sevrage) ou plus tard, ces événements disparaissent et une réponse Th1 domine [146]. Ces données suggèrent que l'environnement pulmonaire du nouveau-né est propice à la survenue de la bronchiolite et que, l'infection par le VRS au cours de la période néonatale entraîne une empreinte immunopathologique dans les poumons favorisant la survenue d'asthme chronique.

Le choix du modèle repose non seulement sur le type de paramètre biologique et/ou clinique que l'on souhaite étudier mais aussi sur la disponibilité des réactifs de laboratoire et des installations expérimentales disponibles. Dans ce contexte, le modèle murin offre de nombreux avantages dont la possibilité d'utiliser un large éventail de souris génétiquement modifiées. En outre, l'immunité innée peut être explorée grâce à des souris invalidées uniquement pour un gène. Il est alors possible d'analyser les conséquences biologiques et/ou cliniques spécifiques à cette délétion au cours de l'infection par le VRS. Néanmoins, les différences d'expression et de fonctionnement des gènes de l'immunité innée entre l'Homme et l'animal ne sont que peu décrites (pour revue [147]). Il est nécessaire de rester prudent

quant à l'extrapolation à l'humain des données obtenues à partir des modèles murins d'invalidation génétique.

Globalement, l'infection par le VRS est essentiellement étudiée avec le modèle souris. Les conditions d'élevage moins contraignantes et moins coûteuses que les autres espèces animales, l'abondance des réactifs de laboratoire disponibles pour ces animaux, la relative similarité des systèmes immunitaires murins et humains ainsi que l'existence de souris transgéniques potentiellement exploitables rendent ce modèle particulièrement attractif.

#### **4. L'initiation de la réponse immunitaire anti-VRS**

L'initiation de la réponse immunitaire innée repose sur la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* ou PAMPs) par des récepteurs spécifiques : les *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). A ce jour, plusieurs classes de récepteurs ont été identifiées (pour revue [148]). Une première famille de PRRs membranaires, les TLRs, est particulièrement impliquée dans les défenses antivirales. Initialement découverts chez la drosophile, onze types de TLRs ont ensuite été identifiés chez l'Homme et treize chez la souris. Une autre famille de PRRs est présente exclusivement au niveau cytosolique : les *retinoic acid-inducible protein 1 (RIG-I)-like receptors* (RLRs) et les *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing proteins* (NLRs). Ces récepteurs sont aussi impliqués dans la défense précoce de l'hôte à l'infection par le VRS (pour revue [149,150]) (figure 7).

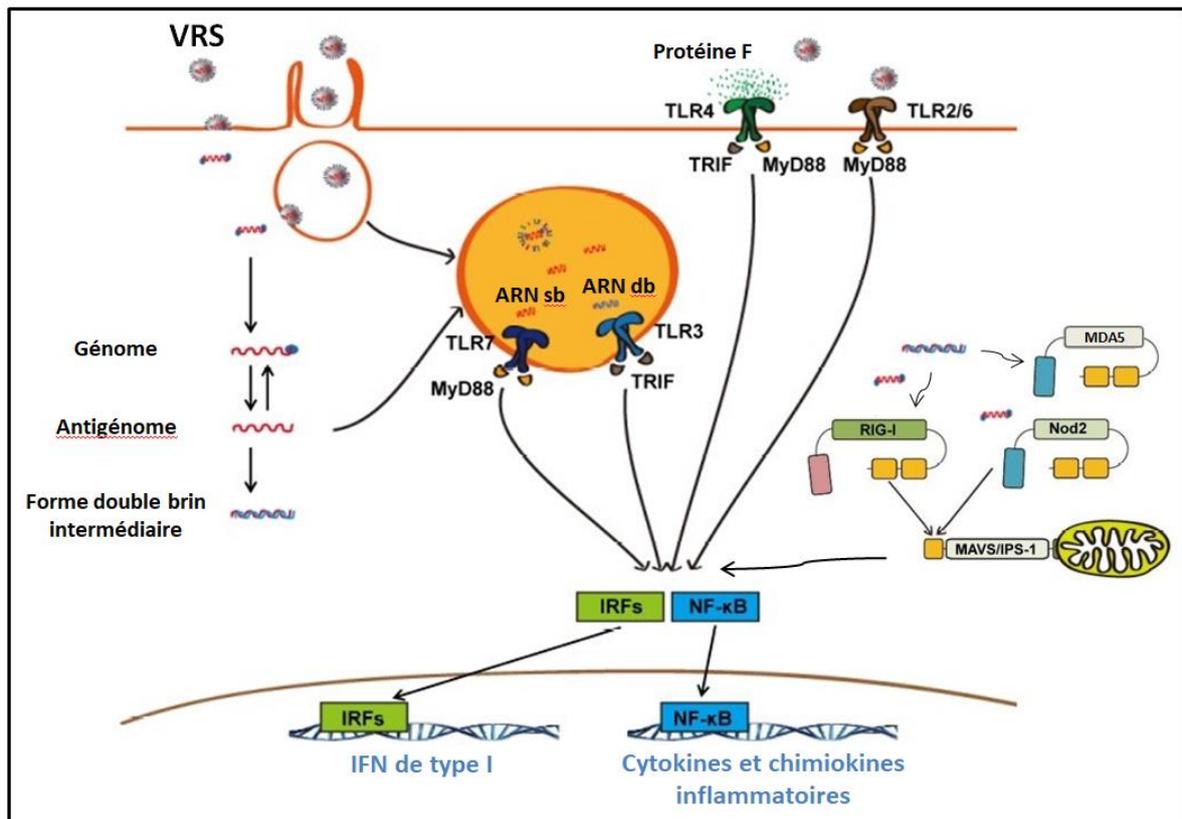


Figure 7. Voies de signalisation activées lors de la détection du VRS par les PRRs membranaires et cytosoliques. ARN sb, ARN simple brin ; ARN db, ARN double brin ; IRF, Interferon regulatory factor ; MAVS/IPS1, Mitochondrial antiviral-signaling protein ou aussi appelée Interferon-β promoter stimulator 1 ; MDA5, Melanoma differentiation associated gene 5 ; MyD88, Myeloid differentiation primary response 88 ; NF-κB, Nuclear Factor κB ; NOD2, Nucleotide-binding oligomerization domain 2 ; RIG-I, Retinoic acid inducible gene I, TLR, Toll-like receptor ; TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β. Adaptée de [151].

#### 4.1. La localisation des récepteurs de l'immunité innée impliqués dans la détection du VRS et l'initiation de la réponse antivirale

Dans la partie qui suit je décrirai la localisation des PRRs impliqués dans la reconnaissance du VRS et les voies de signalisation activées lors de la détection des motifs PAMPs associés au VRS. Les travaux exposés ont été réalisés avec des souris adultes. Cela suggère que la localisation, le trafic ou le fonctionnement des PRRs peut être différent au cours de la période néonatale. Je terminerai cette partie en décrivant de manière générale le rôle des IFNs dans le contrôle des infections virales.

#### 4.1.1. Les TLRs localisés à la membrane plasmique des cellules

Les cellules épithéliales pulmonaires humaines et murines ainsi que les macrophages expriment une large gamme de TLRs incluant le TLR4 (pour revue [152,153]). La protéine de fusion F du VRS est reconnue par le TLR4, qui est également connu pour détecter le LPS des bactéries à Gram négatif [154]. L'activation du TLR4 conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN-I, impliquant les voies de signalisation dépendantes de deux molécules adaptatives : *myeloid differentiation primary response 88 protein* (MyD88) ou *TIR domain-containing adapter inducing interferon  $\beta$*  (TRIF). La signalisation TLR4 et l'engagement de la voie IL-4R $\alpha$  (*interleukin-4 receptor  $\alpha$  chain*) /STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*) et IFN- $\beta$  dans les MAs murins favorisent une réponse immunitaire de type 2 au cours de l'infection par le VRS [155]. Chez les souris C57BL10/ScCr déficientes pour l'expression du TLR4, la clairance du VRS ainsi que l'activation et le recrutement des cellules NK sont altérés [154,156]. Cependant, ces paramètres ne sont pas affectés chez des souris BALB/c déficientes pour ce même récepteur [157].

Le complexe TLR2/TLR6 est également impliqué dans la détection du VRS, mais les PAMPs reconnus par ce complexe au cours de l'infection VRS ne sont pas connus. L'activation de ces récepteurs favorise la production des IFNs de type I et de cytokines pro-inflammatoires par la voie dépendante de MyD88. Dans les poumons de souris adultes déficientes pour les TLR2 et TLR6 infectées, la charge virale est augmentée et le recrutement des neutrophiles est altéré. De plus, les MAs isolés de ces souris produisent des taux réduits d'IFN-I et de cytokines inflammatoires [158].

D'autres cellules immunitaires innées pulmonaires peuvent exprimer les TLR4 et TLR2. Leur expression vient d'être mise en évidence au sein des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2 ou *innate lymphoid cells 2*) et est associée à une réponse immunitaire de type 2 *via* la production d'IL-13 [159].

#### 4.1.2. Les TLRs localisés à la membrane endosomale

Le TLR3 détecte la forme double brin de l'ARN du génome du VRS, qui est généré au cours du cycle de réplication du virus [160]. Le TLR3 signale exclusivement au travers de la voie TRIF. Le recrutement de TRIF conduit à l'activation du facteur de transcription *interferon regulatory factor 3* (IRF-3) qui, après translocation nucléaire, permet la transcription puis la synthèse d'IFN-I par la cellule. Le TLR3 est exprimé constitutivement par

de nombreux types cellulaires y compris les cellules épithéliales nasales et pulmonaires, les MAs et les cellules dendritiques [161,162]. Rudd *et al.* (2005) ont montré que le VRS favorise une immunité de type 2 chez les souris adultes déficientes en TLR3 avec une infiltration d'éosinophiles, une surproduction de mucus et la sécrétion de cytokines de type Th2 (IL-5 et IL-13) tandis que la charge virale reste inchangée [160].

Le TLR7 détecte la forme simple brin de l'ARN virale. Cette fixation de l'ARN monocaténaire du VRS au TLR7 aboutit à la synthèse d'IFN-I et de cytokines pro-inflammatoires *via* l'activation d'IRF-7 et du facteur de transcription *nuclear factor- $\kappa$  B* (NF- $\kappa$ B) grâce au recrutement de MyD88. Les cellules épithéliales pulmonaires, les cellules dendritiques et les éosinophiles sont capables de détecter le VRS par l'intermédiaire du TLR7 [152,163,164]. L'infection par le VRS de souris déficientes pour le TLR7 induit une augmentation significative de l'inflammation et de la production de mucus dans les poumons [163]. Schlender *et al* (2005) ont montré que le VRS empêche la production d'IFN-I dans les cellules dendritiques humaines d'une manière dépendante du TLR7 sans toutefois mettre en évidence le mécanisme impliqué dans cette inhibition [27].

#### 4.1.3. La localisation cytosolique des RLRs et des NLRs

Les récepteurs *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) et *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA5) sont des récepteurs à hélicases localisés dans le cytosol se liant à la forme double brin de l'ARN viral et dans le cas de RIG-I à l'ARN simple brin non coiffé triphosphorylé [165,166]. RIG-I est particulièrement impliqué dans les réponses IFN-I des cellules épithéliales pulmonaires, des cellules dendritiques, des MAs et des fibroblastes lors de l'infection par le VRS [167–169]. RIG-I et MDA5 contiennent deux domaines N-terminaux de recrutement et d'activation des caspases (domaines CARDs) qui, après détection du virus dans le cytosol, interagissent avec la protéine adaptatrice mitochondriale antivirale (MAVS, *mitochondrial antiviral-signaling protein*) pour déclencher les voies NF- $\kappa$ B et IRF-3. D'après Loo *et al* (2007), RIG-I est essentielle pour l'induction de la réponse IFN-I au cours de l'infection par le VRS de fibroblastes embryonnaires murins alors que MDA-5 ne l'est pas. Les auteurs suggèrent que MDA-5 jouerait un rôle auxiliaire dans l'amplification de la réponse IFN-I initiée par l'activation de RIG-I [169]. Le groupe de Johansson a montré que les MAs sont les principaux producteurs d'IFN-I *via* la voie dépendante de MAVS dans les poumons de souris adultes infectées par le VRS [168].

Le récepteur *nucleotide-binding oligomerization domain 2* (NOD2), un membre de la famille des NLRs, peut également détecter l'ARN génomique simple brin du VRS et

déclencher une réponse IFN-I *via* la voie MAVS dans des cellules épithéliales alvéolaires humaines et les poumons de souris [170].

Lors de l'infection par le VRS, les souris déficientes pour l'expression de MAVS présentent une clairance virale retardée et une augmentation du recrutement des neutrophiles dans les poumons [167]. Les cellules épithéliales pulmonaires, les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de ces souris présentent un défaut de production d'IFN-I [167]. L'absence d'expression de MAVS n'influence pas la production d'IFN- $\gamma$  par les LTC mais conduit à une moindre production d'IgG1 et d'IgG2 au cours de l'infection par le VRS [171]. Ainsi, la voie de signalisation des RLRs et NLRs *via* MAVS est importante pour le contrôle de l'inflammation et la mise en place d'une réponse anticorps optimale au cours de l'infection par le VRS.

#### 4.1.4. Le rôle des interférons dans la réponse antivirale

Les IFNs ont été découverts par Isaacs et Lindenmann en 1957 comme des substances qui protègent les cellules de l'infection virale [172]. Depuis, il est reconnu que les IFNs possèdent un large éventail de fonctions biologiques, y compris des propriétés antivirales, antiprolifératives et immunomodulatrices (pour revue [173]). L'infection virale déclenche la synthèse et la sécrétion transitoire d'IFNs pour favoriser la protection des cellules encore non infectées. Les IFNs induisent la transcription de centaines de gènes stimulés par l'IFN (*IFN-stimulated genes* ou ISGs), dont certains produits protéiques inhibent des étapes de la réplication virale. Les virus ont développé de nombreux mécanismes pour échapper aux actions antivirales des IFNs en bloquant leur synthèse et/ou leurs actions. A titre d'exemple les protéines non structurales NS1 et NS2 du VRS sont connues pour inhiber *in vitro* et *in vivo* chez la souris la réponse IFN-I dans les cellules épithéliales et les macrophages [174,175].

La classification des IFNs est basée sur les récepteurs de surface cellulaire auxquels ils se lient pour activer les voies de signalisation intracellulaires (pour revue [176]). La classe des IFN-I comprend de nombreux sous-types d'IFN- $\alpha$  (1 à 13 pour l'Homme et jusqu'à 14 pour la souris), un sous-type d'IFN- $\beta$  et d'autres IFN-I minoritaires (IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$  et IFN- $\zeta$ ). L'IFN- $\gamma$  est le seul IFN de type II (IFN-II) connu et les IFN- $\lambda$ s (1 à 4) appartiennent au type III (IFN-III). Le récepteur dimérique aux IFN-I, *interferon- $\alpha/\beta$  receptor* (IFNAR) 1 et 2, est exprimé de manière ubiquitaire à la surface des cellules. Le récepteur à l'IFN- $\gamma$ , *IFN- $\gamma$  receptor* (IFNGR), constitué de deux sous-unités IFNGR1 et deux sous-unités IFNGR2, est localisé à la surface des lymphocytes T et des cellules présentatrices d'antigène tel que les

macrophages (pour revue [177]. L'expression du récepteur aux IFN-III, *IFN- $\lambda$  receptor* (IFNLR), n'est décrite que dans les cellules épithéliales et les hépatocytes [178–180].

La synthèse des IFNs doit être déclenchée rapidement et fortement lors du contact de l'hôte avec le virus. La détection des protéines d'enveloppe comme la glycoprotéine F du VRS ou le génome viral après l'entrée du virus par les PRRs permet la production rapide des IFN-I et -III par les cellules de l'immunité innée en réponse à l'infection virale. Au cours de l'infection par le VRS, l'IFN-I est majoritairement produit par les MAs et les CDp chez la souris adulte [168,181]. L'IFN-III est principalement produit par les cellules épithéliales [182]. La question reste ouverte chez le souriceau. Après fixation sur leurs récepteurs, les IFN- $\alpha$  et - $\beta$  limitent la propagation de l'infection en induisant un état antiviral intrinsèque aux cellules infectées et aux cellules dans leur voisinage. De plus, les IFN-I participent au contrôle de l'inflammation et renforcent le système immunitaire adaptatif (pour revue [183].

La voie de signalisation intracellulaire mobilisée lors de la fixation des IFN-I et -III sur leur récepteur est similaire et implique le complexe de transcription *ISG factor 3* (ISGF3, *IFN-stimulated gene factor 3*) (pour revue [176]). L'activation d'ISGF3 aboutit à la transcription de groupes d'ISGs dont certains sont des facteurs de restriction viraux qui agissent à différents niveaux du cycle de réplication virale. Parmi les ISGs les plus connus, *PKR* (*protein kinase R*), *OAS* (*2',5'-oligoadenylate synthase*) 1 et 2, *OASL* (*2'-5'-Oligoadenylate Synthetase-Like Protein*), *IFITM3* (*interferon-induced transmembrane protein 3*), *ISG15* (*IFN-stimulated gene 15*) et *Mx* (*myxovirus resistance*) *gene 1* et 2 sont induits au cours de l'infection *in vitro* de cellules épithéliales et de macrophages par le VRS [26,184–191]. Certaines de leurs fonctions sont indiquées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Mécanismes d'action antivirale identifiés de PKR, OAS, IFITM3, ISG15 et Mx. 2-5A : 5'-phosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylate ARNdb : ARN double brin, eIF2 $\alpha$  : eukaryotic translation initiation factor 2 subunit, VRS : virus respiratoire syncytial

Gène induit par l'IFN	Virus/ligand utilisé	Cellules hôtes	Effet sur la réplication virale	Références
<b>PKR</b>	Virus de la Stomatite Vésiculaire	Fibroblastes embryonnaires murins	Inhibition de la traduction des protéines virales (phosphorylation eIF2 $\alpha$ )	[192]
<b>OAS</b>	2-5A induit par l'ARNdb	Cellules prostatiques	Dégradation des ARNs messagers (activation de la RNase L)	[193]
<b>IFITM3</b>	VRS	Cellules épithéliales	Inhibition de l'entrée virale	[191]
<b>ISG15</b>	VRS	Cellules épithéliales	Inhibition de la transcription (ISGylation de protéine(s) virales)	[185]
<b>Mx</b>	Virus Influenza	Fibroblastes embryonnaires murins	Inhibition de la transcription des ARNs messagers viraux et du génome viral	[194,195]

#### 4.2. La régulation de l'activation des TLRs endosomaux et de RIG-I

La localisation membranaire ou intracytosolique des PRRs est un processus biologique finement régulé car d'elle dépend l'activation des récepteurs immunitaires innés. Grâce au modèle murin adulte, beaucoup de données soulignent l'existence d'un trafic intracellulaire intense permettant aux PRRs de se localiser au niveau des compartiments subcellulaires adéquats à leur activation et, au déclenchement de différentes voies de signalisation aboutissant à une réponse cellulaire protectrice. Depuis le réticulum endoplasmique, les TLRs migrent jusqu'à l'appareil de Golgi où ils sont triés pour être pris en charge par le système endo-lysosomal qui contribue à l'activation pH-dépendante de certains TLRs. La description du trafic intracellulaire du TLR7 découle principalement d'études portant sur l'activation du TLR9 (pour revue [196]). De nombreuses protéines adaptatrices (UNC93B1, gp96, PRAT4A, LRRC59, AP-1 à-4...) et transporteurs multiprotéiques (COPII et ESCRT) sont nécessaires au trafic intracellulaire et sont dépendants du TLR engagé. L'équipe de Grégory Barton a pour la

première fois montré dans des macrophages et des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse murine que l'activation des TLR7 et TLR9 nécessite un clivage protéolytique par des enzymes dont l'activité requiert l'acidification endo-lysosomale [197]. Par la suite, le même groupe et d'autres équipes ont montré que le clivage endo-lysosomal des TLR3, TLR7 et TLR9 est dépendant de l'action conjointe de l'endopeptidase à asparagine et de plusieurs cathepsines [198–201]. La nécessité d'un clivage protéolytique des ectodomaines des TLR3, TLR7 et TLR9 dans certaines conditions de pH est un facteur permettant de restreindre leur action aux compartiments endo-lysosomaux et donc de prévenir une activation inappropriée par les acides nucléiques endogènes cytoplasmiques.

Parmi les récepteurs intracytosoliques, l'activation de RIG-I est la plus décrite. L'équipe de Michael Gale a montré qu'au cours d'infections à virus à ARN (virus de l'hépatite C ou virus Sendai) RIG-I, associé à la molécule chaperonne 14-3-3 $\epsilon$  et à la ligase *tripartite motif-containing protein 25* (TRIM25), migre du cytosol à la membrane située à l'interface entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries (*mitochondrial-associated ER membrane* ou MAM) afin d'y recruter MAVS et d'initier la réponse antivirale [202,203]. L'activation de RIG-I repose à la fois sur la translocation du complexe RIG-I/14-3-3 $\epsilon$ /TRIM25 vers le MAM, l'ubiquitination de RIG-I au niveau de l'extrémité N-terminale des domaines CARDS par TRIM25 et, sur les changements structuraux qui s'opèrent en C-terminal permettant alors l'interaction avec MAVS [204,205].

Le trafic intracellulaire des PRRs au sein des différentes cellules de l'immunité innée est nécessaire à leur activation et conditionne la réponse antivirale. Ce trafic est dense, complexe et suppose l'intervention du cytosquelette d'actine dans la régulation de ce processus. A l'heure actuelle il n'existe qu'une seule étude publiée en 2017 par l'équipe de Loredana Saveanu qui souligne l'importance du cytosquelette dans l'activation de certains TLRs endosomaux[206]. Ce travail ajoute une nouvelle dimension à la régulation de l'activation des PRRs et des réponses immunitaires innées qui en découlent en impliquant IRAP (*Insulin Responsive AminoPeptidase*), une protéine localisée à la membrane de nombreuses vésicules intracellulaires et aux multiples fonctions.

### **4.3. IRAP, un acteur majeur de la régulation du trafic intracellulaire des TLRs**

#### *4.3.1. La découverte de IRAP*

IRAP, également appelée *leucyl/cystinyl aminopeptidase* (LNPEP), *cystinyl aminopeptidase* (CAP), *human placental leucine aminopeptidase* (P-LAP), ocytocinase et

vasopressinase, a été étudiée dans différents contextes biologiques depuis 1930. Keller *et al* (1995, 2002) ont décrit IRAP lors de l'étude des mécanismes de régulation de l'internalisation du glucose par l'insuline dans les tissus adipeux même si, déjà dans les années 1930, on l'étudiait sous le nom d'ocytocinase dans le cadre de la régulation hormonale [207–209]. IRAP a été identifiée dans des endosomes appelés *GLUT4 storage vesicles* (GSV). Ces vésicules permettent le transport du glucose du sang aux adipocytes après translocation à la membrane de GLUT4 qui appartient à l'une des trois classes de *glucose transporters* (GLUT). La présence de IRAP dans ces vésicules régulerait la rétention de GLUT4 dans les GSV en contrôlant la fixation des GSV au cytosquelette d'actine [210,211]. Keller et son équipe ont aussi montré que IRAP est exprimée dans un grand nombre d'organes dont les poumons, le cerveau, les reins et la rate [207]. Ces travaux suggèrent une fonction cellulaire de IRAP bien plus large que celle de la régulation de la glycémie et localisent IRAP à la membrane d'un large panel de vésicules intracellulaires.

De nombreuses fonctions sont attribuées à la protéine IRAP en raison de ses domaines intracytosolique de liaison au cytosquelette et intraluminal de catalyse enzymatique (figure 8). IRAP est une protéine transmembranaire composée de 1025 acides aminés [207]. Le domaine N-terminal intracytosolique de 110 acides aminés contient des motifs impliqués dans l'endocytose, le trafic intracellulaire et interagit avec certaines protéines du cytosquelette telle que la vimentine ou *formin-homology-domain-containing protein 1* (FHOD1) [207,212,213]. La protéine IRAP appartient à la famille des aminopeptidases M1 de par son extrémité C-terminale intraluminale de 893 résidus qui contient le site de catalyse enzymatique dont l'activité dépend de la présence d'un atome de zinc [207].

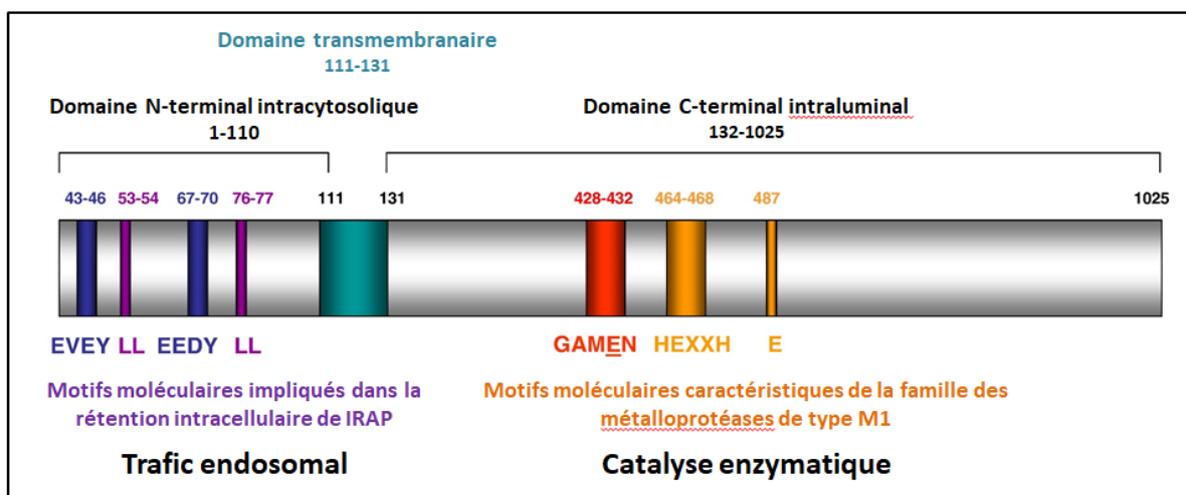


Figure 8. Représentation schématique de la protéine IRAP. Adaptée de [210].

#### 4.3.2. La place de IRAP dans le système immunitaire

L'équipe de Susanna Keller a débuté la caractérisation de la molécule IRAP dans les cellules du système immunitaire dans les années 2000. Dans les mastocytes, Liao *et al* (2006) ont constaté que la protéine IRAP est localisée à la membrane de vésicules qui partagent des marqueurs de fusion et de trafic membranaire (appelés v-SNARE pour *soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptors*) avec les GSV et présentent aussi des marqueurs d'endosomes précoces et de recyclage (*transferrin receptor* et syntaxine 13). Dans ces cellules, les vésicules IRAP<sup>+</sup> migrent du milieu intracellulaire à la membrane plasmique lors d'une stimulation antigène/IgE-dépendante. Les auteurs suggèrent que le trafic des vésicules IRAP<sup>+</sup> est impliqué dans la régulation des fonctions de dégranulation mastocytaire. Néanmoins, en raison de l'absence de drogue interférant spécifiquement avec le trafic des vésicules IRAP<sup>+</sup> sans altérer la fonction enzymatique de la protéine IRAP, les auteurs ne peuvent conclure avec précision sur le rôle de la protéine IRAP dans ces cellules [214].

Nikolaou *et al* (2014) ont montré que la protéine IRAP est également présente dans les macrophages péritonéaux. L'IFN $\gamma$  et le LPS (inducteurs du phénotype M1) provoquent une augmentation de l'expression de la protéine IRAP dans les macrophages contrairement à l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (inducteurs du phénotype M2) qui ne modifient pas son expression [215]. L'équipe suggère que la protéine IRAP serait associée aux fonctions cytotoxiques et inflammatoires des macrophages de type M1. De plus, le LPS ou des billes de latex favorisent très transitoirement le recrutement de la protéine IRAP à la membrane plasmique des macrophages péritonéaux [215]. Grâce à ses interactions avec des protéines du cytosquelette et du système endo-lysosomal, la protéine IRAP naviguerait entre le cytosol et la membrane plasmique afin de délivrer rapidement à la membrane les protéines nécessaires au déclenchement de la réponse TLR4 ou des processus de phagocytose. Ainsi, ces travaux ont permis de montrer que la protéine IRAP est localisée à la membrane de vésicules intracellulaires mobiles qui régulent le fonctionnement cellulaire en réponse à différents stimuli. De par son domaine intracytosolique de liaison au cytosquelette et sa localisation transmembranaire, la protéine IRAP intervient dans le contrôle du trafic vésiculaire.

Dans les cellules dendritiques, la protéine IRAP a d'abord été étudiée dans le contexte de la présentation antigénique en raison de son activité enzymatique intraluminale [216,217]. Les investigations ont débuté par la recherche d'aminopeptidases capables d'élaguer des peptides de grandes tailles pour favoriser leur présentation par le CMH-I. Dans de nombreux sous-types de cellules dendritiques la protéine IRAP est à la fois localisée dans des

endosomes périphériques en présence du CMH-I mais aussi, au niveau de phagosomes précoces qui se forment lors de l'initiation de la phagocytose [216]. L'ensemble de ces éléments a conduit à l'hypothèse que la protéine IRAP pouvait être impliquée dans le processus de présentation croisée des cellules dendritiques. L'utilisation de cellules déficientes pour l'expression de IRAP (IRAP KO) a permis de prouver cette hypothèse puisqu'en l'absence de la protéine IRAP, les antigènes exogènes internalisés ne sont plus présentés par les cellules dendritiques [216].

#### 4.3.3. *Le rôle de la protéine IRAP dans le contrôle de l'activation des TLRs endosomaux*

Cheng *et al* (2014) ont identifié une mutation mononucléotidique (Ala763Thr) du gène codant pour IRAP chez des patients atteints de psoriasis. Les auteurs ont montré que l'expression de la protéine IRAP est diminuée au niveau des lésions de la peau de ces individus [218]. Une activation inappropriée des TLRs endosomaux et de RIG-I favorise la survenue du psoriasis qui est une maladie d'origine auto-immune [219,220]. Actuellement, aucun lien direct n'a pu être démontré entre la protéine IRAP et la régulation de l'activation de ces PRRs lors de psoriasis.

L'équipe de Loredana Saveanu a montré que la protéine IRAP limite les réponses inflammatoires et les productions d'IFN-I dans différentes cellules immunitaires et au cours d'infections respiratoires. Le virus de la grippe possède un génome à ARN simple brin et comme le VRS, est détecté par les TLR3, TLR7 et RIG-I [221,222]. La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) peut être détectée par le TLR9 dont le fonctionnement est relativement proche de celui du TLR7 [223]. Les souris IRAP KO infectées par ces pathogènes meurent plus rapidement que les animaux WT [206] (Descamps *et al.*, données non publiées pour la grippe). Les auteurs ont montré que les liquides de lavages broncho-alvéolaires des souris IRAP KO infectées par *P. aeruginosa* contenaient des concentrations plus élevées de cytokines inflammatoires (CXCL1, IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) que les souris de type sauvage (WT). Les MAs IRAP KO infectés *ex vivo* par *P. aeruginosa* sécrétaient plus d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  que leur homologue WT en réponse à une stimulation du TLR9 [206]. De plus, les réponses induites par l'activation des TLR7 et TLR9 suite à des stimulations par l'imiquimod et le CpG, respectivement, sont augmentées dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse, les CDp de la rate et les cellules épithéliales pulmonaires en l'absence de IRAP ([206] et Descamps *et al.*, données non publiées). Ces résultats suggèrent que la protéine IRAP limite l'exacerbation de la pathologie respiratoire en modérant

l'inflammation grâce au contrôle de l'activation des PRRs. L'étude précise du contrôle de l'activation de ces TLRs par IRAP n'a pu être possible qu'avec le TLR9, compte tenu de l'absence de bons anticorps anti-TLR7. La signalisation TLR9 est augmentée en l'absence de IRAP dans les BMDCs. L'interaction entre la protéine adaptatrice MyD88 et les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B ou IRF-7 est plus forte dans les cellules IRAP KO et les réponses inflammatoires et les sécrétions d'IFN-I sont augmentées [206]. La protéine IRAP interagit avec la protéine du cytosquelette FHOD4 dans les cellules dendritiques. Dès lors, le modèle d'activation des TLR7 et TLR9 proposé par l'équipe de Loredana Savaenu est que, grâce à l'interaction de la protéine IRAP avec le cytosquelette, la maturation endo-lysosomale et l'acidification des endosomes IRAP<sup>+</sup> sont ralentis, limitant alors les réponses inflammatoires et anti-virales (figure 9). Ce travail permet d'identifier la protéine IRAP comme un régulateur clé du trafic intracellulaire de vésicules participante à l'activation pH-dépendante de TLRs endosomaux dans la cellule dendritique.

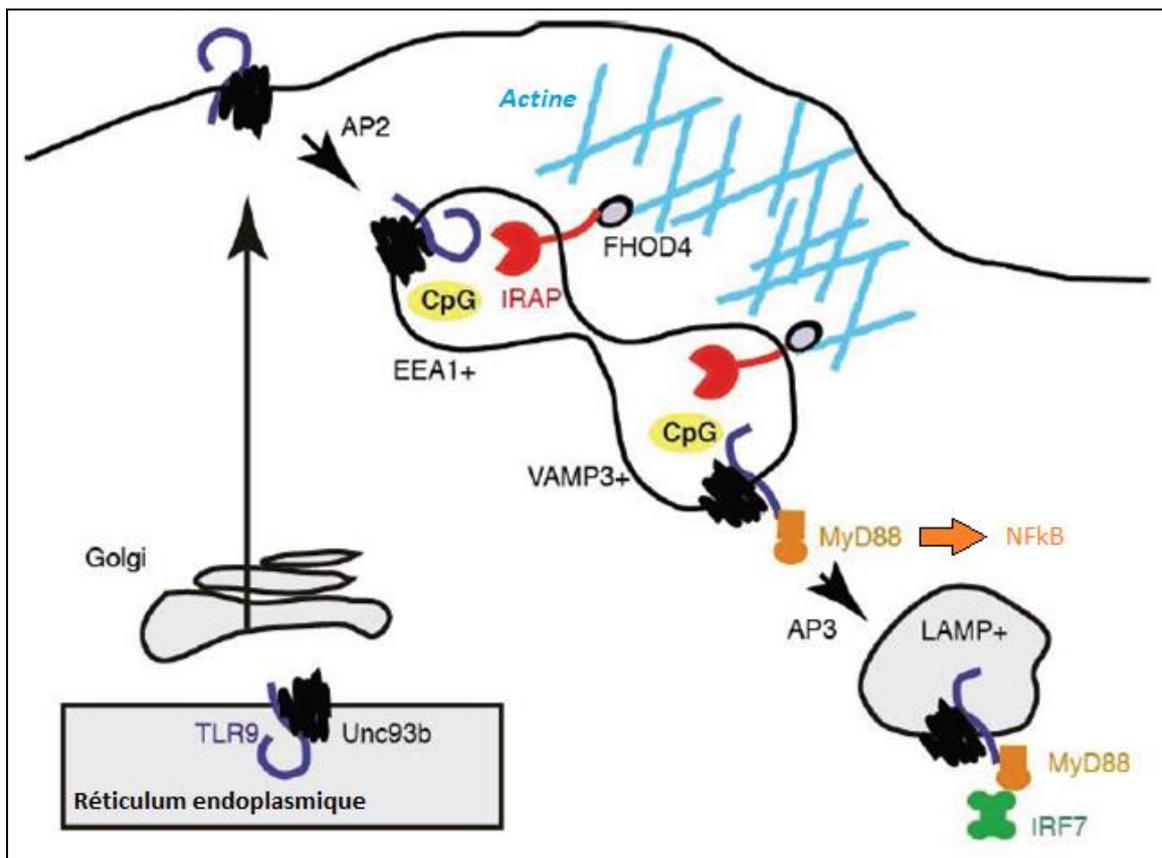


Figure 9. Modèle d'activation du TLR9 proposé par l'équipe de Loredana Saveanu. En conditions basales, le TLR9 est retenu dans le réticulum endoplasmique (RE). Après une stimulation cellulaire, le complexe TLR9-Unc93b se dirige vers la surface cellulaire pour être ensuite internalisé de façon dépendante de la clathrine grâce à l'acquisition de la protéine adaptatrice AP2, qui contribue au trafic membranaire intracellulaire. Le TLR9 atteint les

*endosomes IRAP<sup>+</sup> qui contiennent le CpG. Les vésicules IRAP<sup>+</sup> fusionnent avec des vésicules EEAI<sup>+</sup> VAMP3<sup>+</sup> (marqueurs d'endosomes précoces et de recyclage) pour recruter MyD88 et activer NFκB. L'acquisition d'AP3 permet le transport du TLR9 à des vésicules LAMP<sup>+</sup> (lysosomes), probablement par l'intermédiaire des microtubules, d'où la signalisation via IRF7 est possible. La polarisation de l'actine autour des compartiments endosomaux retarde le transport des CpG et TLR9 aux lysosomes. L'interaction de la protéine IRAP avec FHOD4 encadre les endosomes contenant les CpG et TLR9 au réseau d'actine, bloquant leur transport vers les lysosomes limitant ainsi l'activation du TLR9. Adapté de [206].*

## **5. L'environnement pulmonaire en période néonatale : un facteur de sensibilité à l'infection par le VRS**

### **5.1. Le développement de l'arbre respiratoire**

Le nez, les fosses nasales, la bouche, le pharynx et le larynx composent les voies aériennes supérieures. La trachée fait suite au larynx. Chacune des deux bronches souches partant de la trachée pénètre dans un des deux poumons donnant naissance aux voies aériennes inférieures. Selon leurs fonctions, les voies respiratoires profondes sont divisées en une partie conductrice et une partie respiratoire. A partir de la trachée, les voies aériennes se divisent par dichotomie. A chaque branchement, le nombre de conduits double alors que le diamètre diminue. Il y a 23 divisions et les 16 premières englobent des voies conductrices. Elles comprennent différentes bronches pour arriver jusqu'aux bronchioles terminales. La partie respiratoire (zone de transition et d'échanges gazeux) compte sept générations de voies aériennes. Les bronchioles terminales donnent naissance à plusieurs générations de bronchioles respiratoires avec l'apparition d'alvéoles au niveau de leur paroi permettant alors le début des échanges gazeux. L'arbre respiratoire se termine par les canaux et les sacs alvéolaires. La paroi des voies aériennes est formée de trois tuniques dont la composition varie tout au long du tractus respiratoire. En partant de la lumière, l'épithélium et le chorion forment la muqueuse qui repose sur une couche cartilagineuse. La structure de l'épithélium varie en fonction du diamètre des voies aériennes.

Le développement pulmonaire comprend principalement trois périodes qui peuvent se recouvrir. Les durées des différentes phases sont indiquées en jours post-conception (jpc) entre parenthèses et correspondent à l'humain (H) ou à la souris (S) (figure 10) :

- Embryonnaire (H : 26-49 jpc, S : 9,5-12 jpc)
- Fœtale (H : 35-266 jpc, S : 12 jours jpc à 4 jours après la naissance)
- Post-natale (H : jusqu'à environ 20 ans, S : 4 à environ 36 jours après la naissance)

La période embryonnaire comprend l'organogénèse au cours de laquelle les bourgeons pulmonaires vont s'allonger et débiter une morphogénèse ramifiée à l'origine du futur "arbre respiratoire". Les ramifications pulmonaires se dessinent progressivement et commenceront à se recouvrir de cartilage à la fin de l'embryogénèse.

La période fœtale se distingue par trois niveaux de développement des poumons que sont les étapes pseudoglandulaire, canaliculaire et sacculaire. L'étape pseudoglandulaire (H : 35-119 jpc, S : 12-16,5) se traduit chez l'Homme par l'apparition des vingt premières générations des futures voies respiratoires. A la fin de cette étape, les premières générations de canaux alvéolaires sont déjà esquissées. De plus, à ce stade, les premières cellules épithéliales ciliées, caliciformes et basales sont présentes au niveau proximal des conduits aériens pour ensuite naître vers la périphérie. A l'étape canaliculaire (H : 112-182 jpc, S : 16,5-17,5) les cellules épithéliales se différencient permettant ainsi la distinction entre les voies de conduction de l'air et les voies respiratoires. A ce stade l'unité respiratoire appelée acinus est alors décelable et la barrière alvéolo-capillaire commence à apparaître. L'épithélium encore cuboïde des futures conduits alvéolaires va se différencier en cellules épithéliales alvéolaires de type I ou II. Les cellules de type I de par leurs extensions couvrent la majeure partie de la surface alvéolaire. Les cellules de type II, précurseurs du type I, s'intercalent entre ces dernières, souvent au niveau de la rencontre de trois *septa* alvéolaires. A ce niveau, l'endothélium des capillaires sanguins se trouve en contact étroit avec les cellules alvéolaires de type I pour former la future barrière alvéolo-capillaire. L'étape sacculaire (H : 168-266 jpc, S : 17,5 jpc à 4 jours après la naissance) est l'étape intermédiaire entre la fin de la morphogénèse ramifiée et l'alvéolarisation qui a déjà débuté à la période canaliculaire. La surface d'échanges gazeux croît et à ce stade du développement les précurseurs des cellules de muscles lisses commencent à former un réseau de fibres élastiques et de fibrilles de collagène nécessaire à l'alvéolarisation.

Chez l'Homme, les poumons du nouveau-né arrivé à terme présentent un début d'alvéolarisation. Le nombre de *septa* augmente agrandissant ainsi la surface d'échanges alvéolo-capillaires. Cette phase se poursuit au moins aussi longtemps que les poumons se développent soit environ jusqu'à vingt ans (pour revue [224]).

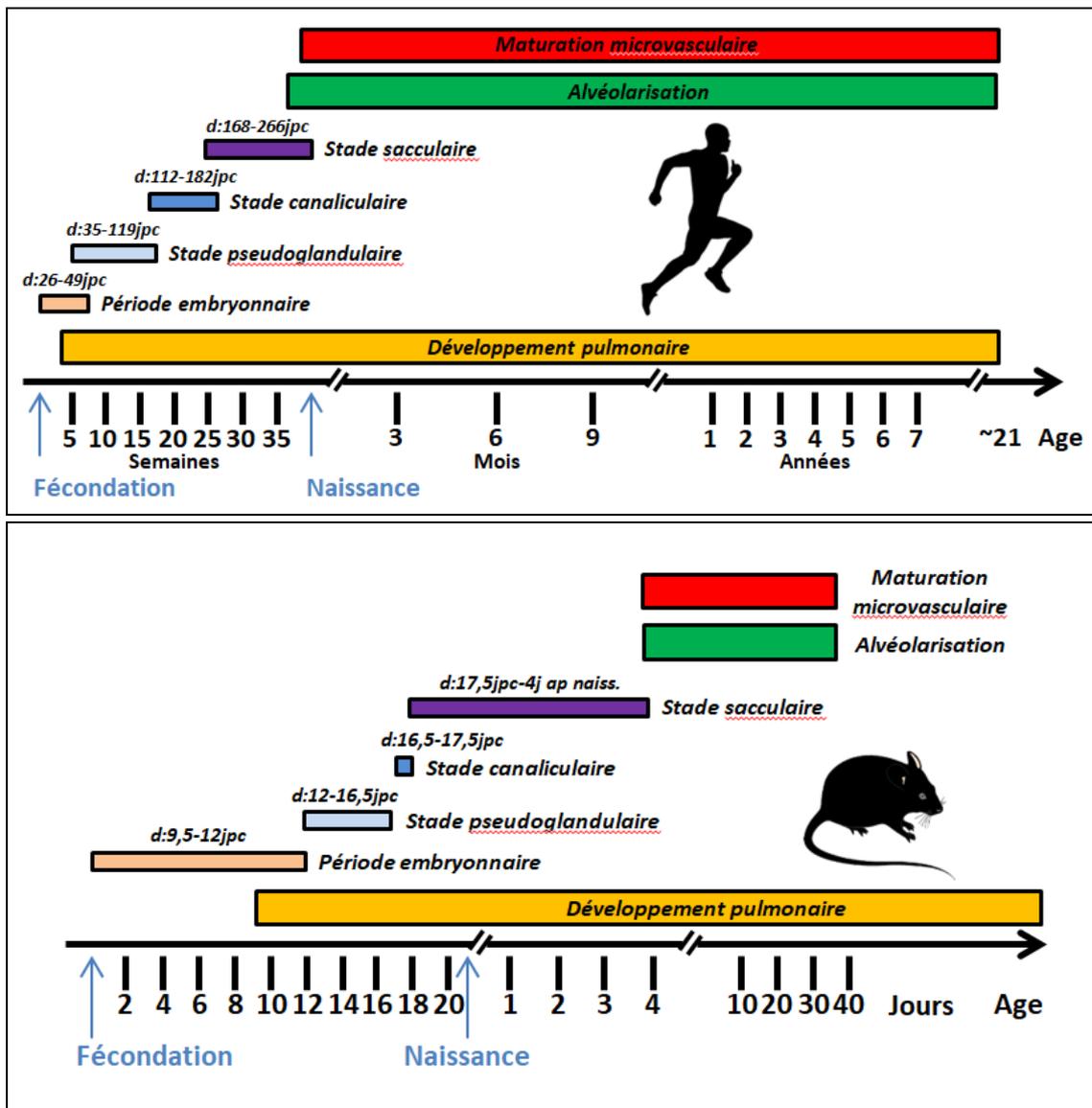


Figure 10. Développement pulmonaire au cours du temps. d : durée, jpc : jours post-conception. Adapté de [224].

## 5.2. La maturation immunitaire du poumon néonatal : mise place d'un environnement immunitaire de type 2 et sensibilité à l'infection par le VRS

Au cours de la période d'alvéolarisation, juste après la naissance, le poumon néonatal est nouvellement exposé à de nombreux stimuli d'origine environnementale mais aussi endogènes comme la sécrétion de chimiokines et de cytokines. Ces changements influencent le développement du système immunitaire associé à la muqueuse pulmonaire. À l'état basal, la composition cellulaire initiale du poumon néonatal favorise naturellement le développement d'une réponse immunitaire de type Th2 [225,226]. Cette orientation prédéfinie de la réponse immunitaire peut être influencée par les cellules immunitaires résidentes dans le poumon et les cellules épithéliales qui produisent différents médiateurs de l'immunité innée lors de la

détection du VRS. La réponse immunitaire innée contrôle la phase précoce de l'infection mais influence aussi la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. En utilisant des modèles animaux, de nombreux travaux ont révélé que les événements immunitaires précoces influencent de manière décisive la sensibilité néonatale à l'infection par le VRS [146]. Dans les paragraphes qui suivent, à partir d'études menées principalement avec le modèle murin, je décrirai les réponses innées des cellules immunitaires résidentes pulmonaires à l'infection par le VRS et montrerai comment ces réponses contribuent au développement et/ou au maintien de l'immunité anti-VRS de type 2.

5.2.1. *Le macrophage alvéolaire, première cellule de l'immunité innée à rencontrer les pathogènes de l'environnement extérieur*

Les cellules immunitaires commencent à coloniser les poumons pendant la phase pseudoglandulaire. Elles sont majoritairement composées de macrophages CD45<sup>+</sup> dérivant du sac vitellin et de monocytes du foie fœtal qui entrent dans les poumons au début de la phase sacculaire [227] (figure 11).

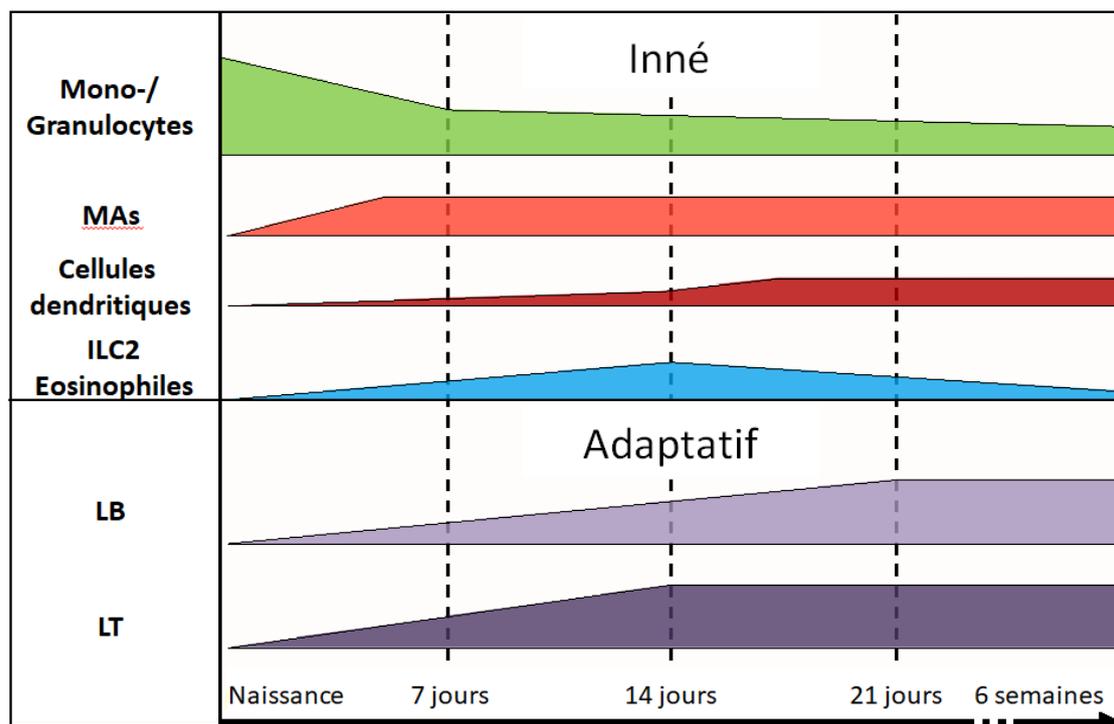


Figure 11. Colonisation des poumons par les cellules immunitaires pendant la période post-natale (représentation schématique des fréquences cellulaires parmi les cellules pulmonaires CD45<sup>+</sup>). MAs, macrophages alvéolaires ; ILC2, innate lymphoid cells 2 ; LB, lymphocyte B ; LT, lymphocyte T. Figure extraite de la revue [228].

A la naissance, les cellules épithéliales produisent en fortes quantités le facteur de croissance *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). Le GM-CSF va promouvoir le développement des MAs à partir des monocytes fœtaux [227,229]. Dans le modèle murin, les MAs apparaissent un jour après la naissance pour atteindre leur maximum d'abondance vers trois jours de vie par rapport au nombre d'alvéoles générées à ce stade du développement. Chez la souris, quatorze jours après la naissance, le nombre de macrophages, monocytes et granulocytes dans les poumons a atteint son niveau adulte. Un jour après la naissance un afflux de granulocytes est brièvement observé dans les poumons (observation non publiée de D. Laubretton ; [225]).

Chez les souris adultes, les MAs ont un rôle important dans la production rapide de molécules pro-inflammatoires et antivirales (TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL3 et IFN- $\alpha/\beta$  et - $\gamma$ ) et dans l'activation et/ou le recrutement de cellules NK [168,230,231]. Les MAs sont connus pour être une population cellulaire flexible qui s'adapte au microenvironnement de la lumière des voies respiratoires. De la même manière qu'il existe une classification des cellules T (phénotype Th1, Th2...), les macrophages ont également été catégorisés en «macrophages activés classiquement» (*classically activated macrophages* : CAMs ou M1) ou «macrophages alternativement activés» (*alternatively activated macrophages* : AAM ou M2), sur la base des cytokines favorisant leur activation (respectivement IFN- $\gamma$  et IL-4) et de leurs fonctions (respectivement inflammation et réparation tissulaire) (pour revue [232,233]). Chez des souris adultes, l'infection par le VRS induit rapidement l'apparition de MAs de type M1 qui ensuite font place à des cellules M2 réduisant la pathologie pulmonaire [155]. La polarisation des MAs au cours de l'infection par le VRS semble dépendre de l'âge. Empey *et al* (2012) ont démontré que les MAs néonataux présentent un retard de leur différenciation vers un phénotype M1 lors de l'infection par le VRS, probablement dû à une très faible production d'IFN $\gamma$  dans leur environnement. Ils suggèrent que l'induction du phénotype M1 en amont du phénotype M2 est une étape importante pour le développement d'une réponse antivirale efficace [234]. De plus, la déplétion des MAs chez les souriceaux est associée à une réduction de l'élimination du VRS et à un retard du gain de poids [235]. Comprendre les mécanismes qui déclenchent la polarisation des MAs néonataux lors de l'infection par le VRS permettrait d'améliorer nos connaissances sur la sévérité de la bronchiolite en période néonatale.

### 5.2.2. Le rôle des cellules lymphoïdes innées dans la sensibilité à l'infection par le VRS

Au début de la période d'alvéolarisation, un recrutement de cellules innées de type 2 (ILC2, mastocytes, éosinophiles et basophiles) est observé. Leur fréquence atteint un

maximum au quatorzième jour de vie puis diminue jusqu'au sevrage [225,226]. Les cellules ILC2 appartiennent à la famille des cellules lymphoïdes innées qui comprend trois groupes de cellules classées en fonction de leur profil de production cytokinique. Le groupe 1 comprend les cellules ILC1 et NK en raison de leur production d'IFN $\gamma$ , tandis que celui des ILC2 a été défini selon leur capacité à produire des cytokines de type Th2 telles que l'IL-4 et l'IL-5. Les ILC3 sont quant à elles productrices d'IL-17 [236]. Une étude récente a montré qu'après la première inspiration, l'épithélium pulmonaire produit une quantité élevée d'IL-33 [226]. L'IL-33 est une alarmine appartenant à la famille de l'IL-1 qui est principalement sécrétée par les cellules stromales telles que les cellules épithéliales ou endothéliales [237]. L'IL-33 signale par son récepteur ST2 présent à la membrane des macrophages, des cellules dendritiques, des mastocytes et des ILC2 [238]. L'IL-33 produite par les cellules épithéliales pulmonaires contribue à la promotion de l'immunité de type 2 dans les poumons des souris en favorisant l'accumulation d'ILC2 pendant la période d'alvéolarisation. Cette sécrétion d'IL-33 stimule la production d'IL-5 et d'IL-13 par les ILC2 à l'homéostasie [225,226,237]. À notre connaissance, ni les ILC1 ni les ILC3 n'ont pu être mises en évidence dans les poumons murins [239,240]. En ce qui concerne les cellules NK, elles représentent jusqu'à 10 % des lymphocytes résidents dans les poumons des souris adultes mais, leur proportion chez les nouveau-nés n'a pas encore été déterminée [241].

La contribution des ILC2 et de l'IL-33 à la sensibilité néonatale au VRS a été récemment étudiée. L'exposition néonatale au VRS renforce la sécrétion précoce d'IL-33 par les cellules épithéliales respiratoires alors que ceci n'est pas observé chez les souris adultes. L'IL-33 joue un rôle majeur dans la sévérité de l'infection par le VRS en favorisant une augmentation du nombre d'ILC2 et de la production d'IL-13 dans les poumons de souris [242]. L'IL-13, l'IL-33 et la *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) ont également été mises en évidence au niveau des sécrétions nasales chez des nourrissons hospitalisés pour une bronchiolite [242,243]. Des souris adultes déficientes pour la production de TSLP ne présentent plus d'activation ni de prolifération des ILC2 lors de l'infection par le VRS [244]. Dans les poumons néonataux, les ILC2 peuvent promouvoir un changement de phénotype des MAs ou des cellules dendritiques vers une réponse de type 2 à l'état basal ou dans un modèle d'asthme induit par les acariens [225,226]. L'analyse de la production d'IFN-I dans les poumons de souris en réponse à l'infection par le VRS met en évidence un défaut de production globale des IFN- $\alpha$  et - $\beta$  [189]. Les MAs et les cellules dendritiques sont les principales sources d'IFN-I au cours de l'infection par VRS de souris adultes [168,181]. Par conséquent, il est possible que les ILC2 contribuent à l'incapacité des souris à mettre en

place une réponse IFN-I efficace lors de l'infection par le VRS en orientant les réponses cytokiniques des cellules dendritiques et des MAs vers un phénotype de type 2.

### 5.2.3. *Les cellules dendritiques, un lien essentiel entre immunité innée et adaptative*

Le GM-CSF contrôle également le développement des cellules dendritiques dans les poumons [245]. Ces cellules sont extrêmement rares dans les voies respiratoires après la naissance mais leur fréquence augmente graduellement avec l'âge [246]. De la période embryonnaire jusqu'à deux jours après la naissance, les CDmo CD11b<sup>+</sup> CD64<sup>+</sup> forment la majorité des cellules dendritiques des poumons [225]. Ensuite, les CDc CD11b<sup>+</sup> ou CD103<sup>+</sup> deviennent majoritaires. Vers 21 jours de vie les populations pulmonaires de cellules dendritiques sont similaire à celles de l'adulte [225].

Au cours de la phase d'alvéolarisation, les cellules dendritiques néonatales expriment fortement le ligand de OX40 (OX40L ou CD252) [225,247]. OX40L et son récepteur apparenté OX40 (CD134), appartiennent à la superfamille du TNF. OX40L est principalement exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes tandis que OX40 est exprimé sur les cellules T activées. L'interaction OX40L-OX40 est impliquée dans l'activation, la survie des cellules T et la génération de lymphocytes T mémoires à partir de cellules T effectrices activées [248]. Neutraliser OX40L dans un modèle d'asthme permet de limiter le développement d'une réponse immunitaire de type Th2 et l'inflammation pulmonaire [249,250]. Lors de l'infection de souriceaux par le VRS, les sécrétions de TSLP et d'IL-33 favorisent l'expression de OX40L à la surface des cellules dendritiques CD11b<sup>+</sup> [225,247]. L'activité du complexe OX40L-OX40 dépend de l'environnement cytokinique pulmonaire dans lequel évoluent les cellules dendritiques. Ainsi, un tissu pulmonaire enrichi en TSLP et IL-33 et pauvre en IL-12 favorise une réponse cellulaire T de type Th2 *via* l'augmentation de l'expression de OX40L à la surface des cellules dendritiques au cours de l'infection néonatale par le VRS [225,247].

La réponse immunitaire adaptative est initiée par les cellules dendritiques qui transitent des poumons infectés aux ganglions lymphatiques respiratoires drainants afin d'amorcer les réponses lymphocytaires T. Notre groupe et d'autres ont décrit des déficiences majeures dans leurs fonctionnalités dans les poumons néonataux à la suite de l'infection par le VRS [181,189,251]. Comparativement aux adultes, les CDc sont peu nombreuses dans les poumons et les ganglions lymphatiques des souriceaux infectés par le VRS, avec une proportion accrue de CDc CD103<sup>+</sup> [189,251]. Les cellules dendritiques néonatales ont également une plus faible expression de la molécule de co-stimulation CD86 et sont donc

moins efficaces dans la présentation de l'antigène [251]. De plus, une moindre mobilisation pulmonaire des CDp, importantes productrices d'IFN- $\alpha/\beta$ , et une faible activation de la voie IFN-I sont décrites chez les souriceaux infectés par le VRS [181,189]. La production d'IFN-I est importante non seulement pour induire une réponse antivirale efficace mais aussi, pour amplifier la réponse pro-inflammatoire dans les poumons de souris adultes [252]. L'administration d'IFN- $\alpha$  ou l'augmentation du nombre de cellules dendritiques pulmonaires grâce au transfert adoptif de cellules adultes ou *via* l'administration d'un facteur de croissance hématopoïétique (le ligand Flt3 (Flt3-L)), boostent la signalisation IFN-I lors de l'infection néonatale et diminuent l'immunopathologie au cours de la réinfection des adultes [181,189]. Ainsi, la production d'IFN-I par les cellules dendritiques mais peut-être aussi par d'autres cellules comme les MAs apparaît comme un facteur clé de la sensibilité néonatale à l'infection par le VRS [181,189,253].

#### 5.2.4. *Le développement de l'immunité adaptative*

De la même manière que les cellules dendritiques, les cellules T et B s'accumulent progressivement dans les poumons de la naissance au sevrage [225]. Les poumons de souriceaux de six jours contiennent quatre fois moins de lymphocytes CD3<sup>+</sup> que le tissu pulmonaire adulte [246]. La population de cellules T néonatales est enrichie en cellules T CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> GATA3<sup>+</sup> alors que les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont moins représentées que chez les adultes [246]. Aucune différence entre les cellules pulmonaires NKT et  $\gamma\delta$  n'est observée entre les adultes et les nouveau-nés. L'infection par le VRS induit une forte prolifération de lymphocytes Th2 CD4<sup>+</sup> IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> et un défaut d'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> avec une moindre production d'IFN- $\gamma$  dans les poumons néonataux (Christiaansen et al., 2014; Tregoning et al., 2008).

Six jours après la naissance, le tissu pulmonaire néonatal contient cinq fois moins de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> que les tissus adultes. Néanmoins, on ne sait que peu de choses sur les cellules B dans les poumons néonataux. Notre groupe a observé que la population de cellules B néonatales pulmonaires est enrichie à la fois en cellules B immatures et en cellules B régulatrices néonatales (nBregs) de type inné (Laubretton D. et Descamps D., données non publiées). Les nBregs ont été récemment caractérisés dans le sang de cordon de nouveau-nés par l'équipe de Richard Lo-Man. La fréquence de cette sous-population dans les sécrétions nasales est considérée comme un marqueur prédictif de sévérité de la bronchiolite à VRS chez les nourrissons [254]. L'infection par le VRS des nBregs induit la production d'IL-10 par ces cellules et réduit les réponses cellulaires de type Th1 [254]. De plus, la production d'IL-10

par les nBregs dans les poumons pourrait être induite par l'IL-33, comme précédemment décrit dans les intestins [255].

L'ensemble de ces résultats indique l'existence d'une immunité innée de type 2 précocement induite lors de l'infection par le VRS dans les poumons néonataux (figure 12). Cette particularité immunologique doit être prise en compte pour développer des approches thérapeutiques pertinentes contre le VRS.

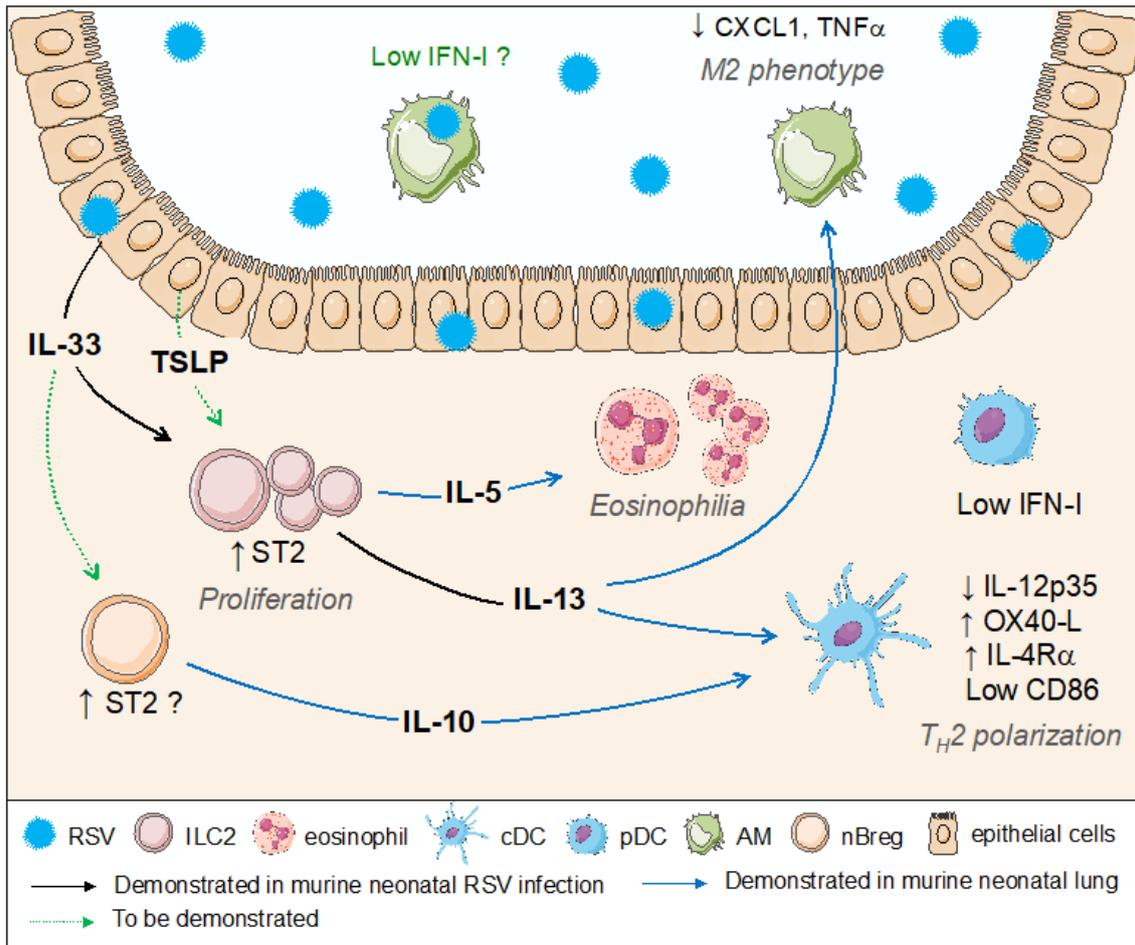


Figure 12. Réponses immunitaires innées des cellules résidentes pulmonaires à l'infection par le VRS au cours de la période néonatale. L'exposition néonatale au VRS entraîne une sécrétion précoce d'IL-33 par les cellules épithéliales respiratoires. L'IL33 signale par l'intermédiaire du récepteur ST2 localisé notamment à la membrane des ILC2. Cette alarmine est à l'origine de l'augmentation du nombre d'ILC2 et de la production d'IL-13 dans les poumons de souris infectées par le VRS. Les ILC2 peuvent contribuer à la polarisation des MAs ou des cellules dendritiques vers un phénotype de type 2 à l'état basal ou dans un modèle d'asthme induit par les poussières d'acariens. Concernant l'activation des voies IFN-I au cours de l'infection néonatale par le VRS, les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont peu mobilisées dans les poumons et produisent de faibles quantités d'IFN-I. Les MAs sont la principale source d'IFN-I dans les poumons de souris adultes infectées par le VRS, mais la question reste ouverte pendant la période néonatale. Par conséquent, il est probable que les ILC2 soient indirectement responsables de l'incapacité des souris à mettre en place une réponse IFN-I efficace pour contrer l'infection par le VRS. De plus, les nBreg sécréteurs d'IL-10 pourraient également contribuer à l'immunité de type 2 induite par l'infection par le VRS au cours de la période néonatale. Figure extraite de la revue [228].

### 5.2.5. *Le développement de l'environnement pulmonaire est en lien avec l'acquisition d'un microbiote respiratoire*

Pendant longtemps le poumon a été considéré comme un environnement stérile. D'ailleurs le *National Institute of Health* (NIH) a initié en 2008 le projet d'envergure intitulé *Human Microbiome Project* en excluant le poumon comme site d'investigation de l'écologie microbienne [256]. Néanmoins, grâce à l'essor des techniques de séquençage à haut débit, diverses communautés microbiennes ont pu être isolées dans les poumons d'individus adultes. Malgré les difficultés d'investigation rencontrées (cohortes de patients réduites, standardisation des procédés de prélèvements...), les Bacteroidetes, les Firmicutes, les Proteobacteria et les Actinobacteria, sont les organismes microbiens les plus communément isolés. Prevotella, Fusobacteria, Veillonella, Streptococcus, Pseudomonas mais aussi Haemophilus et Neisseria sont les genres bactériens les plus couramment détectés [257–260].

#### *a. L'acquisition et la diversification progressive du microbiote pulmonaire commensal*

L'étude du microbiote pulmonaire en période néonatale est rare mais commence à émerger grâce au modèle murin. L'équipe de Anne Schöler a récemment montré chez des souris BALB/c que le microbiome du poumon se diversifiait et se stabilisait avec l'âge [261]. Le phylum majoritaire dans les poumons de souriceaux de cinq jours est celui des Firmicutes avec une majorité de Streptocoques et de Staphylocoques. Avec l'âge, il se produit une augmentation et une diversification des populations de Proteobacteria et d'Actinobacteria. Après deux mois de vie, les genres Bacillus, Kocuria, Granulicatella, Haemophilus, Nocardioïdes et Propionibacterium deviennent particulièrement présents dans les poumons de souris adultes. De plus, la composition du microbiote pulmonaire de jeunes souris (3 semaines) par rapport à celle de souris adultes (8 semaines) s'avère plus sensible à une dysbiose d'origine environnementale provoquée par la mise en contact des souris à de la litière déjà souillée (corrélation élevée entre la composition en espèces bactériennes de la litière et des poumons) [261]. Ces résultats s'accordent avec les données proposées par Gollwitzer *et al* (2014) qui soulignent une stabilisation du microbiote pulmonaire à partir de deux semaines de vie et l'abondance relative des Firmicutes en période néonatale. Ils observent aussi qu'à l'âge adulte les Bacteroidetes sont particulièrement abondants dans les poumons humains [262]. Malgré le peu de travaux disponibles chez les nouveau-nés, deux études menées à partir d'aspirats trachéaux montrent la prédominance des Firmicutes (dont Staphylococcus et Lactobacillus) et des Proteobacteria (dont Pseudomonas et Enhydrobacter)

dans les six heures de vie de nourrissons prématurés ou nés à terme [263,264]. L'étude du microbiome nasopharyngial au cours de la première année de vie montre aussi l'abondance de ces deux phylums. Néanmoins, parmi les Proteobacteria, on retrouve préférentiellement les genres *Moraxella* (31,2%) et *Haemophilus* (9,7%) alors que les Firmicutes se composent majoritairement de Streptocoques (15,5%) et de Staphylocoques (10,3%) [265]. Ainsi, l'ensemble de ces travaux indique l'existence d'une flore microbienne pulmonaire propre à la période néonatale à la fois chez l'Homme et la souris. A l'âge adulte, on assiste à une diversification des populations bactériennes commensales des poumons au sein de l'ensemble des phylums définissant alors, un riche microbiote pulmonaire paraissant moins sensible à la dysbiose que le microbiote néonatal.

*b. L'influence du microbiote respiratoire sur la composition et la maturation fonctionnelle des cellules pulmonaires*

La colonisation bactérienne des poumons dès la naissance coïncide avec l'existence d'une « fenêtre de sensibilité » ou « fenêtre d'opportunité » néonatale pendant laquelle les nourrissons sont particulièrement fragiles à l'infection par le VRS. A cet âge, l'immunité innée est la seule barrière immunitaire disponible en raison de la disparition des anticorps d'origine maternelle et au lent développement des défenses immunitaires adaptatives. Le microbiote commensal favorise la mise en place d'une immunité pulmonaire qui peut-être protectrice vis-à-vis de pathologies respiratoires mais aussi défavorable selon la composition bactérienne [265].

La présence d'un microbiote respiratoire dès les premières heures de vie pose naturellement la question de l'interaction de ce microbiote avec l'ensemble de l'environnement pulmonaire. Grâce aux souris axéniques ou « *germ-free* », élevées dans des conditions excluant toute colonisation de leurs organes par des microorganismes de l'environnement extérieur, il est possible d'étudier l'influence de la composition bactérienne des poumons sur le développement immunitaire respiratoire. L'équipe de Nicola Harris a montré que l'existence d'une flore bactérienne commensale favorise la présence de MAs dont le rôle serait bénéfique contre l'allergie provoquée par l'administration d'ovalbumine [266]. Cheng *et al* (2017) suggèrent également qu'un changement de la composition bactérienne des voies aériennes hautes peut influencer le phénotype des MAs. Grâce à l'administration répétée d'antibiotiques à des souris adultes, ils ont montré qu'une diminution de la charge bactérienne intranasale et un changement de sa composition (principalement composée de Firmicutes et d'Actinobacteria) favorise une polarisation M2 des MAs. Ces MAs produisent des cytokines

de type 2 (IL-10 et IL-13) et pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-6), ainsi que la chimiokine CCL24 qui est particulièrement impliquée dans le recrutement des éosinophiles [267]. D'autre part, l'équipe de Benjamin Marsland a montré que l'apparition progressive du microbiote pulmonaire au cours des deux premières semaines de vie des souriceaux s'accompagne de l'émergence d'un sous-groupe de lymphocytes T régulateurs à l'origine d'une diminution de la sensibilité aux poussières d'acariens [262]. De plus, l'acquisition précoce d'un microbiote pulmonaire permet de contrôler l'apparition des cellules *invariant natural killer T* (iNKT), une population pro-inflammatoire de l'immunité innée à fort potentiel allergisant [268].

L'impact de la colonisation bactérienne sur la maturation fonctionnelle de l'épithélium respiratoire n'a pas encore été décrit. Néanmoins, les équipes de Ulrich Schaible et de Muriel Thomas ont montré que la présence d'une flore bactérienne pulmonaire favorise une alvéolarisation plus riche qu'en l'absence de flore microbienne tandis que l'épaisseur de la muqueuse épithéliale reste inchangée [269,270]. On peut faire l'hypothèse que la composition cellulaire des poumons évolue avec l'âge en fonction de l'acquisition du microbiote commensal. Ce lien entre microbiote et maturation des défenses immunitaires a été démontré dans l'intestin et le colon [271,272].

Beaucoup de travaux soulignent l'existence d'un lien étroit entre la survenue d'infections respiratoires sévères au cours des premières années de vie et l'apparition de troubles respiratoires chroniques (pour revue [273]). Il n'existe cependant pas de travaux montrant l'influence de la composition bactérienne des poumons sur la survenue de la bronchiolite à VRS. La composition du microbiote commensal des poumons pourrait être responsable des séquelles immunopathologiques néonatales laissée par l'infection VRS et du risque de survenue de troubles respiratoires chroniques. La réponse immunitaire aux pathogènes respiratoires tel que le VRS pourrait donc être modulable en fonction de la composition bactérienne des poumons.

## **6. Les stratégies d'immunomodulation potentielles pour combattre l'infection par le VRS au cours de la période néonatale**

Le début de la vie est un moment critique pour le développement de l'immunité et la survenue de pathologies pulmonaires. Les interventions immunomodulatrices ciblant cette période de la vie sont susceptibles d'influencer le développement du système immunitaire et donc la sensibilité aux pathogènes (pour revue [274]). De nombreuses études utilisant des souris à différents âges de la vie ont montré la possibilité de tirer parti de certaines stratégies d'immunomodulation des défenses innées afin de modifier la sensibilité pulmonaire néonatale

à l'infection par le VRS. Certaines stratégies que je vais citer dans les prochains paragraphes ont d'abord été utilisées dans le but de comprendre le rôle protecteur de la réponse immunitaire innée au cours de pathologies respiratoires (infection par le VRS ou asthme) puis, proposées pour quelques-unes comme perspectives thérapeutiques anti-VRS. D'autres ont été directement conçues comme nouvelle stratégie d'intervention anti-VRS (Tableau 4).

Tableau 4. Stratégies de modulation de l'immunité innée néonatale à potentiel anti-VRS

A = adulte ; E = enfant ; N = nouveau-né. Issu de Drajac et al. 2017

Stratégie	Cible	But	Produit biologique	Catégorie	Voie d'administration	Modèle d'étude	Ref.
<b>Contre la faible réponse IFN-I</b>	Cellules productrices d'IFN-I	Activation et recrutement	IFN-I Flt3-L	IFN- $\alpha$ Facteur de croissance	Intranasale ou parentérale	Souris (N)	[181, 189]
	Signalisation IFN-I	Activation	CpG SB 9200	Agonistes TLRs ou RLRs	Orale	Souris (A & N)	[279-281]
<b>Moduler le biais Th2 pulmonaire</b>	Cytokine de type 2	Blocage	Anti-IL13, anti-TSLP, anti-IL33	Anticorps	Parentérale	Humain (A) & Souris (A & N)	[284-285, 242, 244, 247, 283]
	Voies de signalisation	Blocage	Anti-IL-4R $\alpha$ Anti-STAT6	Oligonucléotide antisens Peptide inhibiteur	Intranasale	Souris (N)	[287-288]
<b>Moduler le microbiote des muqueuses</b>	Macrophages alvéolaires	Activation	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ recombinant	Intranasale	Souris (N)	[234-235, 290]
	Muqueuses intestinale et respiratoire	Maturation	Lacto-bacillus rhamnosus CRL1505	Bactéries vivantes ou tuées	Orale ou intranasale	Humain (E) & Souris (N)	[291-294]
	Muqueuse respiratoire	Maturation	Souches bactériennes primocolonisatrices des poumons	Bactéries vivantes	Intranasale	Souris (N)	[269]

## 6.1. Contrecarrer le défaut de production d'IFN-I dans les poumons

### 6.1.1. *L'augmentation du nombre et/ou de l'activation des populations cellulaires productrices d'IFN-I*

La faible production d'IFN-I lors de l'infection par le VRS corrèle avec la sévérité de la pathologie au cours de la période néonatale [181,189,253]. En effet le traitement de souriceaux avec l'IFN- $\alpha$  ou le Flt3-L avant l'infection par le VRS augmente le nombre de CDp dans les poumons, restaure partiellement la réponse IFN-I et limite les conséquences immunopathologiques de l'infection sur le long terme (voir partie 5.2.3) [181,189]. De plus, l'administration d'IFN- $\alpha$  diminue l'expression de l'IL-4R $\alpha$  sur les lymphocytes Th2 dont le rôle pathologique (hyperréactivité des voies aériennes, éosinophilie et hyperproduction de mucus) au cours de la réinfection de souris adultes par le VRS a été mis en évidence [275].

L'administration d'IFN- $\alpha$  en traitement curatif de nourrissons infectés par le VRS a été évalué dans plusieurs essais cliniques dans les années 1990s [276,277]. Le traitement n'a pas entraîné d'effets indésirables majeurs mais les résultats n'ont pas été probants. A titre d'exemple, l'injection intramusculaire quotidienne d'IFN- $\alpha$  chez des nourrissons infectés par le VRS pendant trois jours consécutifs n'a pas modifié l'évolution clinique globale, la durée d'oxygénation ou l'excrétion virale, bien que le traitement ait induit une baisse plus rapide du score clinique au cours des trois premiers jours d'hospitalisation [277]. Dans des essais cliniques impliquant des adultes volontaires en bonne santé, l'IFN- $\alpha$  recombinant administré par voie intranasale a montré une amélioration du score clinique lorsqu'il était administré avant l'inoculation virale, mais n'était pas efficace en tant qu'agent thérapeutique [278]. Ces données suggèrent que l'administration de l'IFN- $\alpha$  par voie muqueuse en traitement préventif chez l'humain limiterait la survenue de formes graves de l'infection par le VRS mais, cela nécessite d'être aussi testé au cours de la période néonatale. De par l'innocuité rapportée de l'IFN- $\alpha$  chez les nourrissons traités en curatif et les résultats encourageants des études réalisées chez les souriceaux, la conception d'un vaccin VRS contenant des adjuvants capables d'induire une production d'IFN-I satisfaisante pourrait être une stratégie préventive prometteuse.

### 6.1.2. *Le boost de la signalisation IFN-I via des agonistes des TLRs et des RLRs*

Plusieurs groupes proposent l'utilisation d'agonistes de synthèse des TLR ou des RLRs pour stimuler les réponses antivirales. La pré-exposition de souriceaux au CpG (ligand TLR9) avant la primo-infection par le VRS réduit la pathologie observée lors de la réinfection à l'âge

adulte. La stimulation du TLR9 réduit la propension néonatale à induire une réponse immunitaire de type Th2 au cours de l'infection. Cette stratégie d'immunomodulation accélère la maturation des cellules présentatrices d'antigènes néonatales ainsi que le recrutement de cellules NK dans les poumons [279]. D'autres stratégies de ciblage du TLR3 ont été testées chez la souris adulte, en utilisant le ligand synthétique poly(I:C) qui est un ARN double brin stabilisé avec de la poly-L-lysine carboxyméthyle cellulose (polyICLC). Cependant, l'administration de ce ligand induit un excès d'inflammation pulmonaire (recrutement de neutrophiles) lors de l'infection du rat du cotonnier par le VRS [280]. Ces résultats soulignent l'importance du choix du modèle animal lors de l'évaluation de thérapie anti-VRS. Récemment, le SB 9200 (Inarigivir), un promédicament dinucléotidique ciblant RIG-I et NOD2, a été présenté comme un nouvel agent immunomodulateur à visées prophylactique et thérapeutique dans le cadre de l'infection par le VRS par *Spring Bank Pharmaceuticals*. Chez la souris adulte, il a été observé que SB 9200 réduit la charge virale et l'inflammation pulmonaire tout en augmentant la production d'IFN-I [281]. À notre connaissance, il s'agit de la première stratégie d'immunomodulation ciblant les RLRs et NLRs qui pourrait être considérée comme une thérapie anti-VRS d'intérêt. Néanmoins, il serait pertinent de tester SB 9200 dans un modèle néonatal d'infection par le VRS en raison d'une fonctionnalité des PRRs et de réponses immunitaires cellulaires qui peuvent être différentes selon l'âge.

## **6.2. La modulation de l'activation des cellules respiratoires favorisant un environnement pulmonaire de type 2**

### *6.2.1. Le blocage des cytokines impliquées dans l'immunité de type 2*

Plusieurs études soulignent le rôle majeur de l'IL-13 dans l'hyper-réactivité bronchique des souris adultes lors de l'infection par le VRS [282,283]. Ainsi, le ciblage de l'IL-13 pourrait représenter une stratégie d'intérêt pour moduler les réponses néonatales à l'infection par le VRS. Chez les souris adultes, le traitement anti-IL-13 avant l'infection par le VRS réduit à la fois la charge virale et l'hypersécrétion de mucus et augmente la production d'IL-12 dans les poumons [283]. Il serait intéressant d'étudier l'effet du traitement anti-IL-13 sur des souriceaux car il a été montré que l'IL-13 est fortement sécrétée dans leurs poumons lors de l'infection par le VRS [242]. Une étude récente suggère que la TSLP pourrait également représenter une cible thérapeutique pertinente. En effet, Stier *et al* (2016) ont montré chez des souris adultes que la TSLP est nécessaire à la production d'IL-13 par les ILC2. Les souris adultes infectées par le VRS recevant un anticorps neutralisant anti-TSLP présentent une

réduction de la production d'IL-13 ainsi qu'une diminution de la charge virale et de la sécrétion de mucus au niveau des voies respiratoires [244]. En outre, l'administration d'anti-TSLP avant l'infection virale des souriceaux réduit l'expression d'OX40-L à la surface des cellules dendritiques réduisant ainsi leur capacité à promouvoir une polarisation Th2 et diminue le nombre d'éosinophiles dans les fluides de lavages broncho-alvéolaires [247]. Les deux stratégies (anti-IL-13 et anti-TSLP) font actuellement l'objet d'une évaluation clinique chez des patients adultes asthmatiques [284,285]. De même, l'administration d'un anticorps neutralisant l'IL-33 lors de la primo-infection par le VRS de souriceaux réduit la production d'IL-13, le nombre d'ILC2 dans les poumons et diminue la sévérité de la maladie après la réinfection à l'âge adulte [242].

#### 6.2.2. *Le blocage des voies de signalisation impliquées dans l'immunité de type 2*

Plusieurs groupes proposent d'interférer avec l'immunopathologie induite lors de l'infection néonatale par le VRS en ciblant les récepteurs de cytokines de type 2 ou des protéines impliquées en aval de leur signalisation. Shrestha *et al* (2017) ont montré que l'expression d'IL-4R $\alpha$  par les CDp et les CDc diminue avec l'âge. L'expression élevée d'IL-4R $\alpha$  sur les CDc CD11b<sup>+</sup> néonatales contribue à l'immunopathologie lors de la réinfection par le VRS [286]. De fait, la régulation négative de l'expression pulmonaire de l'IL-4R $\alpha$  avec des oligonucléotides anti-sens augmente la présence de marqueurs de maturation (CD80 et CD86) à la membrane des CDc CD11b<sup>+</sup> et conduit à la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules Th1 [286]. Lors de l'exposition au VRS, les souriceaux traités avec l'oligonucléotide présentent un taux plus élevé d'anticorps IgG2a (associés à la réponse Th1) que les souris non traitées alors que la charge virale est inchangée [287]. De plus, l'hyperréactivité bronchique au cours de la réinfection par le VRS est réduite par l'administration néonatale de l'oligonucléotide anti-IL-4R $\alpha$  [287]. En cohérence avec ces résultats, l'inhibition de l'activité de STAT6, un facteur de transcription essentiel dans la signalisation induite par la liaison à l'IL-4R $\alpha$ , par un peptide inhibiteur spécifique au cours de l'infection néonatale par le VRS diminue la sécrétion d'IL-4 et le nombre de MAs de type M2 dans les poumons. Lors de la réinfection par le VRS à l'âge adulte, cette stratégie d'immunomodulation néonatale empêche le recrutement d'éosinophiles et diminue l'hyperréactivité bronchique [288].

#### 6.2.3. *L'activation des MAs néonataux*

Plusieurs études ont rapporté que les MAs néonataux présentent un phénotype immature lors de l'infection par le VRS et ceci a été associé à une immunopathologie de type

Th2 après la réinfection à l'âge adulte [234,235,288]. La différenciation des MAs est contrôlée par la sécrétion locale d'IL-4 ou d'IFN- $\gamma$  [233]. Cependant, chez les souriceaux la production d'IFN- $\gamma$  est indétectable lors de l'infection par le VRS [234]. En outre, il a été montré que l'absence de production d'IFN- $\gamma$  au cours de l'infection néonatale influence la sévérité de la pathologie VRS lors de la réinfection des adultes [289]. L'injection intranasale d'IFN- $\gamma$  recombinant à des souriceaux infectés par le VRS induit une meilleure activation des MAs caractérisée par l'expression des marqueurs de MAs de type M1 (CD86, CMH-II et CCR7 et MR, *mannose receptor*) à leur surface et réduit la charge virale pulmonaire [234,235,290].

### **6.3. La maturation du système immunitaire pulmonaire par la modulation du microbiote respiratoire**

Plusieurs groupes ont axé leurs recherches sur la capacité des microorganismes probiotiques à stimuler le système immunitaire pulmonaire et à prévenir l'infection par le VRS au cours des premières années de la vie (pour revue [273]). Des études ont été réalisées avec la souche bactérienne *Lactobacillus rhamnosus* isolée à partir de lait de chèvre afin de contrôler l'infection par le VRS *via* la modulation de l'activation du TLR3 [291–293]. L'administration orale de *L. rhamnosus* CRL1505 à des souris BALB/c âgées de trois semaines réduit significativement la charge virale et les lésions pulmonaires inflammatoires provoquées par l'infection par le VRS [291]. Ainsi, *L. rhamnosus* CRL1505 administrée par voie orale est capable de moduler avantageusement l'immunité mucoale lors de l'exposition au VRS. Son administration nasale après avoir été inactivée par la chaleur augmente également la résistance des souris adultes à l'infection [294]. De plus, Villena *et al* (2012) ont montré que l'ingestion de ce probiotique réduit la fréquence et la sévérité des infections respiratoires dans un essai clinique randomisé impliquant 298 enfants âgés de deux à cinq ans en Argentine [293].

Parallèlement au microbiote intestinal, un microbiote pulmonaire colonise progressivement les voies aériennes pendant la période néonatale [262,269]. Sa composition et sa diversité peuvent affecter la physiologie de l'hôte et les défenses immunitaires des poumons (pour revue [273,274]). Il a d'ailleurs été observé que la composition du microbiote nasopharyngé des jeunes enfants peut influencer la propagation de l'infection par le VRS dans les voies respiratoires inférieures et peut moduler la réponse immunitaire de l'hôte au virus [265,295]. Le groupe de Muriel Thomas a récemment isolé différentes souches bactériennes primocolonisatrices des poumons de souriceaux afin de proposer une nouvelle approche de

modulation de la réponse immunitaire aux pathologies respiratoires. Ainsi, Remot *et al* (2017) ont montré dans un modèle d'induction de l'asthme au cours de la période néonatale que l'administration répétée d'une de ces souches pouvait aggraver ou résoudre la pathologie [269]. D'où l'intérêt d'évaluer cette stratégie dans le cadre de l'infection par le VRS.

L'ensemble de ces données indique que le contrôle de la réponse immunitaire au cours de la primo-infection par le VRS pendant la période néonatale peut prévenir la survenue de troubles respiratoires sur le long terme. Comprendre en quoi l'environnement néonatal pulmonaire présente des propriétés immunologiques spécifiques est un prérequis au développement d'approches thérapeutiques nouvelles et pertinentes afin de lutter efficacement contre l'infection par le VRS.

## **B. OBJECTIFS DE LA THESE**

La problématique de mon travail de thèse est de caractériser la réponse immunitaire innée mise en jeu lors de l'infection par le VRS en période néonatale afin d'expliquer les conséquences immunopathologiques à court et moyen terme (sévérité de l'infection pour le nourrisson et risque accru d'asthme chronique chez l'enfant).

Deux objectifs ont été identifiés pour aborder cette problématique :

- 1) Comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont à l'origine du défaut de la réponse IFN-I en période néonatale.

Pour cela, nous avons testé l'hypothèse que la protéine IRAP est un élément régulateur de la réponse IFN-I dans les MAs lors de l'infection du souriceau par le VRS. Nos arguments pour poser cette hypothèse sont que :

- Les MAs de la souris adultes sont la source principale d'IFN-I en réponse à l'infection par le VRS mais, leur rôle chez le souriceau n'a pas été étudié [168].
- La protéine IRAP est connue pour participer dans les cellules dendritiques (et les MAs) au contrôle de la réponse inflammatoire provoquée par l'engagement de TLRs endosomaux. La protéine IRAP régule le trafic des vésicules cytoplasmiques cargo de TLRs *via* son interaction avec les protéines du cytosquelette [206].

Cette partie de mon travail a consisté à étudier la réponse antivirale des MAs de souriceaux afin d'améliorer notre compréhension de la réponse immunitaire innée à l'infection par le VRS en période néonatale. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence l'implication de

l'aminopeptidase IRAP dans la régulation de la réponse IFN-I spécifiquement au cours de l'infection par le VRS des MAs néonataux.

- 2) Démontrer la faisabilité d'orienter l'immunité de la muqueuse pulmonaire néonatale vers une immunité protectrice contre le VRS en intervenant sur le microbiote pulmonaire.

Notre hypothèse est que les bactéries commensales primo-colonisatrices du poumon participent à la maturation et à l'orientation des défenses immunitaires pulmonaires du nouveau-né :

- Il a été mis en évidence que l'acquisition progressive d'un microbiote pulmonaire juste après la naissance participe au développement immunitaire pulmonaire de la souris [262].
- De plus, parmi un ensemble de souches bactériennes primo-colonisatrices des poumons isolées par l'équipe de Muriel Thomas, certaines protègent de l'asthme chez les souris adultes si elles ont été administrée dès la période néonatale [269].

Ainsi, nous avons évalué l'influence d'une absence de colonisation bactérienne des poumons sur le développement de la réponse cytokinique à partir d'explants pulmonaires murins axéniques stimulés par différents ligands des TLRs ou après une infection par le VRS. De plus, nous avons essayé d'orienter *ex vivo* et *in vivo* la réponse immunitaire des poumons de souriceaux à l'infection par le VRS par l'administration de différentes souches bactériennes primo-colonisatrices isolées par nos collaboratrices.

## C. RESULTATS EXPERIMENTAUX

### 1. Rôle de IRAP dans le contrôle de la réponse immunitaire innée à l'infection par le VRS

#### 1.1. Introduction

Notre but est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine du déficit de production d'IFN-I en période néonatale au cours de l'infection par le VRS. L'IFN-I n'est quasiment pas détecté dans les sécrétions nasales de nourrissons infectés par le VRS [92,93]. Dans le modèle murin, l'infection par le VRS se caractérise par un défaut de la réponse IFN-I dans les poumons de souriceaux infectés par rapport aux adultes [181,189]. Les MAs sont la principale source d'IFN-I au cours de l'infection par le VRS de souris adultes

[168]. La question reste ouverte dans les MAs néonataux. La protéine IRAP contrôle la production d'IFN-I lors de l'activation de TLRs dans les cellules dendritiques [206]. Le rôle de la protéine IRAP dans le contrôle de l'activation des PRRs dans les MAs n'est pas connu.

L'objectif de ce travail a été d'analyser la réponse IFN-I dans les MAs de souriceaux au cours de l'infection par le VRS et de tester l'hypothèse que la protéine IRAP est un élément régulateur de la réponse IFN-I dans ces cellules.

En premier lieu nous avons décrit les capacités de réponse IFN-I des MAs de souriceaux à l'infection *ex vivo* par le VRS.

Nous avons ensuite montré l'influence de la protéine IRAP sur la réponse IFN-I lors de l'infection par le VRS.

Nous avons également recherché le/les senseur(s) de l'immunité innée responsable(s) de la production d'IFN-I par les MAs de souriceaux et d'adultes.

Enfin, nous avons évalué l'influence de la protéine IRAP sur la production d'IFN-I *in vivo* chez des souriceaux et des adultes infectés par le VRS.

Les résultats de ce travail vont être soumis pour publication dans le journal « *Frontiers in Immunology* », section *Molecular Innate Immunity*.

Ce projet a nécessité de collaborer étroitement avec l'IERP de Jouy-en-Josas afin d'élever et accoupler en parallèle et de manière synchrone les lignées murines C57BL6 WT et IRAP KO. En effet, compte-tenu de la fenêtre de susceptibilité néonatale à l'infection par le VRS très réduite chez les souriceaux, les animaux devaient être âgés entre 5 et 6 jours lors des expériences d'infections *in vivo* ou au moment de la réalisation des lavages broncho-alvéolaires pour isoler les MAs néonataux (1 adulte = 100 000 MAs, 1 souriceau = 20 000 MAs). Travailler avec des MAs de souriceaux a nécessité beaucoup d'accouplements et de naissances afin d'obtenir assez de cellules pour tester au moins en dupliqua un panel de conditions lors de chaque expérience. Pour les expériences de microscopie avec les MAs, les cellules ont été isolées et infectées à Jouy-en-Josas ou isolées et stimulées par des ligands de TLRs au centre de recherche sur l'inflammation à l'hôpital Bichat à Paris dans l'équipe de Loredana Saveanu (UMR 1149 INSERM). Les images de microscopie confocale ont été réalisées à l'hôpital Bichat avec Loredana Saveanu.

## **1.2. Article : Control of IFN-I responses by the aminopeptidase IRAP in neonatal alveolar macrophages upon RSV infection**

# **Control of IFN-I responses by the aminopeptidase IRAP in neonatal alveolar macrophages upon RSV infection**

**Running title:** IRAP takes the control of neonatal IFN-I secretions upon RSV infection

Drajac Carole<sup>1</sup>, Laubretton Daphné<sup>1</sup>, Saveanu Loredana<sup>2,3</sup>, Isabelle Schwartz-Cornil<sup>1</sup>, Riffault Sabine<sup>1</sup> & Descamps Delphyne<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> VIM, INRA, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

<sup>2</sup> Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité UMR 1149, Centre de Recherche sur l'Inflammation, Paris, France.

<sup>3</sup> Université Paris Diderot, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris, France.

\*Correspondence should be addressed to Delphyne Descamps: Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France.

E-mail: [delphyne.descamps@inra.fr](mailto:delphyne.descamps@inra.fr)

The number of words = 4412

The number of figures = 6

*Section Molecular Innate Immunity*

**Abstract:**

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the major cause of lower respiratory tract infection in infant and young children. Defective production of type I interferons (IFN-I) in airways during RSV infection has been associated to severe bronchiolitis in infants and further documented in neonatal mice. IFN-I responses are initiated in infected cells upon RSV recognition by innate immune receptors, whose activation and intracellular trafficking are tightly controlled. However, the sensing of RSV by innate immune receptors and its regulation are still poorly described in neonates. Insulin-Responsive Aminopeptidase (IRAP), a protein necessary for anchoring the endosomes to the actin-network, has been described to participate in regulating IFN-I production in dendritic cells. Recently, alveolar macrophages (AMs) have been shown to be the main source of IFN-I upon RSV infection in adult mice. In the present study, we characterized for the first time the ability of neonatal AMs to produce IFN-I and to mobilize the IFN-I pathway upon RSV infection, and we determined the contribution of IRAP to this response. RSV infection of adult WT AMs induced the production of IFN-I and the up-regulation of interferon-stimulated gene (ISG) transcripts, while these responses were very low in neonatal AMs. However, RSV-infected neonatal AMs from IRAP-deficient (IRAP<sup>KO</sup>) mice presented a substantial increase of IFN- $\alpha/\beta$  secretions and expression of ISG in comparison to neonatal WT AMs. This enhanced mobilization of IFN-I pathway was dependent upon viral replication in IRAP<sup>KO</sup> AMs. We revealed also that neonatal WT AMs produced IFN-I as effectively as adult AMs when stimulated with a synthetic RIG-I agonist. This RIG-I-dependent IFN-I production was not changed in neonatal or adult IRAP<sup>KO</sup> AMs. Finally, we demonstrated that newborn IRAP<sup>KO</sup> mice infected with RSV had more IFN-I in their lungs than wild-type (WT) neonates. Taken together, our data pointed to a new role of IRAP as a key regulator of the IFN-I driven-antiviral responses in neonatal AMs during the course of RSV infection. Thus, early-life susceptibility to RSV

infection may be related to an age-dependent suppressive function of IRAP on IFN-I responses.

**Keywords:** Alveolar Macrophages, Lung, RSV, Neonate, interferons, RIG-I, aminopeptidase, antiviral response.

## INTRODUCTION

Human respiratory syncytial virus (RSV) is the major cause of bronchiolitis in infants and a severe infection may lead to long-term effects on the lungs such as asthma occurrence (1). To date, no vaccine is available. Pre-term birth and polymorphism in innate immunity genes are different risk factors clearly related to acute RSV bronchiolitis in infants (2, 3). Moreover, the age of first exposure to RSV constitutes a key parameter in early-life susceptibility to RSV disease (4). The pulmonary mucosa of neonates exhibits an evolving immune environment (cellular composition, microbiota colonization) highly different from the adult mucosa that predisposes to type 2 immune responses (5, 6). This strong bias towards type 2 immunity is implicated in the severity of the RSV infection and in priming for subsequent development of asthma in human (3, 7). Nevertheless, neonatal innate immune responses and their effects on RSV disease progression remain poorly described.

Hence, a better understanding of these innate mechanisms during the early-life period will allow the development of new and more effective therapeutic strategies against RSV infection. The immunopathological imprinting induced by RSV infection in the early-life period can be reproduced experimentally in newborn mice (8). Using this well-established neonatal mouse model, it is possible to obtain a better picture of the early life immunity to RSV in infants, and also its long-term effects on airway pathology (4, 9). We have shown that neonatal mouse lungs have a lower frequency of conventional dendritic cells (DCs) and plasmacytoid DCs, the “professional” type I interferons (IFN-I)-producing cells, than have adult lungs at steady state (10). Furthermore, neonatal mice exhibit a specific innate immunity in response to RSV infection, characterized by a poor DC mobilization and a major defect in IFN-I production and expression of several IFN stimulated genes (ISGs) in the lungs (11, 12). These data are in agreement with previous observations made in nasal washes from RSV-infected children in which IFN-I production has been only occasionally detected (13).

Neonates treated with the DC growth and differentiation factor Flt3-ligand (Flt3-L) exhibit increased DC recruitment and IFN-I response in the lungs which result in mild airway disease upon adult re-exposure to RSV (11). In the same way, the intranasal instillation of recombinant IFN- $\alpha$  prior to neonatal RSV infection protects mice against exacerbated inflammation in airways upon re-exposure at adult age (14). Taken together, these data demonstrated that IFN-I responses strongly impact the type 2 immunity-biased immunopathology observed in the neonatal mouse model of RSV infection.

IFN-I and ISGs are critical for establishing an antiviral state in infected and neighboring cells during infection by directly blocking virus replication or by modulating immune signaling pathways (15, 16). In addition, IFN-I receptor-signaling amplifies the early pro-inflammatory responses in the lungs (17). Therefore, RSV has evolved two non-structural proteins, NS1 and NS2, to degrade or to sequester multiple proteins that affect both induction and effector functions of IFN-I (18). Several pattern recognition receptors (PRRs), including Toll-like receptors (TLRs) or retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors (RLRs) detect the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) of RSV and trigger antiviral responses. Importantly, TLR3, TLR7 and RIG-I, through the activation of the transcription factor interferon regulatory factor 3 (IRF-3) and IRF-7, induce subsequent expression of genes encoding IFN-I and ISGs (19). However, the sensing of viral nucleic acid by these PRRs is still poorly described in neonates (3, 7). IFN-I production is necessary for limiting the spread of infection but must be tightly controlled to avoid an inappropriate immune response that could cause detrimental immunopathology (16). Thereby, intracellular trafficking of PRRs constitutes a major parameter in their sequential mode of activation through acquisition of diverse chaperon molecules and interactions with cytoskeletal components, and consequently for their capacity to induce an antiviral innate response (20-24). Hence, we recently showed that the aminopeptidase IRAP (Insulin-Responsive

Aminopeptidase), a protein anchored at the membrane of many intracellular vesicles and known to control the endosomal maturation (25, 26), participates in IFN-I signaling in dendritic cells (27). Through its interaction with the actin cytoskeleton, IRAP regulates the endosomal trafficking of TLR cargos by slowing their transit to lysosomes, thus moderating the activation of transported innate receptors and their ability to induce cytokines and IFN-I. Moreover, this recent work highlights the importance of the actin cytoskeleton in the activation process of PRRs and its regulation, and consequently in promoting innate immune responses. IRAP is expressed in mouse macrophages (28). In the lungs of adult mice, IFN-I are mainly produced by alveolar macrophages (AMs) upon RSV infection (29). In neonatal lungs, the ability of AMs to produce IFN-I has not yet been investigated. Accordingly, the molecular mechanisms that control IFN-I pathway are poorly described in the context of neonates and remain to be deciphered in order to elucidate their age-related effects in response to RSV infection.

In this study, we analyzed the ability of neonatal AMs to mobilize IFN-I pathway following RSV infection, and we determined the contribution of IRAP in this response. We showed that neonatal AMs from C57BL/6 mice, which are permissive to RSV infection (29-31), were unable to generate IFN-I responses upon viral infection. Depletion of the aminopeptidase IRAP restored the secretion of IFN- $\alpha/\beta$  and the expression of ISGs in neonatal IRAP-deficient (IRAP<sup>KO</sup>) AMs infected with RSV, but did not affect adult AM responses. Enhanced IFN-I production in neonatal IRAP<sup>KO</sup> AMs was dependent upon viral replication. As previously demonstrated in adult AMs (29), we revealed that RIG-I was the major innate sensor responsible for IFN-I responses in neonatal AMs. Surprisingly, the absence of IRAP did not impact on interferon responses in neonatal AMs exposed to different TLR- or RLR-agonists. Finally, we demonstrated that newborn IRAP<sup>KO</sup> mice infected with RSV had a better IFN-I production than wild-type (WT) neonates. Our data taken together,

we propose that IRAP acted in an age-dependent manner as a suppressor of IFN-I pathway following RSV infection *ex vivo* in neonatal AMs or *in vivo* in the lungs.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **AMs isolation, RSV exposure and TLR/RLR ligands stimulation**

A cannula was inserted in trachea from adult or neonatal mice and repeated bronchoalveolar lavages (BALs) were made with PBS. AMs were isolated after centrifugations (BALs from one newborn mouse  $\approx$  20 000 AMs *versus*  $\approx$  100 000 AMs for BALs from one adult mouse) and 100 000 cells were plated in 96-well cell culture plates in RPMI supplemented with L-glutamine 2 mM, FCS 5% and antibiotics for 24 h to allow AMs adhesion. AMs were then used for RSV infection or TLR/RLR stimulation assays. AMs were exposed at MOI 5 to recombinant RSV expressing mCherry (32) or UV-inactivated mCherry-RSV (the same batch exposed 20 min to ultra-violet) or Hep2 cell culture supernatant (mock-infection) for 24h. TLR or RLR stimulations were realized with imiquimod 100  $\mu$ g/ml (Invivogen), CpG-1826 100  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich), Poly(I:C) LMW 100  $\mu$ g/ml (Invivogen), LPS 10  $\mu$ g/ml (E. coli 0111:B4, Sigma-Aldrich) or Poly(I:C)-LMW/LyoVec 0,1 or 1  $\mu$ g/ml (Invivogen) during 24 h. For qRT-PCR analysis, cells were frozen in NucleoSpin®RNA XS Kit (Macherey-Nagel) lysis buffer.

### **Animals and infection**

Animal experiments were approved by the COMETHEA ethics committee under authorization number 15–16. IRAP<sup>KO</sup> mice and C57BL6/J co-housed control animals were bred and housed under SPF conditions in our animal facilities (IERP, INRA, Jouy-en-Josas). Neonatal ( $\leq$ 6 days) or adult ( $\geq$ 8 weeks) mice received respectively 10 or 100  $\mu$ L of recombinant RSV expressing luciferase (32) or Hep2 cell culture supernatant (mock-infection) by intranasal instillation. Mice were then sacrificed by i.p. injection of pentobarbital and lungs were frozen. To perform gene expression analyses, a piece of lungs

was ground in tubes containing NucleoSpin®RNA XS Kit (Macherey-Nagel) lysis buffer and ceramic beads (Mineralex) with Precellys®24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, Ozyme). For IFN-I and bioluminescence assays, lungs were weighed and then ground in tubes containing PLB buffer (Tris 30 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM ; Triton X100 1.25 % ; glycerol 18.75 %), DTT and ceramic beads. For bioluminescence assays, photon emission was counted in lung lysates of RSV-Luc or mock-infected pups using the IVIS system (Xenogen Biosciences). 100 µL of lysate were mixed with 100 µL of D-luciferin (Sigma-Aldrich) supplemented with ATP in flat bottom 96-well black plates (Thermo Scientific). Luciferase activity in each well was measured with Living Image software (version 4.0, Caliper Life Sciences). Photon emission was measured as radiance in photon sec<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> sr<sup>-1</sup> and then normalized to weight lungs.

#### **Viral N-RNA load and gene expression by qRT-PCR**

Total RNA was extracted from lung and cell lysates using NucleoSpin® RNA (XS) kit (Macherey-Nagel) and reverse transcribed using the iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. The primers (Sigma-Aldrich) used are listed below. qPCRs were realized with the MasterCycler RealPlex (Eppendorf) and SYBRGreen PCR Master Mix (Eurogentec) and data analyzed with the Realplex software (Eppendorf) to determine the cycle threshold (Ct) values.

<b>Name of gene</b>	<b>Forward primer (5' to 3')</b>	<b>Reverse primer (5' to 3')</b>
GAPDH	GGGGTCGTTGATGGCAACA	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
N (huRSV-A2)	AGATCAACTTCTGTTCATCCAGC AA	TTCTGCACATCATAATTAGGAGTATC AAT
OAS 1a	CTTTGATGTCCTGGGTCATGT	GCTCCGTGAAGCAGGTAGAG
ISG15	CCCCAGCATCTTCACCTTTA	TGACTGTGAGAGCAAGCAGC
IFITM3	TTCAGGCACTTAGCAGTGGA	AGCCTATGCCTACTCCGTGA
IRF7	CTGGATGAAGAAGATGCACAG	GAAGTTGGTCTTCCAGCCTC
RIG-I	TGGCTTCACAAAGTCCACAG	CTGCCTCACTCTTCCCTCCAG
TLR3	ATAGGGACAAAAGTCCCCCA	ATGATACAGGGATTGCACCC

TLR4	TGTCATCAGGGACTTTGCTG	GGACTCTGATCATGGCACTG
TLR7	CCACAGGCTCACCCATACTTC	GGGATGTCCTAGGTGGTGACA
TLR9	CTGTACCAGGAGGGACAAGG	CAGTTTGTGAGAGGGAGCCT

### **Cytokine quantification**

IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  were measured using IFN alpha/IFN beta 2-Plex Mouse ProcartaPlex™ immunoassay (ebiosciences). Data were acquired using a Bio-Plex® multiplex system (Bio-Rad) and results were analyzed on ProcartaPlex® Analyst software. IL-6 was quantified by ELISA (Ready-SET-Go, eBiosciences) according to the manufacturer's instructions.

### **Western blot analysis**

AMs were coated in 96-well cell culture plates and RSV- or mock-infected. After 24h of incubation cells were lysed in 100  $\mu$ L of lysis buffer (EDTA 0,5 M, NaCl 0,150 M, Triton 1 % et TrisHCl 1 %) containing protease inhibitors (Roche). Total proteins were quantified with Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific). A total of 10  $\mu$ g proteins was separated electrophoretically on a NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gels (Life Technologies) and electrotransferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore) using a semi-dry electroblotting system (Biorad). The membrane was saturated in Tris-Buffer Saline containing 0.1% of Tween 20 (TBST) supplemented with 5 % of skim-milk for 1h at room temperature (RT), then incubated with anti-IRAP (clone 3E1, Cell signaling) or anti-GAPDH (clone 1D4, Enzo) mouse monoclonal antibodies in TBST 5 % milk (dilution 1:1000) overnight at 4°C. After three washes with TBST, the membrane was incubated for 1h at RT with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (1:5000, KPL) in TBST 5 % milk. After extensive washing with TBST, peroxidase activity was revealed by incubation with Pierce™ ECL Western Blotting Detection Reagents (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

### **Immunofluorescence microscopy**

AMs were seeded on fibronectin-coated slides and stained as previously described (27). Cells were fixed with 4 % PFA and permeabilized with 0.2% saponin in PBS containing 0.2% BSA and stained in the same buffer. Cells were stained with rabbit monoclonal anti-IRAP (clone D7C5, Cell signaling) antibody (1:100) and DAPI (1:5000). Alexa 488 was used as secondary anti-IRAP antibody (1:200). Images were acquired on a Leica SP8 confocal microscope. Image treatment and analysis were performed with ImageJ software.

### **Statistical analysis**

Nonparametric Mann-Whitney (comparison of two groups,  $n \geq 4$ ) was used to compare unpaired values (GraphPad Prism software). Significance is represented: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; and \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## RESULTS

### Neonatal AMs exposed to RSV *ex vivo* did not produce IFN-I.

Newborn mice present a major defect in mobilizing the IFN-I pathway following RSV infection (11, 14). In infected adult mice, IFN-I are mainly and rapidly produced by AMs that are permissive to RSV infection although the viral replication is abortive (29-31). Thus, to address the ability of neonatal AMs to mobilize IFN-I pathway in response to an *ex vivo* RSV infection, we infected AMs isolated from the lungs of wild-type (WT) newborn or adult mice. We then measured the production of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  and the expression of different ISGs by those cells 24 h after RSV infection. We found that neonatal AMs were unable to secrete IFN-I in response to RSV infection (**Figure 1A**), while adult AMs secreted significant amounts of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  in supernatants (**Figure 1B**).

IFN-I induce the expression of several ISGs that interfere with viral replication and viral spread, and thus contribute to the early control of infection. Some PRRs and associated-signaling molecules that participate to the IFN-I pathway like TLR3, TLR7, RIG-I or IRF7, are also up-regulated in order to amplify IFN-I response (15, 16). Quantitative real time PCR (qPCR) analyses showed that the mRNA level of molecules known to interfere with viral replication (IFITM3, OAS, ISG15 and PKR) or involved upstream in IFN-I pathways (TLR3, TLR9, RIG-I or IRF7) were found strongly upregulated in adult AMs upon RSV infection in contrast to their very low levels in neonatal AMs (**Figure 1C**). However, we observed that the basal expression levels of TLR4 and TLR7 were increased in both neonatal and adult AMs, and displayed similar upregulation in response to RSV.

Finally, we demonstrated that the deficiency of IFN-I production and ISG expression resulted in better virus replication in neonatal AMs, since *N-RSV* RNA levels were found higher in neonatal than in adult AMs (**Figure 2**). Thus, the expression of *N-RSV* gene was 24-fold more important in neonatal AMs than in adult AMs 24 h after RSV infection.

## **Recovery of IFN-I pathway in response to RSV infection after deletion of IRAP in neonatal AMs.**

Since the amplitude of IFN-I production is regulated by IRAP in dendritic cells (27), we sought to determine whether the deletion of IRAP could affect the IFN-I pathway in AMs. We first showed that both neonatal and adult AMs expressed IRAP, as illustrated by immunostaining of protein in cells at steady state (**Figure 3A**). As a consequence of RSV infection, the level of IRAP protein in neonatal AMs was slightly increased, as shown by immunoblot analysis (**Figure 3B**).

We then evaluated the production of IFN-I and the induction of ISGs in IRAP-deficient AMs (IRAP<sup>KO</sup> AMs) 24 h after exposure to RSV. We found that the production of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  in supernatants of RSV-infected neonatal IRAP<sup>KO</sup> AMs was increased in comparison to neonatal WT AMs (WT AMs) (**Figure 1A**). This enhanced IFN-I production recorded in IRAP<sup>KO</sup> AMs required RSV replication, since the exposure of the same cells to UV-inactivated RSV (UV-RSV) did not lead to secretion of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  (**Figure 1A**). The mobilization of IFN-I pathway was thus dependent on viral replication in AMs. To further investigate the role of IRAP in IFN-I signaling, we showed that the level of expression of all ISGs tested was strongly upregulated in neonatal IRAP<sup>KO</sup> AMs after RSV infection in comparison to neonatal WT AMs (**Figure 1C**). These upregulations of mRNA were similar (*IFITM3*, *TLR3*, *IRF7*) or sometimes even stronger (*OAS*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR9*, *RIG-I*) than those found in adult AMs. In contrast, the levels of expression of ISG15 and PKR remained lower in infected neonatal AMs than those recorded in adult cells. Indeed, RSV infection induced an increase of *ISG15* and *PKR* expression by 96- and 4-times, respectively, in neonatal IRAP<sup>KO</sup> AMs versus 262- and 8-times in adult WT AMs. As a consequence of these potent IFN-I responses, *N-RSV* RNA in neonatal IRAP<sup>KO</sup> AMs was detected at significantly lower levels of expression than in neonatal WT AMs (8.6-times, **Figure 2**). Thus, neonatal

IRAP<sup>KO</sup> AMs were able to block the viral replication much more efficiently than neonatal WT AMs.

We also analyzed the role of IRAP in IFN-I responses of adult AMs. The absence of IRAP had no effect on IFN-I production, ISG induction or viral replication in adult AMs following RSV infection (**Figures 1B, 1C and 2**, respectively), suggesting an age-dependent involvement of IRAP in IFN-I responses in AMs. Collectively, these results demonstrated that IRAP controlled the activation of IFN-I pathway in neonatal AMs exposed to RSV.

### **RIG-I-dependent IFN-I production in neonatal AMs.**

Infected cells detect and respond to virus through the activation of various PRRs, including TLRs or RLRs. We next explored the pathways leading to IFN-I induction in neonatal AMs. We stimulated neonatal WT and IRAP<sup>KO</sup> AMs with specific TLR ligands or RLR-agonist, such as the synthetic RNA duplex Poly(I:C) for TLR3; lipopolysaccharide (LPS) for TLR4; imiquimod for TLR7; and CpG-B for TLR9; or the transfected Poly(I:C) (Poly(I:C)-LyoVec) for RIG-I. We then analyzed IFN-I- and inflammatory-responses after 24 h of stimulation. Our data revealed that only stimulation with Poly(I:C)-LyoVec (1 µg/mL) induced a significant secretion of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  by both neonatal WT and IRAP<sup>KO</sup> AM (**Figure 4A**). Consistent with these results, qPCR analyses showed that the mRNA levels of ISGs (*IFITM3*, *OAS*, *ISG15* and *IRF7*) were upregulated in both neonatal WT and IRAP<sup>KO</sup> AMs upon treatment with LPS and Poly(I:C)-LyoVec (0.1 and 1 µg/mL) (**Figure 4B**). Nevertheless, we found that Poly(I:C), LPS and CpG-B stimulated neonatal AMs (WT and IRAP<sup>KO</sup>) to produce a pro-inflammatory cytokine, the interleukine-6 (IL-6), demonstrating that these cells were able to respond to TLR3-, TLR4- and TLR9-stimulations (**Supplemental Figure 1**). Same observations were made with adult WT and IRAP<sup>KO</sup> AMs (not shown). In addition, we found that RIG-I stimulation induced similar secreted amounts of IFN-I by both neonatal and adult AMs.

In conclusion, neonatal AMs can produce IFN-I in a RIG-I-dependent manner after stimulation with specific synthetic agonist. On the other hand, deletion of IRAP did not change the magnitude of both IL-6 and IFN-I secretions by neonatal or adult AMs when these cells were directly stimulated by TLR- or RLR-agonists.

### **Enhanced IFN-I production in the lungs of newborn IRAP-deficient mice infected with RSV.**

Our *ex vivo* data demonstrated that IRAP prevents IFN-I responses in neonatal AMs exposed to RSV. We next addressed whether newborn mice deficient in IRAP displayed enhanced productions of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  following infection with a recombinant RSV expressing the luciferase gene during its replication (32). As previously described (11, 14), the production of IFN-I was practically undetectable and weakly induced in the lungs of RSV-infected wild-type (WT) neonates (**Figure 5A**). By contrast, RSV infection in newborn IRAP-deficient mice induced three times and four times more IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ , respectively, in their lungs after 8 h of infection. We measured the viral replication in the lungs of infected newborns in order to determine a potential difference between WT and IRAP-deficient mice in their capacity to control the infection. The kinetics of *N-RSV* expression (**Figure 5B**) and luciferase activity (**Figure 5C**) were similar, with peaks at 24 h after RSV exposure, demonstrating an identical ability of newborn WT and IRAP-deficient mice to replicate the virus. Together these results demonstrated that the lack of IRAP enhanced IFN-I production in the lungs of newborn mice without altering virus replication and clearance.

## DISCUSSION

IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  are critical for controlling viral pathogenesis by inducing the expression of several ISGs that provide a robust first line of defense against viruses. Moreover, IFN-I pathway also plays an important role in shaping the inflammatory and adaptive immune responses (15-17). The early-life susceptibility to RSV disease has been associated with the inability of the young to mobilize IFN-I pathway in the lungs upon infection (11, 13, 14). Nevertheless, the molecular mechanisms that control IFN-I pathway are poorly described in the context of neonates. In this study, we identified IRAP as a negative regulator of RSV replication-mediated IFN-I pathway in AMs and in the lungs during the neonatal period.

In contrast to what has been described in adult cells (29), *ex vivo* RSV infection failed to induce the production of IFN- $\alpha/\beta$  and the up-regulation of ISG transcripts in neonatal AMs. We also showed that neonatal C57BL/6 mice were unable to make IFN-I in response to RSV infection, confirming previous observations made in BALB/c neonates, thus extending this neonatal IFN-I defect in two genetically different strains of mice (11, 14). This inability of AMs from neonates to make IFN-I could be explained by age-specific requirements for activation of PRRs and/or for the acquisition of signaling components, as described for key signaling events of IFN-I pathway such as nuclear translocation of IRF-3 or IRF-7 following TLR4- or TLR7-stimulation, respectively, in dendritic cells (33, 34). Our data revealed that neonatal AMs produced IL-6 as effectively as adult AMs after stimulation of TLR3, TLR4 or TLR9. RIG-I is recognized as being the main PRR responsible for IFN-I responses in adult AMs upon RSV infection (29). Here, we showed that IFN- $\alpha/\beta$  were secreted by AMs only after stimulation with a synthetic RIG-I-agonist, and with the same amplitude of secretion in both neonatal and adult AMs. Thus, neonatal AMs had a competent RIG-I-mediated IFN-I pathway, but its activation did not seem to be engaged following RSV infection. It has been demonstrated that the non-structural viral proteins NS1 and NS2 inhibit IFN-I production in

RSV-infected epithelial cell lines by interfering with the activation of IRF-3 and its nuclear translocation, or by inhibiting RIG-I/MAVS interaction (35-38). However, the role of NS1 and NS2 has never been studied in RSV-infected AMs or during the neonatal period. Moreover, it is possible that RSV infection induces the expression of natural inhibitors of PRR pathways, such as LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2), a member of the RLR family, which is a known cellular regulator of both RIG-I and MDA5 (39). To our knowledge, no study has investigated its role in RSV infection (39). However, a potential over-expression of LGP2 upon neonatal RSV infection should be considered, taking into account the study of Si-Tahar's group, which demonstrated a decrease of IFN-I and proinflammatory mediators during influenza virus (H3N2) infection in mice overexpressing human LGP2 (40).

On the other hand, the intracellular trafficking of PRR also exerts a regulatory constraint on IFN-I pathway through their mobility toward the different intracellular compartments required for PRR activation (20-24). Thus, the interaction of actin cytoskeleton with IRAP<sup>+</sup> endosomes controls the early steps of endosomal trafficking of TLR cargos and subsequently moderates their ability to induce cytokines and IFN-I in dendritic cells (27). Here, our results showed that neonatal IRAP<sup>KO</sup> AMs made substantial amount of IFN-I and up-regulated ISG transcripts leading to a significant decrease of RSV replication as compared with neonatal WT AMs. However, the viral replication was not completely blocked in neonatal IRAP<sup>KO</sup> AMs. This could be explained by amounts of ISG15, a protein responsible for ISGylation similar to ubiquitination, and PKR, an inhibitor of cellular and viral mRNA translation, lower in neonatal IRAP<sup>KO</sup> AMs than in adult AMs during RSV infection (15). The negative control exerted by IRAP on the IFN-I pathway has also been demonstrated *in vivo* in the lungs of RSV-infected newborn IRAP<sup>KO</sup> mice. The pulmonary production of IFN-I was increased in the absence of IRAP following RSV infection. However, the kinetic of viral

replication remained unchanged. This discrepancy between viral replication in AMs and in lung tissues from newborn IRAP<sup>KO</sup> mice can be related to the biological complexity existing in the whole tissue (cellular crosstalk, several types of cells). Thus, further studies are required to determine the role of IRAP in pulmonary epithelial cells, the main target for RSV replication. Nonetheless, previous studies in which IFN-I responses are increased *in vivo* by treating pups (with Flt3-L or recombinant IFN- $\alpha$ ) before RSV infection, showed that IFN-I responses impact more the neonatal immunopathological type 2 imprinting revealed upon adult re-exposure to RSV than the viral replication during the course of the neonatal infection (11, 14).

TLR3-, TLR7- or TLR9-pathways could have been influenced by IRAP, since IRAP affects their endosomal trafficking/maturation in DCs (27). Surprisingly, the deletion of IRAP in neonatal and adult AMs did not change their capacity to make IFN-I and IL-6 upon exposure to the respective synthetic agonists of TLR3, TLR7 and TLR9. Moreover, the production of IFN-I measured after exposure to RIG-I agonist remained similar in neonatal IRAP<sup>KO</sup> and WT AMs. These data suggested that the IRAP-dependent control of IFN-I pathway was specific to the combination of neonatal AMs and RSV infection. This control mechanism required viral replication because the enhanced mobilization of IFN-I pathway observed in neonatal IRAP<sup>KO</sup> AMs was lost when cells were exposed to UV-RSV. Recently, newly synthesized viral RNA have been detected in inclusion bodies-associated granules (IBAGs) of human epithelial cell line infected by RSV (41). These data suggest that these IBAGs constitute the main sites of viral RNA synthesis and thus potentially concentrate RSV PAMPs. It will be interesting to characterize the presence of these IBAGs in AMs upon RSV infection and see whether IRAP plays a role in their induction.

A growing body of evidence supports the hypothesis that autophagy influences the viral replication, IFN-I and cytokine responses upon RSV infection in macrophages, DCs and

epithelial cells (42-44). Thus, Pokharel *et al.* showed that autophagy is necessary for IFN- $\beta$  production *via* the activation of TGF- $\beta$ —SMAD2/3 signaling pathway in RSV-infected bone marrow-derived macrophages (BMDMs) (45). By using transgenic mice expressing a recombinant LC3 protein coupled to the green fluorescent protein GFP, it has been shown that autophagy is particularly strong in the lungs, heart and other neonatal organs during the first hours of life (46). The autophagy plays also a critical role in the acquisition of age-dependent features in macrophages. Indeed, BMDMs from aged mice (>100 weeks) exhibit reduced autophagic process compared to young mice (6-8 weeks) (47). Today the link between autophagy and IRAP remains elusive. However, since autophagy contributes to IFN-I production in RSV-infected BMDMs (43) and because autophagy diminishes rapidly with age (46), we make the hypothesis that IRAP could play a repressor role on the dynamic of autophagic process. Today this link between autophagy and the protein IRAP remains elusive. However, IRAP has been showed to interact with several proteins involved in vesicle formation or in cytoskeleton remodeling such as vimentin (48), and different formins (27, 49). In addition, IRAP colocalizes in DCs or in adipocytes with the Rab11 or Rab14 GTPase proteins also required in the autophagic process and for the assembly and budding of RSV at the apical surface of human epithelial cells (26, 50-55). In order to understand how IRAP could mechanistically affect the autophagy in AMs, it would be interesting to analyze the potential interaction of IRAP with proteins participating in the autophagic process such as LC3, beclin or Rab proteins. Finally, we did not observe any modification of the IFN-I responses in adult IRAP<sup>KO</sup> AMs compared to WT cells upon RSV infection. These data suggested that IRAP exerted an age-dependent suppressive function on IFN-I pathway in AMs, and in the particular context of the neonatal airway mucosa whose immunological characteristics are rapidly moving (7).

In conclusion, our study has revealed IRAP as a key element in an as yet unidentified intracellular mechanism for controlling IFN-I production in neonatal AMs exposed to RSV infection. However, further investigations are required to define this anti-viral mechanism induced by RSV replication and regulated by IRAP in neonates. Nevertheless, our study provides a novel insight into RSV-AMs interaction and highlights a new strategy against RSV in the neonatal period: targeting IRAP in order to recover IFN-I-dependent antiviral responses.

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

C.D., S.R. and D.D. conceptualized the study and designed experiments. C.D., D.L and D.D. conducted experiments and generated data analysis. L.S. performed microscopy data analysis. D.L., L.S., I.S. and S.R. guided data analysis, discussed the study. C.D., S.R. and D.D. wrote the manuscript with input from all authors

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank E. Merour (INRA, VIM) for her expertise in western blot and P-L Hervé (DBV Technologies) for Luminex assays. We are grateful to S. Keller (University of Virginia) for providing IRAP-deficient mice, M-A. Rameix-Welti (U1173, UVSQ) for providing recombinant RSV-Luc and RSV-Cherry, and the IERP unit (INRA) to animals' facilities and for birth management.

### **FUNDING**

C.D. was the recipient of a PhD fellowship of Région Ile-de-France (DIM-Malinf). D.L. was supported by a grant of the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV3-0016 SyncBreg).

### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interests.

## REFERENCES

1. R. L. Smyth and P. J. Openshaw: Bronchiolitis. *Lancet*, 368(9532), 312-22 (2006) doi:10.1016/S0140-6736(06)69077-6
2. R. Janssen, L. Bont, C. L. Siezen, H. M. Hodemaekers, M. J. Ermers, G. Doornbos, R. van 't Slot, C. Wijmenga, J. J. Goeman, J. L. Kimpen, H. C. van Houwelingen, T. G. Kimman and B. Hoebee: Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *J Infect Dis*, 196(6), 826-34 (2007) doi:10.1086/520886
3. L. Lambert, A. M. Sagfors, P. J. Openshaw and F. J. Culley: Immunity to RSV in Early-Life. *Front Immunol*, 5, 466 (2014) doi:10.3389/fimmu.2014.00466
4. S. A. Cormier, D. You and S. Honnegowda: The use of a neonatal mouse model to study respiratory syncytial virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8(12), 1371-80 (2010) doi:10.1586/eri.10.125
5. I. M. de Kleer, M. Kool, M. J. de Bruijn, M. Willart, J. van Moorleggem, M. J. Schuijs, M. Plantinga, R. Beyaert, E. Hams, P. G. Fallon, H. Hammad, R. W. Hendriks and B. N. Lambrecht: Perinatal Activation of the Interleukin-33 Pathway Promotes Type 2 Immunity in the Developing Lung. *Immunity*, 45(6), 1285-1298 (2016) doi:10.1016/j.immuni.2016.10.031
6. S. Saluzzo, A. D. Gorki, B. M. Rana, R. Martins, S. Scanlon, P. Starkl, K. Lakovits, A. Hladik, A. Korosec, O. Sharif, J. M. Warszawska, H. Jolin, I. Mesteri, A. N. McKenzie and S. Knapp: First-Breath-Induced Type 2 Pathways Shape the Lung Immune Environment. *Cell Rep*, 18(8), 1893-1905 (2017) doi:10.1016/j.celrep.2017.01.071
7. C. Drajac, D. Laubretton, S. Riffault and D. Descamps: Pulmonary Susceptibility of Neonates to Respiratory Syncytial Virus Infection: A Problem of Innate Immunity? *J Immunol Res*, 2017, 8734504 (2017) doi:10.1155/2017/8734504
8. F. J. Culley, J. Pollott and P. J. Openshaw: Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood. *J Exp Med*, 196(10), 1381-6 (2002)
9. J. S. Tregoning and J. Schwarze: Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev*, 23(1), 74-98 (2010) doi:10.1128/CMR.00032-09
10. X. Roux, A. Remot, A. Petit-Camurdan, M. A. Nahori, H. Kiefer-Biasizzo, G. Marchal, M. Lagranderie and S. Riffault: Neonatal lung immune responses show a shift of

cytokines and transcription factors toward Th2 and a deficit in conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, 41(10), 2852-61 (2011) doi:10.1002/eji.201041224

11. A. Remot, D. Descamps, L. Jouneau, D. Laubret, C. Dubuquoy, S. Bouet, J. Lecardonnel, E. Rebours, A. Petit-Camurdan and S. Riffault: Flt3 ligand improves the innate response to respiratory syncytial virus and limits lung disease upon RSV reexposure in neonate mice. *Eur J Immunol*, 46(4), 874-84 (2016) doi:10.1002/eji.201545929

12. T. J. Ruckwardt, A. M. Malloy, K. M. Morabito and B. S. Graham: Quantitative and qualitative deficits in neonatal lung-migratory dendritic cells impact the generation of the CD8<sup>+</sup> T cell response. *PLoS Pathog*, 10(2), e1003934 (2014) doi:10.1371/journal.ppat.1003934

13. C. B. Hall, R. G. Douglas, Jr., R. L. Simons and J. M. Geiman: Interferon production in children with respiratory syncytial, influenza, and parainfluenza virus infections. *J Pediatr*, 93(1), 28-32 (1978)

14. S. A. Cormier, B. Shrestha, J. Saravia, G. I. Lee, L. Shen, J. P. DeVincenzo, Y. I. Kim and D. You: Limited type I interferons and plasmacytoid dendritic cells during neonatal respiratory syncytial virus infection permit immunopathogenesis upon reinfection. *J Virol*, 88(16), 9350-60 (2014) doi:10.1128/JVI.00818-14

15. W. M. Schneider, M. D. Chevillotte and C. M. Rice: Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*, 32, 513-45 (2014) doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231

16. S. Makris, M. Paulsen and C. Johansson: Type I Interferons as Regulators of Lung Inflammation. *Front Immunol*, 8, 259 (2017) doi:10.3389/fimmu.2017.00259

17. M. Goritzka, L. R. Durant, C. Pereira, S. Salek-Ardakani, P. J. Openshaw and C. Johansson: Alpha/beta interferon receptor signaling amplifies early proinflammatory cytokine production in the lung during respiratory syncytial virus infection. *J Virol*, 88(11), 6128-36 (2014) doi:10.1128/JVI.00333-14

18. P. L. Collins and J. A. Melero: Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res*, 162(1-2), 80-99 (2011) doi:10.1016/j.virusres.2011.09.020

19. R. Zeng, Y. Cui, Y. Hai and Y. Liu: Pattern recognition receptors for respiratory syncytial virus infection and design of vaccines. *Virus Res*, 167(2), 138-45 (2012) doi:10.1016/j.virusres.2012.06.003

20. C. Petes, N. Odoardi and K. Gee: The Toll for Trafficking: Toll-Like Receptor 7 Delivery to the Endosome. *Front Immunol*, 8, 1075 (2017) doi:10.3389/fimmu.2017.01075

21. K. Miyake, T. Shibata, U. Ohto, T. Shimizu, S. I. Saitoh, R. Fukui and Y. Murakami: Mechanisms controlling nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Int Immunol*, 30(2), 43-51 (2018) doi:10.1093/intimm/dxy016
22. S. I. Saitoh, F. Abe, A. Kanno, N. Tanimura, Y. Mori Saitoh, R. Fukui, T. Shibata, K. Sato, T. Ichinohe, M. Hayashi, K. Kubota, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, Y. Kikko, T. Katada, K. Kontani and K. Miyake: TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat Commun*, 8(1), 1592 (2017) doi:10.1038/s41467-017-01687-x
23. Y. Liu, D. Olagnier and R. Lin: Host and Viral Modulation of RIG-I-Mediated Antiviral Immunity. *Front Immunol*, 7, 662 (2016) doi:10.3389/fimmu.2016.00662
24. T. Ohman, J. Rintahaka, N. Kalkkinen, S. Matikainen and T. A. Nyman: Actin and RIG-I/MAVS signaling components translocate to mitochondria upon influenza A virus infection of human primary macrophages. *J Immunol*, 182(9), 5682-92 (2009) doi:10.4049/jimmunol.0803093
25. L. Saveanu, J. Babdor, M. Lawand and P. van Endert: Insulin-regulated aminopeptidase and its compartment in dendritic cells. *Mol Immunol*, 55(2), 153-5 (2013) doi:10.1016/j.molimm.2012.10.013
26. L. Saveanu, O. Carroll, M. Weimershaus, P. Guermontprez, E. Firat, V. Lindo, F. Greer, J. Davoust, R. Kratzer, S. R. Keller, G. Niedermann and P. van Endert: IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science*, 325(5937), 213-7 (2009) doi:10.1126/science.1172845
27. J. Babdor, D. Descamps, A. C. Adiko, M. Tohme, S. Maschalidi, I. Evnouchidou, L. R. Vasconcellos, M. De Luca, F. X. Mauvais, M. Garfa-Traore, M. M. Brinkmann, M. Chignard, B. Manoury and L. Saveanu: IRAP+ endosomes restrict TLR9 activation and signaling. *Nat Immunol*, 18(5), 509-518 (2017) doi:10.1038/ni.3711
28. A. Nikolaou, B. Stijlemans, D. Laoui, E. Schoupe, H. T. Tran, D. Tourwe, S. Y. Chai, P. M. Vanderheyden and J. A. Van Ginderachter: Presence and regulation of insulin-regulated aminopeptidase in mouse macrophages. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 15(4), 466-79 (2014) doi:10.1177/1470320313507621
29. M. Goritzka, S. Makris, F. Kausar, L. R. Durant, C. Pereira, Y. Kumagai, F. J. Culley, M. Mack, S. Akira and C. Johansson: Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *J Exp Med*, 212(5), 699-714 (2015) doi:10.1084/jem.20140825

30. S. Makris, M. Bajorek, F. J. Culley, M. Goritzka and C. Johansson: Alveolar Macrophages Can Control Respiratory Syncytial Virus Infection in the Absence of Type I Interferons. *J Innate Immun*, 8(5), 452-63 (2016) doi:10.1159/000446824
31. L. I. Ravi, L. Li, R. Sutejo, H. Chen, P. S. Wong, B. H. Tan and R. J. Sugrue: A systems-based approach to analyse the host response in murine lung macrophages challenged with respiratory syncytial virus. *BMC Genomics*, 14, 190 (2013) doi:10.1186/1471-2164-14-190
32. M. A. Rameix-Welti, R. Le Goffic, P. L. Herve, J. Sourimant, A. Remot, S. Riffault, Q. Yu, M. Galloux, E. Gault and J. F. Eleouet: Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nat Commun*, 5, 5104 (2014) doi:10.1038/ncomms6104
33. E. Aksoy, V. Albarani, M. Nguyen, J. F. Laes, J. L. Ruelle, D. De Wit, F. Willems, M. Goldman and S. Goriely: Interferon regulatory factor 3-dependent responses to lipopolysaccharide are selectively blunted in cord blood cells. *Blood*, 109(7), 2887-93 (2007) doi:10.1182/blood-2006-06-027862
34. B. Danis, T. C. George, S. Goriely, B. Dutta, J. Renneson, L. Gatto, P. Fitzgerald-Bocarsly, A. Marchant, M. Goldman, F. Willems and D. De Wit: Interferon regulatory factor 7-mediated responses are defective in cord blood plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, 38(2), 507-17 (2008) doi:10.1002/eji.200737760
35. Z. Ling, K. C. Tran and M. N. Teng: Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *J Virol*, 83(8), 3734-42 (2009) doi:10.1128/JVI.02434-08
36. J. Ren, T. Liu, L. Pang, K. Li, R. P. Garofalo, A. Casola and X. Bao: A novel mechanism for the inhibition of interferon regulatory factor-3-dependent gene expression by human respiratory syncytial virus NS1 protein. *J Gen Virol*, 92(Pt 9), 2153-9 (2011) doi:10.1099/vir.0.032987-0
37. K. M. Spann, K. C. Tran and P. L. Collins: Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol*, 79(9), 5353-62 (2005) doi:10.1128/JVI.79.9.5353-5362.2005
38. S. Swedan, A. Musiyenko and S. Barik: Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease levels of multiple members of the cellular interferon pathways. *J Virol*, 83(19), 9682-93 (2009) doi:10.1128/JVI.00715-09

39. K. M. Quicke, M. S. Diamond and M. S. Suthar: Negative regulators of the RIG-I-like receptor signaling pathway. *Eur J Immunol*, 47(4), 615-628 (2017) doi:10.1002/eji.201646484
40. M. Si-Tahar, F. Blanc, L. Furio, D. Choppy, V. Balloy, M. Lafon, M. Chignard, L. Fiette, F. Langa, P. Charneau and J. Pothlichet: Protective role of LGP2 in influenza virus pathogenesis. *J Infect Dis*, 210(2), 214-23 (2014) doi:10.1093/infdis/jiu076
41. V. Rincheval, M. Lelek, E. Gault, C. Bouillier, D. Sitterlin, S. Blouquit-Laye, M. Galloux, C. Zimmer, J. F. Eleouet and M. A. Rameix-Welti: Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nat Commun*, 8(1), 563 (2017) doi:10.1038/s41467-017-00655-9
42. S. Morris, M. S. Swanson, A. Lieberman, M. Reed, Z. Yue, D. M. Lindell and N. W. Lukacs: Autophagy-mediated dendritic cell activation is essential for innate cytokine production and APC function with respiratory syncytial virus responses. *J Immunol*, 187(8), 3953-61 (2011) doi:10.4049/jimmunol.1100524
43. M. Reed, S. H. Morris, S. Jang, S. Mukherjee, Z. Yue and N. W. Lukacs: Autophagy-inducing protein beclin-1 in dendritic cells regulates CD4 T cell responses and disease severity during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol*, 191(5), 2526-37 (2013) doi:10.4049/jimmunol.1300477
44. M. Reed, S. H. Morris, A. B. Owczarczyk and N. W. Lukacs: Deficiency of autophagy protein Map1-LC3b mediates IL-17-dependent lung pathology during respiratory viral infection via ER stress-associated IL-1. *Mucosal Immunol*, 8(5), 1118-30 (2015) doi:10.1038/mi.2015.3
45. S. M. Pokharel, N. K. Shil and S. Bose: Autophagy, TGF-beta, and SMAD-2/3 Signaling Regulates Interferon-beta Response in Respiratory Syncytial Virus Infected Macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*, 6, 174 (2016) doi:10.3389/fcimb.2016.00174
46. A. Kuma, M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhiya and N. Mizushima: The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432(7020), 1032-6 (2004) doi:10.1038/nature03029
47. A. J. Stranks, A. L. Hansen, I. Panse, M. Mortensen, D. J. Ferguson, D. J. Puleston, K. Shenderov, A. S. Watson, M. Veldhoen, K. Phadwal, V. Cerundolo and A. K. Simon: Autophagy Controls Acquisition of Aging Features in Macrophages. *J Innate Immun*, 7(4), 375-91 (2015) doi:10.1159/000370112
48. Y. Hirata, T. Hosaka, T. Iwata, C. T. Le, B. Jambaldorj, K. Teshigawara, N. Harada, H. Sakaue, T. Sakai, K. Yoshimoto and Y. Nakaya: Vimentin binds IRAP and is involved in

GLUT4 vesicle trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*, 405(1), 96-101 (2011)  
doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.134

49. H. Tojo, I. Kaieda, H. Hattori, N. Katayama, K. Yoshimura, S. Kakimoto, Y. Fujisawa, E. Presman, C. C. Brooks and P. F. Pilch: The Formin family protein, formin homolog overexpressed in spleen, interacts with the insulin-responsive aminopeptidase and profilin IIa. *Mol Endocrinol*, 17(7), 1216-29 (2003) doi:10.1210/me.2003-0056

50. S. C. Brock, J. R. Goldenring and J. E. Crowe, Jr.: Apical recycling systems regulate directional budding of respiratory syncytial virus from polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25), 15143-8 (2003) doi:10.1073/pnas.2434327100

51. M. Larance, G. Ramm, J. Stockli, E. M. van Dam, S. Winata, V. Wasinger, F. Simpson, M. Graham, J. R. Junutula, M. Guilhaus and D. E. James: Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *J Biol Chem*, 280(45), 37803-13 (2005) doi:10.1074/jbc.M503897200

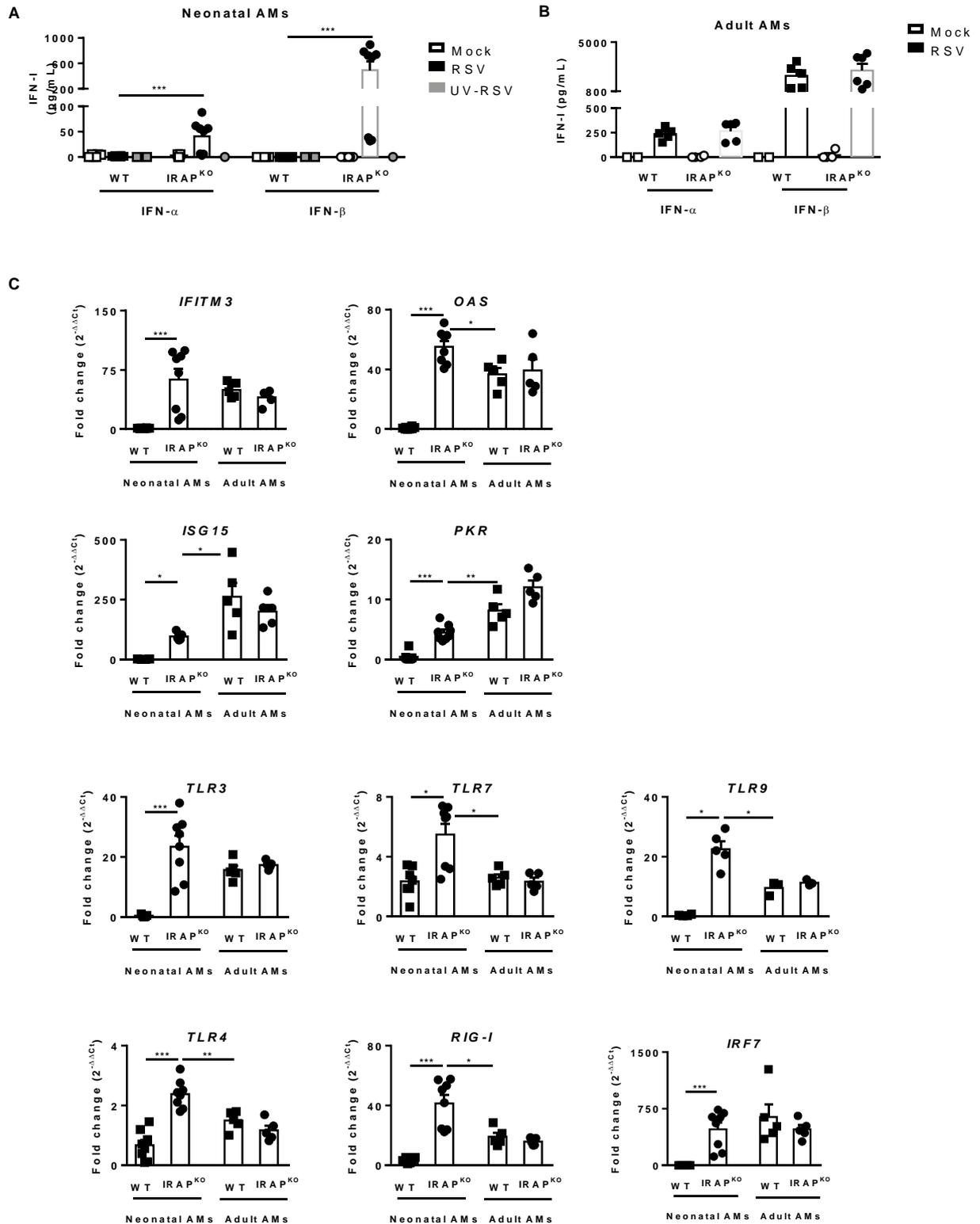
52. C. Mauvezin, A. L. Neisch, C. I. Ayala, J. Kim, A. Beltrame, C. R. Braden, M. K. Gardner, T. S. Hays and T. P. Neufeld: Coordination of autophagosome-lysosome fusion and transport by a Klp98A-Rab14 complex in *Drosophila*. *J Cell Sci*, 129(5), 971-82 (2016) doi:10.1242/jcs.175224

53. Z. Szatmari, V. Kis, M. Lippai, K. Hegedus, T. Farago, P. Lorincz, T. Tanaka, G. Juhasz and M. Sass: Rab11 facilitates cross-talk between autophagy and endosomal pathway through regulation of Hook localization. *Mol Biol Cell*, 25(4), 522-31 (2014) doi:10.1091/mbc.E13-10-0574

54. Z. Szatmari and M. Sass: The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators: a review. *Autophagy*, 10(7), 1154-66 (2014) doi:10.4161/auto.29395

55. T. J. Utey, N. A. Ducharme, V. Varthakavi, B. E. Shepherd, P. J. Santangelo, M. E. Lindquist, J. R. Goldenring and J. E. Crowe, Jr.: Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(29), 10209-14 (2008) doi:10.1073/pnas.0712144105

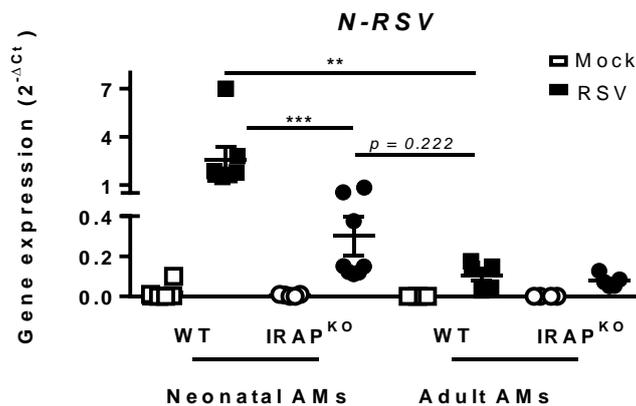
## FIGURES & LEGENDS



**Figure 1 : Deletion of IRAP restores type I IFN (IFN-I) responses in neonatal AMs following RSV infection.**

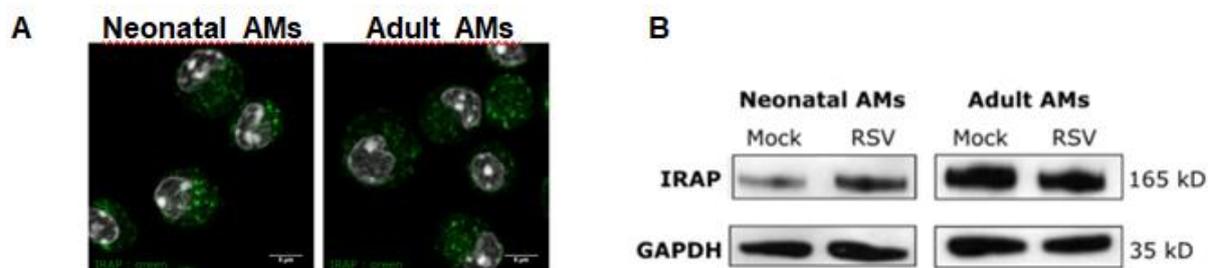
Neonatal or adult AMs from wild-type (WT) or IRAP-deficient (IRAP<sup>KO</sup>) mice were exposed with Hep2-supernatant (Mock, white symbol) or rRSV-mCherry (RSV, black symbol) at MOI

of 5 or UV-inactivated rRSV-mCherry (UV-RSV, grey symbol) for 2 hours. The production of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  were measured 24 h post-infection in supernatants of neonatal AMs (A) or adult AMs (B) using ProcartaPlex immunoassay. (C) The expressions of different ISGs and innate sensing receptors were determined by qRT-PCR performed on cell lysates 24 h post-infection. The level of expression was calculated by the formula  $2^{-\Delta Ct}$  with  $\Delta Ct_{RSV} = Ct_{gene} - Ct_{GADPH}$ . Results are expressed in fold-change calculated with the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  with  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{RSV}/\text{mean of } \Delta Ct_{\text{mock}}$ . Data are from two experiments. Means  $\pm$  SEM are represented.



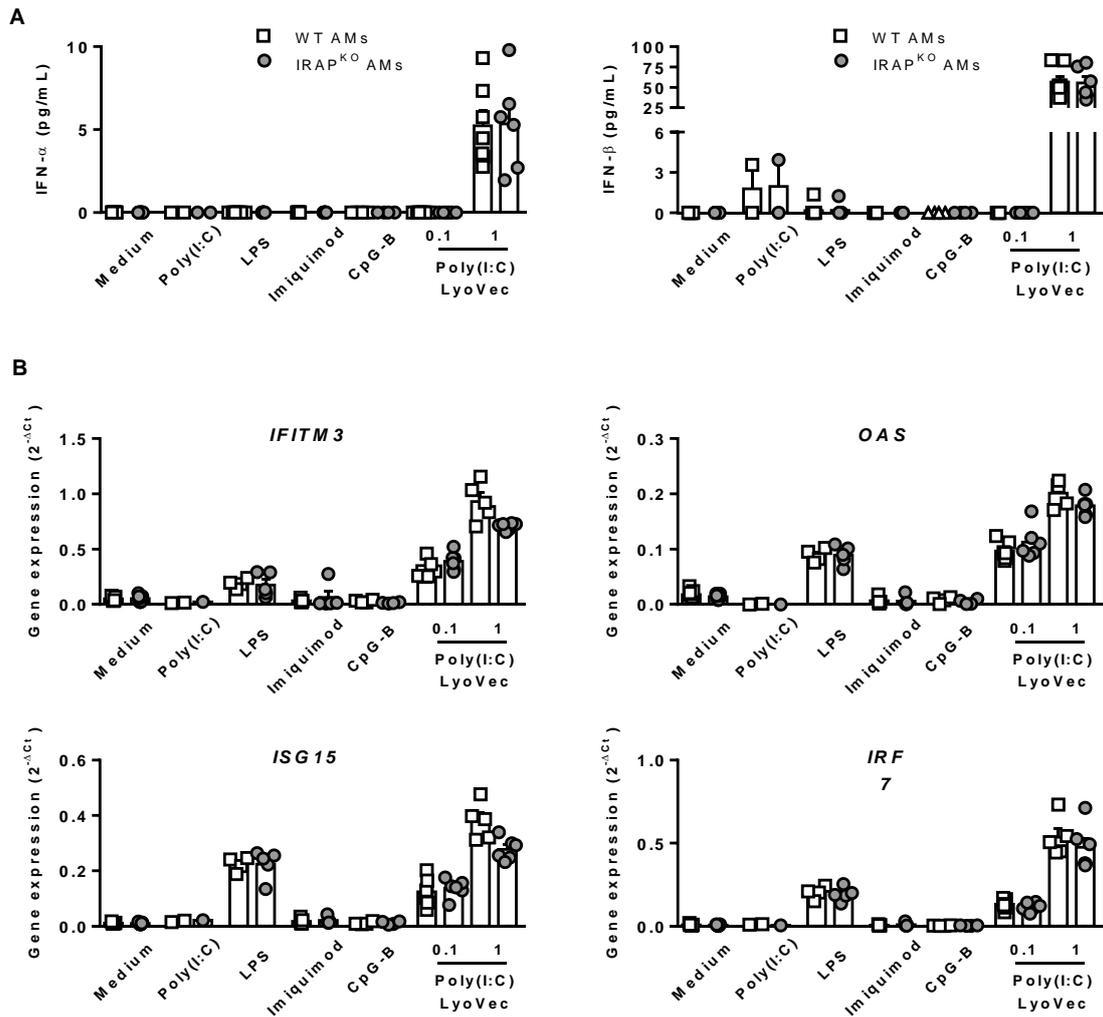
**Figure 2 : RSV replication in AMs.**

Neonatal or adult AMs from wild-type (WT) or IRAP-deficient (IRAPKO) mice were exposed with rRSV-mCherry (RSV, black symbol) at MOI of 5 or Hep2-supernatant (Mock, white symbol) for 2 hours. RSV replication was evaluated by the level expression of the gene encoding for the viral N protein quantified by qRT-PCR performed on cell lysates 24 h post-infection. Results were calculated by the formula  $2^{-\Delta Ct}$  with  $\Delta Ct = Ct_{gene} - Ct_{GADPH}$ . Data are from two experiments. Means  $\pm$  SEM are represented.



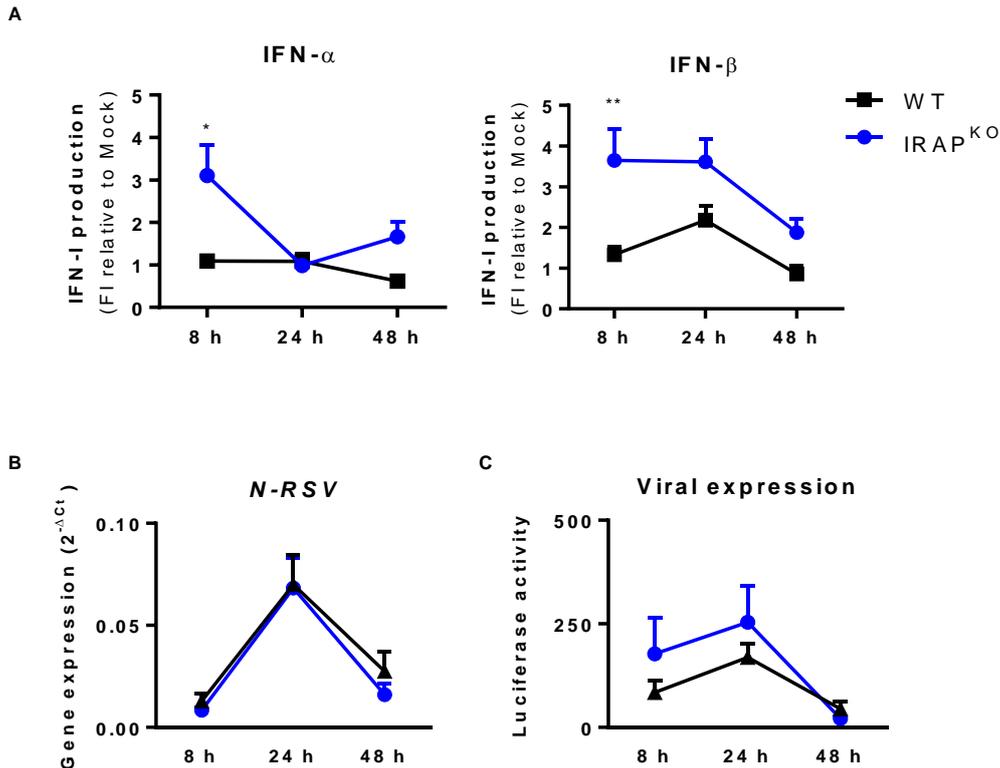
**Figure 3 : Expression of IRAP protein in AMs.**

(A) Immunofluorescence microscopy of neonatal or adult AMs from WT mice stained with anti-IRAP (green labelling) and nuclear DAPI labelling (grey). (B) Immunoblot analysis of endogenous IRAP and GAPDH proteins in AMs 24 h after an exposition with Hep2-supernatant (Mock) or rRSV-mCherry at MOI of 5 for 2 hours.



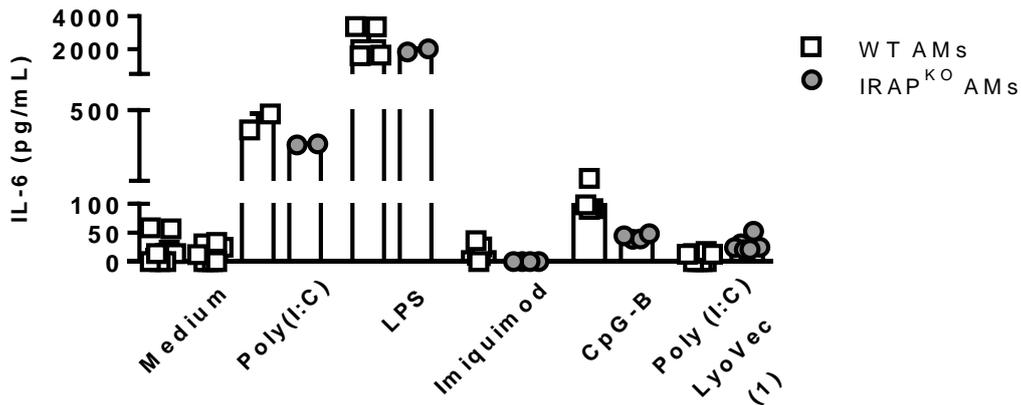
**Figure 4 : Type I IFN productions of neonatal AMs in response to innate sensing receptor stimulation by PAMPs is independent of IRAP expression.**

Neonatal AMs from wild-type (WT, white square) or IRAP-deficient (IRAP<sup>KO</sup>, grey circle) mice were stimulated with different PAMPs; Poly(I:C) (100  $\mu$ g/mL), LPS (10 ng/mL), Imiquimod (100  $\mu$ g/mL), CpG-B (100  $\mu$ g/mL) or Poly(I:C)-LyoVec (0.1 or 1  $\mu$ g/mL). (A) The production of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  were measured 24 h post-infection in supernatants using ProcartaPlex immunoassay. (B) The expressions of different ISGs were determined by qRT-PCR performed on cell lysates 24 h post-infection. The level of expression was calculated by the formula  $2^{-\Delta Ct}$  with  $\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{GADPH}}$ . Data are from four experiments. Means  $\pm$  SEM are represented.



**Figure 5 : IRAP-deficient newborn mice display an enhanced production of type I IFNs in the lungs following RSV infection.**

Wild-type (WT) or IRAP-deficient (IRAP<sup>KO</sup>) neonatal mice were infected with Hep2-supernatant or rRSV-luciferase. (A) The productions of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  were measured post-infection in lung lysates using ProcartaPlex immunoassay. Results are expressed in fold increase relative to mock and are calculated by the formula  $\text{signal MFI}_{\text{Infected}} / (\text{mean of signal MFI}_{\text{Mock}})$  at 8, 24 or 48 hours post-infection. (B) RSV replication in the lungs was evaluated by quantification of gene expression of the N-RSV protein assessed by qRT-PCR analysis and calculated by the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  with  $\Delta Ct = Ct_{\text{N-RSV}} - Ct_{\text{GADPH}}$ . (C) Luciferase activity was measured in lung lysates by quantification of photon emission (radiance in photon/sec/cm<sup>2</sup>/sr) and was normalized to the amount of lysed tissue (mg of lungs) in order to determine the viral expression. Data are mean  $\pm$  SEM from three independent experiments with  $n = 8-10$  mice per group and per hours post-infection.



**Supplemental Figure 1 : The deficient expression of IRAP does not change the reactivity of neonatal AMs to innate sensing receptor stimulations by PAMPs.**

Neonatal AMs from wild-type (WT, white square) or IRAP-deficient (IRAP<sup>KO</sup>, grey circle) mice were stimulated with different PAMPs; Poly(I:C) (100 µg/mL), LPS (10 ng/mL), Imiquimod (100 µg/mL), CpG-B (100 µg/mL) or Poly(I:C)-LyoVec (0.1 or 1 µg/mL). The production of IL-6 was measured 24 h post-stimulation in supernatants using ELISA. Data are from four experiments. Means ± SEM are represented.

### 1.3. Résultats supplémentaires non publiés

#### 1.3.1. *Le rôle de la protéine IRAP dans la régulation de la réponse innée des cellules épithéliales pulmonaires infectées par le VRS*

Nous avons focalisé nos études sur le rôle de l'aminopeptidase IRAP dans les MAs puisqu'ils sont la principale source d'IFN-I au cours de l'infection par le VRS de souris adultes. Néanmoins, les cellules épithéliales respiratoires sont aussi des cellules productrices d'IFN-I et -III et sont le site privilégié de la réplication du VRS. Nous avons donc étendu notre étude du rôle de la protéine IRAP dans les cellules épithéliales pulmonaires néonatales (figure 13).

Après l'euthanasie des souris C57BL6 WT et IRAP KO, les lavages broncho-alvéolaires et la perfusion intracardiaque de PBS ont permis d'éliminer les MAs et les cellules sanguines des poumons. Les poumons ont été prélevés et digérés en présence de dispase et de DNase pendant 1 h. Les lysats pulmonaires ont été filtrés puis centrifugés pour recueillir les cellules. Les culots ont été remis en suspension et les cellules déposées dans boîtes de pétri recouvertes d'anticorps anti-CD45 et anti-CD16/CD32 pour éliminer les cellules myéloïdes. Les surnageants ont été récoltés après 2 h d'incubation puis centrifugés pour recueillir les cellules pulmonaires. Les cellules ont été remises en suspension et 100  $\mu$ L ont été déposés dans des puits de P96 recouverts de fibronectine. Après 7 jours de croissance cellulaire, les cellules ont été infectées avec le virus recombinant VRS-mCherry ou non infectées. L'émission de la fluorescence par le VRS-mCherry au cours de sa réplication a été évaluée à 6 h, 24 h, 48 h et 72 h post-infection (580-620 nm, lecture au Tecan). Les cellules ont été congelées pour réaliser des analyses de qRT-PCR et les surnageants récoltés pour doser les cytokines et les interférons.

La réplication du VRS a été évaluée par l'émission de fluorescence ou par analyse de l'expression du gène N du virus par qRT-PCR. Ces deux techniques montrent que le VRS se réplique bien dans les cellules épithéliales isolées de poumons de souris WT ou IRAP KO à 1 et 2 jours post-infection (figure 13A). Cependant, en l'absence de la protéine IRAP, la réplication du VRS est significativement réduite 2 jours post-infection (figure 13A). La production d'IFN-III et d'IL-6 au cours de l'infection par le VRS ont été mesurées par ELISA dans les surnageants de culture (figures 13C et 13D). Les cellules épithéliales IRAP KO produisent significativement plus d'IFN-III et d'IL-6 que leurs homologues WT en réponse à l'infection. Parmi les ISGs testés (quantification des transcrits par PCR en temps réel), le niveau d'expression des transcrits IRF7 est significativement augmenté en l'absence de la

protéine IRAP alors que le niveau d'expression des transcrits IFITM3 n'est pas modifié (figures 13E et 13F). Nous n'avons pas encore quantifié la production d'IFN-I dans les surnageants de culture.

L'ensemble de ces données indique que la protéine IRAP est également impliquée dans la réponse innée des cellules épithéliales pulmonaires à l'infection par le VRS au cours de la période néonatale. Cependant, les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire par la protéine IRAP peuvent être différents entre les MAs et les cellules épithéliales pulmonaires néonatales. Le rôle de la protéine IRAP dans le contrôle des réponses IFNs doit être également étudié dans les cellules épithéliales pulmonaires adultes.

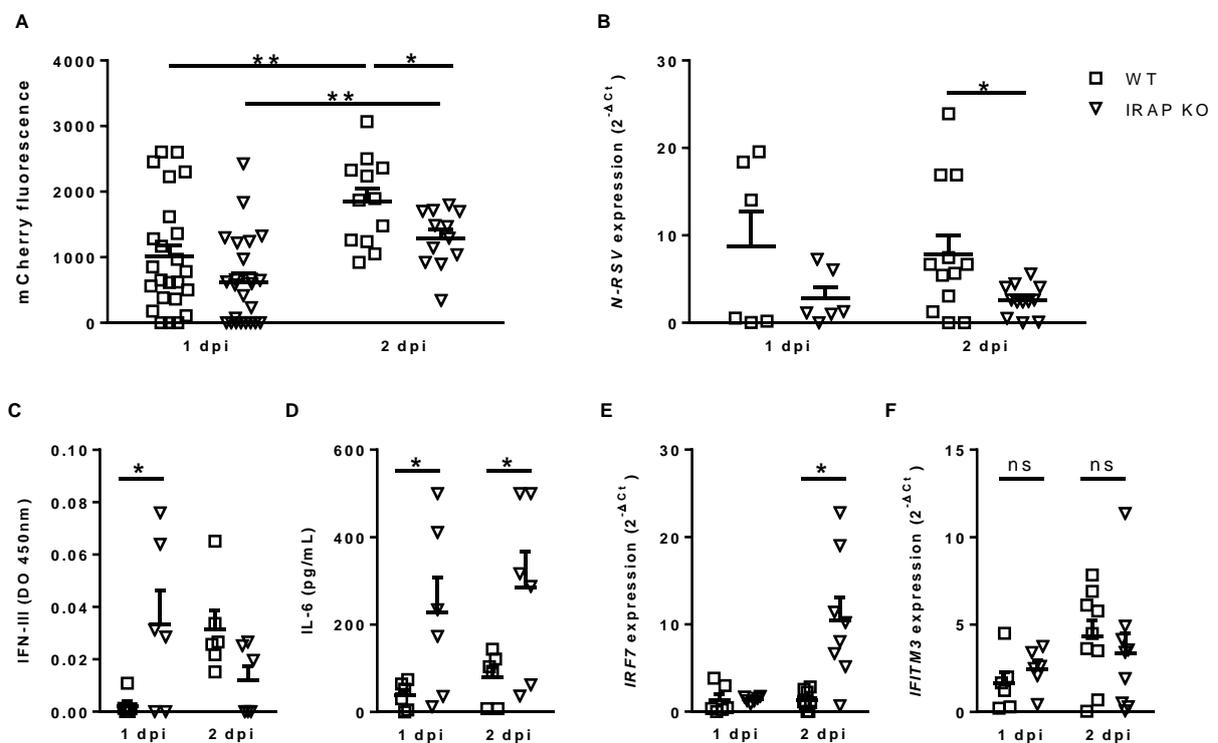


Figure 13 : Le rôle de IRAP dans la réponse de cellules épithéliales pulmonaires primaires infectées par le VRS. Des cellules épithéliales pulmonaires ont été isolées de souris C57BL6 WT ou IRAP KO par digestion en dispase et DNase pendant 1 h. Les cellules ont été infectées par un VRS recombinant produisant la protéine mCherry ce qui permet de quantifier la répllication virale par le niveau de fluorescence au cours du temps (A). Un ou deux jours après l'infection, les cellules ont été lysées pour analyser l'expression du gène N du VRS, d'IRF7 et d'IFITM3 par qRT-PCR (B) (E) (F). L'IFN-III (C) et l'IL-6 (D) ont été dosées dans les surnageants de culture par ELISA. Les données issues de deux expériences indépendantes ont été rassemblées pour chacune des figures excepté un jour post-infection pour l'analyse de l'expression de N (B). Test statistique utilisé : Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . dpi : day post-infection.

### 1.3.2. *La caractérisation du compartiment des endosomes IRAP<sup>+</sup> dans les MAs*

Pour étendre notre étude du contrôle exercé par la protéine IRAP sur la réponse IFN-I lors de l'infection par le VRS en période néonatale, nous avons souhaité caractériser plus finement le compartiment endosomal IRAP<sup>+</sup> dans les MAs néonataux et adultes.

Dans les cellules dendritiques humaines, IRAP co-localise à plus de 50 % avec EEA1, Rab 14, STX6 et MMR [216,217]. Pour caractériser les endosomes IRAP<sup>+</sup> dans les MAs, j'ai réalisé des expériences de co-localisation en immuno-fluorescence avec le marqueur EEA1, à l'état basal ou après stimulation par l'imiquimod, ligand du TLR7. Nous avons choisi de stimuler les MAs par l'imiquimod sur la base des études menées dans les cellules dendritiques suggérant que l'activation du TLR7 est contrôlée par la protéine IRAP. Les souris C57BL6 WT et IRAP KO ont été euthanasiées et les lavages bronchoalvéolaires ont été réalisés. Les MAs ont été isolés puis ensemencés sur des lames recouvertes de fibronectine pendant la nuit à 37°C. Le lendemain les cellules ont été stimulées avec l'imiquimod ou non traitées. Après 24 h de stimulation, les MAs ont été fixés en paraformaldéhyde (4 %) et perméabilisés en présence de saponine (0,2 %) et d'albumine de sérum bovin (0,2 %). Les cellules ont été marquées avec les anticorps monoclonaux anti-IRAP et anti-EEA1 et colorées au DAPI. Des anticorps secondaires anti-IgG de souris ou de lapin respectivement couplés à l'Alexa 488 (A488) et à l'Alexa 594 (A594) ont été utilisés comme anticorps secondaires.

Mes travaux préliminaires montrent que la protéine IRAP co-localise en partie avec EEA1 à l'état basal dans le cytoplasme des MAs néonataux (figure 14, flèches blanches). En présence d'imiquimod cette co-localisation disparaît. En l'absence de l'expression de la protéine IRAP (MAs IRAP KO), et après traitement à l'imiquimod, EEA1 est essentiellement détectée à la membrane de la cellule. Ces données préliminaires indiquent un lien entre IRAP et le trafic de vésicules endosomales EEA1<sup>+</sup> dans les MAs comme démontré précédemment dans les cellules dendritiques [216,217].

Sur la base des études menées lors de la stimulation des MAs de souris par les différents ligands de TLRs et de RLRs et lors de l'exposition au VRS (figures 1 et 4 de l'article), nous avons pu constater que la réponse IFN-I est influencée par la présence de la protéine IRAP uniquement au cours de la réplication du VRS.

De ce fait, il serait intéressant de poursuivre les investigations en examinant la maturation des endosomes IRAP<sup>+</sup> (acquisition de marqueurs d'endosomes précoces, tardifs ou de lysosomes) au cours de l'infection par le VRS dans les MAs WT et IRAP KO ainsi que la présence de composants viraux (comme par exemple le complexe RNP) au sein des

endosomes IRAP<sup>+</sup>. Ces expériences permettraient d'indiquer le devenir du virus dans les MAs (par exemple la rétention du génome viral dans des compartiments de la cellule inaccessibles aux PRRs).

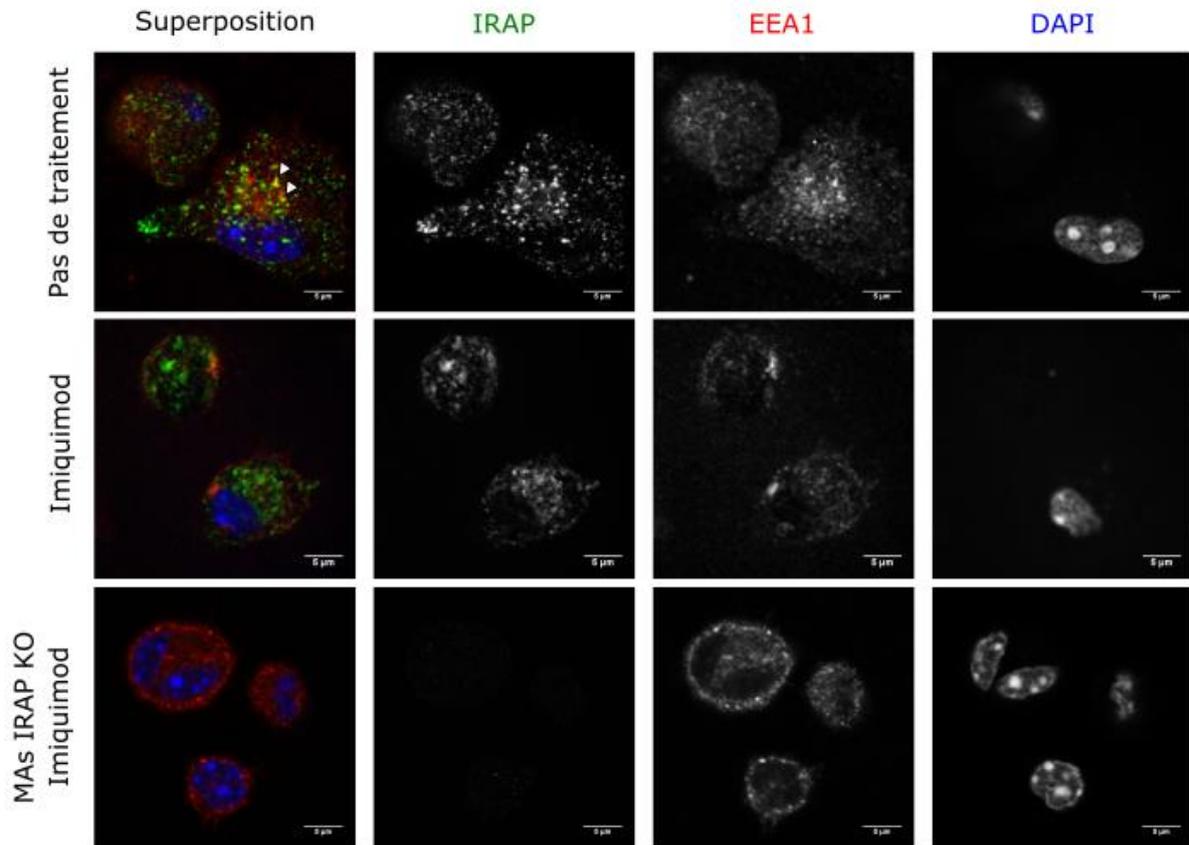


Figure 14. La protéine IRAP co-localise en partie avec EEA1 dans les MAs de souris WT à l'état basal. Les MAs ont été isolés de souris WT ou IRAP KO puis stimulés pendant 24 h avec l'imiquimod (10 µg/mL) ou non traités. Les cellules ont ensuite été marquées par des anticorps anti-IRAP (A488, vert) et anti-EEA1 (A594, rouge) et le noyau coloré au DAPI (bleu). La co-localisation entre IRAP et EEA1 est indiquée par des flèches blanches. Les images ont été acquises sur un microscope confocal Leica SP8 (grossissement x63). Le traitement et l'analyse des images ont été réalisés avec le logiciel ImageJ.

### 1.3.3. L'autophagie comme mécanisme de régulation de la réponse IFN-I par la protéine IRAP au cours de l'infection par le VRS dans les MAs en période néonatale

L'aminopetidase IRAP intervient dans la régulation du trafic endo-lysosomal qui est particulièrement important pour le transport, le recyclage et la dégradation de molécules internalisées par la cellule. Le système endolysosomal est étroitement lié à l'autophagie principalement connue comme un processus physiologique d'autodigestion nécessaire à la survie cellulaire en cas de carence énergétique. Il existe plusieurs types d'autophagie : la microautophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes et la forme principale, la

macroautophagie (ou simplement désignée autophagie). Je me focaliserai sur cette dernière qui comprend également le processus de dégradation spécifique aux mitochondries, la mitophagie. L'autophagie est régulée par l'activation séquentielle de protéines Atg (*autophagy-related genes*), découvertes chez la levure, qui s'assemblent en complexe pour générer une vacuole appelée autophagosome. La formation de l'autophagosome comprend trois phases : l'initiation, l'élongation et la maturation. Atg8, aussi nommée LC3 chez les mammifères (ou MAP1LC3, *microtubule associated protein 1 light-chain 3*), intervient après la phase d'initiation. Lors de la phagocytose de billes de latex par des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse IRAP KO, la protéine LC3 s'accumule autour des billes 2 h après le début de l'expérience de façon significativement plus importante que dans les cellules sauvages exprimant la protéine IRAP (L. Saveanu, D. Descamps, données non publiées). Dans les adipocytes et les cellules de muscles lisses, les protéines IRAP, Rab11 et Rab14 composent les GSV et dans les cellules dendritiques la protéine IRAP colocalise avec Rab14 (voir partie 4.3.1 de l'introduction) [296]. Les GTPases Rab sont des régulateurs importants du trafic vésiculaire intracellulaire. Les protéines Rab se localisent à la membrane d'organites spécifiques, dont les protéines et lipides associés sont recyclés à la membrane plasmique, transportés à l'appareil de Golgi ou dégradés au sein des lysosomes. Les protéines Rab interagissent avec le cytosquelette et le réseau de microtubules grâce à de nombreux effecteurs (protéines FIPs, *family interacting partners*) et protéines motrices (kinésines et dynéine). Rab11 associée à FIP-1/-2 est requise pour l'assemblage et le bourgeonnement du VRS à la surface apicale de cellules épithéliales humaines [297,298]. Rab11 et Rab14 se trouvent au carrefour de l'autophagie et de la voie endolysosomale. En réponse à une privation nutritive (induction de l'autophagie), Rab 11 facilite la fusion des endosomes avec les autophagosomes en levant l'inhibition exercée par la protéine Hook sur les endosomes tardifs chez la drosophile [299]. Dans le même modèle, Mauvezin *et al* (2016) ont montré que Rab14 permet la fusion des autophagosomes et des lysosomes [300]. Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent que la protéine IRAP pourrait participer à la régulation du processus autophagique dans les cellules de l'immunité innée.

De nombreux travaux mettent en avant le rôle de l'autophagie dans la régulation de l'immunité. L'autophagie est impliquée dans l'élimination de pathogènes intracellulaires, dans le contrôle de l'inflammation, la sécrétion de médiateurs immunitaires et la mise en place de l'immunité adaptative (pour revue [301]). A titre d'exemple, les autophagosomes peuvent contenir des PAMPs et de ce fait facilitent leur reconnaissance par les TLRs intracytosoliques en libérant les PAMPs au sein de la lumière endosomale. Lee *et al* (2007)

ont montré qu'en l'absence d'autophagie (utilisation d'inhibiteurs tels que la 3-méthyladenine (3-MA), de wortmannine ou de souris chimériques  $Atg5^{-/-}$ ) les CDp ne produisent pas d'IFN-I lors de la reconnaissance et de l'activation du TLR7 par des virus à ARN simple brin [302]. Morris *et al* (2011) ont montré dans des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse que l'autophagie induite par carence nutritive associée à l'infection par le VRS exacerbe les productions d'IFN- $\beta$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6. En l'absence de MyD88 ou de TRIF (protéines adaptatrices des TLR3, TLR4 et TLR7), les productions de ces cytokines sont réduites au moins de moitié [303]. Par ailleurs, Pokharel *et al* (2016) ont montré que l'autophagie était nécessaire à la production d'IFN- $\beta$  par l'intermédiaire du TGF- $\beta$  dans des macrophages dérivés de moelle osseuse lors de leur exposition au VRS [304]. Kuma *et al* (2004), grâce à l'utilisation de souris recombinantes exprimant la protéine LC3 couplée à la protéine fluorescente verte GFP (*green fluorescent protein*), ont montré que l'autophagie est particulièrement induite dans les poumons, le cœur et d'autres organes néonataux durant les premières heures de vie des souriceaux [305]. Toutefois, l'autophagie semble rapidement réprimée 1 jour après la naissance [305]. Enfin, il apparaît que l'autophagie est indispensable à la survie des souriceaux. L'absence d'expression de la protéine Atg5 ou d'Atg6 (aussi appelée beclin) conduit à la mort de l'ensemble des animaux au cours du premier jour de leur vie [305,306].

Ainsi, étant donné que l'autophagie contribue à l'induction des IFN-I dans les macrophages dérivés de moelle osseuse de souris adultes et que la présence de la protéine IRAP empêche les souriceaux de produire les IFN-I au cours de l'infection par le VRS, nous supposons un rôle répresseur de la protéine IRAP sur l'autophagie pendant la période néonatale à l'origine de l'inhibition de la réponse IFN-I au cours de l'infection par le VRS.

J'ai donc commencé à tester cette hypothèse en analysant l'autophagie à l'homéostasie et lors de l'exposition au VRS dans des MAs de souriceaux et d'adultes et évalué si ce processus biologique est dépendant de la présence de la protéine IRAP dans les cellules.

Les MAs ont été isolés à partir des lavages broncho-alvéolaires réalisés chez des souriceaux et des adultes C57BL6 WT et IRAP KO puisensemencés sur des lames recouvertes de fibronectine pendant la nuit à 37°C. Le lendemain les cellules ont été exposées au VRS ou non infectées (mock). Après 2 h ou 24 h d'incubation, les MAs ont été fixés en paraformaldéhyde (4 %) et perméabilisés en présence de saponine (0,2 %) et d'albumine de sérum bovin (0,2 %). Les cellules ont été marquées avec l'anticorps monoclonal anti-beclin et colorées au DAPI. Un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 594 (A594) a été utilisé pour révéler le marquage beclin qui a été quantifié à l'aide du logiciel *Imaris 7.2*.

Beclin est une protéine de l'autophagie dont le rôle est indispensable au début de la formation de l'autophagosome. A l'état basal, le nombre de spots beclin<sup>+</sup> dans les MAs est significativement plus important chez les souriceaux que chez les adultes (figure 15B, conditions mock/WT). En revanche, la quantité de spots beclin<sup>+</sup> est réduite 2 h et 24 h post-infection, dans les MAs néonataux alors qu'elle est augmentée dans les MAs adultes (figure 15B, conditions 2h/WT et 24h/WT). Ces données sont en accord avec les observations faites par l'équipe de Santanu Bose qui démontre la nécessité de l'induction de l'autophagie dans les macrophages dérivés de moelle osseuse de souris adultes pour produire l'IFN- $\beta$  [304]. En l'absence de la protéine IRAP, le nombre de spots beclin<sup>+</sup> augmente légèrement dans les MAs néonataux et très fortement dans les cellules adultes dans lesquelles ce nombre est déjà importante à l'état basal (figure 15B, conditions 2h/IRAP KO). Ces résultats suggèrent que l'infection par le VRS des MAs de souriceaux provoque une diminution de l'autophagie, qui est dépendante de la présence de la protéine IRAP.

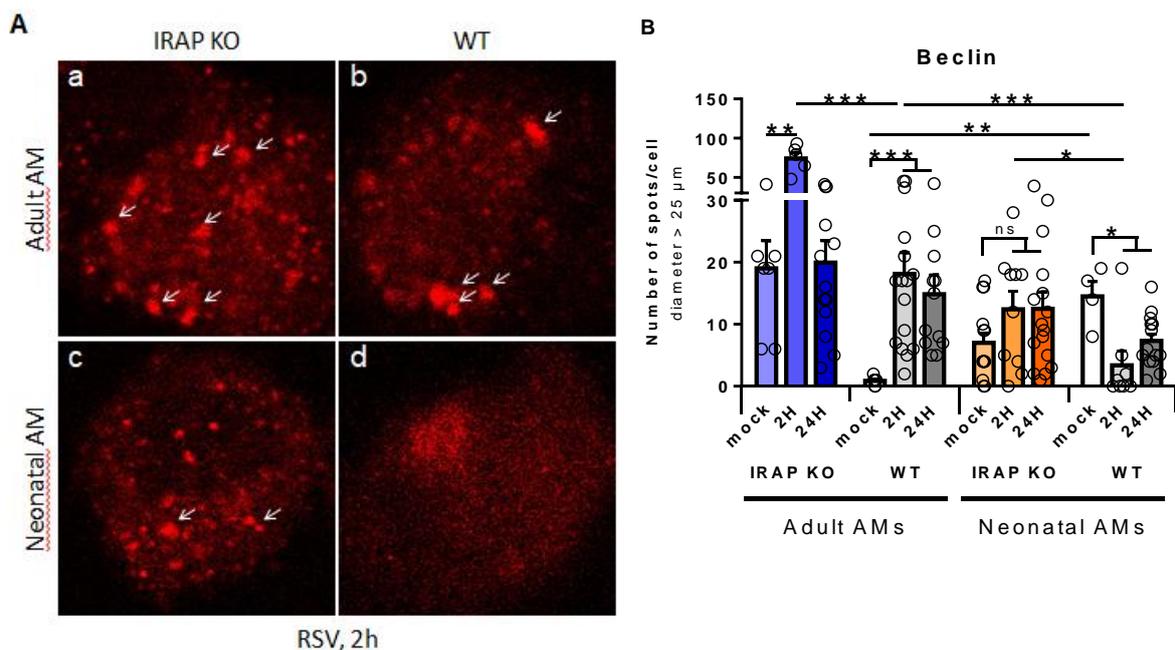


Figure 15. L'expression de beclin est réduite dans les MAs néonataux infectés par le VRS. Les MAs ont été isolés de souris adultes ou de souriceaux C57BL6 WT ou IRAP KO puis infectés pendant 2 h ou 24 h par le VRS. Les cellules ont été marquées par un anticorps anti-beclin (A594, rouge) et au DAPI (non montré). A. Images prises en microscopie confocale (grossissement x63) puis analysées avec le logiciel Imaris 7.2. Une cellule de chacune des populations de MAs analysées 2 h après l'infection par le VRS est montrée : A(a), MA de souris adulte IRAP KO ; A(b) MA de souris adulte WT ; A(c) MA de souriceau IRAP KO ; A(d) MA de souriceau WT. Les flèches indiquent les spots considérés positifs pour beclin (beclin<sup>+</sup>) dont le diamètre est supérieur à 25  $\mu$ m et l'intensité supérieure à 1800. B. Nombre de spots beclin<sup>+</sup> par MA analysé pour chacune des conditions testée. n=4 à 16 cellules

analysées par condition testée. Test statistique utilisé : Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Il s'agit d'une unique expérience.

Dans le but de tester l'hypothèse que la production d'IFN-I et d'IL-6 au cours de l'infection par le VRS est dépendante de l'autophagie et de la protéine IRAP, j'ai utilisé des inhibiteurs de l'autophagie dans le contexte néonatal IRAP KO pour inhiber la réponse IFN-I des MAs (figure 16). La 3-MA intervient dans l'inhibition de la formation des autophagosomes en inhibant les kinases PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) de classe I et III impliquées dans le contrôle de l'activation de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), un régulateur clé de nombreux processus biologiques dont la biosynthèse des protéines, la croissance cellulaire et l'autophagie (pour revue [307]).

Les MAs ont été isolés à partir des lavages broncho-alvéolaires réalisés chez des souriceaux IRAP KO, exposés ou non à la 3-MA pendant 2 h puis infectés par le VRS (avec ou sans 3-MA) ou non infectés (mock). Après 24 h d'incubation post-infection VRS, les surnageants de culture ont été récoltés et les MAs lysés afin d'analyser par qRT-PCR l'expression du gène N du virus et d'IFITM3.

Mes résultats indiquent que l'inhibition de l'autophagie avec la drogue 3-MA dans les MAs IRAP KO néonataux augmente l'expression du gène N du VRS (figure 16A) et réduit l'expression d'IFITM3 et la production d'IL-6 (figure 16B et 16C). La production d'IFN-I dans les surnageants de culture doit encore être dosée. Il semblerait donc que l'autophagie est nécessaire à l'induction de la réponse innée antivirale (IFITM3 et IL-6) au cours de l'infection par le VRS dans le contexte IRAP KO. Cependant, ces résultats nécessitent d'être confirmés et complétés avec des souris adultes WT et IRAP KO. Bien que la 3-MA soit couramment utilisée pour inhiber l'autophagie [304,308,309], son mécanisme d'action est complexe et l'interprétation des données nécessite une certaine réserve. Wu *et al* (2010) ont montré que la 3-MA bloque de manière persistante la PI3K de classe I mais seulement de manière transitoire la PI3K de classe III dans des fibroblastes embryonnaires murins [310]. Ces auteurs ont montré l'accumulation de marqueurs autophagiques dès 6 h d'exposition à la 3-MA et suggèrent de travailler avec un autre inhibiteur de l'autophagie, la wortmannine, qui inhibe de manière persistante la PI3K de classe III et transitoirement la PI3K de classe I [311]. Mes expériences préliminaires avec la wortmannine ne me permettent pas de conclure quant à l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur la réponse innée antivirale lors de l'exposition des MAs néonataux au VRS (données non montrées).

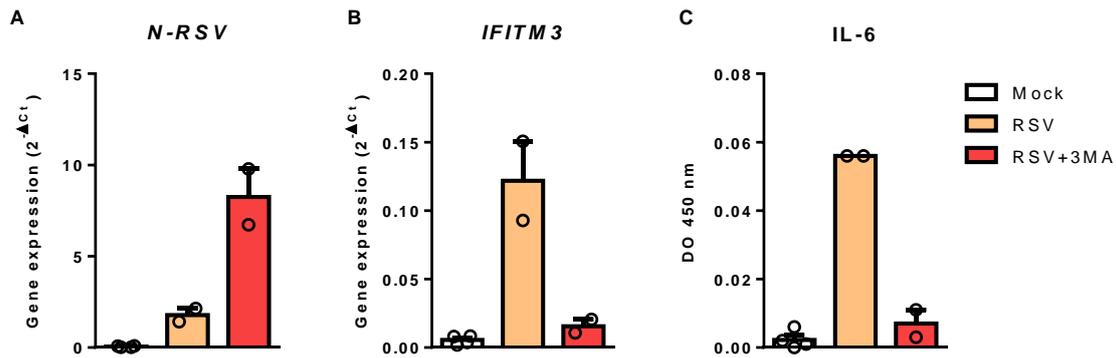


Figure 16. Le blocage de l'autophagie inhibe la réponse IFN-I et la production d'IL-6 dans les MAs déficients pour l'expression de IRAP infectés par le VRS. Les MAs de souriceaux IRAP KO ont été pré-exposés ou non à la 3-MA pendant 2 h puis exposés au VRS pendant 2h (avec ou sans 3-MA) ou non infectés (mock). 24 h après l'infection, les cellules ont été lysées pour analyser l'expression du gène N du VRS (A) et IFITM3 par qRT-PCR (B). L'IL-6 a été dosée dans les surnageants de culture par ELISA (C). Il s'agit d'une unique expérience.

#### 1.4. Conclusion et discussion

Dans ce travail, nous avons montré pour la première fois que les macrophages alvéolaires de souriceaux exposés *ex vivo* au VRS ne produisent pas d'IFN-I de manière détectable, contrairement aux MAs isolés de souris adultes. De façon complémentaire aux données publiées par le laboratoire avec des souriceaux BALB/c [189], nous avons montré chez des souriceaux de fond génétique C57BL6 l'existence d'un défaut global de production IFN-I dans les poumons au cours de l'infection par le VRS. Ces résultats permettent de généraliser l'absence de mobilisation des voies IFN-I chez les souriceaux infectés par le VRS quel que soit le fond génétique de l'animal. L'aminopeptidase IRAP est pour la première fois étudiée dans le contexte d'une infection virale dans laquelle son expression et son rôle dans la régulation de la réponse pulmonaire anti-virale sont évalués en fonction de l'âge. Nous avons pu montrer que la protéine IRAP exerce dans les MAs et *in vivo* un contrôle des réponses IFN-I à l'infection par le VRS propre à la période néonatale.

Le contrôle de la protéine IRAP sur la voie IFN-I a été démontré *in vivo* dans le poumon et *in vitro* dans les MAs ainsi que dans des cellules épithéliales isolées du poumon (données encore préliminaires). La réponse IFN-I est augmentée en l'absence de la protéine IRAP dans les poumons de souriceaux infectés *in vivo* par le VRS alors que la réplication virale reste inchangée. Or, dans les MAs et les cellules épithéliales pulmonaires exposés *ex vivo* au VRS la charge virale est diminuée. Ces résultats contraires peuvent s'expliquer par le degré de complexité biologique plus élevé que représente le tissu entier lors d'un modèle

d'infection *in vivo* (exposition probablement moindre des cellules pulmonaires à l'inoculum virale lors de l'infection *in vivo* en raison de la dissémination virale débutant au niveau des voies aériennes supérieures, nombreuses interactions cellulaires au niveau des poumons et masquage de la réplication virale dans les cellules épithéliales et les MAs par le bruit de fond généré par l'ensemble du tissu pulmonaire).

Nos données obtenues avec les MAs de souriceaux indiquent que ces cellules sont autant capables de répondre aux stimulations par des agonistes synthétiques de PPRs que les adultes (figure 4 et figure supplémentaire 1 dans l'article). La stimulation des MAs de souriceaux et de souris adultes par les ligands des TLR3, TLR4, TLR7, TLR9 et de RIG-I montre que la production d'IFN-I par les MAs ne passe pas par l'activation des TLRs mais plutôt des RLRs. L'activation de RIG-I par un agoniste synthétique induit la production de la même quantité d'IFN-I par les MAs de souriceaux et d'adultes. Les MAs néonataux et adultes synthétisent aussi des quantités comparables d'IL-6 en réponse à la stimulation du TLR4. Kollmann *et al* (2009) ont montré que les cellules de sang de cordon produisent en moindres quantités l'IL-12p70, l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  au cours des stimulations par les agonistes des TLR4, TLR7 et TLR8 mais sont tout aussi capables voire meilleures dans la production de cytokines pro-Th17 (IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23) et anti-inflammoire (IL-10) [102]. Ces données suggèrent une orientation de type Th2 et Th17 de la réponse immunologique néonatale et une capacité réduite à soutenir des réponses de type Th1. Le défaut de production d'IFN-I par les cellules néonatales du sang pourrait s'expliquer par une signalisation intracellulaire différente selon l'âge. La stimulation par le LPS de CDmo humaines induit la translocation nucléaire d'IRF-3 dans les CDmo de nouveau-nés et d'individus adultes. Néanmoins, la liaison d'IRF-3 à l'ADN et son association avec le coactivateur CBP (*CREB-binding protein*) sont diminuées dans les cellules dendritiques néonatales [312]. De plus, Danis *et al* (2008) ont mis en évidence que la translocation nucléaire d'IRF-7 est réduite dans les CDp de sang de cordon lors de la stimulation du TLR9 par rapport aux cellules adultes [313]. Ainsi, ces deux études suggèrent l'existence d'une signalisation intracellulaire spécifique à la période néonatale dans les cellules sanguines néonatales contrairement à nos données sur les MAs néonataux et adultes murins qui ne montrent pas de différences lors de la stimulation des TLRs et RLRs. Il est donc important de noter que selon le tissu étudié et le modèle utilisé, il est difficile de généraliser la réponse immunologique d'une population cellulaire lorsqu'elle est étudiée *ex vivo* avec des ligands synthétiques.

Finalement l'étude de l'activation de la voie IFN-I au cours de la stimulation par le ligand synthétique de RIG-I de MAs néonataux dépourvus ou non de l'aminopeptidase IRAP

n'indique pas de différence de réponse IFN-I (figure 4 de l'article). Nous n'observons pas non plus de différence lors de l'exposition des MAs WT et IRAP KO avec le VRS inactivé aux UV (figure 1 de l'article). Cependant, la réponse IFN-I est augmentée dans les MAs IRAP KO infectés par le VRS lorsque le virus est capable de se répliquer (figure 1 de l'article). Ces données indiquent que le contrôle par IRAP de la réponse IFN-I est spécifique à la période néonatale et nécessite la réplication virale dans les MAs.

Une telle spécificité du contrôle des réponses IFN-I avait été proposée chez l'Homme à partir de cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp) isolées de sang de cordon [314]. Les CDp isolées de sang de cordon et exposées au VRS produisent significativement moins d'IFN- $\alpha$  que des CDp adultes exposées au VRS [314]. Ces auteurs montrent également que la production des IFN-I au cours de l'infection des cellules adultes ne dépend pas de l'activation des TLRs endosomaux (l'inhibition de l'acidification endosomale n'a pas d'effet sur la réponse antivirale), mais de l'activation de RIG-I [314]. La production d'IFN- $\alpha$  en réponse à la stimulation de RIG-I est plus faible par les CDp néonatales que par les CDp adultes, alors même que l'expression de RIG-I est similaire entre les CDp adultes et néonatales. Ainsi, les auteurs proposent d'expliquer le défaut de production d'IFN-I dans les cellules dendritiques néonatales par une altération de la maturation post-traductionnelle de RIG-I ou de MAVS ou par l'absence de certains événements de signalisation en aval de MAVS [314].

Dans nos mains, la stimulation de RIG-I (avec le ligand synthétique Poly(I:C)-LyoVec) dans les MAs de souriceaux induit une production d'IFN-I similaire indépendamment de l'expression de la protéine IRAP alors que la réponse IFN-I à l'infection par le VRS est indétectable dans les cellules néonatales sauf si le gène IRAP est invalidé. Les MAs néonataux sont donc compétents pour produire des IFN-I mais cette production n'est pas induite au cours de l'infection par le VRS. D'un point de vue fonctionnel, les protéines NS1 et NS2 du VRS sont capables d'inhiber la production d'IFN-I dans des lignées de cellules épithéliales humaines en interférant avec la formation du complexe d'activation d'IRF-3 et sa translocation au noyau ou en interagissant avec RIG-I, inhibant de ce fait son interaction avec MAVS [315–318]. Le rôle des protéines NS1 et NS2 n'a jamais été étudié dans le contexte néonatal ni dans les MAs. Il est possible d'envisager que la cellule de nouveau-né soit plus sensible à l'antagonisation de la réponse IFN-I par NS1 et NS2 ce qui impliquerait un mécanisme intracellulaire spécifique à la période néonatale exploité par le virus pour contrer la réponse antivirale.

Une autre possibilité est que le mécanisme d'entrée du VRS dans les MAs néonataux soit différent de celui des MAs adultes et de ce fait, ne sollicite pas les mêmes signalisations

pour activer les voies IFN-I. Le récepteur membranaire CX3CR1, qui est aussi un marqueur d'immaturité cellulaire, est capable d'interagir avec la glycoprotéine virale G du VRS et de faciliter l'entrée du virus dans les cellules épithéliales et les lymphocytes Breg [78,254,319]. Dans nos mains, l'expression de CX3CR1 est significativement augmentée dans les MAs de souriceaux à l'homéostasie et lors de l'infection par le VRS par rapport aux adultes (données non montrées). Néanmoins l'expression ne diffère pas entre les MAs WT et IRAP KO néonataux. Ces données suggèrent que l'entrée du VRS dans les MAs de souriceaux pourrait être éventuellement facilitée par l'interaction entre CX3CR1 et la protéine G ce qui expliquerait la charge virale augmentée dans les MAs néonataux WT par rapport aux MAs adultes. Néanmoins, pour confirmer cette hypothèse, il faudrait analyser par cytométrie en flux l'expression de CX3CR1 à la surface des MAs. De plus, l'analyse de l'expression du gène N du VRS nécessite d'être réalisée à un temps plus précoce que 24 h afin de s'affranchir de l'action antivirale des IFN-I déjà produits par les MAs adultes. Enfin, il serait intéressant de comparer la charge virale de MAs issus de souris déficientes pour l'expression de CX3CR1 avec des cellules sauvages suite à une infection *ex vivo* par le VRS.

Le travail publié en 2017 par l'équipe de Loredana Saveanu montre que l'activation des TLR7 et TLR9 est régulée grâce au trafic des vésicules endosomales IRAP<sup>+</sup> dans les cellules dendritiques. Les vésicules IRAP<sup>+</sup> transportent ces TLRs jusqu'à des compartiments endolysomaux qui permettent l'activation séquentielle des voies de signalisation situées en aval de ces récepteurs aboutissant à la synthèse des IFN-I et des cytokines inflammatoires. Les auteurs montrent également que les vésicules IRAP<sup>+</sup> se déplacent dans les cellules dendritiques grâce à leur fixation au cytosquelette d'actine par l'extrémité cytosolique de la protéine IRAP et de son interaction avec FHOD4. Mon travail de thèse indique que la production d'IFN-I est induite au cours de la stimulation de RIG-I par le ligand synthétique Poly(I:C)-LyoVec dans les MAs. RIG-I est localisé dans le cytosol des cellules, les endosomes IRAP<sup>+</sup> ne participent donc pas directement à son activation et donc au contrôle de la réponse IFN-I selon le mécanisme décrit par l'équipe de Loredana Saveanu [206].

Un certain nombre de données (voir partie résultats paragraphe 1.3.3) nous ont poussées à faire l'hypothèse que la protéine IRAP inhibe l'autophagie pendant la période néonatale entraînant alors la réduction de la production d'IFN-I au cours de l'infection par le VRS. Mes résultats semblent indiquer un rôle différent de l'autophagie entre les MAs adultes et néonataux. L'expression de beclin est significativement augmentée dans les MAs adultes infectés IRAP KO par le VRS par rapport à leurs homologues WT alors que la réponse IFN-I est similaire. Au cours de l'infection par le VRS des MAs néonataux IRAP KO, l'expression

de beclin est légèrement augmentée alors qu'elle est diminuée dans les MAs néonataux WT. La réponse IFN-I est induite dans les MAs néonataux IRAP KO infectées par le VRS alors que les MAs WT ne répondent pas à l'infection. De plus, l'inhibition de l'autophagie par la 3-MA dans notre étude préliminaire indique que l'autophagie est nécessaire à la production d'IFN-I dans les MAs de souriceaux IRAP KO. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'effet de l'inhibition de l'autophagie dans les MAs adultes WT et IRAP KO sur la réponse IFN-I à l'infection par le VRS afin d'identifier si l'autophagie est nécessaire à la réponse antivirale à cet âge et si la protéine IRAP intervient dans la mécanistique autophagique. Inversement, l'activation de l'autophagie dans les MAs néonataux WT par privation de sérum (starvation) ou par inhibition de mTOR *via* la rapamycine, devrait restaurer la production des IFN- $\alpha/\beta$ , et ainsi finaliser la démonstration de l'importance de l'induction de l'autophagie dans la production des IFN-I par les MAs en période néonatale.

Pour faire le parallèle avec d'autres types cellulaires infectés par le VRS, l'autophagie dans les cellules épithéliales humaines en culture est nécessaire à la réplication virale alors que dans les macrophages l'autophagie induit la production d'IFN-I important pour la clairance du VRS [304,320]. Li *et al* (2018) ont montré que l'autophagie favorise la réplication du VRS en inhibant l'apoptose des cellules épithéliales respiratoires infectées (cellules Hep2). Dans le cas de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris adulte infectées par le VRS, l'induction de l'autophagie provoque la sécrétion de cytokine de type 1 et pro-inflammatoires (IFN-I, IL-12p35 et IL-6), favorise la maturation cellulaire (augmentation de l'expression des marqueurs de surface CMH-II, CD40, CD80 et CD86) et conditionne les capacités des cellules dendritiques à activer les cellules T CD4<sup>+</sup> [303]. Reed *et al* (2013) ont montré que l'infection *in vivo* par le VRS induit l'autophagie dans les poumons de souris adultes ce qui limite la sévérité de l'infection (réduction de la production de cytokine Th2, de la sécrétion de mucus et de l'infiltration pulmonaire d'éosinophiles). Ainsi, le rôle de l'autophagie au cours de l'infection par le VRS est différent en fonction du type cellulaire étudié. De plus, dans le cadre de la poursuite des travaux de cette thèse, le rôle de l'autophagie dans la réponse antivirale pulmonaire à l'infection par le VRS pourrait être pour la première fois décrit en fonction de l'âge.

## **2. Modulation de la réponse immunitaire à l'infection VRS par des bactéries primocolonisatrices des poumons au cours de la période néonatale**

### **2.1. Introduction**

A la naissance, l'organisme du nouveau-né est progressivement colonisé par des microorganismes de l'environnement extérieur. Globalement, la stabilisation du microbiote des muqueuses intervient à un moment de la vie qui correspond au développement et à la maturation des défenses immunitaires. La composition du microbiote pulmonaire se diversifie avec l'âge et semble plus encline à la dysbiose avant l'âge adulte (voir partie 5.2.5 de l'introduction) [261]. Cette évolution impacte la maturation cellulaire des poumons et donc les défenses contre les pathogènes respiratoires et en particulier les virus [262].

L'infection par le VRS en période néonatale engendre une empreinte immunopathologique caractérisée par une signature immunitaire de type 2. Notre hypothèse est que la composition du microbiote respiratoire pourrait participer à la mise en place de l'immunité anti-VRS précoce du nouveau-né en agissant sur les effecteurs cellulaires et moléculaires de l'immunité innée, en particulier les PRRs.

De fait l'influence de la colonisation microbienne des poumons sur l'activation des TLRs n'a jamais été étudiée. Pour tester notre hypothèse nous avons utilisé le modèle d'étude *ex vivo* des explants de poumons qui est bien adapté pour tester rapidement un large panel de conditions et avoir un aperçu de la réponse immunitaire pulmonaire précoce qui se produirait lors d'une exposition *in vivo* à des ligands de TLRs [321,322]. Dans un premier temps, nous avons comparé les réponses cytokiniques d'explants de poumon de souris adultes axéniques et de souris conventionnelles C57BL6 lors de la stimulation par les ligands synthétiques des TLR3, TLR4, TLR7, TLR9 et lors de l'exposition au VRS. Nous avons également comparé les réponses TLRs entre des explants pulmonaires issus de souriceaux et d'adultes BALB/c et C57BL6. Dans cette partie de la thèse nous nous sommes intéressées à la polarisation de la réponse immunologique en dosant des cytokines de type 1, de type 2, de type 17 et régulatrices plutôt qu'à la réponse antivirale IFN-I.

Dans un deuxième temps, nous avons choisi d'évaluer la capacité de deux souches bactériennes primo-colonisatrices CNCM 4969 et CNCM 4970 à moduler les réponses immunitaires innée et systémique lors de l'infection par le VRS. CNCM 4969 et CNCM 4970 ont été isolées à partir de poumons de souriceaux C57BL6 et référencées à la Collection

Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) de l'institut Pasteur par l'équipe de notre collaboratrice Muriel Thomas (INRA, Micalis). CNCM 4969 induit la production de cytokines de type 1 et CNCM 4970 la sécrétion de cytokines de type 2 par des explants pulmonaires de souris adultes axénique C57BL6 [269]. Ces deux souches bactériennes ont été testées dans un modèle d'asthme chez la souris. Elles ont été administrées de manière répétée par voie nasale à des souriceaux C57BL6 pendant les deux premières semaines de vie. Une sensibilisation suivie d'une épreuve aux poussières d'acariens (House Dust Mite ; HDM administré par voie nasale) a été réalisée sur la même période puis les souris ont été sacrifiées à trois semaines de vie. Les données obtenues indiquent que l'hypersensibilité respiratoire déclenchée par l'exposition à HDM varie en fonction de la souche bactérienne administrée pendant la période néonatale. La souche bactérienne CNCM 4969 protège de l'asthme alors que CNCM 4970 sensibilise à la survenue de cette pathologie [269]. Ces données indiquent qu'il est possible de moduler l'immunité pulmonaire néonatale *via* l'administration de bactéries commensales des poumons. Nous avons donc testé l'effet de CNCM 4969 et CNCM 4970 lors de l'exposition néonatale au VRS soit *ex vivo* sur explants pulmonaires murins, soit *in vivo*.

Mon travail montre que la présence d'un microbiote commensal des poumons influence la réponse cytokinique à différents ligands de TLRs et à l'infection par le VRS. Par contre l'administration répétée de CNCM 4969 ou de CNCM 4970 à la naissance ne modifie pas notablement l'orientation de la réponse immunitaire au cours de l'infection par le VRS en période néonatale.

## **2.2. Matériel et méthode**

### *2.2.1. Animaux utilisés et préparation des explants de poumons*

Les explants de poumons ont été obtenus à partir de souris BALB/c et C57BL6 élevées en condition EOPS (IERP, Jouy-en-Josas) ou de souris C57BL6 axéniques élevées en isolateur stérile (Anaxem, INRA, Jouy-en-Josas) âgées de 6 à 8 semaines. Les souris ont été euthanasiées par overdose de pentobarbital, la cage thoracique ouverte et la trachée libérée. Une canule a été insérée dans la trachée afin de perfuser une solution liquide à 37°C d'agarose *UltraPure Low Melting Point* 1,5% (Life Technologies) pour gonfler les poumons. Après quelques minutes de refroidissement de la solution perfusée permettant ainsi la solidification de l'agarose, les poumons ont été prélevés et les lobes séparés puis stockés à 4°C dans du milieu de culture *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, GE Healthcare) complet (serum de

veau fœtal 10 %, L-glutamine 2 mM). Les lobes ont été ensuite inclus dans un insert métallique. L'insert a été refroidi puis introduit dans la partie microtome préalablement stérilisée du *Krumdieck tissu slicer* (Alabama Research and Development). Les lobes ont été coupés à une épaisseur de 200-250 µm dans un milieu stérile de Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma-Aldrich) supplémenté de pénicilline (10 U/mL) et de streptomycine (100 µg/mL). Les tranches de poumons ainsi obtenues ont ensuite été distribuées en plaques 24 puits (2 explants par puits) et incubées en milieu RPMI complet préchauffé à 37°C afin de resolubiliser l'agarose contenu dans les explants pulmonaires. Le milieu de culture a été changé quatre fois pendant 2 h pour resolubiliser totalement l'agarose. Les explants de poumons ont ensuite été incubés à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub> pendant la nuit.

### 2.2.2. Préparation des bactéries

Les bactéries CNCM 4969 ou CNCM 4970 ont été isolées de poumons de souris C57BL/6 âgés de 6 jours et référencées à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) de l'institut Pasteur par nos collaboratrices Muriel Thomas et Aude Remot (Institut Micalis) [269]. Pour chacune des expériences impliquant CNCM 4969 et CNCM 4970 présentées dans ce manuscrit les inocula bactériens ont été préparés par nos collaborateurs de Micalis (Elliot Mathieu). Brièvement, les bactéries ont été décongelées puis ensemencées en milieu de culture *Brain heart infusion* (BHI) (préculture). Après 24 h d'incubation à 37 °C sous agitation (120 rpm), 1 mL de préculture additionné à 9 mL de milieu frais a été incubé à 37°C pendant 24 h sous agitation (120 rpm). Le lendemain la préculture a été centrifugée (10 min, 4200 rpm à 4°C) et le culot repris dans 1 mL de PBS. Les bactéries ont été dénombrées avec un cytomètre Accuri (BD Biosciences).

### 2.2.3. Stimulation par les ligands de TLRs, pré-exposition bactérienne et infection des explants de poumons

#### a. Stimulation par les ligands de TLRs

Les explants de poumons ont été incubés dans 500 µL de milieu RPMI complet préchauffé à 37°C en présence du lipopolysaccharide bactérien (LPS ; 500 ng/mL, Sigma-Aldrich, Escherichia coli 0111:B4), de CpG-B ODN1826 (10 µg/mL, Sigma-Aldrich, séquence (5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3')), de l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly(I:C) ; 100 µg/mL, InvivoGen) ou d'imiquimod (10 µg/mL, InvivoGen). Les explants de poumons non stimulés (contrôles) ont été incubés avec le milieu de culture seul. Les surnageants ont été collectés après 24 h d'incubation afin de quantifier la sécrétion de

cytokines et d'évaluer la mortalité tissulaire. Les explants de poumons ont été lysés dans 500 µL de tampon de lyse (EDTA 0,5 M, NaCl 0,150 M, Triton 1 % et TrisHCl 1 %) en présence d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics) dans des tubes contenant des billes céramiques (Mineralex) et broyés avec le Precellys24 (Bertin Technologies ; 2 cycles de 6000 rpm pendant 15 secondes). Les surnageants de culture et les lysats tissulaires ont été stockés à -20°C.

*b. Pré-exposition bactérienne et infection des explants pulmonaires*

Dans une première série d'expérience les explants de poumons ont exposées pendant 2 h à 250 µL d'inoculum de virus recombinant VRS-luciférase (8100 pfu) [323] ou non infectés. Les explants de poumons ont ensuite été incubés pendant 24 h après l'ajout de 250 µL de RPMI complet. Les surnageants ont été collectés afin de quantifier la sécrétion de cytokines et d'évaluer la mortalité tissulaire. Les explants de poumons utilisés pour quantifier la réplication virale par dosage de l'activité luciférase ont été lysés dans 500 µL de tampon *Passive Lysis Buffer* (PLB) (Tris 30 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM ; Triton X100 1,25 % ; glycerol 18,75 %) additionné de DTT en présence de billes de céramique et broyés avec le Precellys24. La quantité de protéines totales présentent dans les lysats a également été quantifiée (voir plus loin).

Dans une autre série d'expériences, avant d'être infectés, les explants de poumons ont été incubés pendant 5 h dans 500 µL de milieu RPMI (serum de veau fœtal 10 %, L-glutamine 2 mM) en présence ou non de 10<sup>5</sup> cfu de CNCM 4969 ou CNCM 4970. Après retrait des bactéries et lavage des explants de poumons en RPMI complet, les explants pulmonaires ont été exposés au VRS-luciférase selon le protocole cité précédemment et les surnageants et les explants pulmonaires ont été récoltés afin d'évaluer la cytotoxicité tissulaire et la réplication virale.

*c. Détermination de la cytotoxicité tissulaire*

La cytotoxicité a été évaluée par la quantification de l'activité lactate deshydrogénase (LDH) dans les surnageants et les lysats tissulaires en utilisant le kit *CytoTox 96 Non Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega). La cytotoxicité tissulaire est exprimée en % et a été déterminée avec la formule suivante :  $100 \times ((\text{LDH surnageant})/(\text{LDH lysat} + \text{LDH surnageant}))$ .

#### d. Détermination des concentrations protéiques dans les broyats d'explants de poumons

Les concentrations protéiques des lysats des explants de poumons sans DTT ont été déterminées avec le kit *Protein Quantification Assay* (Macherey-Nagel) à partir d'une courbe de calibration (0,031 à 1 µg/µL) obtenue avec la *bovine serum albumin* (BSA). Le kit de dosage *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) a été utilisé dans le cas des explants de poumons broyés en tampon de lyse contenant du DTT (courbe de calibration de la BSA 20 - 2000 µg/mL)

#### 2.2.4. Infections in vivo et administration des bactéries

Les souches bactériennes primo-colonisatrices CNCM 4969 et CNCM 4970 ou une solution saline contrôle (PBS) ont été inoculées en intranasale (10 µL, 10<sup>6</sup> cfu) à partir de 2 et 3 jours de vie à des souriceaux BALB/c puis tous les 2 jours. Les groupes de souriceaux ont été infectés à 6 jours de vie par inoculation intranasale du VRS-luciférase (10 µL, 23400 pfu) (suivi de l'infection néonatale) ou du VRS-A2 (10 µL, 77900 pfu) (suivi de l'immunopathologie après réinfection à l'âge adulte). La croissance des souriceaux a été suivie par la mesure du poids dès l'âge de 6 jours. Un jour après l'infection, les souriceaux infectés par le VRS-luciférase et leurs contrôles non infectés ont été sacrifiés. Des lavages bronchoalvéolaires (LBA) ont été réalisés et une partie des poumons prélevée afin de réaliser l'analyse de la composition en cellules des poumons par cytomètre de flux (voir plus loin). L'autre partie des poumons et les fosses nasales ont été prélevées, pesées et broyées dans 300 µL de tampon PLB additionné de DTT et de billes de céramique avec le Precellys24 (1 cycle de 6000 rpm pendant 15 secondes pour les poumons ou 2 cycles pour les fosses nasales). Les lysats tissulaires ont été stockés à -20°C afin de quantifier plus tard la réplication virale par analyse de la bioluminescence et les cytokines produites dans les broyats pulmonaires (voir plus loin).

Les inoculations bactériennes ont été poursuivies chez les souriceaux infectés par le VRS-A2 jusqu'à 15 jours de vie. Ces souriceaux ont été réinfectés par le VRS-A2 à l'âge adulte (100 µL en intranasal). Le sang a été prélevé avant et après la réinfection afin de quantifier les anticorps anti-VRS et anti-N dirigés contre le virus. Le poids a été mesuré chaque jour suite à la ré-administration du virus. 7 jours post-infection les souris ont été euthanasiées et le sang prélevé. Les LBA ont été réalisés pour analyser les populations cellulaires recrutées dans les poumons et les poumons prélevés pour réaliser les analyses de cytométrie en flux.

*a. Analyse des cellules des LBA chez les souriceaux et les adultes*

Les cellules des LBA ont été isolées par centrifugation (1200 rpm, 10 min) puis dénombrées sur lames de Kovas (Dutscher) ou transférées sur lames de microscopie (Superfrost) par cyto-centrifugation (Cytospin 5) afin d'être colorées au May-Grünwald-Giemsa. Les poumons ont été pesés puis broyés avec le Precellys24 dans des tubes contenant du tampon PLB additionné de DTT et des billes de céramique. Les lysats tissulaires ont été stockés à -20°C.

*b. Analyses par cytométrie en flux des populations cellulaires des poumons chez les souriceaux*

Une partie des poumons a été déposée dans des tubes pré-remplis contenant des billes de céramique de 2,8 mm (Bertin Corp) et 1 mL de milieu de culture RPMI complet. Les poumons ont été broyés au Precellys24 (5000 rpm, 15 sec) puis filtrés (100 µm) et centrifugés (1500 rpm, 10 sec). Le culot a été repris dans 200 µL de RPMI complet. 20 µL ont été déposés dans 10 mL d'isoton (Beckman Coulter) et 3 gouttes de tampon de lyse des globules rouges Zapoglobin (Beckman Coulter) afin de dénombrer les cellules avec l'appareil Z Series Coulter Counter (Beckman Coulter). Après saturation avec les anticorps anti-CD16/32 (BD biosciences), 90 µL de suspension cellulaire ont été déposés en puits de P96 pour chacun des cocktails d'anticorps utilisés (voir description des cocktails ci-après). Les cellules ont été lavées en tampon FACS (PBS et SVF 2 %) (2000 rpm, 1 min) entre chaque étape du traitement des cellules. Le culot a été repris dans 50 µL de chacun des cocktails d'anticorps puis incubées à 4°C pendant 10 min. Pour les marquages intracellulaires, les culots de cellules ont été suspendus dans 100 µL de Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) et incubés pendant 20 min à 4°C. 50 µL du cocktail d'anticorps ont ensuite été déposés dans les puits pendant 25 min à 4°C. Pour finir, les cellules ont été reprises dans 100 µL de tampon FACS afin d'être analysées au cytomètre de flux Fortessa (BD biosciences) et analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star Inc.).

Cocktail 1			Cocktail 2, expérience 1			Cocktail 2, expérience 2		
Fluorochrome	Marqueur	Clone	Fluorochrome	Marqueur	Clone	Fluorochrome	Marqueur	Clone
FITC	Ly6C	HK1.4	FITC	CD4	GK1.5	FITC	CD8	53-6.7
PerCPCy5.5	CD3	17A2	PerCPCy5.5	CD3	17A2	PerCPCy5.5	CD3	17A2
PE	Ly6G	1A8	PE	FoxP3	150D	PerCPCy5.5	B220	RA36B2
PECy7	CD11c	N418	PE-CF594	RORyt	Q31 378	PE	EOMES	Dan11Mag
APC	CD19	1D3	APC	CD8a	53-6.7	PECy7	CD4	RM4
APC/Cy7	CD45.2	104	APC/Cy7	CD45.2	104	APC	GATA3	53-6.7
BV421	SiglecF	E50 2440	BV421	CD49b	DX5	APC/Cy7	CD45.2	104
BV 510	CMH-II	2G9	BV650	NKp46	29A1.4	BV421	ST2	DIH9
BV786	CD11b	M1/70	BV711	CD49a	HA31/8	BV510	CD49b	DX5
			BV786	CD11b	M1/70	BV605	NKp46	29A1.4
			BV786	CD11c	N418	BV711	CD49a	HA31/8
			BV786	CD19	6D5	BV786	CD11b	M1/70
						BV786	CD11c	N418

Les anticorps ont été achetés auprès de Sony Biotechnologies, BD biosciences ou ebiosciences.

### c. Dosage des anticorps sériques chez les souris adultes

Les anticorps spécifiques de la protéine virale N du VRS (IgG2a et IgG1) ont été analysés dans les sérums par ELISA. Des plaques de microtitrage (Immulon 2HB, ThermoLabsystems) ont été recouvertes pendant une nuit à 4°C avec l'antigène N du VRS (200 ng par puits en tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 9,5). Les plaques ont été lavées (PBS 0,05% Tween 20), saturées (5% de SVF dans du PBS 0,05% de Tween 20) pendant 1 h à 37°C. Les anticorps anti-N ont été incubés en présence d'un anti-IgG1/-IgG2a de rat (1 ng/mL, BD-Biosciences) pendant 1 h à 37 ° C. Le substrat TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) a été ajouté puis après 10 min d'incubation la réaction a été arrêtée par de l'acide phosphorique (1 M). Les absorbances ont été mesurées avec le lecteur de plaques *ELISA Multiskan FC Microplate Photometer* (Thermoscientific) à 450 nm et ont été analysées avec le logiciel *SkaniT Software 3.1* (Thermoscientific). Les résultats sont exprimés en titres d'anticorps et ont été calculés grâce à la courbe de régression  $y = (b+cx)/(1+ax)$  en utilisant le logiciel Origin. Pour le dosage des anticorps anti-VRS, les plaques ont été recouvertes de lysats cellulaires inactivés aux UV issus de cellules Hep2 infectées par le VRS ou non infectées. Les échantillons ont été dilués en série et incubés avec les lysats cellulaires et le test ELISA a été effectué comme décrit ci-dessus. Pour mesurer la spécificité de liaison des anticorps, le bruit de fond induit par la liaison non spécifique des anticorps aux lysats

cellulaires provenant de cellules Hep2 non infectées a été soustrait à la valeur d'absorbance obtenue avec les puits contenant les antigènes viraux.

#### 2.2.5. Quantification de la réplication du VRS-luciférase

##### a. Dans les broyats d'explants, de poumons et de fosses nasales

La réplication du VRS-luciférase conduit à la production de luciférase qui catalyse l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine permettant la libération de photons. L'activité de la luciférase a été évaluée après ajout de luciférine (Promega ou Sigma, 100 ng/mL, selon le test) et d'ATP (0,5 mM) aux lysats d'explants pulmonaires ou de poumons ou de fosses nasales en plaque 96 puits à fond noir. L'émission de photons a été mesurée avec l'appareil IVIS200 (Xenogen Biosciences) par délimitation des ROI (*Region of Interest*) correspondant au diamètre des puits. Le logiciel *Living Image* (version 4.0, Caliper Life Sciences) a été utilisé pour quantifier la bioluminescence émise pendant 1 min avec  $f/stop=1$  et  $binning=8$ . La quantification de l'émission de photons est donnée en radiance = photon/sec/cm<sup>2</sup>/sr (nombre de photons par seconde qui quittent un centimètre carré de tissu et rayonnent en un angle solide d'un stéradian) et a été normalisée à la quantité de protéines totales dans les tissus pour les explants (luminescence/mg de protéines) ou au poids des poumons (luminescence/mg de poumons).

##### b. Quantification de la réplication du VRS-luciférase in vivo

Les souris ont reçu 50 µL de luciférine (30 mg/mL, Perking Elmer) par voie intrapéritonéale et la bioluminescence a été mesurée avec le logiciel *Living Image*. Les images ont été acquises pendant 1 min avec  $f/stop = 1$  et  $binning = 8$ . Une image numérique a été générée et l'émission de luminescence a été évaluée au niveau des poumons et des fosses nasales. L'émission de photons a été mesurée en radiance = photon/sec/cm<sup>2</sup>/sr par délimitation des ROI (*Region of Interest*) selon un quadrant défini englobant les fosses nasales ou les poumons.

#### 2.2.6. Dosages cytokiniques

Les dosages de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-12, l'IL-13, du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  dans les surnageants de culture des explants pulmonaires ont été réalisés avec les kits de dosage mouse ELISA *Ready-Set-Go!* (ebiosciences) en accord avec les instructions du fabricant. Les concentrations ont été déterminées à partir des courbes de calibration obtenues avec les étalons correspondant à chacune des cytokines dosées. Les densités optiques (DO)

ont été obtenues au *Multiskan FC Microplate Photometer* (Thermoscientific) à 450 nm et ont été analysées avec le logiciel *SkatIt Software 3.1* (Thermoscientific). Les concentrations cytokiniques ont ensuite été normalisées à la quantité de protéines totales dans les tissus lysés (ng/mg de protéines).

Les dosages de cytokines et chimiokines dans les broyats de poumons ont été réalisés avec le kit *Cytokine & Chemokine 26-Plex Mouse ProcartaPlex Panel 1* (ebiosciences) selon les instructions du fabricant. Les données ont été obtenues avec le système multiplexe *Bio-Plex* (Bio-Rad) et les résultats analysés avec le logiciel *ProcartaPlex*. Les concentrations ont été normalisées au poids des poumons.

#### 2.2.7. *Western blot*

L'étude de l'expression de la protéine TLR4 dans les poumons de souris adultes axéniques et EOPS C57BL6 a été réalisée par nos collaborateurs à Micalis (Marie-Louis Noordine). Brièvement, les poumons de souris adultes axéniques ou EOPS C57BL6 ont été broyés dans 500 µL de tampon de lyse (EDTA 0,5 M, NaCl 0,150 M, Triton 1 % et TrisHCl 1 %) en présence d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics) dans des tubes contenant des billes céramiques (Mineralex) et broyés avec le Precellys24 (Bertin Technologies ; 2 cycles de 6000 rpm pendant 15 secondes). Les échantillons ont été dénaturés (100°C, 5 min), 15 µg de protéines totales ont été déposés sur gel acrylamide 10 % puis les protéines ont été séparées par électrophorèse pendant 2 h (60 mA). Le transfert des protéines a été réalisé sur membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) grâce à un système de transfert semi-sec (Bio-Rad) (2 h). La membrane a été saturée en tampon *tris-buffered saline* et *tween 20* (TBST 1X) et lait 5 % pendant 2 h. Ensuite, la membrane a été incubée pendant 2h en présence de l'anticorps polyclonal de lapin anti-TLR4 (0,4 µg/ml, clone M-300, santa cruz biotechnology) ou de l'anticorps monoclonal de souris anti-actine β (0,4 µg/ml, clone AC-74, Sigma-Aldrich), rincée plusieurs fois puis incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplé à la peroxydase (1/5000<sup>e</sup>, Jackson). Après plusieurs rinçages, la membrane a été incubée avec la solution de révélation (5 min) (Thermo Scientific) puis la détection des protéines a été réalisée grâce à la mesure de la chimioluminescence (30 s à 2 min d'exposition) avec l'appareil ChemiDoc (Bio-Rad).

### 2.2.8. Tests statistiques

Le test non paramétrique de Mann-Whitney (comparaison de deux groupes,  $n \geq 4$ ) a été utilisé pour comparer des valeurs non appariées (logiciel *GraphPad Prism*). La représentation de la significativité est la suivante : \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 2.3. Résultats

### 2.3.1. Influence du microbiote pulmonaire sur la réponse immunitaire innée locale au cours de stimulations des TLRs

L'influence du microbiote pulmonaire sur la maturation fonctionnelle de l'épithélium n'a jamais été décrite. L'utilisation d'explants pulmonaires permet d'étudier la réponse innée épithéliale en exposant directement les cellules à différents stimuli dans un environnement tissulaire complexe. Nous avons exposé les explants à différents ligands de TLRs afin d'étudier les capacités de réponses du tissu pulmonaire de souris adultes sans microbiote élevées en isolateurs stériles (souris axéniques) ou de souris avec une flore bactérienne exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (souris EOPS). Les explants pulmonaires axéniques produisent significativement plus de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) que les explants EOPS en réponse aux ligands de TLR3 (Poly(I:C)), TLR4 (LPS), TLR7 (Imiquimod) et TLR9 (CpG-B ODN 1826) (figure 17). De plus, à l'exception de la stimulation du TLR9, la stimulation des autres TLRs induit une plus forte synthèse de cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et TSLP) par les explants en conditions axéniques (figure 17). Les explants axéniques produisent significativement plus d'IL-17 en réponse au LPS et à l'imiquimod, et plus d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  en réponse à l'imiquimod que les explants EOPS (figure 17). La cytotoxicité induite par les stimulations des TLRs dans les explants axéniques et EOPS n'excède pas 15 % (données non montrées). Ainsi, l'absence de microbiote dans les poumons se traduit par des réponses inflammatoires et de type 2 exacerbées au cours des stimulations par les agonistes synthétiques des TLRs. On peut noter que c'est la stimulation du TLR7 qui induit la production accrue du plus large panel de cytokines dans les explants pulmonaires de souris axéniques.

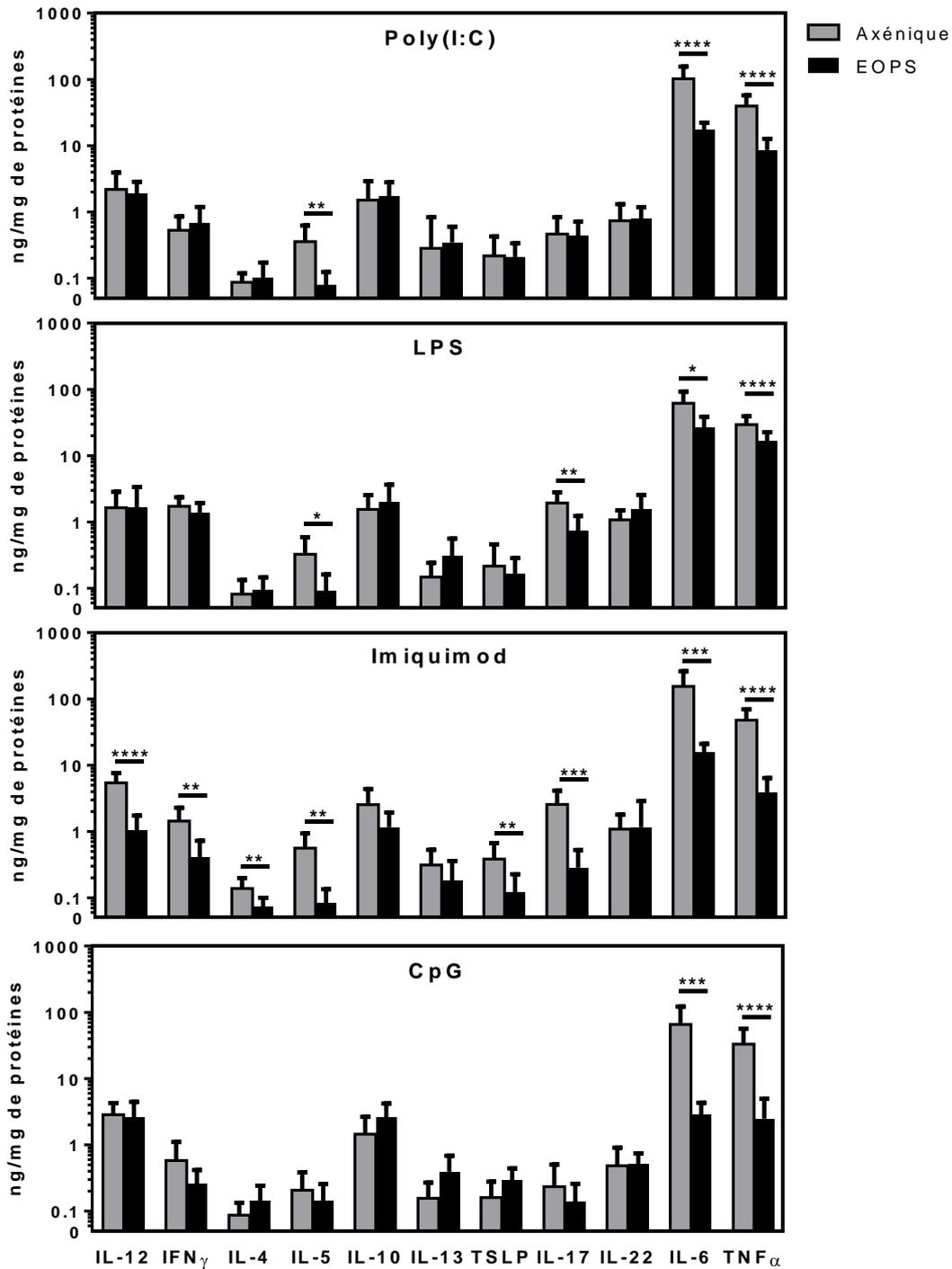


Figure 17. Les réponses cytokiniques au cours de stimulations des TLRs sont exacerbées en l'absence de microbiote pulmonaire. Les explants de poumons de souris adultes axéniques ou EOPS ont été stimulés pendant 24 h par le poly(I:C), le LPS, l'imiquimod et le CpG-B ODN1826, ligands synthétiques respectifs des TLR3, TLR4, TLR7 et TLR9. Les surnageants de culture ont été récoltés pour doser par ELISA des cytokines de type 1 (IL-12 et IFN- $\gamma$ ), de type 2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et TSLP), de type 17 (IL-17 et IL-22) et inflammatoires (IL-6 et TNF- $\alpha$ ). Les concentrations cytokiniques ont été rapportées à la quantité de protéines totales dans les lysats d'explants.  $n=16$  échantillons axéniques et  $n=12$  échantillons EOPS. Test statistique utilisé : Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Les données de 2 expériences avec des résultats similaires ont été compilées.

### 2.3.2. *Influence du microbiote sur la réponse pulmonaire à l'infection par le VRS*

Afin d'étudier l'influence du microbiote pulmonaire sur la réponse cytokinique à l'infection par le VRS, nous avons infecté des explants pulmonaires de souris axéniques ou élevées en conditions EOPS (figure 18). Nous observons que la production de cytokines pro-inflammatoires, de type 1 et de type 2 au cours de l'infection est significativement plus forte dans les surnageants de culture des explants pulmonaires de souris axéniques que de souris EOPS (figure 18A), alors que la réplication virale est identique dans les deux types d'explants (figure 18B). Ainsi, le tissu pulmonaire dépourvu de flore bactérienne présente une réactivité innée accrue à l'infection par le VRS. On remarque que le profil de sécrétion cytokinique généré au cours de l'infection par le VRS en l'absence de microbiote est très similaire à celui engendré lors de la stimulation du TLR7 (excepté pour la production d'IL-17 qui n'est pas détectable au cours de l'infection).

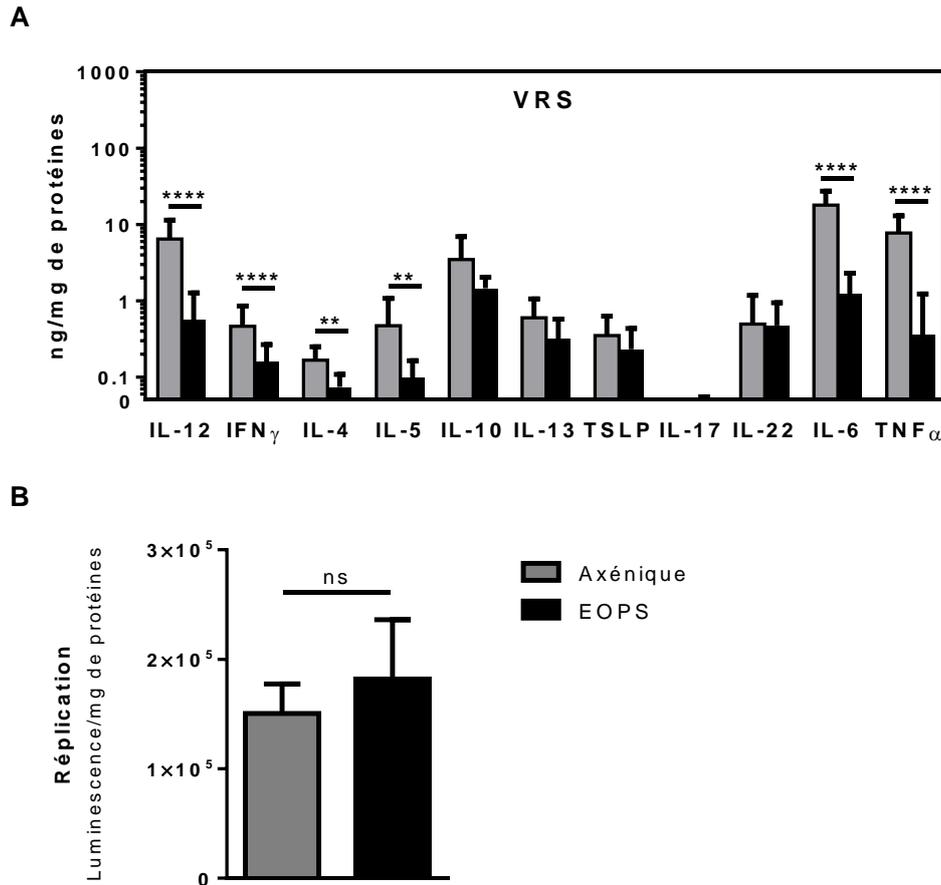


Figure 18. Les réponses cytokiniques au cours de l'exposition au VRS sont exacerbées en l'absence de microbiote pulmonaire. Les explants de poumons de souris adultes axéniques ou EOPS ont été infectés par le VRS-luciférase pendant 24h. (A) Les surnageants de culture ont été récoltés pour doser par ELISA des cytokines de type 1 (IL-12 et IFN- $\gamma$ ), de type 2 (IL-4, -5, -10, -13 et TSLP), de type 17 (IL-17 et -22) et inflammatoires (IL-6 et TNF- $\alpha$ ). (B) La réplication a été mesurée par la détection de la luminescence (photon/sec/cm<sup>2</sup>/sr) émise par le virus dans les broyats d'explants pulmonaires en présence de luciférine. Les concentrations cytokiniques et la luminescence ont été rapportées à la quantité de protéines totales dans les lysats d'explants. Les données de 2 expériences avec des résultats similaires ont été compilées pour chacun des paramètres évalués. Cytokines : n=16 échantillons axéniques et n=8 échantillons EOPS. Réplication : n= 10 (axénique) ou 6 (EOPS) échantillons par groupe. Test statistique utilisé : Mann-Whitney. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001.

### 2.3.3. *Influence du microbiote pulmonaire sur l'expression des récepteurs de l'immunité innée à l'homéostasie*

Dans le but de mieux appréhender le rôle des bactéries commensales des poumons sur la régulation des réponses cytokiniques induites par l'activation des récepteurs de l'immunité innée, nous avons étudié avec l'aide de nos collaboratrices de l'unité Micalis (Marie-Louise Noordine et Muriel Thomas) l'expression de gènes de TLRs et RLRs par qRT-PCR dans les poumons de souris axéniques et EOPS à l'homéostasie. Nous n'avons pas mis en évidence de différence d'expression des PPRs entre les poumons de souris axéniques et EOPS à l'état basal (figure 19A). Néanmoins, l'analyse par western blot de l'expression du TLR4 montre que cette protéine est présente dans les poumons de souris axéniques alors qu'elle n'est pas détectable dans les poumons de souris EOPS à l'homéostasie (figure 19B). Ces données indiquent un décalage dans le temps entre l'expression du gène TLR4 et l'abondance de la protéine dans les poumons. Nous avons tenté d'analyser en western bot l'expression des autres TLRs et de la molécule MyD88 sans succès sans doute du fait de l'absence de bons anticorps commercialisés. La détection de RIG-I doit encore être réalisée. Ainsi, l'exacerbation des réponses cytokiniques constatée en l'absence de microbiote en stimulant le TLR4 par le LPS ou en infectant par le VRS les explants pulmonaires de souris axéniques peut être due à la présence accrue de la protéine TLR4 dans leurs poumons.

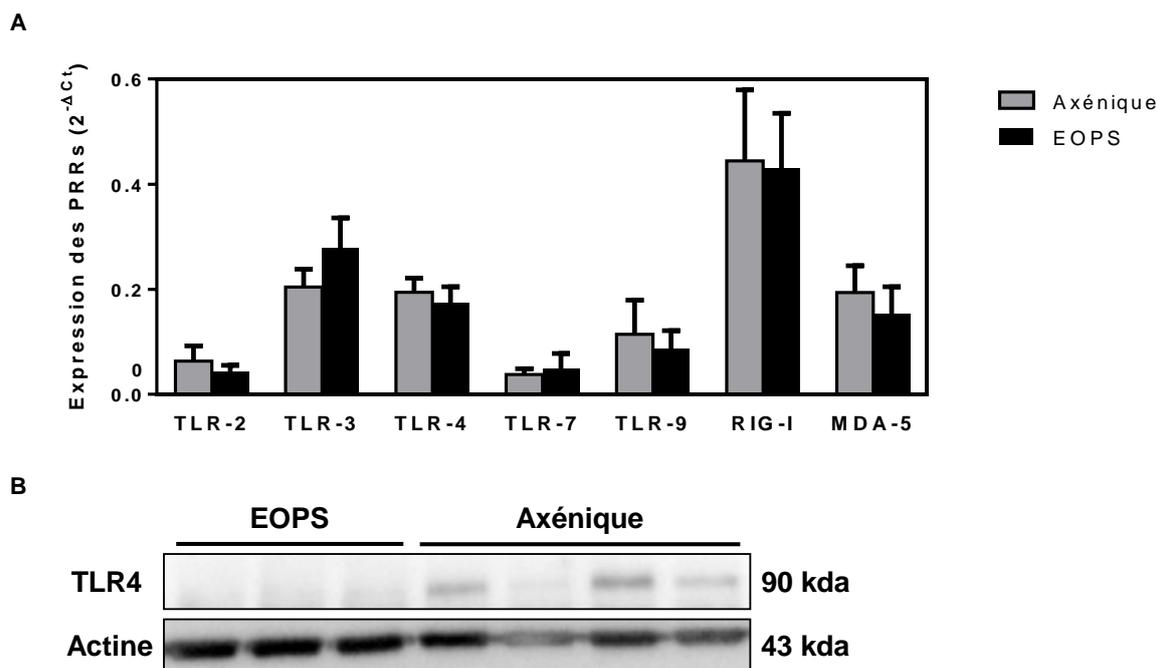


Figure 19. Le TLR4 est plus abondant dans les poumons dépourvu de microbiote commensal. (A) Les expressions des TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR9 ainsi que de RIG-I et MDA-5 ont été analysées par qRT-PCR dans les poumons de souris axéniques et EOPS à l'état basal. Les courbes de fluorescence ont été analysées avec le logiciel Realplex (Eppendorf) pour déterminer la valeur du cycle threshold (Ct) pour chaque gène. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de ménage (HPRT) en calculant le  $\Delta Ct$  ( $Ct$  moyen (gène) -  $Ct$  moyen (HPRT)). L'expression relative de chaque gène a ensuite été calculée avec la formule  $2^{(-\Delta Ct)}$ .  $n=6$  échantillons de souris adultes EOPS et  $n=8$  échantillons de souris adultes axéniques. Test statistique utilisé : Mann-Whitney (B) La détection de la protéine TLR4 a été réalisée par western blot dans les lysats de poumons de souris adultes EOPS et axéniques à l'homéostasie ( $n=3$  et  $n=4$  respectivement).

#### 2.3.4. Microbiote pulmonaire néonatal et réponse immunitaire innée au cours de stimulations des TLRs

D'après Gollwitzer *et al* (2014), l'acquisition du microbiote pulmonaire est progressive jusqu'à 14 jours de vie [262,269]. A 6 jours de vie la quantité de bactéries dans les poumons de souriceaux BALB/c et C57BL6 est significativement plus faible que dans les poumons de jeunes souris âgées de plus de 14 jours [262,269]. Nous avons donc testé si cette faible abondance en microbiote se traduit par une plus forte réponse cytokinique aux ligands de TLRs par rapport à des explants de poumons adultes (figure 20). Nous avons stimulé par les ligands des TLR3, TLR4, TLR7 et TLR9 des explants pulmonaires de souris BALB/c de 6 jours et adultes. Les productions d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par les explants pulmonaires de souriceaux et d'adultes BALB/c sont identiques. Ces données indiquent qu'à 6 jours de vie la

flore commensale bactérienne présente dans les poumons de souriceaux BALB/c assure des niveaux de réponse inflammatoire à des PAMPs synthétiques identiques à la situation de l'adulte.

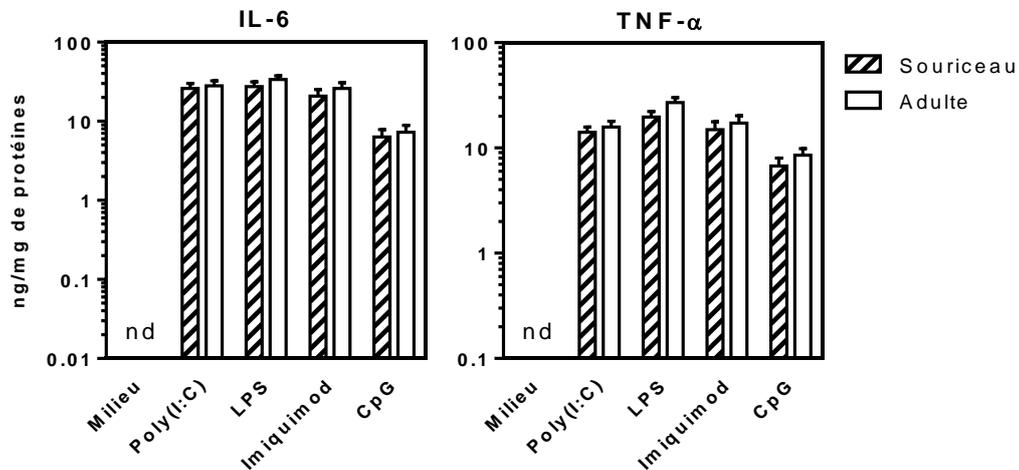


Figure 20. La réponse inflammatoire pulmonaire néonatale au cours de stimulations TLRs est identique entre les souriceaux et les adultes. Les explants de poumons de souriceaux ou d'adultes BALB/c ont été stimulés pendant 24 h par le poly(I:C), le LPS, l'imiquimod ou le CpG, ligands synthétiques des TLR3, TLR4, TLR7 et TLR9 respectivement. Les surnageants de culture ont été récoltés pour doser l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  par ELISA. Les concentrations cytokiniques ont été rapportées à la quantité de protéines totales présentes dans les lysats d'explants.  $n=19$  échantillons souriceaux et  $n=16$  échantillons adultes BALB/c par condition, les données de 3 ou 4 expériences avec des résultats similaires ont été compilées. Test statistique utilisé : Mann-Whitney. \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ .

### 2.3.5. Orientation de la réponse immunitaire à l'infection par le VRS par l'administration de souches bactériennes primo-colonisatrices des poumons au cours de la période néonatale

L'enrichissement en cellules immunitaires dans les poumons se déroule en parallèle de l'acquisition et de la diversification de la flore microbienne au cours du temps. La composition microbienne des poumons pourrait donc avoir un effet sur la sensibilité néonatale à l'infection par le VRS.

L'équipe de Muriel Thomas a isolé de poumons de souriceaux C57BL6, 20 souches bactériennes dont quatre ont été référencées au CNCM de l'institut Pasteur (Paris). Leurs caractéristiques immunologiques ont été déterminées à partir des profils de sécrétions cytokiniques obtenus en exposant des explants pulmonaires de souris adultes axéniques C57BL6 aux différentes bactéries découvertes. La souche CNCM 4969 a été sélectionnée pour ses capacités d'induction cytokinique de type 1 et la souche CNCM 4970 pour ses propriétés de type 2 [269]. De plus, si les explants de souris adultes C57BL6 sont pré-exposés

à CNCM 4969 ou CNCM 4970, la réplication du VRS est significativement plus faible dans les explants traités par CNCM 4969 par rapport au contrôle non pré-exposé aux bactéries (milieu de culture) et à CNCM 4970 (figure 21). La mortalité tissulaire est faible et similaire entre les groupes (donnée non montrées).

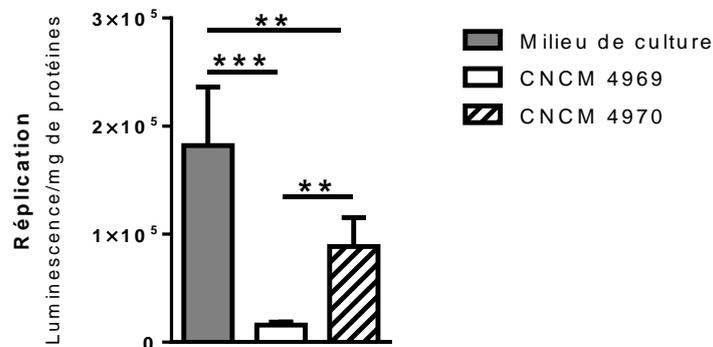


Figure 21. La pré-exposition des explants de poumons de souris adultes à CNCM 4969 et CNCM 4970 réduit la réplication du VRS. Les explants pulmonaires de souris adultes C57BL6 EOPS ont été exposés pendant 5 h à CNCM 4969 ou CNCM 4970 (100 000 cfu) puis infectés par le VRS-luciférase pendant 24 h. Les surnageants de culture ont été récoltés et les explants broyés afin d'analyser la cytotoxicité tissulaire par dosage de l'activité LDH. La réplication a été mesurée par la détection de la luminescence (photon/sec/cm<sup>2</sup>/sr) émise par les broyats d'explants pulmonaires en présence de luciférine. La luminescence a été rapportée à la quantité de protéines totales présentes dans les lysats d'explants. n= 6 échantillons par groupe. Test statistique utilisé : Mann-Whitney. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Les données de 2 expériences avec des résultats similaires ont été compilées.

Dans le but d'évaluer les effets de l'administration de bactéries primo-colonisatrices des poumons sur l'immunité innée néonatale et sur la réplication du VRS-luciférase *in vivo*, nous avons administré à des souriceaux BALB/c par voie nasale CNCM 4969 ou CNCM 4970 à 2 et 3 jours de vie puis tous les deux jours pendant 15 jours avec une infection par le VRS à 6 jours de vie (figure 22A). Nous avons choisi d'euthanasier les souriceaux 1 jour après l'infection en raison de la fulgurance des réponses cytokiniques et du pic de réplication virale situé entre 1 et 2 jours post-infection. Cela d'après des données non publiées par l'équipe comparant les cinétiques de réplication virale entre des souriceaux et des adultes dans les fonds génétiques BALB/c et C57BL6. De plus, les premières expériences d'intervention sur le microbiote pulmonaire nous ont indiqué que l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$  étaient indétectables dans les poumons BALB/c néonataux. Nous n'avons donc pas évalué l'influence de l'administration des souches bactériennes primo-colonisatrices sur la réponse antivirale IFN-I dans les expériences présentées ci-après.

Le traitement par les souches bactériennes CNCM 4969 ou CNCM 4970 ne modifie par la réplication du VRS mesurée *in vivo* (figure 22B) ou dans les lysats de poumons 1 jour post-infection (figure 22C) ni dans les lysats de fosses nasales (non montré). Cependant nous avons observé un léger ralentissement de la croissance des souriceaux traités avec la souche bactérienne CNCM 4970 après infection par le VRS (figure 22D). En l'absence d'infection par le VRS, l'exposition à la souche bactérienne CNCM 4970 provoque également une augmentation significative des productions d'IL-9, d'IL-13 voire d'IL-6 dans les lysats pulmonaires (figure 22E) sans que cela s'accompagne d'une différence significative sur le recrutement cellulaire dans les lavages broncho-alvéolaires (figure 22F, nombre de cellules dans les LBA et % de neutrophiles). Les analyses par cytométrie de flux ne montrent pas non plus de modification significative de la composition cellulaire des poumons (MAs, neutrophiles, éosinophiles, cellules dendritiques, monocytes, cellules NK, ILC2, lymphocytes CD49a<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>, lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, lymphocytes Treg et Th17 et lymphocytes B) après traitement par les souches bactériennes et l'infection par le VRS de (données non présentées). Ces résultats indiquent que CNCM 4969 et CNCM 4970 n'influencent pas la réponse immédiate à l'infection par le VRS. En dehors de l'infection, CNCM 4970 tend à orienter l'immunité des poumons vers un environnement pulmonaire de type 2 et pro-inflammatoire.

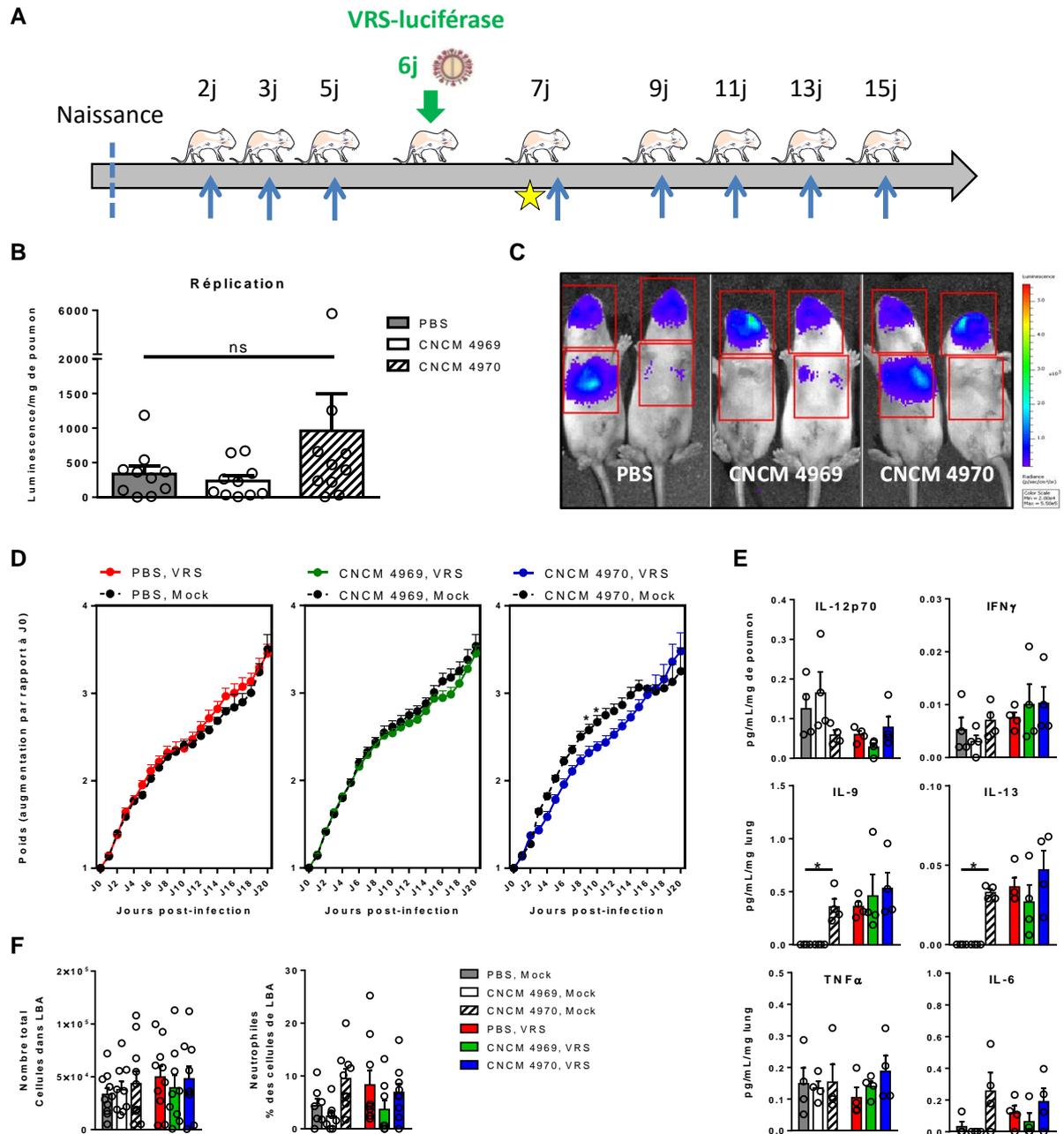


Figure 22. L'administration répétée de CNCM 4969 ou de CNCM 4970 au cours de la période néonatale n'influence pas significativement la réplication du VRS-luciférase dans les poumons ni l'orientation de la réponse immunitaire innée à l'infection *in vivo*.

(A) CNCM 4969, CNCM 4970 ou une solution saline contrôle (PBS) ont été administrées par voie intranasale à des souriceaux BALB/c âgés de 2 et 3 jours de vie puis tous les deux jours pendant 15 jours avec une infection par le VRS à 6 jours de vie. Un jour post-infection (7 jours de vie), certains souriceaux ont été sacrifiés (étoile) alors que les inoculations bactériennes (flèches bleues) ont été poursuivies chez d'autres souriceaux qui ont grandi jusqu'à l'âge adulte.

(B) La réplication a été mesurée par la détection de la luminescence (photon/sec/cm<sup>2</sup>/sr) émise dans les broyats de poumons en présence de luciférine puis rapportée au poids des poumons.

(C) Image illustrant l'émission de luminescence *in vivo*.

(D) La croissance des souriceaux a été suivie par la mesure du poids chaque jour post-infection rapporté au poids avant l'infection (J0).

(E) Les concentrations de cytokines dans les broyats de poumons ont été mesurées en multiplex avec le système BioPlex puis rapportées au poids des poumons.

(F) Les cellules ont été dénombrées dans le liquide de lavages bronchoalvéolaires (LBA).

Test statistique utilisé : Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . (B) (D) (F) Les données obtenues dans 2 expériences indépendantes ont été compilées ( $n=10$  souris par groupe). (E) Il s'agit d'une unique expérience ( $n=4$  souris par groupe).

Dans le modèle de sensibilisation immunopathologique au VRS en période néonatale, les souriceaux BALB/c infectés par le VRS avant l'âge de 7 jours de vie, vont développer lors d'une seconde infection à l'âge adulte une perte de poids sévère, un recrutement de cellules inflammatoires (éosinophiles et neutrophiles), une forte production d'IL-4 et une réponse anticorps majoritairement tournée vers une réponse Th2 [146,324]. Nous avons évalué l'effet immunomodulateur du traitement par les souches bactériennes CNCM 4969 et CNCM 4970 en période néonatale dans ce modèle de double infection par le VRS (néonatale et adulte) (figure 23A). Tous les groupes présentent une perte de poids au cours de la seconde infection par le VRS et cette perte de poids est plus marquée lorsque les souriceaux ont reçu les souches bactériennes CNCM 4969 ou CNCM 4970 (figure 23B). Le pourcentage en neutrophiles et en éosinophiles dans les LBA est un bon marqueur de l'immunopathologie post ré-infection par le VRS (augmentation du % en éosinophiles). Quel que soit le traitement en période néonatale (PBS, CNCM 4969 ou CNCM 4970), le pourcentage de neutrophiles est diminué et celui des éosinophiles augmenté lors de l'infection des souris qui avait déjà été infectées par le VRS à l'âge de 6 jours (figure 23C). De plus, les réponses anticorps dirigés contre le VRS ou spécifiquement contre la protéine N du virus sont identiques entre les différents groupes (données non montrées). Ainsi, l'administration en période néonatale des bactéries primo-colonistrices CNCM 4969 ou CNCM 4970 n'a pas permis de modifier l'empreinte immunopathologique induite lors de l'infection néonatale par le VRS.

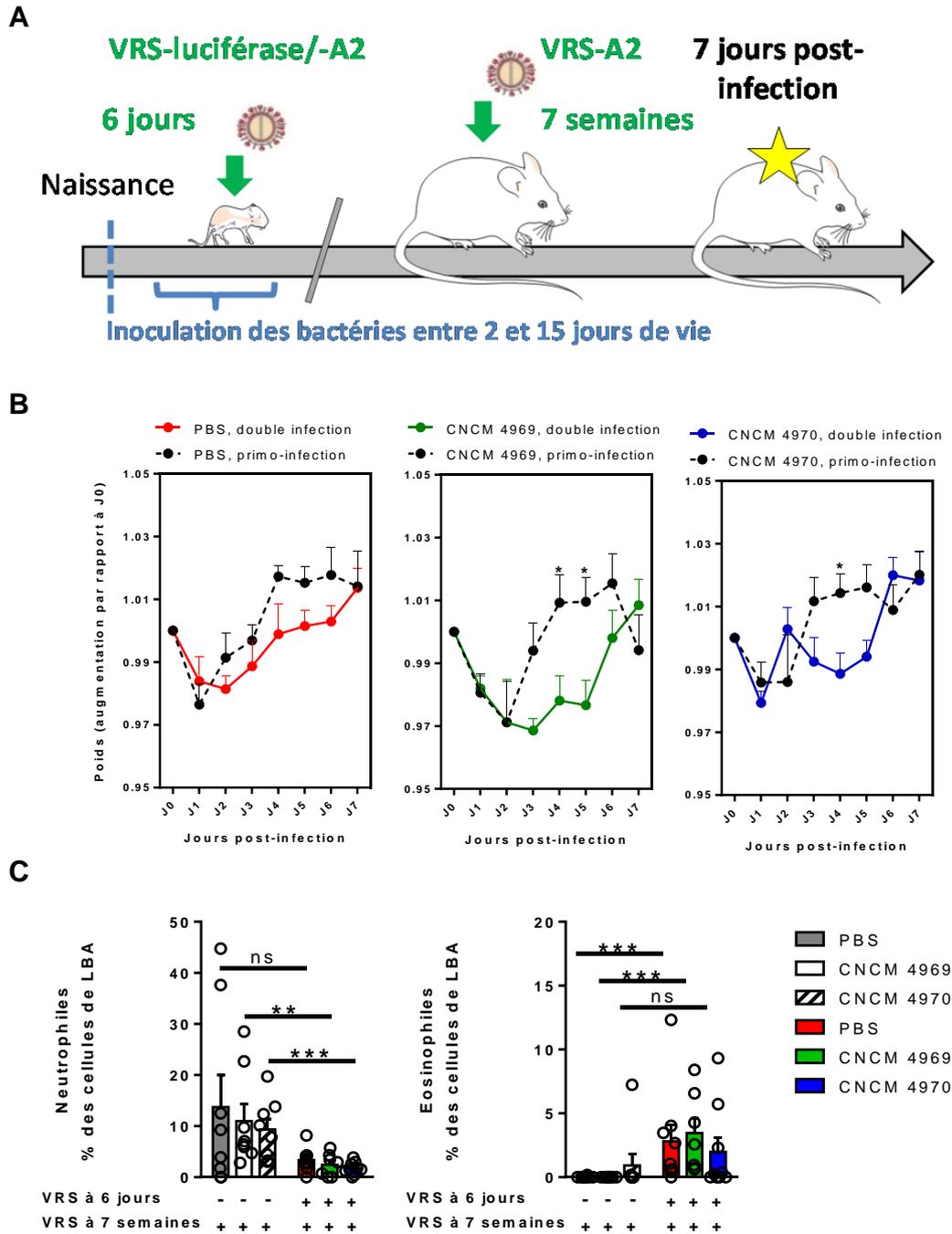


Figure 23. L'administration répétée de CNCM 4969 ou de CNCM 4970 au cours de la période néonatale n'influence pas la réponse immunitaire induite lors de la ré-infection par le VRS à l'âge adulte. (A) Les souris exposées au cours de la période néonatale à CNCM 4969, CNCM 4970 ou au PBS ont été primo- ou ré-infectées à l'âge adulte par le VRS-A2. (B) Le poids des souris a été mesuré chaque jour post-infection puis rapporté au poids avant l'infection (J0). (C) Sept jours post-infection les souris ont été sacrifiées et les cellules présentes dans les liquides de lavages bronchoalvéolaires (LBA) dénombrées. Test statistique utilisé : Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Les données issues de 2 expériences similaires ont été compilées ( $n = 8$  souris par groupe).

## 2.4. Conclusion et discussion

Les résultats que nous avons obtenus *ex vivo* à partir des explants de poumons montrent que l'absence de microbiote pulmonaire chez l'adulte influence la réactivité immunitaire innée du tissu pulmonaire (évaluée par la réponse à des ligands synthétiques de TLRs ou à l'infection par le VRS). Cependant, la comparaison des réponses en cytokines inflammatoires d'explants de souris adultes et de souriceaux ne permet pas de retrouver cette différence de réactivité innée du tissu. Cela peut suggérer que déjà à 6 jours de vie la colonisation bactérienne conditionne les capacités de réponse du tissu pulmonaire.

De nombreuses équipes ont montré que le microbiote commensal des poumons apparait et se diversifie avec l'âge [261,262,269]. A l'âge de 6 jours, le niveau de développement immunitaire des poumons de souriceaux (mais aussi la taille, données non montrée) semble dépendre du fond génétique des souris. Il serait intéressant de comparer la composition des microbiotes commensaux pulmonaires et des cellules immunitaires présentes dans les poumons entre des souriceaux C57BL6 et BALB/c mais aussi après une infection par le VRS.

Nos données suggèrent que l'acquisition d'une flore commensale bactérienne pulmonaire module la réponse immunitaire à différents stimuli probablement en diminuant l'expression de la protéine TLR4. Nous ne pouvons pas conclure pour le moment quant à l'expression protéique des autres TLRs et RLRs dans le tissu pulmonaire axénique et non axénique. Toutefois, pour valider cette diminution de l'expression du TLR4 dans les souris EOPS, il serait intéressant de comparer la sensibilité de ces souris à produire des cytokines suite à une exposition de leurs poumons au LPS par rapport à la réponse de souris axéniques.

Nous pensons qu'intervenir sur la composition du microbiote commensal au cours de la période néonatale pourrait ré-orienter le système immunitaire vers une immunité protectrice contre l'infection par le VRS. Dans nos conditions expérimentales, l'administration de souches bactériennes primo-colonisatrices des poumons à des souriceaux ne modifie pas notablement la réponse à l'infection par le VRS (lors de l'infection néonatale ou de la ré-infection à l'âge adulte). CNCM 4969 et CNCM 4970 ont été isolées dans les poumons de souriceaux C57BL6 et leur profil d'inductions cytokiniques ont été évalués avec des explants pulmonaires de souris adultes axéniques C57BL6. L'absence d'effet immunomodulateur de CNCM 4969 et CNCM 4970 chez les souriceaux BALB/c infectés par le VRS pourrait être la conséquence d'un effet âge associé à un effet du fond génétique sur l'orientation immunologique pré-existante à l'homéostasie : C57BL6 (pro-Th1) et BALB/c (pro-Th2).

Ainsi, ces 2 souches bactériennes pourraient être nouvellement testées au cours d'un protocole d'infection par le VRS impliquant des souris C57BL/6 dans le cas de l'étude de la modulation de réponse immunitaire innée (étude de la réponse IFN-I, de la réplication virale et des profils de réponses cytokiniques de type 1 et 2). D'autres souches primo-colonisatrices des poumons ont été isolées par l'équipe de Muriel Thomas. Dès lors, pour étudier la modulation de la réponse adaptative à l'infection par le VRS avec le modèle de double infection qui fonctionne avec des souris BALB/c, il sera nécessaire de caractériser en amont le profil cytokinique induit, et notamment les interférons, par l'administration de ces souches bactériennes sur des explants pulmonaires de souris BALB/c.

#### **D. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

L'infection par le VRS est problématique chez les nouveau-nés dont l'immunité est en cours de développement. Les mécanismes de détection du virus et les voies de signalisation aboutissant à la réponse à l'infection par le VRS évoluent avec l'âge. En parallèle, la flore microbienne commensale des poumons apparaît progressivement après la naissance et se diversifie avec l'âge.

Les MAs et les cellules épithéliales pulmonaires agissent rapidement lors de la détection des microorganismes commensaux et pathogènes entrant dans les poumons. Ils sont des éléments importants de la régulation de l'immunité puisque leur réponse va conditionner l'activation des autres cellules pulmonaires résidentes (cellules épithéliales, cellules dendritiques, NK et ILC). Leur réaction immédiate nécessite d'être finement régulée afin d'éviter de potentielles séquelles immunopathologiques. La relation entre ces défenseurs cellulaires locaux et le microbiote devient évidente et leur association est dynamique tout au long de la vie. Cependant, les perturbations dans leur relation ont des conséquences pour le développement d'une immunité efficace.

Etudier les mécanismes de défenses intracellulaires mis en place par les nouveau-nés pour contrer l'infection par le VRS est un défi majeur car il est nécessaire d'utiliser des cellules primaires de nouveau-nés ce qui techniquement est limitant. Il en découle que les mécanismes de régulation des réponses cytokiniques à l'échelle de la cellule chez les nouveau-nés infectés par le VRS sont encore méconnus. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude comparant les mécanismes d'entrée du virus dans les cellules néonatales et adultes (MAs, cellules épithéliales...). Cela suggère que les PRRs sollicités au cours de l'infection par le VRS peuvent être différents en fonction de l'âge ainsi que le recrutement et l'activation de molécules de signalisation localisées en aval du récepteur. De plus, le VRS est fin

modulateur de la réponse immunitaire innée via ses protéines NS1 et NS2 qui inhibent la réponse IFN-I. Il existe probablement des mécanismes de subversion de l'immunité antivirale employés par le VRS spécifiques à la période néonatale. Dans le modèle murin, de nombreuses données indiquent que le défaut de réponse IFN-I constaté au cours de la période néonatale participe à la sévérité de l'infection par le VRS d'autant plus que le poumon néonatal est prédisposé à générer une réponse immunologique de type 2.

## **1. La réponse immunitaire innée au VRS en période néonatale**

### **1.1. Le MA, une des cellules immunitaires innées responsables du défaut d'IFN-I au cours de l'infection par le VRS**

Dans ce travail, nous avons montré pour la première fois que les macrophages alvéolaires de souriceaux exposés *ex vivo* au VRS ne produisent pas d'IFN-I de manière détectable, contrairement aux MAs isolés de souris adultes. De plus, nos résultats permettent de généraliser l'absence de mobilisation des voies IFN-I dans les poumons de souriceaux infectés par le VRS quel que soit le fond génétique de l'animal (BALB/c ou C57BL6).

Nous avons également montré que les MAs de souriceaux sont capables de générer une réponse antivirale en réponse à l'activation de RIG-I par un ligand synthétique comme chez les adultes ce qui révèle un mécanisme de subversion de la réponse antivirale par le VRS spécifique à la période néonatale.

L'aminopeptidase IRAP est pour la première fois étudiée dans le contexte d'une infection virale au cours de laquelle son expression et son rôle dans la régulation de la réponse pulmonaire antivirale sont évalués en fonction de l'âge. Nous avons pu montrer que la protéine IRAP exerce dans les MAs et *in vivo* un contrôle des réponses IFN-I à l'infection par le VRS propre au contexte néonatal.

## 1.2. L'autophagie dans les MAs au cours de la période néonatale

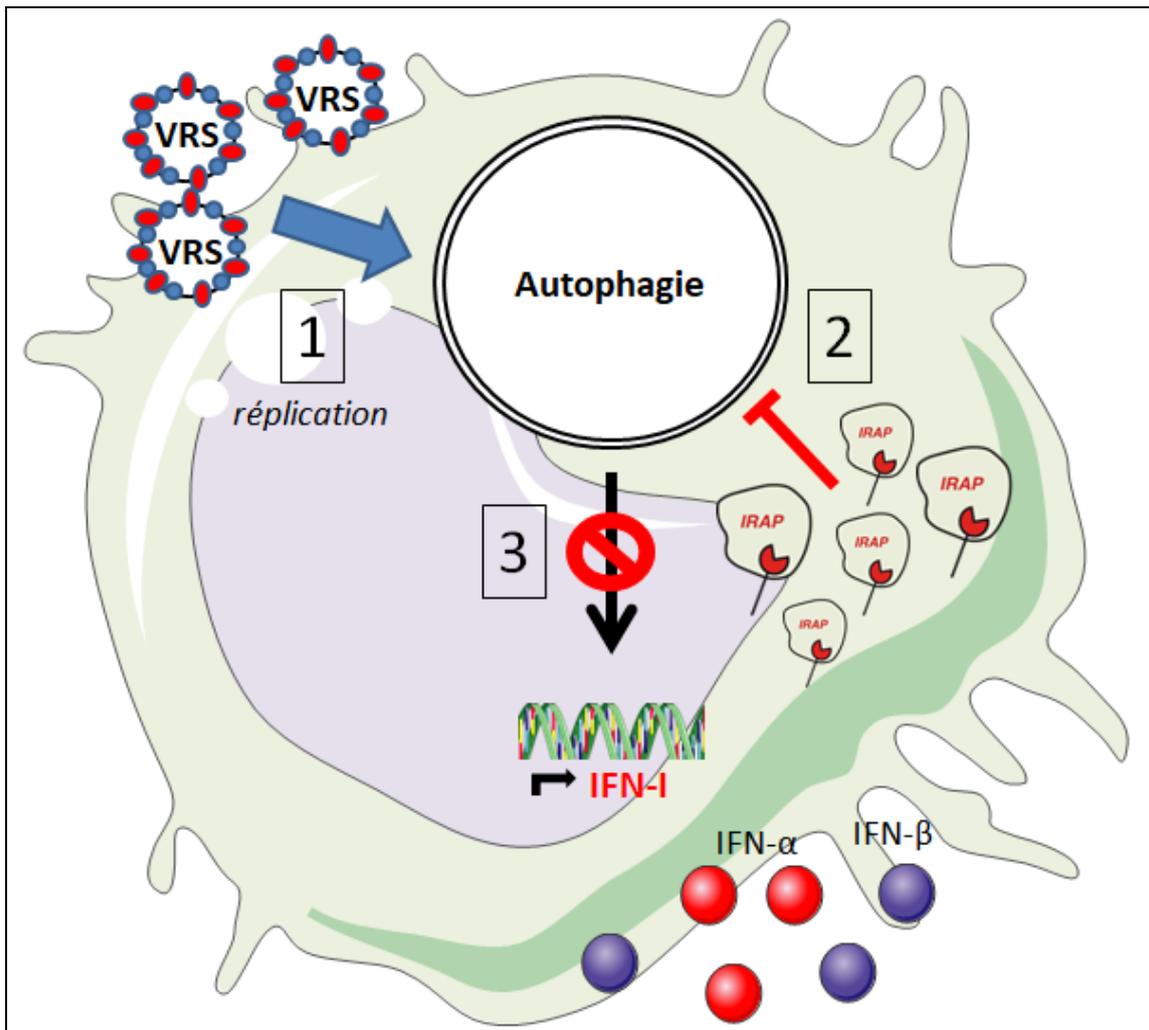


Figure 24. Proposition d'un mécanisme d'inhibition de la réponse IFN-I des MAs à l'infection par le VRS au cours de la période néonatale. Dans les MAs l'exposition au VRS induit l'autophagie (1) qui est rapidement bloquée par l'action des endosomes IRAP<sup>+</sup> (2) empêchant alors la synthèse d'IFN-I (3).

Reed *et al* (2013) ont montré que l'infection *in vivo* par le VRS induit l'autophagie dans les poumons de souris adultes ce qui limite la sévérité de l'infection [308]. De plus, Pokharel *et al* (2016) ont montré que l'autophagie permet la production d'IFN-I dans les macrophages de souris adulte [304]. Le rôle de l'autophagie dans l'immunité néonatale n'est pas bien défini. Juste après la naissance, période de carence nutritive, l'autophagie est à son paroxysme dans les poumons puis semble rapidement inhibée [305]. En parallèle, les nouveau-nés sont soumis à un bombardement d'éléments de l'environnement extérieur auxquels ils répondent en évitant que cela devienne pathologique (auto-immunité). On ne sait pas actuellement si le processus autophagique peut influencer les défenses immunitaires néonatales, cela reste à définir. Les voies endolysosomales impliquées dans le transport et

l'activation des TLRs et des RLRs croisent les voies de l'autophagie, il est donc possible d'envisager que la protéine IRAP soit au carrefour de ces différentes voies de régulation et devienne une cible majeure pour interférer avec certaines d'entre elles. Ainsi, nous supposons que la répression de l'autophagie exercée par les endosomes exprimant à leur membrane la protéine IRAP contribue au défaut de réponse IFN-I au cours de l'infection néonatale par le VRS (figure 24).

### **1.3. Les MAs et le microbiote commensal des poumons**

Notre travail concernant l'étude du microbiote pulmonaire indique que l'absence de colonisation microbienne des poumons génère un environnement pulmonaire prompt à l'inflammation lors de stimulation des TLRs par des ligands synthétiques ou lors de l'infection par le VRS. A l'âge de 6 jours, la charge bactérienne des poumons est plus faible qu'à l'âge adulte. Néanmoins, le tissu pulmonaire du souriceau BALB/c est déjà moins sensible à l'exacerbation inflammatoire provoquée par des ligands de TLRs montrant alors les capacités de modulation précoce du microbiote pulmonaire au cours de la période néonatale.

Les bactéries des poumons participent à la polarisation immunologique des MAs chez la souris adulte. L'absence de bactéries après un traitement antibiotique induit l'apparition de MAs producteurs d'IL-6 et de CCL24 (eotaxin-2), impliqué dans le recrutement d'éosinophiles, au cours de stimulation des TLR3 et TLR4 [267]. Le microbiote commensal des poumons protège de la grippe par l'intermédiaire des MAs. Abt *et al* (2012) ont montré chez des souris adultes traitées par cures répétées d'antibiotiques que les MAs présentaient un défaut de réponse IFN-I au cours de l'infection par le virus Influenza [325]. De plus la composition bactérienne des poumons semble importante au cours de l'infection grippale. Wang *et al* (2013) ont montré que la colonisation bactérienne des poumons par *Staphylococcus aureus* permet le recrutement de MAs de type M2 protecteurs [326]. Ainsi, il serait intéressant d'établir une corrélation entre la polarisation des MAs de souriceaux dans le contexte de l'infection par le VRS et les populations bactériennes présentes dans les poumons à cet âge. Cela afin d'identifier les souches présentant un profil de polarisation de la réponse immunitaire de type 1 ou de type 2.

### **1.4. Existe-t-il un lien entre les bactéries commensales des poumons et l'autophagie ?**

Est-ce que l'inhibition ou l'activation de l'autophagie modifie la composition microbienne (bactéries commensales ou pathogènes) des poumons ? Inversement est-ce que le

microbiote commensal influence l'autophagie ? Ces questions n'ont jamais été étudiées dans les poumons. Néanmoins quelques études réalisées à partir du microbiote commensale du système digestif mettent en évidence que *Bacteroidetes fragilis*, bactérie commensale du tube digestif, est capable de moduler l'activation des macrophages de la muqueuse digestive et d'induire l'autophagie dans le cas de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [327,328]. Ainsi, s'il est prouvé que l'induction de l'autophagie est bénéfique au cours de l'infection par le VRS en période néonatale, ce paramètre pourrait devenir un marqueur d'efficacité dans le cas de stratégies de modulation de la réponse immunitaire des poumons.

## **2. Modulation de l'immunité innée néonatale pour lutter contre l'infection par le VRS**

Il a été montré que l'augmentation de la réponse IFN-I au cours de la période néonatale pourrait renforcer les défenses antivirales (état antivirale par induction des ISGs), conditionner la réponse adaptative (activation des cellules dendritiques et des lymphocytes B) et potentiellement favoriser un environnement pulmonaire de type Th1.

Dans le but de favoriser la production d'IFN-I au cours de la période néonatale il serait intéressant de contrer l'action régulatrice de la protéine IRAP dans les poumons des nouveau-nés. Toutefois, il n'existe actuellement pas de drogue inhibant le trafic des endosomes IRAP sans toucher aux autres fonctions de cette protéine (rôle de l'aminopeptidase IRAP dans la présentation croisée). Bien que le rôle de l'autophagie dans la réponse antivirale à l'infection par le VRS soit prouvé chez l'adulte, l'induction de l'autophagie au cours de la période néonatale, comme moyen de lutte contre l'infection VRS, reste à démontrer. Il existe des drogues et des régimes alimentaires particuliers qui peuvent induire l'autophagie, dont beaucoup sont utilisés chez l'Homme. Toutefois, leurs indications dans le cadre de l'induction de l'autophagie restent à être évaluées (pour revues [329–331]).

Nous pensons qu'une intervention sur la composition du microbiote commensal au cours de la période néonatale constitue un moyen pour ré-orienter le système immunitaire vers une immunité protectrice contre l'infection par le VRS. Ainsi, si une bactérie commensale des poumons néonataux pro-Th1 au cours de l'infection VRS était découverte, elle pourrait être administrée de manière répétée dès la période néonatale afin d'amener l'immunité pulmonaire du nouveau-né vers une immunité de type 1. Il pourrait être envisagé d'évaluer l'effet pro-autophagique et stimulant de la réponse IFN-I de cette souche bactérienne.

Pour finir on peut imaginer combiner des stratégies d'immunomodulation pour prévenir les infections graves par le VRS en période néonatale. Par exemple, Eichinger *et al* (2015) ont montré que l'administration intranasale d'IFN- $\gamma$  à des souris stimule l'activation des MAs, accélère la clairance virale mais n'induit pas le recrutement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> [235]. Dans le but de booster les défenses immunitaires innées contre le VRS et d'améliorer la réponse adaptative, il pourrait être bénéfique de coupler l'administration d'IFN- $\gamma$  à des souches bactériennes commensales des poumons capables d'induire une immunité de type 1 pour prévenir de la bronchiolite du nourrisson. Toutefois, la balance bénéfice/risque des inductions des IFN- $\alpha/\beta$  et de l'autophagie devra être évaluée et les modalités de suivi de ces paramètres biologiques déterminées.



## E. BIBLIOGRAPHIE

1. Giersing, B. K.; Karron, R. A.; Vekemans, J.; Kaslow, D. C.; Moorthy, V. S. Meeting report: WHO consultation on Respiratory Syncytial Virus (RSV) vaccine development, Geneva, 25–26 April 2016. *Vaccine* **2017**, doi:10.1016/j.vaccine.2017.02.068.
2. Nair, H.; Nokes, D. J.; Gessner, B. D.; Dherani, M.; Madhi, S. A.; Singleton, R. J.; O'Brien, K. L.; Roca, A.; Wright, P. F.; Bruce, N.; Chandran, A.; Theodoratou, E.; Sutanto, A.; Sedyaningsih, E. R.; Ngama, M.; Munywoki, P. K.; Kartasasmita, C.; Simões, E. A. F.; Rudan, I.; Weber, M. W.; Campbell, H. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **2010**, *375*, 1545–1555, doi:10.1016/S0140-6736(10)60206-1.
3. Shi, T.; McAllister, D. A.; O'Brien, K. L.; Simoes, E. A. F.; Madhi, S. A.; Gessner, B. D.; Polack, F. P.; Balsells, E.; Acacio, S.; Aguayo, C.; Alassani, I.; Ali, A.; Antonio, M.; Awasthi, S.; Awori, J. O.; Azziz-Baumgartner, E.; Baggett, H. C.; Baillie, V. L.; Balmaseda, A.; Barahona, A.; Basnet, S.; Bassat, Q.; Basualdo, W.; Bigogo, G.; Bont, L.; Breiman, R. F.; Brooks, W. A.; Broor, S.; Bruce, N.; Bruden, D.; Buchy, P.; Campbell, S.; Carosone-Link, P.; Chadha, M.; Chipeta, J.; Chou, M.; Clara, W.; Cohen, C.; de Cuellar, E.; Dang, D.-A.; Dash-Yandag, B.; Deloria-Knoll, M.; Dherani, M.; Eap, T.; Ebruke, B. E.; Echavarria, M.; de Freitas Lázaro Emediato, C. C.; Fasce, R. A.; Feikin, D. R.; Feng, L.; Gentile, A.; Gordon, A.; Goswami, D.; Goyet, S.; Groome, M.; Halasa, N.; Hirve, S.; Homaira, N.; Howie, S. R. C.; Jara, J.; Jroundi, I.; Kartasasmita, C. B.; Khuri-Bulos, N.; Kotloff, K. L.; Krishnan, A.; Libster, R.; Lopez, O.; Lucero, M. G.; Lucion, F.; Lupisan, S. P.; Marcone, D. N.; McCracken, J. P.; Mejia, M.; Moisi, J. C.; Montgomery, J. M.; Moore, D. P.; Moraleda, C.; Moyes, J.; Munywoki, P.; Mutyara, K.; Nicol, M. P.; Nokes, D. J.; Nymadawa, P.; da Costa Oliveira, M. T.; Oshitani, H.; Pandey, N.; Paranhos-Baccalà, G.; Phillips, L. N.; Picot, V. S.; Rahman, M.; Rakoto-Andrianarivelo, M.; Rasmussen, Z. A.; Rath, B. A.; Robinson, A.; Romero, C.; Russomando, G.; Salimi, V.; Sawatwong, P.; Scheltema, N.; Schweiger, B.; Scott, J. A. G.; Seidenberg, P.; Shen, K.; Singleton, R.; Sotomayor, V.; Strand, T. A.; Sutanto, A.; Sylla, M.; Tapia, M. D.; Thamthitawat, S.; Thomas, E. D.; Tokarz, R.; Turner, C.; Venter, M.; Waicharoen, S.; Wang, J.; Watthanaworawit, W.; Yoshida, L.-M.; Yu, H.; Zar, H. J.; Campbell, H.; Nair, H.; RSV Global Epidemiology Network Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet Lond. Engl.* **2017**, *390*, 946–958, doi:10.1016/S0140-6736(17)30938-8.
4. Openshaw, P. J. M.; Yamaguchi, Y.; Tregoning, J. S. Childhood infections, the developing immune system, and the origins of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *114*, 1275–1277, doi:10.1016/j.jaci.2004.08.024.
5. Blount, R. E.; Morris, J. A.; Savage, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **1956**, *92*, 544–549.
6. Chanock, R.; Roizman, B.; Myers, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am. J. Hyg.* **1957**, *66*, 281–290.
7. Chanock, R.; Finberg, L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am. J. Hyg.* **1957**, *66*, 291–300.
8. Glezen, W. P.; Taber, L. H.; Frank, A. L.; Kasel, J. A. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am. J. Dis. Child.* **1960** *1986*, *140*, 543–546.
9. Haute Autorité de Santé Conférence de consensus Haute Autorité de Santé - Management of bronchiolitis in infants Available online: [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_271917/en/management-of-bronchiolitis-in-infants](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_271917/en/management-of-bronchiolitis-in-infants) (accessed on Aug 16, 2014).

10. Simoes, E. A. Respiratory syncytial virus infection. *Lancet* **1999**, *354*, 847–852, doi:10.1016/S0140-6736(99)80040-3.
11. Murray, J.; Bottle, A.; Sharland, M.; Modi, N.; Aylin, P.; Majeed, A.; Saxena, S.; Medicines for Neonates Investigator Group Risk factors for hospital admission with RSV bronchiolitis in England: a population-based birth cohort study. *PloS One* **2014**, *9*, e89186, doi:10.1371/journal.pone.0089186.
12. Grimprel, E. [Epidemiology of infant bronchiolitis in France]. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Fr. Pédiatrie* **2001**, *8 Suppl 1*, 83S-92S.
13. Freymuth, F.; Quibriac, M.; Petitjean, J.; Daon, F.; Amiel, M. L. Les virus responsables d'infections respiratoires en pédiatrie: bilan de 3480 aspirations nasales réalisées chez l'enfant en une période de six ans. *Sem. Hôp. Paris* **1987**, *63*, 3593–3601.
14. Freymuth, F.; Vabret, A.; Gouarin, S.; Petitjean, J.; Charbonneau, P.; Lehoux, P.; Galateau-Salle, F.; Tremolières, F.; Carette, M. F.; Mayaud, C.; Mosnier, A.; Burnouf, L. [Epidemiology and diagnosis of respiratory syncytial virus in adults]. *Rev. Mal. Respir.* **2004**, *21*, 35–42.
15. Beem, M. Repeated Infections with Respiratory Syncytial Virus. *J. Immunol.* **1967**, *98*, 1115–1122.
16. Hall, C. B.; Geiman, J. M.; Biggar, R.; Kotok, D. I.; Hogan, P. M.; Douglas, G. R. Respiratory syncytial virus infections within families. *N. Engl. J. Med.* **1976**, *294*, 414–419, doi:10.1056/NEJM197602192940803.
17. Hall, C. B.; Walsh, E. E.; Long, C. E.; Schnabel, K. C. Immunity to and Frequency of Reinfection with Respiratory Syncytial Virus. *J. Infect. Dis.* **1991**, *163*, 693–698, doi:10.1093/infdis/163.4.693.
18. Hall, C. B.; Long, C. E.; Schnabel, K. C. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2001**, *33*, 792–796, doi:10.1086/322657.
19. Che, D.; Nicolau, J.; Bergounioux, J.; Perez, T.; Bitar, D. [Bronchiolitis among infants under 1 year of age in France: epidemiology and factors associated with mortality] Bronchiolite aiguë du nourrisson en France : bilan des cas hospitalisés en 2009 et facteurs de létalité. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Fr. Pédiatrie* **2012**, *19*, 700–706, doi:10.1016/j.arcped.2012.04.015.
20. Chevret, L.; Mbieleu, B.; Essouri, S.; Durand, P.; Chevret, S.; Devictor, D. [Bronchiolitis treated with mechanical ventilation: prognosis factors and outcome in a series of 135 children]. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Fr. Pédiatrie* **2005**, *12*, 385–390, doi:10.1016/j.arcped.2005.01.008.
21. Hernando Puente, M.; López-Herce Cid, J.; Bellón Cano, J. M.; Villaescusa, J. U.; Santiago Lozano, M. J.; Sánchez Galindo, A. [Prognostic factors for bronchiolitis complications in a pediatric intensive care unit] Factores pronósticos de evolución complicada en la bronquiolitis que requiere ingreso en cuidados intensivos pediátricos. *An. Pediatría Barc. Spain 2003* **2009**, *70*, 27–33, doi:10.1016/j.anpedi.2008.08.004.
22. Prais, D.; Schonfeld, T.; Amir, J.; Israeli Respiratory Syncytial Virus Monitoring Group Admission to the intensive care unit for respiratory syncytial virus bronchiolitis: a national survey before palivizumab use. *Pediatrics* **2003**, *112*, 548–552.
23. Cherian, T.; Simoes, E. A.; Steinhoff, M. C.; Chitra, K.; John, M.; Raghupathy, P.; John, T. J. Bronchiolitis in tropical south India. *Am. J. Dis. Child.* **1990**, *144*, 1026–1030.
24. Scheltema, N. M.; Gentile, A.; Lucion, F.; Nokes, D. J.; Munywoki, P. K.; Madhi, S. A.; Groome, M. J.; Cohen, C.; Moyes, J.; Thorburn, K.; Thamthitawat, S.; Oshitani, H.; Lupisan, S. P.; Gordon, A.; Sánchez, J. F.; O'Brien, K. L.; PERCH Study Group; Gessner, B. D.; Sutanto, A.; Mejias, A.; Ramilo, O.; Khuri-Bulos, N.; Halasa, N.; de-Paris, F.; Pires, M. R.; Spaeder, M. C.; Paes, B. A.; Simões, E. A. F.; Leung, T. F.; da Costa Oliveira, M. T.; de Freitas Lázaro Emediato, C. C.; Bassat, Q.; Butt, W.; Chi, H.; Aamir, U. B.; Ali, A.; Lucero, M. G.; Fasce, R. A.; Lopez, O.; Rath, B. A.; Polack, F. P.; Papenburg, J.; Roglić, S.; Ito, H.; Goka, E. A.; Grobbee, D. E.; Nair, H.; Bont, L. J. Global respiratory syncytial virus-associated mortality in young children (RSV GOLD): a

- retrospective case series. *Lancet Glob. Health* **2017**, *5*, e984–e991, doi:10.1016/S2214-109X(17)30344-3.
25. de Graaff, P. M. A.; de Jong, E. C.; van Capel, T. M.; van Dijk, M. E. A.; Roholl, P. J. M.; Boes, J.; Luytjes, W.; Kimpen, J. L. L.; van Bleek, G. M. Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2005**, *175*, 5904–5911.
  26. Makris, S.; Bajorek, M.; Culley, F. J.; Goritzka, M.; Johansson, C. Alveolar Macrophages Can Control Respiratory Syncytial Virus Infection in the Absence of Type I Interferons. *J. Innate Immun.* **2016**, *8*, 452–463, doi:10.1159/000446824.
  27. Schlender, J.; Hornung, V.; Finke, S.; Günthner-Biller, M.; Marozin, S.; Brzózka, K.; Moghim, S.; Endres, S.; Hartmann, G.; Conzelmann, K.-K. Inhibition of Toll-Like Receptor 7- and 9-Mediated Alpha/Beta Interferon Production in Human Plasmacytoid Dendritic Cells by Respiratory Syncytial Virus and Measles Virus. *J. Virol.* **2005**, *79*, 5507–5515, doi:10.1128/JVI.79.9.5507-5515.2005.
  28. Resch, B.; Manzoni, P.; Lanari, M. Severe respiratory syncytial virus (RSV) infection in infants with neuromuscular diseases and immune deficiency syndromes. *Paediatr. Respir. Rev.* **2009**, *10*, 148–153, doi:10.1016/j.prrv.2009.06.003.
  29. Munywoki, P. K.; Koech, D. C.; Agoti, C. N.; Kibirige, N.; Kipkoech, J.; Cane, P. A.; Medley, G. F.; Nokes, D. J. Influence of age, severity of infection, and co-infection on the duration of respiratory syncytial virus (RSV) shedding. *Epidemiol. Infect.* **2014**, 1–9, doi:10.1017/S0950268814001393.
  30. Hall, C. B.; Douglas, R. G.; Geiman, J. M. Respiratory syncytial virus infections in infants: quantitation and duration of shedding. *J. Pediatr.* **1976**, *89*, 11–15.
  31. Hishiki, H.; Ishiwada, N.; Fukasawa, C.; Abe, K.; Hoshino, T.; Aizawa, J.; Ishikawa, N.; Kohno, Y. Incidence of bacterial coinfection with respiratory syncytial virus bronchopulmonary infection in pediatric inpatients. *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.* **2011**, *17*, 87–90, doi:10.1007/s10156-010-0097-x.
  32. Thorburn, K.; Harigopal, S.; Reddy, V.; Taylor, N.; van Saene, H. K. F. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax* **2006**, *61*, 611–615, doi:10.1136/thx.2005.048397.
  33. Weinberger, D. M.; Klugman, K. P.; Steiner, C. A.; Simonsen, L.; Viboud, C. Association between Respiratory Syncytial Virus Activity and Pneumococcal Disease in Infants: A Time Series Analysis of US Hospitalization Data. *PLOS Med.* **2015**, *12*, e1001776, doi:10.1371/journal.pmed.1001776.
  34. Avadhanula, V.; Rodriguez, C. A.; Devincenzo, J. P.; Wang, Y.; Webby, R. J.; Ulett, G. C.; Adderson, E. E. Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *J. Virol.* **2006**, *80*, 1629–1636, doi:10.1128/JVI.80.4.1629-1636.2006.
  35. Chan, M.; Park, J. J.; Shi, T.; Martín-Torres, F.; Bont, L.; Nair, H.; Respiratory Syncytial Virus Network (ReSViNET) The burden of respiratory syncytial virus (RSV) associated acute lower respiratory infections in children with Down syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J. Glob. Health* **2017**, *7*, 020413, doi:10.7189/jogh.07.020413.
  36. Shi, T.; Balsells, E.; Wastnedge, E.; Singleton, R.; Rasmussen, Z. A.; Zar, H. J.; Rath, B. A.; Madhi, S. A.; Campbell, S.; Vaccari, L. C.; Bulkow, L. R.; Thomas, E. D.; Barnett, W.; Hoppe, C.; Campbell, H.; Nair, H. Risk factors for respiratory syncytial virus associated with acute lower respiratory infection in children under five years: Systematic review and meta-analysis. *J. Glob. Health* **2015**, *5*, 020416, doi:10.7189/jogh.05.020416.
  37. Caballero, M. T.; Polack, F. P.; Stein, R. T. Viral bronchiolitis in young infants: new perspectives for management and treatment. *J. Pediatr. (Rio J.)* **2017**, doi:10.1016/j.jpmed.2017.07.003.
  38. Thomsen, S. F.; van der Sluis, S.; Stensballe, L. G.; Posthuma, D.; Skytthe, A.; Kyvik, K. O.; Duffy, D. L.; Backer, V.; Bisgaard, H. Exploring the association between severe respiratory syncytial

- virus infection and asthma: a registry-based twin study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2009**, *179*, 1091–1097, doi:10.1164/rccm.200809-1471OC.
39. Janssen, R.; Bont, L.; Siezen, C. L. E.; Hodemaekers, H. M.; Ermers, M. J.; Doornbos, G.; van 't Slot, R.; Wijmenga, C.; Goeman, J. J.; Kimpen, J. L. L.; van Houwelingen, H. C.; Kimman, T. G.; Hoebee, B. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 826–834, doi:10.1086/520886.
  40. Alvarez, A. E.; Marson, F. A. L.; Bertuzzo, C. S.; Bastos, J. C. S.; Baracat, E. C. E.; Brandão, M. B.; Tresoldi, A. T.; das Neves Romaneli, M. T.; Almeida, C. C. B.; de Oliveira, T.; Schlodtmann, P. G.; Corrêa, E.; de Miranda, M. L. F.; Dos Reis, M. C.; De Pieri, J. V.; Arns, C. W.; Ribeiro, J. D. Association between single nucleotide polymorphisms in TLR4, TLR2, TLR9, VDR, NOS2 and CCL5 genes with acute viral bronchiolitis. *Gene* **2017**, doi:10.1016/j.gene.2017.12.022.
  41. Caballero, M. T.; Serra, M. E.; Acosta, P. L.; Marzec, J.; Gibbons, L.; Salim, M.; Rodriguez, A.; Reynaldi, A.; Garcia, A.; Bado, D.; Buchholz, U. J.; Hijano, D. R.; Coviello, S.; Newcomb, D.; Bellabarba, M.; Ferolla, F. M.; Libster, R.; Berenstein, A.; Siniawski, S.; Blumetti, V.; Echavarría, M.; Pinto, L.; Lawrence, A.; Ossorio, M. F.; Grosman, A.; Mateu, C. G.; Bayle, C.; Dericco, A.; Pellegrini, M.; Igarza, I.; Repetto, H. A.; Grimaldi, L. A.; Gudapati, P.; Polack, N. R.; Althabe, F.; Shi, M.; Ferrero, F.; Bergel, E.; Stein, R. T.; Peebles, R. S.; Boothby, M.; Kleeberger, S. R.; Polack, F. P. TLR4 genotype and environmental LPS mediate RSV bronchiolitis through Th2 polarization. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 571–582, doi:10.1172/JCI75183.
  42. AquRespi Réseau Respiratoire d'Aquitaine Bronchiolite et asthme - BPCO - Mucoviscidose AquBronchio : Bronchiolite du Nourrisson Available online: <http://90plan.ovh.net/~raban/> (accessed on Aug 17, 2014).
  43. Dutau, G.; Juchet, A.; Rittié, J. L.; Rancé, F.; Brémont, F.; Nouilhan, P. Aspects thérapeutiques conflictuels au cours des bronchiolites aiguës du nourrisson. *Arch. Pédiatrie* **1997**, *4*, *Supplement 2*, 72s-77s, doi:10.1016/S0929-693X(97)86466-4.
  44. Deschildre, A.; Thumerelle, C.; Bruno, B.; Dubos, F.; Santos, C.; Dumonceaux, A. Bronchiolite aiguë du nourrisson. *Arch. Pédiatrie* **2000**, *7*, *Supplement 1*, 21s-26s, doi:10.1016/S0929-693X(00)88814-4.
  45. Bourrillon, A.; David, S.; Vanhuxem, C. L.; Dubus, J. C.; Chabrol, B. À propos des bronchiolites aiguës du nourrisson. *Arch. Pédiatrie* **2004**, *11*, 709–711, doi:10.1016/j.arcped.2004.03.075.
  46. David, M.; Luc-Vanuxem, C.; Loundou, A.; Bosdure, E.; Auquier, P.; Dubus, J.-C. Application de la Conférence de consensus sur la bronchiolite aiguë du nourrisson en médecine générale : évolution entre 2003 et 2008. *Arch. Pédiatrie* **2010**, *17*, 125–131, doi:10.1016/j.arcped.2009.10.022.
  47. World Health Organization *Immunization, Vaccines and Biologicals. Global vaccine action plan 2011–2020*; World Health Organization, 2013; ISBN 978-92-4-150498-0.
  48. Kim, H. W.; Canchola, J. G.; Brandt, C. D.; Pyles, G.; Chanock, R. M.; Jensen, K.; Parrott, R. H. Respiratory Syncytial Virus Disease in Infants Despite Prior Administration of Antigenic Inactivated Vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **1969**, *89*, 422–434.
  49. Afonso, C. L.; Amarasinghe, G. K.; Bányai, K.; Bào, Y.; Basler, C. F.; Bavari, S.; Bejerman, N.; Blasdel, K. R.; Briand, F.-X.; Briesse, T.; Bukreyev, A.; Calisher, C. H.; Chandran, K.; Chéng, J.; Clawson, A. N.; Collins, P. L.; Dietzgen, R. G.; Dolnik, O.; Domier, L. L.; Dürrwald, R.; Dye, J. M.; Easton, A. J.; Ebihara, H.; Farkas, S. L.; Freitas-Astúa, J.; Formenty, P.; Fouchier, R. A. M.; Fù, Y.; Ghedin, E.; Goodin, M. M.; Hewson, R.; Horie, M.; Hyndman, T. H.; Jiāng, D.; Kitajima, E. W.; Kobinger, G. P.; Kondo, H.; Kurath, G.; Lamb, R. A.; Lenardon, S.; Leroy, E. M.; Li, C.-X.; Lin, X.-D.; Liú, L.; Longdon, B.; Marton, S.; Maisner, A.; Mühlberger, E.; Netesov, S. V.; Nowotny, N.; Patterson, J. L.; Payne, S. L.; Paweska, J. T.; Randall, R. E.; Rima, B. K.; Rota, P.; Rubbenstroth, D.; Schwemmler, M.; Shi, M.; Smither, S. J.; Stenglein, M. D.; Stone, D. M.; Takada, A.; Terregino, C.; Tesh, R. B.; Tian, J.-H.; Tomonaga, K.; Tordo, N.; Towner, J. S.; Vasilakis, N.; Verbeek, M.; Volchkov, V. E.; Wahl-Jensen, V.; Walsh, J. A.; Walker, P. J.; Wang, D.; Wang, L.-F.; Wetzel, T.; Whitfield, A. E.; Xiè, J. T.; Yuen, K.-Y.; Zhang, Y.-Z.; Kuhn, J. H. Taxonomy of the

- order Mononegavirales: update 2016. *Arch. Virol.* **2016**, *161*, 2351–2360, doi:10.1007/s00705-016-2880-1.
50. Mitra, R.; Baviskar, P.; Duncan-Decocq, R. R.; Patel, D.; Oomens, A. G. P. The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. *J. Virol.* **2012**, *86*, 4432–4443, doi:10.1128/JVI.06744-11.
  51. Vanover, D.; Smith, D. V.; Blanchard, E. L.; Alonas, E.; Kirschman, J. L.; Lifland, A. W.; Zurla, C.; Santangelo, P. J. RSV glycoprotein and genomic RNA dynamics reveal filament assembly prior to the plasma membrane. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 667, doi:10.1038/s41467-017-00732-z.
  52. Rameix-Welti, M.-A.; Gault, E. Le virus respiratoire syncytial (VRS): état actuel des connaissances. *Feuill. Biol.* **2017**.
  53. Jeffree, C. E.; Brown, G.; Aitken, J.; Su-Yin, D. Y.; Tan, B.-H.; Sugrue, R. J. Ultrastructural analysis of the interaction between F-actin and respiratory syncytial virus during virus assembly. *Virology* **2007**, *369*, 309–323, doi:10.1016/j.virol.2007.08.007.
  54. Pastey, M. K.; Gower, T. L.; Spearman, P. W.; Crowe, J. E.; Graham, B. S. A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 35–40, doi:10.1038/71503.
  55. Jans, J.; elMoussaoui, H.; de Groot, R.; de Jonge, M. I.; Ferwerda, G. Actin- and clathrin-dependent mechanisms regulate interferon gamma release after stimulation of human immune cells with respiratory syncytial virus. *Virol. J.* **2016**, *13*, doi:10.1186/s12985-016-0506-6.
  56. Gutiérrez-Ortega, A.; Sánchez-Hernández, C.; Gómez-García, B. Respiratory syncytial virus glycoproteins uptake occurs through clathrin-mediated endocytosis in a human epithelial cell line. *Virol. J.* **2008**, *5*, 127, doi:10.1186/1743-422X-5-127.
  57. Kolokoltssov, A. A.; Deniger, D.; Fleming, E. H.; Roberts, N. J.; Karpilow, J. M.; Davey, R. A. Small Interfering RNA Profiling Reveals Key Role of Clathrin-Mediated Endocytosis and Early Endosome Formation for Infection by Respiratory Syncytial Virus. *J. Virol.* **2007**, *81*, 7786–7800, doi:10.1128/JVI.02780-06.
  58. Krzyzaniak, M. A.; Zumstein, M. T.; Gerez, J. A.; Picotti, P.; Helenius, A. Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003309, doi:10.1371/journal.ppat.1003309.
  59. Burke, E.; Dupuy, L.; Wall, C.; Barik, S. Role of Cellular Actin in the Gene Expression and Morphogenesis of Human Respiratory Syncytial Virus. *Virology* **1998**, *252*, 137–148, doi:10.1006/viro.1998.9471.
  60. Burke, E.; Mahoney, N. M.; Almo, S. C.; Barik, S. Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. *J. Virol.* **2000**, *74*, 669–675.
  61. Blocquel, D.; Bourhis, J.-M.; Éléouët, J.-F.; Gerlier, D.; Habchi, J.; Jamin, M.; Longhi, S.; Yabukarski, F. Transcription et réplication des Mononegavirales: une machine moléculaire originale. *Virologie* **2012**, *16*, 225–57, doi:10.1684/vir.2012.0458.
  62. Cowton, V. M.; McGivern, D. R.; Fearn, R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 1805–1821, doi:10.1099/vir.0.81786-0.
  63. Shahriari, S.; Gordon, J.; Ghildyal, R. Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding. *Virol. J.* **2016**, *13*, doi:10.1186/s12985-016-0618-z.
  64. García, J.; García-Barreno, B.; Vivo, A.; Melero, J. A. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* **1993**, *195*, 243–247, doi:10.1006/viro.1993.1366.
  65. Radhakrishnan, A.; Yeo, D.; Brown, G.; Myaing, M. Z.; Iyer, L. R.; Fleck, R.; Tan, B.-H.; Aitken, J.; Sanmun, D.; Tang, K.; Yarwood, A.; Brink, J.; Sugrue, R. J. Protein Analysis of Purified Respiratory Syncytial Virus Particles Reveals an Important Role for Heat Shock Protein 90 in Virus Particle Assembly. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2010**, *9*, 1829–1848, doi:10.1074/mcp.M110.001651.

66. Crim, R. L.; Audet, S. A.; Feldman, S. A.; Mostowski, H. S.; Beeler, J. A. Identification of Linear Heparin-Binding Peptides Derived from Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein That Inhibit Infectivity. *J. Virol.* **2007**, *81*, 261–271, doi:10.1128/JVI.01226-06.
67. Feldman, S. A.; Hendry, R. M.; Beeler, J. A. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J. Virol.* **1999**, *73*, 6610–6617.
68. Feldman, S. A.; Audet, S.; Beeler, J. A. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *J. Virol.* **2000**, *74*, 6442–6447.
69. Bar-On, L.; Birnberg, T.; Lewis, K. L.; Edelson, B. T.; Bruder, D.; Hildner, K.; Buer, J.; Murphy, K. M.; Reizis, B.; Jung, S. CX3CR1+ CD8alpha+ dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 14745–14750, doi:10.1073/pnas.1001562107.
70. Delputte, P. L.; Vanderheijden, N.; Nauwynck, H. J.; Pensaert, M. B. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* **2002**, *76*, 4312–4320.
71. Gallagher, J. T.; Lyon, M.; Steward, W. P. Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem. J.* **1986**, *236*, 313–325.
72. Imai, T.; Hieshima, K.; Haskell, C.; Baba, M.; Nagira, M.; Nishimura, M.; Kakizaki, M.; Takagi, S.; Nomiyama, H.; Schall, T. J.; Yoshie, O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* **1997**, *91*, 521–530.
73. Lories, V.; Cassiman, J. J.; Van den Berghe, H.; David, G. Differential expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans in human mammary epithelial cells and lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1116–1122.
74. Nishimura, M.; Umehara, H.; Nakayama, T.; Yoneda, O.; Hieshima, K.; Kakizaki, M.; Dohmae, N.; Yoshie, O.; Imai, T. Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2002**, *168*, 6173–6180.
75. Tayyari, F.; Marchant, D.; Moraes, T. J.; Duan, W.; Mastrangelo, P.; Hegele, R. G. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1132–1135, doi:10.1038/nm.2444.
76. Hovanessian, A. G.; Puvion-Dutilleul, F.; Nisole, S.; Svab, J.; Perret, E.; Deng, J. S.; Krust, B. The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* **2000**, *261*, 312–328, doi:10.1006/excr.2000.5071.
77. Chirkova, T.; Lin, S.; Oomens, A. G. P.; Gaston, K. A.; Boyoglu-Barnum, S.; Meng, J.; Stobart, C. C.; Cotton, C. U.; Hartert, T. V.; Moore, M. L.; Ziady, A. G.; Anderson, L. J. CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 2543–2556, doi:10.1099/vir.0.000218.
78. Tripp, R. A.; Jones, L. P.; Haynes, L. M.; Zheng, H.; Murphy, P. M.; Anderson, L. J. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 732–738, doi:10.1038/90675.
79. McNamara, P. S.; Flanagan, B. F.; Selby, A. M.; Hart, C. A.; Smyth, R. L. Pro- and anti-inflammatory responses in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur. Respir. J.* **2004**, *23*, 106–112.
80. McNamara, P. S.; Flanagan, B. F.; Hart, C. A.; Smyth, R. L. Production of Chemokines in the Lungs of Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* **2005**, *191*, 1225–1232, doi:10.1086/428855.
81. Shedden, W. I.; Emery, J. L. IMMUNOFLUORESCENT EVIDENCE OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION IN CASES OF GIANT CELL BRONCHIOLITIS IN CHILDREN. *J. Pathol. Bacteriol.* **1965**, *89*, 343–347.
82. Neilson, K. A.; Yunis, E. J. Demonstration of respiratory syncytial virus in an autopsy series. *Pediatr. Pathol.* **1990**, *10*, 491–502.

83. Johnson, J. E.; Gonzales, R. A.; Olson, S. J.; Wright, P. F.; Graham, B. S. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **2007**, *20*, 108–119, doi:10.1038/modpathol.3800725.
84. Welliver, T. P.; Garofalo, R. P.; Hosakote, Y.; Hintz, K. H.; Avendano, L.; Sanchez, K.; Velozo, L.; Jafri, H.; Chavez-Bueno, S.; Ogra, P. L.; McKinney, L.; Reed, J. L.; Welliver, R. C. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *J. Infect. Dis.* **2007**, *195*, 1126–1136, doi:10.1086/512615.
85. Welliver, T. P.; Reed, J. L.; Welliver, R. C. Respiratory syncytial virus and influenza virus infections: observations from tissues of fatal infant cases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2008**, *27*, S92–96, doi:10.1097/INF.0b013e318168b706.
86. Openshaw, P. J. M.; Chiu, C.; Culley, F. J.; Johansson, C. Protective and Harmful Immunity to RSV Infection. *Annu. Rev. Immunol.* **2017**, *35*, 501–532, doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052206.
87. Reed, J. L.; Welliver, T. P.; Sims, G. P.; McKinney, L.; Velozo, L.; Avendano, L.; Hintz, K.; Luma, J.; Coyle, A. J.; Welliver, R. C. Innate immune signals modulate antiviral and polyreactive antibody responses during severe respiratory syncytial virus infection. *J. Infect. Dis.* **2009**, *199*, 1128–1138, doi:10.1086/597386.
88. Heidema, J.; Lukens, M. V.; van Maren, W. W. C.; van Dijk, M. E. A.; Otten, H. G.; van Vught, A. J.; van der Werff, D. B. M.; van Gestel, S. J. P.; Semple, M. G.; Smyth, R. L.; Kimpen, J. L. L.; van Bleek, G. M. CD8+ T cell responses in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells of infants with severe primary respiratory syncytial virus infections. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2007**, *179*, 8410–8417.
89. Smith, P.; Wang, S.-Z.; Dowling, K.; Forsyth, K. Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. *J. Paediatr. Child Health* **2001**, *37*, 146–151, doi:10.1046/j.1440-1754.2001.00618.x.
90. Geerdink, R. J.; Pillay, J.; Meyaard, L.; Bont, L. Neutrophils in respiratory syncytial virus infection: A target for asthma prevention. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *136*, 838–847, doi:10.1016/j.jaci.2015.06.034.
91. Gill, M. A.; Palucka, A. K.; Barton, T.; Ghaffar, F.; Jafri, H.; Banchereau, J.; Ramilo, O. Mobilization of plasmacytoid and myeloid dendritic cells to mucosal sites in children with respiratory syncytial virus and other viral respiratory infections. *J. Infect. Dis.* **2005**, *191*, 1105–1115, doi:10.1086/428589.
92. Hall, C. B.; Douglas, R. G.; Simons, R. L.; Geiman, J. M. Interferon production in children with respiratory syncytial, influenza, and parainfluenza virus infections. *J. Pediatr.* **1978**, *93*, 28–32.
93. McIntosh, K.; Masters, H. B.; Orr, I.; Chao, R. K.; Barkin, R. M. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J. Infect. Dis.* **1978**, *138*, 24–32.
94. Zhu, J.; Paul, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **2008**, *112*, 1557–1569, doi:10.1182/blood-2008-05-078154.
95. Brinkmann, V.; Geiger, T.; Alkan, S.; Heusser, C. H. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **1993**, *178*, 1655–1663.
96. Demeure, C. E.; Wu, C. Y.; Shu, U.; Schneider, P. V.; Heusser, C.; Yssel, H.; Delespesse, G. In vitro maturation of human neonatal CD4 T lymphocytes. II. Cytokines present at priming modulate the development of lymphokine production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **1994**, *152*, 4775–4782.
97. Chen, K.; Kolls, J. K. T Cell–Mediated Host Immune Defenses in the Lung. *Annu. Rev. Immunol.* **2013**, *31*, 605–633, doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100019.
98. Carter, N. A.; Vasconcellos, R.; Rosser, E. C.; Tulone, C.; Muñoz-Suano, A.; Kamanaka, M.; Ehrenstein, M. R.; Flavell, R. A.; Mauri, C. Mice Lacking Endogenous IL-10–Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 5569–5579, doi:10.4049/jimmunol.1100284.

99. Flores-Borja, F.; Bosma, A.; Ng, D.; Reddy, V.; Ehrenstein, M. R.; Isenberg, D. A.; Mauri, C. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 173ra23, doi:10.1126/scitranslmed.3005407.
100. Carter, N. A.; Rosser, E. C.; Mauri, C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2012**, *14*, R32, doi:10.1186/ar3736.
101. Aberle, J. H.; Aberle, S. W.; Dworzak, M. N.; Mandl, C. W.; Rebhandl, W.; Vollnhofer, G.; Kundi, M.; Popow-Kraupp, T. Reduced interferon-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells of infants with severe respiratory syncytial virus disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1999**, *160*, 1263–1268, doi:10.1164/ajrccm.160.4.9812025.
102. Kollmann, T. R.; Crabtree, J.; Rein-Weston, A.; Blimkie, D.; Thommai, F.; Wang, X. Y.; Lavoie, P. M.; Furlong, J.; Fortunato, E. S., 3rd; Hajjar, A. M.; Hawkins, N. R.; Self, S. G.; Wilson, C. B. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2009**, *183*, 7150–7160, doi:10.4049/jimmunol.0901481.
103. Legg, J. P.; Hussain, I. R.; Warner, J. A.; Johnston, S. L.; Warner, J. O. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2003**, *168*, 633–639, doi:10.1164/rccm.200210-1148OC.
104. Bont, L.; Heijnen, C. J.; Kavelaars, A.; van Aalderen, W. M.; Brus, F.; Draaisma, J. T.; Geelen, S. M.; Kimpen, J. L. Monocyte IL-10 production during respiratory syncytial virus bronchiolitis is associated with recurrent wheezing in a one-year follow-up study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *161*, 1518–1523, doi:10.1164/ajrccm.161.5.9904078.
105. Bont, L.; Heijnen, C. J.; Kavelaars, A.; van Aalderen, W. M.; Brus, F.; Draaisma, J. M.; Pekelharing-Berghuis, M.; van Diemen-Steenvoorde, R. A.; Kimpen, J. L. Local interferon-gamma levels during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection are associated with disease severity. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 355–358, doi:10.1086/322035.
106. Stoppelenburg, A. J.; Salimi, V.; Hennis, M.; Plantinga, M.; Huis in 't Veld, R.; Walk, J.; Meerding, J.; Coenjaerts, F.; Bont, L.; Boes, M. Local IL-17A potentiates early neutrophil recruitment to the respiratory tract during severe RSV infection. *PLoS One* **2013**, *8*, e78461, doi:10.1371/journal.pone.0078461.
107. Stoppelenburg, A. J.; de Roock, S.; Hennis, M. P.; Bont, L.; Boes, M. Elevated Th17 response in infants undergoing respiratory viral infection. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 1274–1279, doi:10.1016/j.ajpath.2014.01.033.
108. Christiaansen, A. F.; Syed, M. A.; Ten Eyck, P. P.; Hartwig, S. M.; Durairaj, L.; Kamath, S. S.; Varga, S. M. Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants. *Pediatr. Res.* **2016**, doi:10.1038/pr.2016.130.
109. Bartholdy, C.; Olszewska, W.; Stryhn, A.; Thomsen, A. R.; Openshaw, P. J. M. Gene-gun DNA vaccination aggravates respiratory syncytial virus-induced pneumonitis. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 3017–3026, doi:10.1099/vir.0.80098-0.
110. Ostler, T.; Davidson, W.; Ehl, S. Virus clearance and immunopathology by CD8(+) T cells during infection with respiratory syncytial virus are mediated by IFN-gamma. *Eur. J. Immunol.* **2002**, *32*, 2117–2123, doi:10.1002/1521-4141(200208)32:8<2117::AID-IMMU2117>3.0.CO;2-C.
111. Jozwik, A.; Habibi, M. S.; Paras, A.; Zhu, J.; Guvenel, A.; Dhariwal, J.; Almond, M.; Wong, E. H. C.; Sykes, A.; Maybeno, M.; Del Rosario, J.; Trujillo-Torralbo, M.-B.; Mallia, P.; Sidney, J.; Peters, B.; Kon, O. M.; Sette, A.; Johnston, S. L.; Openshaw, P. J.; Chiu, C. RSV-specific airway resident memory CD8+ T cells and differential disease severity after experimental human infection. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10224, doi:10.1038/ncomms10224.
112. Lukens, M. V.; van de Pol, A. C.; Coenjaerts, F. E. J.; Jansen, N. J. G.; Kamp, V. M.; Kimpen, J. L. L.; Rossen, J. W. A.; Ulfman, L. H.; Tacke, C. E. A.; Viveen, M. C.; Koenderman, L.; Wolfs, T. F. W.; van Bleek, G. M. A systemic neutrophil response precedes robust CD8(+) T-cell activation during natural respiratory syncytial virus infection in infants. *J. Virol.* **2010**, *84*, 2374–2383, doi:10.1128/JVI.01807-09.

113. Hussell, T.; Baldwin, C. J.; O'Garra, A.; Openshaw, P. J. CD8+ T cells control Th2-driven pathology during pulmonary respiratory syncytial virus infection. *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 3341–3349, doi:10.1002/eji.1830271233.
114. Alwan, W. H.; Record, F. M.; Openshaw, P. J. CD4+ T cells clear virus but augment disease in mice infected with respiratory syncytial virus. Comparison with the effects of CD8+ T cells. *Clin. Exp. Immunol.* **1992**, *88*, 527–536.
115. Alwan, W. H.; Kozłowska, W. J.; Openshaw, P. J. Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J. Exp. Med.* **1994**, *179*, 81–89.
116. Graham, B. S.; Bunton, L. A.; Wright, P. F.; Karzon, D. T. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J. Clin. Invest.* **1991**, *88*, 1026–1033.
117. Taylor, G.; Thomas, L. H.; Wyld, S. G.; Furze, J.; Sopp, P.; Howard, C. J. Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves. *J. Virol.* **1995**, *69*, 6658–6664.
118. Burbulla, D.; Günther, P. S.; Peper, J. K.; Jahn, G.; Dennehy, K. M. Human CD8+ T Cells Target Multiple Epitopes in Respiratory Syncytial Virus Polymerase. *Viral Immunol.* **2016**, *29*, 307–314, doi:10.1089/vim.2015.0091.
119. Shao, H.-Y.; Lin, Y.-W.; Yu, S.-L.; Lin, H.-Y.; Chitra, E.; Chang, Y.-C.; Sia, C.; Chong, P.; Hsu, M.-T.; Wei, O. L.; Chow, Y.-H. Immunoprotectivity of HLA-A2 CTL Peptides Derived from Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein in HLA-A2 Transgenic Mouse. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e25500, doi:10.1371/journal.pone.0025500.
120. Chiu, C.; Ellebedy, A. H.; Wrammert, J.; Ahmed, R. B cell responses to influenza infection and vaccination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2015**, *386*, 381–398, doi:10.1007/82\_2014\_425.
121. Chávez-Bueno, S.; Mejías, A.; Merryman, R. A.; Ahmad, N.; Jafri, H. S.; Ramilo, O. Intravenous palivizumab and ribavirin combination for respiratory syncytial virus disease in high-risk pediatric patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2007**, *26*, 1089–1093, doi:10.1097/INF.0b013e3181343b7e.
122. Helmink, B. J.; Ragsdale, C. E.; Peterson, E. J.; Merkel, K. G. Comparison of Intravenous Palivizumab and Standard of Care for Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection in Mechanically Ventilated Pediatric Patients. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther. JPPT* **2016**, *21*, 146–154, doi:10.5863/1551-6776-21.2.146.
123. Lacaze-Masmonteil, T.; Rozé, J.-C.; Fauroux, B.; French Pediatricians' Group of Sunagis Patients' Name-Based Programs Incidence of respiratory syncytial virus-related hospitalizations in high-risk children: follow-up of a national cohort of infants treated with Palivizumab as RSV prophylaxis. *Pediatr. Pulmonol.* **2002**, *34*, 181–188, doi:10.1002/ppul.10175.
124. Malley, R.; DeVincenzo, J.; Ramilo, O.; Dennehy, P. H.; Meissner, H. C.; Gruber, W. C.; Sanchez, P. J.; Jafri, H.; Balsley, J.; Carlin, D.; Buckingham, S.; Vernacchio, L.; Ambrosino, D. M. Reduction of respiratory syncytial virus (RSV) in tracheal aspirates in intubated infants by use of humanized monoclonal antibody to RSV F protein. *J. Infect. Dis.* **1998**, *178*, 1555–1561.
125. Sáez-Llorens, X.; Moreno, M. T.; Ramilo, O.; Sánchez, P. J.; Top, F. H.; Connor, E. M.; MEDI-493 Study Group Safety and pharmacokinetics of palivizumab therapy in children hospitalized with respiratory syncytial virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2004**, *23*, 707–712.
126. Chu, H. Y.; Steinhoff, M. C.; Magaret, A.; Zaman, K.; Roy, E.; Langdon, G.; Formica, M. A.; Walsh, E. E.; Englund, J. A. Respiratory syncytial virus transplacental antibody transfer and kinetics in mother-infant pairs in Bangladesh. *J. Infect. Dis.* **2014**, *210*, 1582–1589, doi:10.1093/infdis/jiu316.
127. McIntosh, K.; McQuillin, J.; Gardner, P. S. Cell-free and cell-bound antibody in nasal secretions from infants with respiratory syncytial virus infection. *Infect. Immun.* **1979**, *23*, 276–281.
128. Sande, C. J.; Cane, P. A.; Nokes, D. J. The association between age and the development of respiratory syncytial virus neutralising antibody responses following natural infection in infants. *Vaccine* **2014**, *32*, 4726–4729, doi:10.1016/j.vaccine.2014.05.038.

129. Shinoff, J. J.; O'Brien, K. L.; Thumar, B.; Shaw, J. B.; Reid, R.; Hua, W.; Santosham, M.; Karron, R. A. Young infants can develop protective levels of neutralizing antibody after infection with respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* **2008**, *198*, 1007–1015, doi:10.1086/591460.
130. McNamara, P. S.; Fonseca, A. M.; Howarth, D.; Correia, J. B.; Slupsky, J. R.; Trinick, R. E.; Al Turaiki, W.; Smyth, R. L.; Flanagan, B. F. Respiratory syncytial virus infection of airway epithelial cells, in vivo and in vitro, supports pulmonary antibody responses by inducing expression of the B cell differentiation factor BAFF. *Thorax* **2013**, *68*, 76–81, doi:10.1136/thoraxjnl-2012-202288.
131. Jans, J.; Pettengill, M.; Kim, D.; van der Made, C.; de Groot, R.; Henriët, S.; de Jonge, M. I.; Ferwerda, G.; Levy, O. Human newborn B cells mount an interferon- $\alpha/\beta$  receptor-dependent humoral response to respiratory syncytial virus. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *139*, 1997–2000.e4, doi:10.1016/j.jaci.2016.10.032.
132. Taylor, G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine* **2017**, *35*, 469–480, doi:10.1016/j.vaccine.2016.11.054.
133. Anh, D. B. T.; Faisca, P.; Desmecht, D. J.-M. Differential resistance/susceptibility patterns to pneumovirus infection among inbred mouse strains. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2006**, *291*, L426–435, doi:10.1152/ajplung.00483.2005.
134. Bonville, C. A.; Bennett, N. J.; Percopo, C. M.; Branigan, P. J.; Del Vecchio, A. M.; Rosenberg, H. F.; Domachowske, J. B. Diminished inflammatory responses to natural pneumovirus infection among older mice. *Virology* **2007**, *368*, 182–190, doi:10.1016/j.virol.2007.06.020.
135. Bonville, C. A.; Ptaschinski, C.; Percopo, C. M.; Rosenberg, H. F.; Domachowske, J. B. Inflammatory responses to acute pneumovirus infection in neonatal mice. *Viol. J.* **2010**, *7*, 320, doi:10.1186/1743-422X-7-320.
136. Cook, P. M.; Eglin, R. P.; Easton, A. J. Pathogenesis of pneumovirus infections in mice: detection of pneumonia virus of mice and human respiratory syncytial virus mRNA in lungs of infected mice by in situ hybridization. *J. Gen. Virol.* **1998**, *79* ( Pt 10), 2411–2417, doi:10.1099/0022-1317-79-10-2411.
137. Watkiss, E. R. T.; Shrivastava, P.; Arsic, N.; Gomis, S.; van Drunen Littel-van den Hurk, S. Innate and Adaptive Immune Response to Pneumonia Virus of Mice in a Resistant and a Susceptible Mouse Strain. *Viruses* **2013**, *5*, 295–320, doi:10.3390/v5010295.
138. Domachowske, J. B.; Bonville, C. A.; Dyer, K. D.; Easton, A. J.; Rosenberg, H. F. Pulmonary eosinophilia and production of MIP-1 $\alpha$  are prominent responses to infection with pneumonia virus of mice. *Cell. Immunol.* **2000**, *200*, 98–104, doi:10.1006/cimm.2000.1620.
139. Bonville, C. A.; Bennett, N. J.; Koehnlein, M.; Haines, D. M.; Ellis, J. A.; DelVecchio, A. M.; Rosenberg, H. F.; Domachowske, J. B. Respiratory dysfunction and proinflammatory chemokines in the pneumonia virus of mice (PVM) model of viral bronchiolitis. *Virology* **2006**, *349*, 87–95, doi:10.1016/j.virol.2006.02.017.
140. Garofalo, R. P.; Patti, J.; Hintz, K. A.; Hill, V.; Ogra, P. L.; Welliver, R. C. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 393–399, doi:10.1086/322788.
141. Welliver, R. C.; Garofalo, R. P.; Ogra, P. L. Beta-chemokines, but neither T helper type 1 nor T helper type 2 cytokines, correlate with severity of illness during respiratory syncytial virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2002**, *21*, 457–461.
142. Connors, M.; Giese, N. A.; Kulkarni, A. B.; Firestone, C. Y.; Morse, H. C.; Murphy, B. R. Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *J. Virol.* **1994**, *68*, 5321–5325.
143. Waris, M. E.; Tsou, C.; Erdman, D. D.; Zaki, S. R.; Anderson, L. J. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J. Virol.* **1996**, *70*, 2852–2860.

144. Delgado, M. F.; Coviello, S.; Monsalvo, A. C.; Melendi, G. A.; Hernandez, J. Z.; Batalle, J. P.; Diaz, L.; Trento, A.; Chang, H.-Y.; Mitzner, W.; Ravetch, J.; Melero, J. A.; Irusta, P. M.; Polack, F. P. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 34–41, doi:10.1038/nm.1894.
145. Cormier, S. A.; You, D.; Honnegowda, S. The use of a neonatal mouse model to study respiratory syncytial virus infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2010**, *8*, 1371–1380, doi:10.1586/eri.10.125.
146. Culley, F. J.; Pollott, J.; Openshaw, P. J. M. Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 1381–1386.
147. Mestas, J.; Hughes, C. C. W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 2731–2738, doi:10.4049/jimmunol.172.5.2731.
148. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **2007**, *449*, 819–826, doi:10.1038/nature06246.
149. Johansson, C. Respiratory syncytial virus infection: an innate perspective. *F1000Research* **2016**, *5*, doi:10.12688/f1000research.9637.1.
150. Lambert, L.; Sagfors, A. M.; Openshaw, P. J. M.; Culley, F. J. Immunity to RSV in Early-Life. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, doi:10.3389/fimmu.2014.00466.
151. Kim, T. H.; Lee, H. K. Innate immune recognition of respiratory syncytial virus infection. *BMB Rep.* **2014**, *47*, 184–191.
152. Vareille, M.; Kieninger, E.; Edwards, M. R.; Regamey, N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 210–229, doi:10.1128/CMR.00014-10.
153. Zeng, R.; Cui, Y.; Hai, Y.; Liu, Y. Pattern recognition receptors for respiratory syncytial virus infection and design of vaccines. *Virus Res.* **2012**, *167*, 138–145, doi:10.1016/j.virusres.2012.06.003.
154. Kurt-Jones, E. A.; Popova, L.; Kwinn, L.; Haynes, L. M.; Jones, L. P.; Tripp, R. A.; Walsh, E. E.; Freeman, M. W.; Golenbock, D. T.; Anderson, L. J.; Finberg, R. W. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* **2000**, *1*, 398–401, doi:10.1038/80833.
155. Shirey, K. A.; Pletneva, L. M.; Puche, A. C.; Keegan, A. D.; Prince, G. A.; Blanco, J. C. G.; Vogel, S. N. Control of RSV-induced lung injury by alternatively activated macrophages is IL-4R alpha-, TLR4-, and IFN-beta-dependent. *Mucosal Immunol.* **2010**, *3*, 291–300, doi:10.1038/mi.2010.6.
156. Haynes, L. M.; Moore, D. D.; Kurt-Jones, E. A.; Finberg, R. W.; Anderson, L. J.; Tripp, R. A. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **2001**, *75*, 10730–10737, doi:10.1128/JVI.75.22.10730-10737.2001.
157. Ehl, S.; Bischoff, R.; Ostler, T.; Vallbracht, S.; Schulte-Mönting, J.; Poltorak, A.; Freudenberg, M. The role of Toll-like receptor 4 versus interleukin-12 in immunity to respiratory syncytial virus. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 1146–1153, doi:10.1002/eji.200324449.
158. Murawski, M. R.; Bowen, G. N.; Cerny, A. M.; Anderson, L. J.; Haynes, L. M.; Tripp, R. A.; Kurt-Jones, E. A.; Finberg, R. W. Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2. *J. Virol.* **2009**, *83*, 1492–1500, doi:10.1128/JVI.00671-08.
159. Ishii, T.; Hosoki, K.; Niikura, Y.; Nagase, T.; Yamashita, N. The Activation of Pulmonary Type2 Innate Lymphoid Cells Through Toll-Like Receptors. In *C35. ASTHMA AND ALLERGY CELLULAR INVESTIGATIONS*; American Thoracic Society International Conference Abstracts; American Thoracic Society, 2017; pp. A5284–A5284.
160. Rudd, B. D.; Burstein, E.; Duckett, C. S.; Li, X.; Lukacs, N. W. Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *J. Virol.* **2005**, *79*, 3350–3357, doi:10.1128/JVI.79.6.3350-3357.2005.
161. Guillot, L.; Goffic, R. L.; Bloch, S.; Escriou, N.; Akira, S.; Chignard, M.; Si-Tahar, M. Involvement of Toll-like Receptor 3 in the Immune Response of Lung Epithelial Cells to Double-stranded

- RNA and Influenza A Virus. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5571–5580, doi:10.1074/jbc.M410592200.
162. Qi, F.; Wang, D.; Liu, J.; Zeng, S.; Xu, L.; Hu, H.; Liu, B. Respiratory macrophages and dendritic cells mediate respiratory syncytial virus-induced IL-33 production in TLR3- or TLR7-dependent manner. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *29*, 408–415, doi:10.1016/j.intimp.2015.10.022.
  163. Lukacs, N. W.; Smit, J. J.; Mukherjee, S.; Morris, S. B.; Nunez, G.; Lindell, D. M. Respiratory virus-induced TLR7 activation controls IL-17-associated increased mucus via IL-23 regulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2010**, *185*, 2231–2239, doi:10.4049/jimmunol.1000733.
  164. Phipps, S.; Lam, C. E.; Mahalingam, S.; Newhouse, M.; Ramirez, R.; Rosenberg, H. F.; Foster, P. S.; Matthaei, K. I. Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. *Blood* **2007**, *110*, 1578–1586, doi:10.1182/blood-2007-01-071340.
  165. Hornung, V.; Ellegast, J.; Kim, S.; Brzózka, K.; Jung, A.; Kato, H.; Poeck, H.; Akira, S.; Conzelmann, K.-K.; Schlee, M.; Endres, S.; Hartmann, G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **2006**, *314*, 994–997, doi:10.1126/science.1132505.
  166. Takahashi, K.; Yoneyama, M.; Nishihori, T.; Hirai, R.; Kumeta, H.; Narita, R.; Gale, M.; Inagaki, F.; Fujita, T. Nonsel self RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol. Cell* **2008**, *29*, 428–440, doi:10.1016/j.molcel.2007.11.028.
  167. Demoor, T.; Petersen, B. C.; Morris, S.; Mukherjee, S.; Ptaschinski, C.; De Almeida Nagata, D. E.; Kawai, T.; Ito, T.; Akira, S.; Kunkel, S. L.; Schaller, M. A.; Lukacs, N. W. IPS-1 signaling has a nonredundant role in mediating antiviral responses and the clearance of respiratory syncytial virus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2012**, *189*, 5942–5953, doi:10.4049/jimmunol.1201763.
  168. Goritzka, M.; Makris, S.; Kausar, F.; Durant, L. R.; Pereira, C.; Kumagai, Y.; Culley, F. J.; Mack, M.; Akira, S.; Johansson, C. Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *J. Exp. Med.* **2015**, *212*, 699–714, doi:10.1084/jem.20140825.
  169. Loo, Y.-M.; Fornek, J.; Crochet, N.; Bajwa, G.; Perwitasari, O.; Martinez-Sobrido, L.; Akira, S.; Gill, M. A.; García-Sastre, A.; Katze, M. G.; Gale, M. Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity. *J. Virol.* **2008**, *82*, 335–345, doi:10.1128/JVI.01080-07.
  170. Sabbah, A.; Chang, T. H.; Harnack, R.; Frohlich, V.; Tominaga, K.; Dube, P. H.; Xiang, Y.; Bose, S. Activation of innate immune antiviral response by NOD2. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 1073–1080, doi:10.1038/ni.1782.
  171. Bhoj, V. G.; Sun, Q.; Bhoj, E. J.; Somers, C.; Chen, X.; Torres, J.-P.; Mejias, A.; Gomez, A. M.; Jafri, H.; Ramilo, O.; Chen, Z. J. MAVS and MyD88 are essential for innate immunity but not cytotoxic T lymphocyte response against respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 14046–14051, doi:10.1073/pnas.0804717105.
  172. Isaacs, A.; Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1957**, *147*, 258–267.
  173. Wijesundara, D. K.; Xi, Y.; Ranasinghe, C. Unraveling the Convolved Biological Roles of Type I Interferons in Infection and Immunity: A Way Forward for Therapeutics and Vaccine Design. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, doi:10.3389/fimmu.2014.00412.
  174. Spann, K. M.; Tran, K.-C.; Chi, B.; Rabin, R. L.; Collins, P. L. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J. Virol.* **2004**, *78*, 4363–4369.
  175. Yang, P.; Zheng, J.; Wang, S.; Liu, P.; Xie, M.; Zhao, D. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2 are crucial pathogenic factors that modulate interferon signaling and Treg cell distribution in mice. *Virology* **2015**, *485*, 223–232, doi:10.1016/j.virol.2015.07.016.
  176. Fensterl, V.; Chattopadhyay, S.; Sen, G. C. No Love Lost Between Viruses and Interferons. *Annu. Rev. Virol.* **2015**, *2*, 549–572, doi:10.1146/annurev-virology-100114-055249.
  177. de Weerd, N. A.; Nguyen, T. The interferons and their receptors--distribution and regulation. *Immunol. Cell Biol.* **2012**, *90*, 483–491, doi:10.1038/icb.2012.9.

178. Mordstein, M.; Neugebauer, E.; Ditt, V.; Jessen, B.; Rieger, T.; Falcone, V.; Sorgeloos, F.; Ehl, S.; Mayer, D.; Kochs, G.; Schwemmle, M.; Günther, S.; Drosten, C.; Michiels, T.; Staeheli, P. Lambda Interferon Renders Epithelial Cells of the Respiratory and Gastrointestinal Tracts Resistant to Viral Infections. *J. Virol.* **2010**, *84*, 5670–5677, doi:10.1128/JVI.00272-10.
179. Sheahan, T.; Imanaka, N.; Marukian, S.; Dorner, M.; Liu, P.; Ploss, A.; Rice, C. M. Interferon lambda alleles predict innate antiviral immune responses and hepatitis C virus permissiveness. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 190–202, doi:10.1016/j.chom.2014.01.007.
180. Sommereyns, C.; Paul, S.; Staeheli, P.; Michiels, T. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000017, doi:10.1371/journal.ppat.1000017.
181. Cormier, S. A.; Shrestha, B.; Saravia, J.; Lee, G. I.; Shen, L.; DeVincenzo, J. P.; Kim, Y.-I.; You, D. Limited Type I Interferons and Plasmacytoid Dendritic Cells during Neonatal Respiratory Syncytial Virus Infection Permit Immunopathogenesis upon Reinfection. *J. Virol.* **2014**, *88*, 9350–9360, doi:10.1128/JVI.00818-14.
182. Okabayashi, T.; Kojima, T.; Masaki, T.; Yokota, S.; Imaizumi, T.; Tsutsumi, H.; Himi, T.; Fujii, N.; Sawada, N. Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. *Virus Res.* **2011**, *160*, 360–366, doi:10.1016/j.virusres.2011.07.011.
183. Ivashkiv, L. B.; Donlin, L. T. Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 36–49, doi:10.1038/nri3581.
184. Dhar, J.; Cuevas, R. A.; Goswami, R.; Zhu, J.; Sarkar, S. N.; Barik, S. 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase-Like Protein Inhibits Respiratory Syncytial Virus Replication and Is Targeted by the Viral Nonstructural Protein 1. *J. Virol.* **2015**, *89*, 10115–10119, doi:10.1128/JVI.01076-15.
185. González-Sanz, R.; Mata, M.; Bermejo-Martín, J.; Álvarez, A.; Cortijo, J.; Melero, J. A.; Martínez, I. ISG15 Is Upregulated in Respiratory Syncytial Virus Infection and Reduces Virus Growth through Protein ISGylation. *J. Virol.* **2016**, *90*, 3428–3438, doi:10.1128/JVI.02695-15.
186. Groskreutz, D. J.; Monick, M. M.; Powers, L. S.; Yarovinsky, T. O.; Look, D. C.; Hunninghake, G. W. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2006**, *176*, 1733–1740.
187. Lindquist, M. E.; Mainou, B. A.; Dermody, T. S.; Crowe, J. E. Activation of protein kinase R is required for induction of stress granules by respiratory syncytial virus but dispensable for viral replication. *Virology* **2011**, *413*, 103–110, doi:10.1016/j.virol.2011.02.009.
188. Ravi, L. I.; Li, L.; Sutejo, R.; Chen, H.; Wong, P. S.; Tan, B. H.; Sugrue, R. J. A systems-based approach to analyse the host response in murine lung macrophages challenged with respiratory syncytial virus. *BMC Genomics* **2013**, *14*, 190, doi:10.1186/1471-2164-14-190.
189. Remot, A.; Descamps, D.; Jouneau, L.; Laubretton, D.; Dubuquoy, C.; Bouet, S.; Lecardonnel, J.; Rebours, E.; Petit-Camurdan, A.; Riffault, S. Flt3 ligand improves the innate response to respiratory syncytial virus and limits lung disease upon RSV reexposure in neonate mice. *Eur. J. Immunol.* **2016**, *46*, 874–884, doi:10.1002/eji.201545929.
190. Schoggins, J. W.; MacDuff, D. A.; Imanaka, N.; Gainey, M. D.; Shrestha, B.; Eitson, J. L.; Mar, K. B.; Richardson, R. B.; Ratushny, A. V.; Litvak, V.; Dabelic, R.; Manicassamy, B.; Aitchison, J. D.; Aderem, A.; Elliott, R. M.; García-Sastre, A.; Racaniello, V.; Snijder, E. J.; Yokoyama, W. M.; Diamond, M. S.; Virgin, H. W.; Rice, C. M. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* **2014**, *505*, 691–695, doi:10.1038/nature12862.
191. Zhang, W.; Zhang, L.; Zan, Y.; Du, N.; Yang, Y.; Tien, P. Human respiratory syncytial virus infection is inhibited by IFN-induced transmembrane proteins. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 170–182, doi:10.1099/vir.0.066555-0.
192. Balachandran, S.; Roberts, P. C.; Brown, L. E.; Truong, H.; Pattnaik, A. K.; Archer, D. R.; Barber, G. N. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* **2000**, *13*, 129–141.

193. Malathi, K.; Paranjape, J. M.; Bulanova, E.; Shim, M.; Guenther-Johnson, J. M.; Faber, P. W.; Eling, T. E.; Williams, B. R. G.; Silverman, R. H. A transcriptional signaling pathway in the IFN system mediated by 2'-5'-oligoadenylate activation of RNase L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 14533–14538, doi:10.1073/pnas.0507551102.
194. Krug, R. M.; Shaw, M.; Broni, B.; Shapiro, G.; Haller, O. Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *J. Virol.* **1985**, *56*, 201–206.
195. Turan, K.; Mibayashi, M.; Sugiyama, K.; Saito, S.; Numajiri, A.; Nagata, K. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 643–652, doi:10.1093/nar/gkh192.
196. Petes, C.; Odoardi, N.; Gee, K. The Toll for Trafficking: Toll-Like Receptor 7 Delivery to the Endosome. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fimmu.2017.01075.
197. Ewald, S. E.; Lee, B. L.; Lau, L.; Wickliffe, K. E.; Shi, G.-P.; Chapman, H. A.; Barton, G. M. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* **2008**, *456*, 658–662, doi:10.1038/nature07405.
198. Ewald, S. E.; Engel, A.; Lee, J.; Wang, M.; Bogyo, M.; Barton, G. M. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 643–651, doi:10.1084/jem.20100682.
199. Garcia-Cattaneo, A.; Gobert, F.-X.; Müller, M.; Toscano, F.; Flores, M.; Lescure, A.; Del Nery, E.; Benaroch, P. Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 9053–9058, doi:10.1073/pnas.1115091109.
200. Maschalidi, S.; Hässler, S.; Blanc, F.; Sepulveda, F. E.; Tohme, M.; Chignard, M.; van Endert, P.; Si-Tahar, M.; Descamps, D.; Manoury, B. Asparagine endopeptidase controls anti-influenza virus immune responses through TLR7 activation. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002841, doi:10.1371/journal.ppat.1002841.
201. Park, B.; Brinkmann, M. M.; Spooner, E.; Lee, C. C.; Kim, Y.-M.; Ploegh, H. L. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1407–1414, doi:10.1038/ni.1669.
202. Horner, S. M.; Wilkins, C.; Badil, S.; Iskarpatyoti, J.; Gale, M. Proteomic analysis of mitochondrial-associated ER membranes (MAM) during RNA virus infection reveals dynamic changes in protein and organelle trafficking. *PloS One* **2015**, *10*, e0117963, doi:10.1371/journal.pone.0117963.
203. Liu, H. M.; Loo, Y.-M.; Horner, S. M.; Zornetzer, G. A.; Katze, M. G.; Gale, M. The mitochondrial targeting chaperone 14-3-3 $\epsilon$  regulates a RIG-I translocon that mediates membrane association and innate antiviral immunity. *Cell Host Microbe* **2012**, *11*, 528–537, doi:10.1016/j.chom.2012.04.006.
204. Gack, M. U.; Shin, Y. C.; Joo, C.-H.; Urano, T.; Liang, C.; Sun, L.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Chen, Z.; Inoue, S.; Jung, J. U. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* **2007**, *446*, 916–920, doi:10.1038/nature05732.
205. Ohman, T.; Rintahaka, J.; Kalkkinen, N.; Matikainen, S.; Nyman, T. A. Actin and RIG-I/MAVS signaling components translocate to mitochondria upon influenza A virus infection of human primary macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2009**, *182*, 5682–5692, doi:10.4049/jimmunol.0803093.
206. Babbior, J.; Descamps, D.; Adiko, A. C.; Tohmé, M.; Maschalidi, S.; Evnouchidou, I.; Vasconcellos, L. R.; De Luca, M.; Mauvais, F.-X.; Garfa-Traore, M.; Brinkmann, M. M.; Chignard, M.; Manoury, B.; Saveanu, L. IRAP(+) endosomes restrict TLR9 activation and signaling. *Nat. Immunol.* **2017**, doi:10.1038/ni.3711.
207. Keller, S. R.; Scott, H. M.; Mastick, C. C.; Aebersold, R.; Lienhard, G. E. Cloning and Characterization of a Novel Insulin-regulated Membrane Aminopeptidase from Glut4 Vesicles. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23612–23618, doi:10.1074/jbc.270.40.23612.
208. Keller, S. R.; Davis, A. C.; Clairmont, K. B. Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain

- normal glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 17677–17686, doi:10.1074/jbc.M202037200.
209. Mizutani, S. Physiological roles of placental proteases in fetoplacental homeostasis. *Nagoya J. Med. Sci.* **1998**, *61*, 85–95.
  210. Albiston, A. L.; Peck, G. R.; Yeatman, H. R.; Fernando, R.; Ye, S.; Chai, S. Y. Therapeutic targeting of insulin-regulated aminopeptidase: heads and tails? *Pharmacol. Ther.* **2007**, *116*, 417–427, doi:10.1016/j.pharmthera.2007.07.006.
  211. Bryant, N. J.; Govers, R.; James, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 267–277, doi:10.1038/nrm782.
  212. Hirata, Y.; Hosaka, T.; Iwata, T.; Le, C. T. K.; Jambaldorj, B.; Teshigawara, K.; Harada, N.; Sakaue, H.; Sakai, T.; Yoshimoto, K.; Nakaya, Y. Vimentin binds IRAP and is involved in GLUT4 vesicle trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *405*, 96–101, doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.134.
  213. Tojo, H.; Kaieda, I.; Hattori, H.; Katayama, N.; Yoshimura, K.; Kakimoto, S.; Fujisawa, Y.; Presman, E.; Brooks, C. C.; Pilch, P. F. The Formin family protein, formin homolog overexpressed in spleen, interacts with the insulin-responsive aminopeptidase and profilin IIa. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **2003**, *17*, 1216–1229, doi:10.1210/me.2003-0056.
  214. Liao, H.; Keller, S. R.; Castle, J. D. Insulin-regulated aminopeptidase marks an antigen-stimulated recycling compartment in mast cells. *Traffic Cph. Den.* **2006**, *7*, 155–167, doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00373.x.
  215. Nikolaou, A.; Stijlemans, B.; Laoui, D.; Schoupe, E.; Tran, H. T.; Tourwé, D.; Chai, S. Y.; Vanderheyden, P. M.; Van Ginderachter, J. A. Presence and regulation of insulin-regulated aminopeptidase in mouse macrophages. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. JRAAS* **2014**, doi:10.1177/1470320313507621.
  216. Saveanu, L.; Carroll, O.; Weimershaus, M.; Guermonprez, P.; Firat, E.; Lindo, V.; Greer, F.; Davoust, J.; Kratzer, R.; Keller, S. R.; Niedermann, G.; van Endert, P. IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* **2009**, *325*, 213–217, doi:10.1126/science.1172845.
  217. Weimershaus, M.; Maschalidi, S.; Sepulveda, F.; Manoury, B.; van Endert, P.; Saveanu, L. Conventional dendritic cells require IRAP-Rab14 endosomes for efficient cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2012**, *188*, 1840–1846, doi:10.4049/jimmunol.1101504.
  218. Cheng, H.; Li, Y.; Zuo, X.-B.; Tang, H.-Y.; Tang, X.-F.; Gao, J.-P.; Sheng, Y.-J.; Yin, X.-Y.; Zhou, F.-S.; Zhang, C.; Chen, G.; Zhu, J.; Pan, Q.; Liang, B.; Zheng, X.-D.; Li, P.; Ding, Y.-T.; Cheng, F.; Luo, J.; Chang, R.-X.; Pan, G.-B.; Fan, X.; Wang, Z.-X.; Zhang, A.-P.; Liu, J.-J.; Yang, S.; Sun, L.-D.; Zhang, X.-J. Identification of a missense variant in LNPEP that confers psoriasis risk. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134*, 359–365, doi:10.1038/jid.2013.317.
  219. Balak, D. M. W.; van Doorn, M. B. A.; Arbeit, R. D.; Rijneveld, R.; Klaassen, E.; Sullivan, T.; Brevard, J.; Thio, H. B.; Prens, E. P.; Burggraaf, J.; Rissmann, R. IMO-8400, a toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonist, demonstrates clinical activity in a phase 2a, randomized, placebo-controlled trial in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **2017**, *174*, 63–72, doi:10.1016/j.clim.2016.09.015.
  220. Zhu, H.; Lou, F.; Yin, Q.; Gao, Y.; Sun, Y.; Bai, J.; Xu, Z.; Liu, Z.; Cai, W.; Ke, F.; Zhang, L.; Zhou, H.; Wang, H.; Wang, G.; Chen, X.; Zhang, H.; Wang, Z.; Ginhoux, F.; Lu, C.; Su, B.; Wang, H. RIG-I antiviral signaling drives interleukin-23 production and psoriasis-like skin disease. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 589–604, doi:10.15252/emmm.201607027.
  221. Pang, I. K.; Pillai, P. S.; Iwasaki, A. Efficient influenza A virus replication in the respiratory tract requires signals from TLR7 and RIG-I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 13910–13915, doi:10.1073/pnas.1303275110.
  222. Wu, W.; Zhang, W.; Duggan, E. S.; Booth, J. L.; Zou, M.-H.; Metcalf, J. P. RIG-I and TLR3 are both required for maximum interferon induction by influenza virus in human lung alveolar epithelial cells. *Virology* **2015**, *482*, 181–188, doi:10.1016/j.virol.2015.03.048.

223. Benmohamed, F.; Medina, M.; Wu, Y.-Z.; Maschalidi, S.; Jouvion, G.; Guillemot, L.; Chignard, M.; Manoury, B.; Touqui, L. Toll-like receptor 9 deficiency protects mice against pseudomonas aeruginosa lung infection. *PLoS One* **2014**, *9*, e90466, doi:10.1371/journal.pone.0090466.
224. Schittny, J. C. Development of the lung. *Cell Tissue Res.* **2017**, *367*, 427–444, doi:10.1007/s00441-016-2545-0.
225. de Kleer, I. M.; Kool, M.; de Bruijn, M. J. W.; Willart, M.; van Moorleghem, J.; Schuijs, M. J.; Plantinga, M.; Beyaert, R.; Hams, E.; Fallon, P. G.; Hammad, H.; Hendriks, R. W.; Lambrecht, B. N. Perinatal Activation of the Interleukin-33 Pathway Promotes Type 2 Immunity in the Developing Lung. *Immunity* **2016**, *45*, 1285–1298, doi:10.1016/j.immuni.2016.10.031.
226. Saluzzo, S.; Gorki, A.-D.; Rana, B. M. J.; Martins, R.; Scanlon, S.; Starkl, P.; Lakovits, K.; Hladik, A.; Korosec, A.; Sharif, O.; Warszawska, J. M.; Jolin, H.; Mesteri, I.; McKenzie, A. N. J.; Knapp, S. First-Breath-Induced Type 2 Pathways Shape the Lung Immune Environment. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 1893–1905, doi:10.1016/j.celrep.2017.01.071.
227. Williams, M.; De Kleer, I.; Henri, S.; Post, S.; Vanhoutte, L.; De Prijck, S.; Deswarte, K.; Malissen, B.; Hammad, H.; Lambrecht, B. N. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 1977–1992, doi:10.1084/jem.20131199.
228. Drajac, C.; Laubretton, D.; Riffault, S.; Descamps, D. Pulmonary Susceptibility of Neonates to Respiratory Syncytial Virus Infection: A Problem of Innate Immunity? *J. Immunol. Res.* **2017**, *2017*, 8734504, doi:10.1155/2017/8734504.
229. Schneider, C.; Nobs, S. P.; Kurrer, M.; Rehrauer, H.; Thiele, C.; Kopf, M. Induction of the nuclear receptor PPAR- $\gamma$  by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 1026–1037, doi:10.1038/ni.3005.
230. Kolli, D.; Gupta, M. R.; Sbrana, E.; Velayutham, T. S.; Hong, C.; Casola, A.; Garofalo, R. P. Alveolar Macrophages Contribute to the Pathogenesis of hMPV Infection While Protecting Against RSV Infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2014**, doi:10.1165/rcmb.2013-0414OC.
231. Pribul, P. K.; Harker, J.; Wang, B.; Wang, H.; Tregoning, J. S.; Schwarze, J.; Openshaw, P. J. M. Alveolar Macrophages Are a Major Determinant of Early Responses to Viral Lung Infection but Do Not Influence Subsequent Disease Development. *J. Virol.* **2008**, *82*, 4441–4448, doi:10.1128/JVI.02541-07.
232. Hussell, T.; Bell, T. J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 81–93, doi:10.1038/nri3600.
233. Mosser, D. M.; Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 958–969, doi:10.1038/nri2448.
234. Empey, K. M.; Orend, J. G.; Peebles, R. S.; Egaña, L.; Norris, K. A.; Oury, T. D.; Kolls, J. K. Stimulation of Immature Lung Macrophages with Intranasal Interferon Gamma in a Novel Neonatal Mouse Model of Respiratory Syncytial Virus Infection. *PLoS ONE* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0040499.
235. Eichinger, K. M.; Egaña, L.; Orend, J. G.; Resetar, E.; Anderson, K. B.; Patel, R.; Empey, K. M. Alveolar macrophages support interferon gamma-mediated viral clearance in RSV-infected neonatal mice. *Respir. Res.* **2015**, *16*, 122, doi:10.1186/s12931-015-0282-7.
236. Spits, H.; Artis, D.; Colonna, M.; Diefenbach, A.; Di Santo, J. P.; Eberl, G.; Koyasu, S.; Locksley, R. M.; McKenzie, A. N. J.; Mebius, R. E.; Powrie, F.; Vivier, E. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 145–149, doi:10.1038/nri3365.
237. Miller, A. M. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J. Inflamm. Lond. Engl.* **2011**, *8*, 22, doi:10.1186/1476-9255-8-22.
238. Lu, J.; Kang, J.; Zhang, C.; Zhang, X. The role of IL-33/ST2L signals in the immune cells. *Immunol. Lett.* **2015**, *164*, 11–17, doi:10.1016/j.imlet.2015.01.008.
239. Gasteiger, G.; Fan, X.; Dikiy, S.; Lee, S. Y.; Rudensky, A. Y. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science* **2015**, *350*, 981–985, doi:10.1126/science.aac9593.

240. Kim, C. H.; Hashimoto-Hill, S.; Kim, M. Migration and Tissue Tropism of Innate Lymphoid Cells. *Trends Immunol.* **2016**, *37*, 68–79, doi:10.1016/j.it.2015.11.003.
241. Grégoire, C.; Chasson, L.; Luci, C.; Tomasello, E.; Geissmann, F.; Vivier, E.; Walzer, T. The trafficking of natural killer cells. *Immunol. Rev.* **2007**, *220*, 169–182, doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00563.x.
242. Saravia, J.; You, D.; Shrestha, B.; Jaligama, S.; Siefker, D.; Lee, G. I.; Harding, J. N.; Jones, T. L.; Rovnaghi, C.; Bagga, B.; DeVincenzo, J. P.; Cormier, S. A. Respiratory Syncytial Virus Disease Is Mediated by Age-Variable IL-33. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1005217, doi:10.1371/journal.ppat.1005217.
243. García-García, M. L.; Calvo, C.; Moreira, A.; Cañas, J. A.; Pozo, F.; Sastre, B.; Quevedo, S.; Casas, I.; Del Pozo, V. Thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and periostin in hospitalized infants with viral bronchiolitis. *Medicine (Baltimore)* **2017**, *96*, doi:10.1097/MD.0000000000006787.
244. Stier, M. T.; Bloodworth, M. H.; Toki, S.; Newcomb, D. C.; Goleniewska, K.; Boyd, K. L.; Qitalig, M.; Hotard, A. L.; Moore, M. L.; Hartert, T. V.; Zhou, B.; McKenzie, A. N.; Peebles, R. S. Respiratory syncytial virus infection activates IL-13–producing group 2 innate lymphoid cells through thymic stromal lymphopoietin. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *138*, 814–824.e11, doi:10.1016/j.jaci.2016.01.050.
245. Greter, M.; Helft, J.; Chow, A.; Hashimoto, D.; Mortha, A.; Agudo-Cantero, J.; Bogunovic, M.; Gautier, E. L.; Miller, J.; Leboeuf, M.; Lu, G.; Aloman, C.; Brown, B. D.; Pollard, J. W.; Xiong, H.; Randolph, G. J.; Chipuk, J. E.; Frenette, P. S.; Merad, M. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* **2012**, *36*, 1031–1046, doi:10.1016/j.immuni.2012.03.027.
246. Roux, X.; Remot, A.; Petit-Camurdan, A.; Nahori, M.-A.; Kiefer-Biasizzo, H.; Marchal, G.; Lagranderie, M.; Riffault, S. Neonatal lung immune responses show a shift of cytokines and transcription factors toward Th2 and a deficit in conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 2852–2861, doi:10.1002/eji.201041224.
247. Han, J.; Dakhama, A.; Jia, Y.; Wang, M.; Zeng, W.; Takeda, K.; Shiraishi, Y.; Okamoto, M.; Ziegler, S. F.; Gelfand, E. W. Responsiveness to respiratory syncytial virus in neonates is mediated through thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *130*, 1175–1186.e9, doi:10.1016/j.jaci.2012.08.033.
248. Croft, M.; So, T.; Duan, W.; Soroosh, P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol. Rev.* **2009**, *229*, 173–191, doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x.
249. Hoshino, A.; Tanaka, Y.; Akiba, H.; Asakura, Y.; Mita, Y.; Sakurai, T.; Takaoka, A.; Nakaike, S.; Ishii, N.; Sugamura, K.; Yagita, H.; Okumura, K. Critical role for OX40 ligand in the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *Eur. J. Immunol.* **2003**, *33*, 861–869, doi:10.1002/eji.200323455.
250. Salek-Ardakani, S.; Song, J.; Halteman, B. S.; Jember, A. G.-H.; Akiba, H.; Yagita, H.; Croft, M. OX40 (CD134) Controls Memory T Helper 2 Cells that Drive Lung Inflammation. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 315–324, doi:10.1084/jem.20021937.
251. Ruckwardt, T. J.; Malloy, A. M. W.; Morabito, K. M.; Graham, B. S. Quantitative and Qualitative Deficits in Neonatal Lung-Migratory Dendritic Cells Impact the Generation of the CD8+ T Cell Response. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, doi:10.1371/journal.ppat.1003934.
252. Goritzka, M.; Durant, L. R.; Pereira, C.; Salek-Ardakani, S.; Openshaw, P. J. M.; Johansson, C. Alpha/beta interferon receptor signaling amplifies early proinflammatory cytokine production in the lung during respiratory syncytial virus infection. *J. Virol.* **2014**, *88*, 6128–6136, doi:10.1128/JVI.00333-14.
253. Johnson, T. R.; Mertz, S. E.; Gitiban, N.; Hammond, S.; Legallo, R.; Durbin, R. K.; Durbin, J. E. Role for innate IFNs in determining respiratory syncytial virus immunopathology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2005**, *174*, 7234–7241.
254. Zhivaki, D.; Lemoine, S.; Lim, A.; Morva, A.; Vidalain, P.-O.; Schandene, L.; Casartelli, N.; Rameix-Welti, M.-A.; Hervé, P.-L.; Dériaud, E.; Beitz, B.; Ripaux-Lefevre, M.; Miatello, J.;

- Lemercier, B.; Lorin, V.; Descamps, D.; Fix, J.; Eléouët, J.-F.; Riffault, S.; Schwartz, O.; Porcheray, F.; Mascart, F.; Mouquet, H.; Zhang, X.; Tissières, P.; Lo-Man, R. Respiratory Syncytial Virus Infects Regulatory B Cells in Human Neonates via Chemokine Receptor CX3CR1 and Promotes Lung Disease Severity. *Immunity* **2017**, *46*, 301–314, doi:10.1016/j.immuni.2017.01.010.
255. Sattler, S.; Ling, G.-S.; Xu, D.; Husaarts, L.; Romaine, A.; Zhao, H.; Fossati-Jimack, L.; Malik, T.; Cook, H. T.; Botto, M.; Lau, Y.-L.; Smits, H. H.; Liew, F. Y.; Huang, F.-P. IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. *J. Autoimmun.* **2014**, *50*, 107–122, doi:10.1016/j.jaut.2014.01.032.
256. Proctor, L. M. The Human Microbiome Project in 2011 and beyond. *Cell Host Microbe* **2011**, *10*, 287–291, doi:10.1016/j.chom.2011.10.001.
257. Durack, J.; Lynch, S. V.; Nariya, S.; Bhakta, N. R.; Beigelman, A.; Castro, M.; Dyer, A.-M.; Israel, E.; Kraft, M.; Martin, R. J.; Mauger, D. T.; Rosenberg, S. R.; Sharp-King, T.; White, S. R.; Woodruff, P. G.; Avila, P. C.; Denlinger, L. C.; Holguin, F.; Lazarus, S. C.; Lugogo, N.; Moore, W. C.; Peters, S. P.; Que, L.; Smith, L. J.; Sorkness, C. A.; Wechsler, M. E.; Wenzel, S. E.; Boushey, H. A.; Huang, Y. J.; National Heart, Lung and Blood Institute’s “AsthmaNet” Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *140*, 63–75, doi:10.1016/j.jaci.2016.08.055.
258. Erb-Downward, J. R.; Thompson, D. L.; Han, M. K.; Freeman, C. M.; McCloskey, L.; Schmidt, L. A.; Young, V. B.; Toews, G. B.; Curtis, J. L.; Sundaram, B.; Martinez, F. J.; Huffnagle, G. B. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PloS One* **2011**, *6*, e16384, doi:10.1371/journal.pone.0016384.
259. Hilty, M.; Burke, C.; Pedro, H.; Cardenas, P.; Bush, A.; Bossley, C.; Davies, J.; Ervine, A.; Poulter, L.; Pachter, L.; Moffatt, M. F.; Cookson, W. O. C. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS One* **2010**, *5*, e8578, doi:10.1371/journal.pone.0008578.
260. Morris, A.; Beck, J. M.; Schloss, P. D.; Campbell, T. B.; Crothers, K.; Curtis, J. L.; Flores, S. C.; Fontenot, A. P.; Ghedin, E.; Huang, L.; Jablonski, K.; Kleerup, E.; Lynch, S. V.; Sodergren, E.; Twigg, H.; Young, V. B.; Bassis, C. M.; Venkataraman, A.; Schmidt, T. M.; Weinstock, G. M.; Lung HIV Microbiome Project Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *187*, 1067–1075, doi:10.1164/rccm.201210-1913OC.
261. Kostic, M.; Milger, K.; Krauss-Etschmann, S.; Engel, M.; Vestergaard, G.; Schloter, M.; Schöler, A. Development of a Stable Lung Microbiome in Healthy Neonatal Mice. *Microb. Ecol.* **2017**, doi:10.1007/s00248-017-1068-x.
262. Gollwitzer, E. S.; Saglani, S.; Trompette, A.; Yadava, K.; Sherburn, R.; McCoy, K. D.; Nicod, L. P.; Lloyd, C. M.; Marsland, B. J. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 642–647, doi:10.1038/nm.3568.
263. Lal, C. V.; Travers, C.; Aghai, Z. H.; Eipers, P.; Jilling, T.; Halloran, B.; Carlo, W. A.; Keeley, J.; Rezonzew, G.; Kumar, R.; Morrow, C.; Bhandari, V.; Ambalavanan, N. The Airway Microbiome at Birth. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31023, doi:10.1038/srep31023.
264. Lohmann, P.; Luna, R. A.; Hollister, E. B.; Devaraj, S.; Mistretta, T.-A.; Welty, S. E.; Versalovic, J. The airway microbiome of intubated premature infants: characteristics and changes that predict the development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr. Res.* **2014**, *76*, 294–301, doi:10.1038/pr.2014.85.
265. Teo, S. M.; Mok, D.; Pham, K.; Kusel, M.; Serralha, M.; Troy, N.; Holt, B. J.; Hales, B. J.; Walker, M. L.; Hollams, E.; Bochkov, Y. A.; Grindle, K.; Johnston, S. L.; Gern, J. E.; Sly, P. D.; Holt, P. G.; Holt, K. E.; Inouye, M. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 704–715, doi:10.1016/j.chom.2015.03.008.
266. Herbst, T.; Sichelstiel, A.; Schär, C.; Yadava, K.; Bürki, K.; Cahenzli, J.; McCoy, K.; Marsland, B. J.; Harris, N. L. Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial

- colonization. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *184*, 198–205, doi:10.1164/rccm.201010-1574OC.
267. Cheng, M.; Chen, Y.; Wang, L.; Chen, W.; Yang, L.; Shen, G.; Xu, T.; Shen, G.; Tian, Z.; Hu, S. Commensal microbiota maintains alveolar macrophages with a low level of CCL24 production to generate anti-metastatic tumor activity. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7471, doi:10.1038/s41598-017-08264-8.
268. Olszak, T.; An, D.; Zeissig, S.; Vera, M. P.; Richter, J.; Franke, A.; Glickman, J. N.; Siebert, R.; Baron, R. M.; Kasper, D. L.; Blumberg, R. S. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* **2012**, *336*, 489–493, doi:10.1126/science.1219328.
269. Remot, A.; Descamps, D.; Noordine, M.-L.; Boukadiri, A.; Mathieu, E.; Robert, V.; Riffault, S.; Lambrecht, B.; Langella, P.; Hammad, H.; Thomas, M. Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *ISME J.* **2017**, *11*, 1061–1074, doi:10.1038/ismej.2016.181.
270. Yun, Y.; Srinivas, G.; Kuenzel, S.; Linnenbrink, M.; Alnahas, S.; Bruce, K. D.; Steinhoff, U.; Baines, J. F.; Schaible, U. E. Environmentally Determined Differences in the Murine Lung Microbiota and Their Relation to Alveolar Architecture. *PLoS ONE* **2014**, *9*, doi:10.1371/journal.pone.0113466.
271. Tomas, J.; Wrzosek, L.; Bouznad, N.; Bouet, S.; Mayeur, C.; Noordine, M.-L.; Honvo-Houeto, E.; Langella, P.; Thomas, M.; Cherbuy, C. Primocolonization is associated with colonic epithelial maturation during conventionalization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2013**, *27*, 645–655, doi:10.1096/fj.12-216861.
272. Yu, Y.; Lu, L.; Sun, J.; Petrof, E. O.; Claud, E. C. Preterm infant gut microbiota affects intestinal epithelial development in a humanized microbiome gnotobiotic mouse model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2016**, *311*, G521–532, doi:10.1152/ajpgi.00022.2016.
273. Lynch, J. P.; Sikder, M. A. A.; Curren, B. F.; Werder, R. B.; Simpson, J.; Cuív, P. Ó.; Dennis, P. G.; Everard, M. L.; Phipps, S. The Influence of the Microbiome on Early-Life Severe Viral Lower Respiratory Infections and Asthma—Food for Thought? *Front. Immunol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fimmu.2017.00156.
274. Gollwitzer, E. S.; Marsland, B. J. Impact of Early-Life Exposures on Immune Maturation and Susceptibility to Disease. *Trends Immunol.* **2015**, *36*, 684–696, doi:10.1016/j.it.2015.09.009.
275. You, D.; Marr, N.; Saravia, J.; Shrestha, B.; Lee, G. I.; Turvey, S. E.; Brombacher, F.; Herbert, D. R.; Cormier, S. A. IL-4R $\alpha$  on CD4<sup>+</sup> T cells plays a pathogenic role in respiratory syncytial virus reinfection in mice infected initially as neonates. *J. Leukoc. Biol.* **2013**, *93*, 933–942, doi:10.1189/jlb.1012498.
276. Chipps, B. E.; Sullivan, W. F.; Portnoy, J. M. Alpha-2A-interferon for treatment of bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **1993**, *12*, 653–658.
277. Sung, R. Y.; Yin, J.; Oppenheimer, S. J.; Tam, J. S.; Lau, J. Treatment of respiratory syncytial virus infection with recombinant interferon alfa-2a. *Arch. Dis. Child.* **1993**, *69*, 440–442.
278. Higgins, P. G.; Barrow, G. I.; Tyrrell, D. A.; Isaacs, D.; Gauci, C. L. The efficacy of intranasal interferon alpha-2a in respiratory syncytial virus infection in volunteers. *Antiviral Res.* **1990**, *14*, 3–10.
279. Yamaguchi, Y.; Harker, J. A.; Wang, B.; Openshaw, P. J.; Tregoning, J. S.; Culley, F. J. Preexposure to CpG protects against the delayed effects of neonatal respiratory syncytial virus infection. *J. Virol.* **2012**, *86*, 10456–10461, doi:10.1128/JVI.01082-12.
280. Boukhvalova, M. S.; Sotomayor, T. B.; Point, R. C.; Pletneva, L. M.; Prince, G. A.; Blanco, J. C. G. Activation of interferon response through toll-like receptor 3 impacts viral pathogenesis and pulmonary toll-like receptor expression during respiratory syncytial virus and influenza infections in the cotton rat *Sigmodon hispidus* model. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **2010**, *30*, 229–242, doi:10.1089/jir.2009.0025.
281. Challa, S.; Sheri, A.; Padmanabhan, S.; Korba, B.; Chang, T.-H.; Shil, N.; Bose, S.; Lyer, R. Prophylactic and therapeutic anti-RSV activity of SB 9200 – a novel agent that activates RIG-I

- and NOD2. *Spring Bank Pharm. Presents Data Immunomodulatory Agent SB 9200 29th Int. Conf. Antivir. Res.* 2016.
282. Dakhama, A.; Park, J.-W.; Taube, C.; Joetham, A.; Balhorn, A.; Miyahara, N.; Takeda, K.; Gelfand, E. W. The Enhancement or Prevention of Airway Hyperresponsiveness during Reinfection with Respiratory Syncytial Virus Is Critically Dependent on the Age at First Infection and IL-13 Production. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 1876–1883, doi:10.4049/jimmunol.175.3.1876.
  283. Tekkanat, K. K.; Maassab, H. F.; Cho, D. S.; Lai, J. J.; John, A.; Berlin, A.; Kaplan, M. H.; Lukacs, N. W. IL-13-induced airway hyperreactivity during respiratory syncytial virus infection is STAT6 dependent. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2001**, *166*, 3542–3548.
  284. De Boever, E. H.; Ashman, C.; Cahn, A. P.; Locantore, N. W.; Overend, P.; Pouliquen, I. J.; Serone, A. P.; Wright, T. J.; Jenkins, M. M.; Panesar, I. S.; Thiagarajah, S. S.; Wenzel, S. E. Efficacy and safety of an anti-IL-13 mAb in patients with severe asthma: a randomized trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *133*, 989–996, doi:10.1016/j.jaci.2014.01.002.
  285. Gauvreau, G. M.; O’Byrne, P. M.; Boulet, L.-P.; Wang, Y.; Cockcroft, D.; Bigler, J.; FitzGerald, J. M.; Boedigheimer, M.; Davis, B. E.; Dias, C.; Gorski, K. S.; Smith, L.; Bautista, E.; Comeau, M. R.; Leigh, R.; Parnes, J. R. Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 2102–2110, doi:10.1056/NEJMoa1402895.
  286. Shrestha, B.; You, D.; Saravia, J.; Siefker, D. T.; Jaligama, S.; Lee, G. I.; Sallam, A. A.; Harding, J. N.; Cormier, S. A. IL-4R $\alpha$  on dendritic cells in neonates and Th2 immunopathology in respiratory syncytial virus infection. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *102*, 153–161, doi:10.1189/jlb.4A1216-536R.
  287. Ripple, M. J.; You, D.; Honnegowda, S.; Giaimo, J. D.; Sewell, A. B.; Becnel, D. M.; Cormier, S. A. Immunomodulation with IL-4 Receptor- $\alpha$  Antisense Oligonucleotide Prevents RSV-Mediated Pulmonary Disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2010**, *185*, 4804–4811, doi:10.4049/jimmunol.1000484.
  288. Srinivasa, B. T.; Restori, K. H.; Shan, J.; Cyr, L.; Xing, L.; Lee, S.; Ward, B. J.; Fixman, E. D. STAT6 inhibitory peptide given during RSV infection of neonatal mice reduces exacerbated airway responses upon adult reinfection. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, doi:10.1189/jlb.4A0215-062RR.
  289. Lee, Y.-M.; Miyahara, N.; Takeda, K.; Prpich, J.; Oh, A.; Balhorn, A.; Joetham, A.; Gelfand, E. W.; Dakhama, A. IFN-gamma production during initial infection determines the outcome of reinfection with respiratory syncytial virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *177*, 208–218, doi:10.1164/rccm.200612-1890OC.
  290. Eichinger, K. M.; Resetar, E.; Orend, J.; Anderson, K.; Empey, K. M. Age predicts cytokine kinetics and innate immune cell activation following intranasal delivery of IFN $\gamma$  and GM-CSF in a mouse model of RSV infection. *Cytokine* **2017**, *97*, 25–37, doi:10.1016/j.cyto.2017.05.019.
  291. Chiba, E.; Tomosada, Y.; Vizoso-Pinto, M. G.; Salva, S.; Takahashi, T.; Tsukida, K.; Kitazawa, H.; Alvarez, S.; Villena, J. Immunobiotic Lactobacillus rhamnosus improves resistance of infant mice against respiratory syncytial virus infection. *Int. Immunopharmacol.* **2013**, *17*, 373–382, doi:10.1016/j.intimp.2013.06.024.
  292. Villena, J.; Chiba, E.; Tomosada, Y.; Salva, S.; Marranzino, G.; Kitazawa, H.; Alvarez, S. Orally administered Lactobacillus rhamnosus modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C). *BMC Immunol.* **2012**, *13*, 53, doi:10.1186/1471-2172-13-53.
  293. Villena, J.; Salva, S.; Núñez, M.; Corzo, J.; Tolaba, R.; Faedda, J.; Font, G.; Alvarez, S. Probiotics for everyone! The novel immunobiotic Lactobacillus rhamnosus CRL1505 and the beginning of Social Probiotic Programs in Argentina. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* **2012**, *1*, 189–198.
  294. Tomosada, Y.; Chiba, E.; Zelaya, H.; Takahashi, T.; Tsukida, K.; Kitazawa, H.; Alvarez, S.; Villena, J. Nasally administered Lactobacillus rhamnosus strains differentially modulate respiratory antiviral immune responses and induce protection against respiratory syncytial virus infection. *BMC Immunol.* **2013**, *14*, 40, doi:10.1186/1471-2172-14-40.

295. de Steenhuijsen Piters, W. A. A.; Heinonen, S.; Hasrat, R.; Bunsow, E.; Smith, B.; Suarez-Arrabal, M.-C.; Chaussabel, D.; Cohen, D. M.; Sanders, E. A. M.; Ramilo, O.; Bogaert, D.; Mejias, A. Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, doi:10.1164/rccm.201602-0220OC.
296. Larance, M.; Ramm, G.; Stöckli, J.; van Dam, E. M.; Winata, S.; Wasinger, V.; Simpson, F.; Graham, M.; Junutula, J. R.; Guilhaus, M.; James, D. E. Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 37803–37813, doi:10.1074/jbc.M503897200.
297. Brock, S. C.; Goldenring, J. R.; Crowe, J. E. Apical recycling systems regulate directional budding of respiratory syncytial virus from polarized epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 15143–15148, doi:10.1073/pnas.2434327100.
298. Utley, T. J.; Ducharme, N. A.; Varthakavi, V.; Shepherd, B. E.; Santangelo, P. J.; Lindquist, M. E.; Goldenring, J. R.; Crowe, J. E. Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 10209–10214, doi:10.1073/pnas.0712144105.
299. Szatmári, Z.; Kis, V.; Lippai, M.; Hegedűs, K.; Faragó, T.; Lőrincz, P.; Tanaka, T.; Juhász, G.; Sass, M. Rab11 facilitates cross-talk between autophagy and endosomal pathway through regulation of Hook localization. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 522–531, doi:10.1091/mbc.E13-10-0574.
300. Mauvezin, C.; Neisch, A. L.; Ayala, C. I.; Kim, J.; Beltrame, A.; Braden, C. R.; Gardner, M. K.; Hays, T. S.; Neufeld, T. P. Coordination of autophagosome–lysosome fusion and transport by a Klp98A–Rab14 complex in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 971–982, doi:10.1242/jcs.175224.
301. Deretic, V.; Saitoh, T.; Akira, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 722–737, doi:10.1038/nri3532.
302. Lee, H. K.; Lund, J. M.; Ramanathan, B.; Mizushima, N.; Iwasaki, A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* **2007**, *315*, 1398–1401, doi:10.1126/science.1136880.
303. Morris, S.; Swanson, M. S.; Lieberman, A.; Reed, M.; Yue, Z.; Lindell, D. M.; Lukacs, N. W. Autophagy-mediated DC activation is essential for innate cytokine production and APC function with Respiratory Syncytial Virus responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2011**, *187*, 3953–3961, doi:10.4049/jimmunol.1100524.
304. Pokharel, S. M.; Shil, N. K.; Bose, S. Autophagy, TGF- $\beta$ , and SMAD-2/3 Signaling Regulates Interferon- $\beta$  Response in Respiratory Syncytial Virus Infected Macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 174, doi:10.3389/fcimb.2016.00174.
305. Kuma, A.; Hatano, M.; Matsui, M.; Yamamoto, A.; Nakaya, H.; Yoshimori, T.; Ohsumi, Y.; Tokuhiya, T.; Mizushima, N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **2004**, *432*, 1032–1036, doi:10.1038/nature03029.
306. Yue, Z.; Jin, S.; Yang, C.; Levine, A. J.; Heintz, N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 15077–15082, doi:10.1073/pnas.2436255100.
307. Saxton, R. A.; Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **2017**, *168*, 960–976, doi:10.1016/j.cell.2017.02.004.
308. Reed, M.; Morris, S. H.; Jang, S.; Mukherjee, S.; Yue, Z.; Lukacs, N. W. Autophagy-inducing protein beclin-1 in dendritic cells regulates CD4 T cell responses and disease severity during respiratory syncytial virus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2013**, *191*, 2526–2537, doi:10.4049/jimmunol.1300477.
309. Reed, M.; Morris, S. H.; Owczarczyk, A. B.; Lukacs, N. W. Deficiency of autophagy protein Map1-LC3b mediates IL-17-dependent lung pathology during respiratory viral infection via ER stress-associated IL-1. *Mucosal Immunol.* **2015**, *8*, 1118–1130, doi:10.1038/mi.2015.3.
310. Wu, Y.-T.; Tan, H.-L.; Shui, G.; Bauvy, C.; Huang, Q.; Wenk, M. R.; Ong, C.-N.; Codogno, P.; Shen, H.-M. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal

- patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 10850–10861, doi:10.1074/jbc.M109.080796.
311. Petiot, A.; Ogier-Denis, E.; Blommaert, E. F.; Meijer, A. J.; Codogno, P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 992–998.
  312. Aksoy, E.; Albarani, V.; Nguyen, M.; Laes, J.-F.; Ruelle, J.-L.; De Wit, D.; Willems, F.; Goldman, M.; Goriely, S. Interferon regulatory factor 3-dependent responses to lipopolysaccharide are selectively blunted in cord blood cells. *Blood* **2007**, *109*, 2887–2893, doi:10.1182/blood-2006-06-027862.
  313. Danis, B.; George, T. C.; Goriely, S.; Dutta, B.; Renneson, J.; Gatto, L.; Fitzgerald-Bocarsly, P.; Marchant, A.; Goldman, M.; Willems, F.; De Wit, D. Interferon regulatory factor 7-mediated responses are defective in cord blood plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 507–517, doi:10.1002/eji.200737760.
  314. Marr, N.; Wang, T.-I.; Kam, S. H. Y.; Hu, Y. S.; Sharma, A. A.; Lam, A.; Markowski, J.; Solimano, A.; Lavoie, P. M.; Turvey, S. E. Attenuation of respiratory syncytial virus-induced and RIG-I-dependent type I IFN responses in human neonates and very young children. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2014**, *192*, 948–957, doi:10.4049/jimmunol.1302007.
  315. Ling, Z.; Tran, K. C.; Teng, M. N. Human Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Protein NS2 Antagonizes the Activation of Beta Interferon Transcription by Interacting with RIG-I. *J. Virol.* **2009**, *83*, 3734–3742, doi:10.1128/JVI.02434-08.
  316. Ren, J.; Liu, T.; Pang, L.; Li, K.; Garofalo, R. P.; Casola, A.; Bao, X. A novel mechanism for the inhibition of interferon regulatory factor-3-dependent gene expression by human respiratory syncytial virus NS1 protein. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2153–2159, doi:10.1099/vir.0.032987-0.
  317. Spann, K. M.; Tran, K. C.; Collins, P. L. Effects of Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Human Respiratory Syncytial Virus on Interferon Regulatory Factor 3, NF- $\kappa$ B, and Proinflammatory Cytokines. *J. Virol.* **2005**, *79*, 5353–5362, doi:10.1128/JVI.79.9.5353-5362.2005.
  318. Swedan, S.; Musiyenko, A.; Barik, S. Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins Decrease Levels of Multiple Members of the Cellular Interferon Pathways. *J. Virol.* **2009**, *83*, 9682–9693, doi:10.1128/JVI.00715-09.
  319. Jeong, K.-I.; Piepenhagen, P. A.; Kishko, M.; DiNapoli, J. M.; Groppo, R. P.; Zhang, L.; Almond, J.; Kleanthous, H.; Delagrave, S.; Parrington, M. CX3CR1 Is Expressed in Differentiated Human Ciliated Airway Cells and Co-Localizes with Respiratory Syncytial Virus on Cilia in a G Protein-Dependent Manner. *PLoS One* **2015**, *10*, e0130517, doi:10.1371/journal.pone.0130517.
  320. Subramanian, G.; Kuzmanovic, T.; Zhang, Y.; Peter, C. B.; Veleparambil, M.; Chakravarti, R.; Sen, G. C.; Chattopadhyay, S. A new mechanism of interferon's antiviral action: Induction of autophagy, essential for paramyxovirus replication, is inhibited by the interferon stimulated gene, TDRD7. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1006877, doi:10.1371/journal.ppat.1006877.
  321. Henjakovic, M.; Sewald, K.; Switalla, S.; Kaiser, D.; Müller, M.; Veres, T. Z.; Martin, C.; Uhlig, S.; Krug, N.; Braun, A. Ex vivo testing of immune responses in precision-cut lung slices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *231*, 68–76, doi:10.1016/j.taap.2008.04.003.
  322. Switalla, S.; Lauenstein, L.; Prenzler, F.; Knothe, S.; Förster, C.; Fieguth, H.-G.; Pfennig, O.; Schaumann, F.; Martin, C.; Guzman, C. A.; Ebensen, T.; Müller, M.; Hohlfeld, J. M.; Krug, N.; Braun, A.; Sewald, K. Natural innate cytokine response to immunomodulators and adjuvants in human precision-cut lung slices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, doi:10.1016/j.taap.2010.04.010.
  323. Rameix-Welti, M.-A.; Le Goffic, R.; Hervé, P.-L.; Sourimant, J.; Rémot, A.; Riffault, S.; Yu, Q.; Galloux, M.; Gault, E.; Eléouët, J.-F. Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5104, doi:10.1038/ncomms6104.
  324. Tregoning, J. S.; Wang, B. L.; McDonald, J. U.; Yamaguchi, Y.; Harker, J. A.; Goritzka, M.; Johansson, C.; Bukreyev, A.; Collins, P. L.; Openshaw, P. J. Neonatal antibody responses are attenuated by interferon- $\gamma$  produced by NK and T cells during RSV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 5576–5581, doi:10.1073/pnas.1214247110.

325. Abt, M. C.; Osborne, L. C.; Monticelli, L. A.; Doering, T. A.; Alenghat, T.; Sonnenberg, G. F.; Paley, M. A.; Antenus, M.; Williams, K. L.; Erikson, J.; Wherry, E. J.; Artis, D. Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity* **2012**, *37*, 158–170, doi:10.1016/j.immuni.2012.04.011.
326. Wang, J.; Li, F.; Sun, R.; Gao, X.; Wei, H.; Li, L.-J.; Tian, Z. Bacterial colonization dampens influenza-mediated acute lung injury via induction of M2 alveolar macrophages. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2106, doi:10.1038/ncomms3106.
327. Chu, H.; Khosravi, A.; Kusumawardhani, I. P.; Kwon, A. H. K.; Vasconcelos, A. C.; Cunha, L. D.; Mayer, A. E.; Shen, Y.; Wu, W.-L.; Kambal, A.; Targan, S. R.; Xavier, R. J.; Ernst, P. B.; Green, D. R.; McGovern, D. P. B.; Virgin, H. W.; Mazmanian, S. K. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science* **2016**, *352*, 1116–1120, doi:10.1126/science.aad9948.
328. Deng, H.; Li, Z.; Tan, Y.; Guo, Z.; Liu, Y.; Wang, Y.; Yuan, Y.; Yang, R.; Bi, Y.; Bai, Y.; Zhi, F. A novel strain of *Bacteroides fragilis* enhances phagocytosis and polarises M1 macrophages. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep29401.
329. Byun, S.; Lee, E.; Lee, K. W. Therapeutic Implications of Autophagy Inducers in Immunological Disorders, Infection, and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18091959.
330. Junkins, R. D.; McCormick, C.; Lin, T.-J. The emerging potential of autophagy-based therapies in the treatment of cystic fibrosis lung infections. *Autophagy* **2014**, *10*, 538–547, doi:10.4161/auto.27750.
331. Towers, C. G.; Thorburn, A. Therapeutic Targeting of Autophagy. *EBioMedicine* **2016**, *14*, 15–23, doi:10.1016/j.ebiom.2016.10.034.



## **ANNEXE**

### **Congrès et formations suivis pendant le doctorat & Revue publiée**

#### Congrès scientifiques

- Journées Francophones de Virologie (communication orale), 2018, Paris
- 3<sup>e</sup> symposium IRAP (communication orale), 2017, Paris
- Annual meeting of the French Society for Immunology (poster), 2016, Paris
- Congrès international RSV16 (poster), 2016, Argentine
- Symposium inflammation, 2016, Paris

#### Outils et méthodes pour bien exercer son métier de doctorant

- Expérimentation animale niveau 1, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
- Travail en milieu confiné, INRA Jouy-en-Josas
- ImageJ niveau débutant, INRA Jouy-en-Josas
- Initiation à la gestion de projet, AgroParisTech

#### Valorisation de la Recherche, Innovation, Entrepreneuriat, Marketing

- Ecole innovation thérapeutique organisée par ARIIS/AVIESAN/INSERM/Labex LERMIT/Mis'Apprentissage, 2016, Rochefort en Yvelines
- Suivi du MOOC « Création d'entreprises innovantes : de l'idée à la start-up » proposé par l'Université de Montpellier

#### Communication et médiation scientifique

- Organisation du 1<sup>er</sup> forum international professionnel des docteurs et doctorants, 2015, AgroParisTech
- Représentant des doctorants au Conseil Académique de l'Université Paris-Saclay, 2015-2016
- Secrétaire de l'association Doc'J de doctorants du centre INRA Jouy-en-Josas et organisation du colloque Doc'J, 2015
- Journées ABIÉS 2015 à 2017, AgroParisTech

## Review Article

# Pulmonary Susceptibility of Neonates to Respiratory Syncytial Virus Infection: A Problem of Innate Immunity?

Carole Drajac, Daphné Laubreton, Sabine Riffault, and Delphyne Descamps

VIM, INRA, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

Correspondence should be addressed to Delphyne Descamps; delphyne.descamps@inra.fr

Received 28 July 2017; Accepted 9 October 2017

Academic Editor: Elias Said

Copyright © 2017 Carole Drajac et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Human respiratory syncytial virus (RSV) is a common and highly contagious viral agent responsible for acute lower respiratory infection in infants. This pathology characterized by mucus hypersecretion and a disturbed T cell immune response is one of the major causes of infant hospitalization for severe bronchiolitis. Although different risk factors are associated with acute RSV bronchiolitis, the immunological factors contributing to the susceptibility of RSV infection in infants are not clearly elucidated. Epidemiological studies have established that the age at initial infection plays a central role in the severity of the disease. Thus, neonatal susceptibility is intrinsically linked to the immunological characteristics of the young pulmonary mucosa. Early life is a critical period for the lung development with the first expositions to external environmental stimuli and microbiota colonization. Furthermore, neonates display a lung immune system that profoundly differs to those from adults, with the predominance of type 2 immune cells. In this review, we discuss the latest information about the lung immune environment in the early period of life at a steady state and upon RSV infection and how we can modulate neonatal susceptibility to RSV infection.

## 1. Introduction

Human respiratory syncytial virus (RSV) was isolated for the first time in chimpanzees and identified in 1957 in children with severe lower respiratory illness [1–3]. RSV is an enveloped negative-sense single-stranded RNA (ssRNA) virus of the Pneumoviridae family [4]. RSV consists of a single serotype and two antigenic subtypes, A or B. The RSV genome is about 15 kb nucleotides and encodes nine structural proteins and two nonstructural proteins (NS1 and NS2). The envelope of RSV contains three transmembrane surface proteins, which are the fusion glycoprotein (F protein), the G glycoprotein (G protein), and the SH protein. F and G are the only RSV proteins that induce neutralizing antibodies [5].

RSV is the commonest viral agent causing acute lower respiratory infection (ALRI) in infants, a disease usually named bronchiolitis [6]. Bronchiolitis is characterized by mucus hypersecretion and inflammatory cell infiltration into the airspaces leading to airway lumen narrowing [7]. RSV infection is the main cause of hospitalization for severe bronchiolitis and is responsible for important infant mortality in developing countries [8]. RSV is highly contagious, and it is

estimated that 95% of children have experienced at least one RSV infection before the age of two. Thus, the development of new treatment strategies is the World Health Organization's priority. A growing concern is that severe RSV infection may adversely affect pulmonary development and may lead to long-term respiratory disorders. Indeed, infants exposed to severe bronchiolitis or even to mild RSV disease are at much higher risk to develop recurrent wheeze up to teenage years [9].

In the sixties, the administration of formaldehyde-inactivated RSV vaccine (FIRSV) to a cohort of infants resulted in 80% of hospitalization due to an enhanced form of RSV-mediated disease (RSV disease). Two infants died and eighteen developed bronchiolitis and/or pneumonia, characterized by an excess of monocytes and eosinophils in the lungs [10]. High levels of anti-inflammatory type 2 T helper cell ( $T_H2$ ) cytokines, such as interleukin-4 (IL-4), IL-13, and IL-15, have also been detected in mice vaccinated with FIRSV [11, 12]. This dramatic episode highlights the need to improve our knowledge of infant immune responses to viral infection as well as of RSV pathogenesis in newborn airways. Although different risk factors (preterm birth,

polymorphisms in host immune genes) are associated with acute RSV bronchiolitis [13, 14], the immunological factors contributing to the susceptibility of RSV infections in infants are not clearly elucidated. Different human epidemiological studies have established that the age at initial infection plays a key role in the susceptibility of RSV disease and the development of an asthma-like phenotype [15]. At birth, neonates, which rely on maternally derived antibodies (MDA) and innate responses, have a limited ability to defend themselves against pathogens. Indeed, the critical period of susceptibility to RSV arises between 2 and 6 months of age when MDA decrease beyond protective levels and before host neutralizing antibodies reach sufficient titers [16, 17]. Protection of preterm infants with higher occurrence of severe bronchiolitis (measured as the duration of wheezing) can be achieved through prophylactic treatment with a neutralizing humanized antibody called palivizumab [18]. Innate immune components that are the first available line of defense in neonates will also contribute to covering the “hole” in acquired immunity, educating the adaptive immune system, and strengthening it. Yet little is known about innate immunity in the lungs of neonates and how it will imprint further acquired immunity to RSV.

To better understand the immune pathways mobilized by RSV infection in infants and their long-term effects on the lungs, a mouse model of neonatal infection has been developed in BALB/c mice [19]. Mice infected under age 7 days (neonatal mice) develop an asthma-like pathology upon adult reinfection, characterized by weight loss, airway hyperresponsiveness, mucus hypersecretion, type 2 immune responses (neutrophil and eosinophil recruitment and IL-13 and IL-4 secretion), and airway remodelling [19, 20]. Thereby, as in human infants, the age of neonatal mice at initial RSV infection determines the clinical outcome upon RSV reexposure at adult age. These data suggest that RSV infection during the neonatal period is responsible for an immunopathological imprinting in the lungs that could influence the development and the severity of disease and finally long-term respiratory disorders. Thus, neonatal mice are an experimental model of interest to study the causes of this age-specific susceptibility.

The infant susceptibility to RSV infection is intrinsically linked to the immunological characteristics of the pulmonary mucosa. To date, neonatal innate immune responses and their effects on RSV disease progression remain poorly described. In this review, we resume the latest information about the immune environment in the young lung (mice and human). Then, the advanced researches on the mechanisms of the innate response to RSV infection in neonates are described. Finally, we discuss different approaches to modulate the young susceptibility to RSV infection by targeting the neonatal window of intervention.

## 2. Lung Tissue in Neonatal Life: A Moving Landscape

In mice, lung development begins at embryonic day 9 (ED9) and can be divided in three main periods, referred to as embryonic, fetal, and postnatal periods [21]. Before birth, lung

development proceeds to pseudoglandular (ED12–16.5), canalicular (ED16.5–17.5), and saccular (ED18–PND4) stages forming the branching tree and future air space [21]. After birth, the formation of the secondary septa occurs resulting in the formation of the alveoli. This alveolarization phase takes place from postnatal day (PND) 4 to approximately PND21, with the development of the first mature alveoli and microvascular system around PND14 [21, 22]. During this period, the young lungs are exposed to a specific pattern of chemokines and cytokines, physical stress, and/or external environmental stimuli that will influence the immune system development [23, 24].

Immune cells start to colonize the lungs during the pseudoglandular phase (ED12) with the major population consisting of CD45<sup>+</sup> yolk sac-derived macrophages, followed by fetal liver monocytes that enter the lungs at the beginning of the sacular phase (ED18) [25]. Following birth, lung epithelial cells produce elevated levels of GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Csf-2). GM-CSF is a hematopoietic growth factor that promotes alveolar macrophage (AM) development in the lungs from fetal monocytes [25, 26]. AMs appear after PND1 in lung tissue and reach their maximum abundance in the lungs at PND3 where they fully colonize the alveolar space, coinciding with the start of the alveolar phase [25] (Figure 1). At PND14, monocytes, macrophages, and granulocytes reach adult-like cell frequencies [25, 27]. An influx of granulocytes (CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>int</sup> Ly6G/SiglecF<sup>+</sup> cells probably corresponding to neutrophils) is quickly observed at PND1 [27]. Similar observations have been reported for circulating neutrophils. In human, following the first 24 hours after birth, the circulating neutrophil count abruptly raises and gradually stabilizes by 48 to 72 hours of life [28]. In neonatal mice, there is also a marked increase in circulating neutrophil numbers from PND1 to PND3 reaching an adult number from PND14 [29].

A recruitment of type 2 innate cells (type 2 innate lymphoid cells or ILC2s, mast cells, eosinophils, and basophils) occurs in the lungs at the start of the alveolarization period. Their frequency reaches a maximum at PND14 and then declines until weaning [27, 30]. A recent study showed that following the first breathes, the lung epithelium also produces high amount of IL-33 [30]. IL-33 is an alarmin that belongs to the IL-1 family and is mainly secreted by stromal cells such as epithelial and endothelial cells [31]. IL-33 signals through its receptor ST2 present in particular at the membrane of macrophages, dendritic cells (DCs), mast cells, and ILC2 [32]. IL-33 contributes to the promotion of T<sub>H</sub>2 immunity [31], particularly in the lungs of newborn mice [27, 30]. Indeed, IL-33 released by lung epithelial cells has been recently associated with the accumulation of ILC2 during the alveolar period [27, 30]. ILC2 cells belong to the family of innate lymphoid cells (ILCs). This family comprises three cellular groups that have been divided according to their cytokine production profile. Group 1 comprises both ILC1 and NK cells and is defined by the production of the signature cytokine IFN $\gamma$ , while ILC2 has been defined by their ability to produce T<sub>H</sub>2-type cytokines such as IL-4 and IL-5 and ILC3 through their IL-17 production [33]. Thus, IL-33 secretion stimulates steady-state IL-5 and IL-13 production

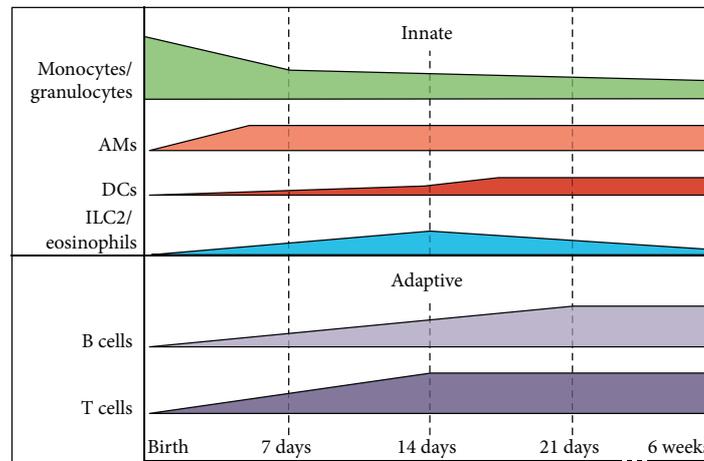


FIGURE 1: Immune cell colonization of the lungs during the postnatal period (schematization of cellular frequencies in CD45<sup>+</sup> lung cells). Adapted from [25, 27, 30, 38] and personal unpublished data.

by ILC2 that in turn promotes a neonatal AM or DC phenotype switch towards type 2 immune response [27, 30]. To our knowledge, neither ILC1 nor ILC3 has been found in murine lungs [34, 35]. It is well known that NK cells represent up to 10% of resident lymphocytes in the lungs of adult mice [36], but their proportion in neonates has not been described yet.

GM-CSF also controls DC development in the lungs [37]. DCs are extremely rare in the respiratory tract after birth, but their frequency gradually increases over time. From E20 until PND2, CD11b<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup> monocyte-derived DCs (moDCs) form the majority of DCs. Our group showed that 6-day-old BALB/c neonatal lungs display less conventional (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs), with a lower CD103<sup>+</sup> to CD11b<sup>+</sup> cDC ratio, as compared to adult lungs [38]. However, a study using a gating strategy that separates cDCs from moDCs in C57Bl/6J newborn mice showed that lung CD11b<sup>+</sup> cDCs developed more slowly, leading to a predominance of CD103<sup>+</sup> cDCs until PND7 [27]. During the alveolarization phase, neonatal DCs and pDCs display increased levels of OX40L (CD134) [27, 39] and this is related to their preferential ability to promote T<sub>H</sub>2 responses. Both IL-33 [27] and TSLP [39] production by lung epithelial cells seem to influence OX40-L expression in neonates.

As for DCs, T and B cells progressively accumulate in the lungs from birth to weaning [27]. Lung tissue of 6-day-old mice contain fourfold less CD3<sup>+</sup> lymphocytes than adult tissue [38]. Neonatal T cell population is enriched in CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>GATA3<sup>+</sup> T cells while CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are less represented than those in adults [38]. No difference in both NKT and  $\gamma\delta$  pulmonary cells are observed between adults and neonates. Little is known about B cells in neonatal lungs. At PND6, the neonatal lung tissues contain fivefold less CD19<sup>+</sup> B cells than adult tissue [27]. Our group observed that the neonatal B cell population is enriched in both immature B cells and innate-like CD5<sup>+</sup> B1a cells (Laubret D. and Descamps D., unpublished data). A previous study has demonstrated that the CD5<sup>+</sup> B cell population is more abundant in the spleen of 6-day-old C57Bl/6J

neonates than in the adult spleen [40]. An equivalent subset named neonatal regulatory B cells (nBreg) has recently been identified in human cord blood [41].

First breaths not only provide signals that will shape lung maturation but also carry microbes that will form the microbiota. In neonatal mice, bacteria start to colonize the lungs around PND3, with their number and diversity progressively increasing until weaning [42, 43]. Interestingly, microbiota installation is closely related to the alveolarization phase. Indeed, Yun et al. suggest that bacteria influence lung development and barrier functions [44]. Bacteria can also influence the lung immune environment. In germ-free (GF) mice, invariant NKT accumulates in the lungs [45], and CD40 and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression by neonatal DCs is affected [42].

In conclusion, neonates display a lung immune system that is profoundly different from that of adults especially in regard to the presence of innate immune cells able to induce T<sub>H</sub>2 immunity. Moreover, the early life is a critical period for the lung development with the first expositions to external environmental stimuli and microbiota colonization. All these events affect the maturation of the pulmonary immune capacity and thus the lung susceptibility to respiratory pathogens [23, 24, 46].

### 3. Innate Sensing of RSV in Neonatal Lungs

At a steady state, the age-specific cellular composition of the neonatal lungs naturally promotes the initial development of T<sub>H</sub>2 immune responses [27, 30]. This ability can be influenced by innate responses of resident airway cells that produce different mediators following RSV sensing. Innate immune responses to RSV are important to control the early phase of viral infection but also to influence the polarization of anti-RSV immune responses and thus the outcome of RSV infection. The difficulty in studying lung cells in infants with bronchiolitis and in healthy controls leads to an incomplete knowledge of innate pulmonary immunity and

factors influencing it in neonates. However, using animal models, numerous studies have identified that innate responses to RSV are decisive immunological events in neonatal RSV susceptibility [14, 47].

**3.1. RSV Detection by Pattern Recognition Receptors (PRRs).** Several Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors (RLRs), or nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing proteins (NLRs) are particularly involved in antiviral defenses and cytokine production upon RSV infection [14, 47]. Recognition of the virus by these PRRs is well defined in human and adult mouse but is still poorly described in neonates [48–50].

**3.1.1. Membrane TLRs Involved in RSV Recognition.** The F fusion protein is recognized by TLR4, which is also known to detect lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria [51]. TLR4 stimulation leads to the production of proinflammatory cytokines and type I interferons (IFN-I), involving the signalling pathways dependent on two adaptive molecules which are the myeloid differentiation primary response 88 protein (MyD88) or the TIR domain-containing adapter inducing interferon  $\beta$  (TRIF). In TLR4-deficient C57BL10/ScCr mice, RSV clearance as well as activation and recruitment of NK cells is impaired [51, 52]. However, RSV infection is not affected in another TLR4-deficient BALB/c mice [53]. Human and murine pulmonary epithelial cells and macrophages express a broad range of TLRs including TLR4 [50, 54–56]. Interestingly, TLR4 signalling and IL-4 $\alpha$ /STAT6 and IFN- $\beta$  pathway engagement in murine AMs promote a type 2 immune response in the course of RSV infection [57].

TLR2/TLR6 complex is also involved in the detection of RSV, but the mechanisms of sensing remain unknown. Activation of these receptors promotes the production of IFN-I and proinflammatory cytokines through the MyD88-dependent pathway [48–50]. In the lungs of TLR2- and TLR6-deficient adult mice, viral load is increased and neutrophil recruitment is impaired following RSV infection. Moreover, isolated AMs from these mice produce decreased levels of IFN-I and inflammatory cytokines [58].

The PRR expression by other mucosal innate immune cells like ILCs is better documented for the digestive tract than for the lungs [59]. Nevertheless, a recent work showed that TLR2 and TLR4 are expressed in pulmonary ILC2 and drive together a type 2 immune response by inducing IL-13 production [60].

**3.1.2. Endosomal TLRs Involved in RSV Recognition.** TLR3 detects the double-stranded RNA form of the RSV genome, which is generated during the virus replication cycle [61]. TLR3 exclusively signals through the TRIF pathway. TRIF recruitment leads to the activation of the transcription factor interferon regulatory factor 3 (IRF-3), which generates IFN-I production by the cell. TLR3 is constitutively expressed in numerous cell types including nasal and pulmonary epithelial cells, AMs, and DCs [62, 63]. Rudd et al. showed that RSV promotes a type 2 immunity in TLR3-deficient adult mice with eosinophilic infiltration, mucus overproduction,

and T<sub>H</sub>2-type cytokine secretion (IL-5, IL-8, and IL-13) while viral load remains unchanged [61].

TLR7 recognizes the single-stranded RNA genome of RSV and triggers subsequent expression of genes encoding IFN-I and proinflammatory cytokines via IRF-7 and NF- $\kappa$ B activation through the MyD88-dependent pathway [48–50]. Lung epithelial cells, DCs, and eosinophils are able to sense RSV via TLR7 activation [56, 64–66]. RSV infection in TLR7-deficient mice induces a significant increase in inflammation and mucus production in the lungs [65]. Interestingly, Schlender et al. showed that RSV prevents IFN-I production in human pDCs in a TLR7-dependant manner, but they cannot explain the mechanism involved in such inhibition [67].

**3.1.3. Cytosolic Location of RLRs and NLRs.** Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) are both RNA helicases that can bind to the double-stranded RNA form of the RSV genome and 5'-triphosphorylated uncapped viral RNA in the cytosol [68, 69]. RIG-I signalling is particularly involved in IFN-I responses in lung epithelial cells, DCs, and AMs [56, 64, 68, 70]. RIG-I and MDA5 contain two N-terminal caspase activation and recruitment domains (CARDs), which, upon virus sensing in the cytosol, interact with the mitochondrial antiviral signalling (MAVS) protein to trigger the NF- $\kappa$ B and IRF-3 pathways [48–50].

Nucleotide-binding oligomerization domain 2 (Nod2), a member of the NLR family, can also detect single-stranded viral RNA and triggers innate immune activation by binding with MAVS [71]. Upon RSV infection, MAVS-deficient mice displayed higher viral load in the lungs and profound defects in antiviral defenses in comparison with control WT mice, although RSV clearance is still effective in the absence of RIG-I, MDA5, and Nod signalings [64, 72]. Johansson's group showed that AMs are the main IFN-I producers through the MAVS-dependent pathway in adult lungs of RSV-infected mice [70, 73].

**3.2. PRR Expression or Functionality, a Factor of Neonatal Susceptibility to RSV Infection.** In infants, several genetic polymorphisms in innate immune genes have been associated with the susceptibility to develop RSV-mediated bronchiolitis [13, 74–76]. Thus, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes coding for PRRs have been considered attractive targets for clinical decision-making [77]. However, contradictory studies with other cohorts have failed to correlate SNPs in RIG-I or TLR4 genes with the severity of RSV disease [78]. Adult mouse models similarly show a variable role of the TLR4 pathway in the development of RSV disease [51–53]. Consequently, the severity of RSV disease appears likely dependent on both genetic and environmental factors (microbiota and coinfections) during the neonatal period [47]. Accordingly, a combination of the TLR4 genotype and environmental exposure to LPS during early life is involved in the occurrence of RSV bronchiolitis [79]. Most studies using cord blood cells suggest that TLR expression is not a modulator of the degree of cytokine responsiveness during the perinatal period [69, 80]. Furthermore, Marr

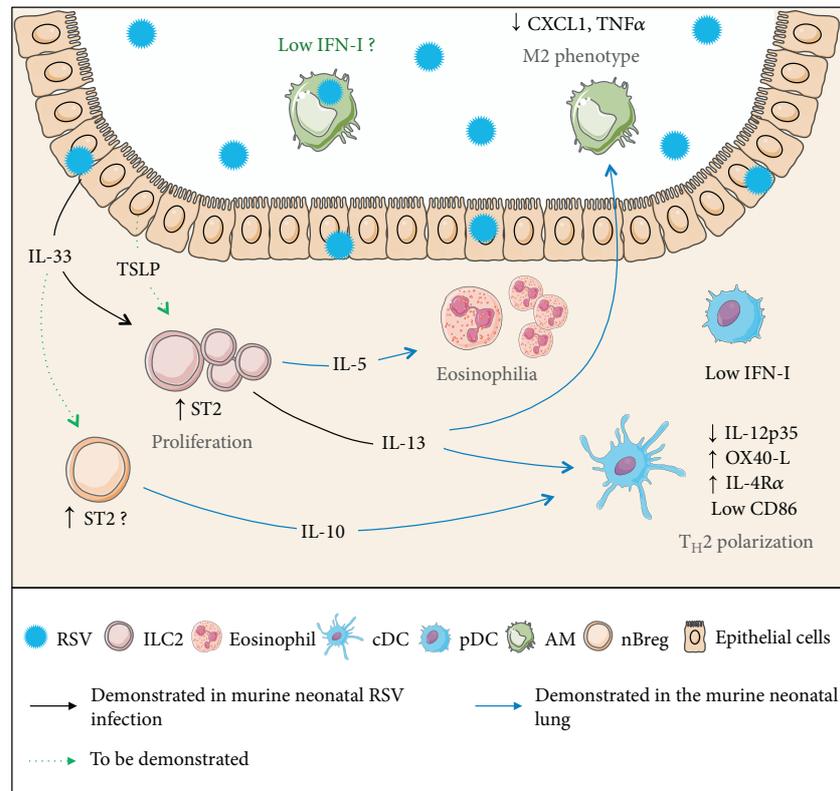


FIGURE 2: Immediate immune responses of pulmonary resident cells to RSV infection in neonates. Servier Medical Art has provided images. Neonatal RSV exposure leads to an early IL-33 secretion by respiratory epithelial cells [96]. IL-33 signals through its receptor ST2 localized at the membrane of ILC2. This alarmin supports the increase in the ILC2 number and IL-13 production in the lungs of RSV-infected neonatal mice [74]. ILC2 can promote a switch towards a type 2 phenotype for AMs or lung DCs at a steady state or in a house dust mite-induced asthma model [27, 30]. Concerning the IFN-I pathway, neonatal pDCs display a poor pulmonary mobilization and a weak activation of the IFN-I pathway following RSV infection [29]. AMs are the main source of IFN-I in RSV-infected adult lungs, but the question remains open during the neonatal period [54]. Therefore, it is strongly suspected that ILC2 cells are indirectly responsible for the inability of neonatal mice to mount an effective IFN-I response to counteract RSV infection. In addition, IL-10-secreting nBregs may constitute another cellular subset contributing to the type 2 immunity induced by RSV infection in neonates [40, 99].

et al. showed that RIG-I expression is similar between neonatal and adult pDCs [69]. They propose that IFN-I responses following RSV infection are decreased in neonatal pDCs compared to adult pDCs because of different signaling events downstream of MAVS or posttranslational modifications affecting either RIG-I or MAVS pathways [69].

Nevertheless, a correlation between pulmonary PRR acquisition after birth and RSV susceptibility cannot be excluded. Several studies in the mouse model showed that TLR4 expression is very low in the fetal lungs and increases throughout development [81, 82]. Harju et al. proposed an association between reduced pulmonary TLR4 expression at baseline and neonatal hyporesponsiveness to LPS [82]. Currently, there are virtually no studies on the maturation of TLR3 and 7 and RIG-I signalling in the neonatal lungs at a basal state and upon RSV infection.

**3.3. Immediate Innate Responses of Pulmonary Resident Immune Cells to RSV Infection.** RSV infection in neonatal mice promotes a type 2 immunity characterized by a strong

proliferation of an  $IL-4R\alpha^+ - CD4^+ T_H2$  subset together with a defect in  $CD8^+$  T cell activation and  $IFN\gamma$  production [83, 84]. In this part, we describe the first innate responses of pulmonary resident cells to RSV infection that contribute to the development and/or maintenance of anti-RSV  $T_H2$  immunity (Figure 2).

Adaptive immune responses are initiated by DCs that traffic from the infected lungs to the draining respiratory lymph nodes in order to prime T cell responses. Our group and others have described major deficiencies in the functionality of DCs in neonatal lungs following RSV infection [85–87]. As compared to adults, cDCs are poorly represented in the lungs and in the lymph nodes of RSV-infected neonates, with an increased proportion of a  $CD103^+$  DC subset [85]. These neonatal DCs also have lower expression of the costimulatory molecule CD86 and thus are less effective in antigen presentation [85]. Moreover, a poor pulmonary mobilization of pDCs, potent producers of  $IFN\alpha/\beta$ , and a weak activation of the IFN-I pathway are described in RSV-infected neonatal mice [86, 87]. IFN-I production is important not only to

induce antiviral responses but also to amplify proinflammatory responses in the lungs of adult mice [88]. It has been demonstrated that IFN $\alpha$  treatment or an increased lung DC number (by adoptive transfer of adult pDCs or administration of a hematopoietic cell proliferation factor, the Flt3 ligand (Flt3-L)) reboots the IFN-I pathway upon RSV neonatal infection and decreases T<sub>H</sub>2-biased immunopathology upon adult reinfection [86, 87]. Thus, IFN-I production clearly appears as a key factor in neonatal susceptibility to RSV infection [86, 87, 89].

The role of AMs in primary RSV infection only begins to be appreciated. Thus, the depletion of AMs in the early period of life has been associated with a reduction in RSV clearance and a delay in weight gain [90]. In adult mice, AMs have also been described to play an essential role in early inflammatory molecule production (TNF $\alpha$ , IL-6, CCL3, and IFN $\alpha$ ) and activation/recruitment of NK cells [91, 92]. Recently, it has been reported that adult AMs are the main source of IFN-I following RSV infection [70]. To date, these observations have not been checked in neonatal mice. AMs are known to be a flexible cellular subset that adapts to the microenvironment of the airway lumen [93]. It is not known yet whether neonatal AMs have the same reactivity to RSV infection than adult AMs. Addressing this issue seems critical to understand the causes of inability of a neonate to generate IFN-I response following RSV infection. Similar to the classification of T cells in a T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 phenotype, macrophages have been also categorized into classically activated macrophages (CAMs or M1) or alternatively activated macrophages (AAMs or M2), based on activating cytokines (IFN $\gamma$  and IL-4, resp.) and functional activities (inflammation and airway remodelling, resp.) [94]. Interestingly, Empey et al. have demonstrated that neonatal AMs present a delay of their differentiation toward a CAM phenotype following RSV infection, likely due to undetectable IFN $\gamma$  production [95]. In adult mice, RSV infection induces AAMs that are important to reduce lung pathology [57]. Thus, pulmonary AM polarization seems to depend on age. Altogether, in the particular context of the neonatal airway environment, it becomes important to understand the mechanism that triggers the polarization of neonatal AMs following RSV infection and to evaluate its relationship with exacerbated airway responses upon adult reinfection.

The contribution of ILC2 and IL-33 to the neonatal RSV susceptibility has been recently investigated. Neonatal RSV exposure leads to an early IL-33 secretion by respiratory epithelial cells; this is not observed in adult mice. IL-33 plays a major function in the immunopathogenesis of RSV infection by supporting an increase in the ILC2 number and IL-13 production in the lungs of neonatal mice that will impact on disease severity in reinfected mice [96]. Additionally, it has been reported that hospitalized infants with viral bronchiolitis have detectable levels of nasal IL-13, IL-33, and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) [96, 97]. Importantly, TSLP-deficient adult mice are unable to mount ILC2 proliferation and activation upon RSV infection [98]. The link between TSLP from respiratory epithelium and ILC2 proliferation/activation is not yet reported in RSV-infected neonatal mice. Nevertheless, the release of TSLP is identified

as an important event for pulmonary DC polarization during RSV infection in the neonatal period and for RSV-mediated long-term respiratory disorders [39]. ILC2 is known to secrete T<sub>H</sub>2-type cytokines, such as IL-5 and IL-13. In the neonatal lungs, these cells can promote an AM or DC phenotype switch towards type 2-polarizing abilities at a steady state or in a house dust mite-induced asthma model [27, 30]. Therefore, it is strongly suspected that ILC2 cells are indirectly responsible for the inability of neonatal mice to mount an effective IFN-I response following RSV infection.

Finally, nBregs (or CD5<sup>+</sup> B1a subset) may constitute another cellular subset contributing to the type 2 immunity induced by RSV infection in neonates. In the neonatal spleen, these nBregs have been previously described for their ability to produce IL-10 and to control the DC activation *in vivo* for T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 polarization [40]. Moreover, IL-10-producing nBregs in the lungs could be induced by IL-33, as previously described in the intestines [99]. An equivalent subset of nBregs has been recently characterized in the blood of human neonates, and its frequency is identified as a predictive factor for the severity of RSV-mediated bronchiolitis in infants [41].

All these results point to the existence of T<sub>H</sub>2-like innate immune responses that are early induced by RSV infection in the neonatal lungs. These specific immunological properties must be considered in order to develop relevant therapeutic approaches against RSV infection.

#### 4. Experimental Strategies to Modulate the Neonatal Susceptibility to RSV

An increasing set of data supports the concept of a “neonatal window of opportunity”. The early life is the critical period for the development of immunity and therefore for the newborn sensitivity to the development of pulmonary pathologies. Immunomodulatory interventions targeting this period of life are likely to have profound effects on immune system homeostasis and hence on an individual’s susceptibility to pathogens [23]. Different studies using neonatal or adult mice have shown the possibility to take advantage of immunomodulation strategies on innate defenses to modify the neonatal pulmonary susceptibility to RSV infection and to fight RSV disease (Table 1).

##### 4.1. Counteracting the Ineffective IFN-I Secretion in the Lungs

**4.1.1. Increase and/or Activation of IFN-I-Producing Cell Population.** IFN-I production in neonatal RSV infection is decisive for the severity of RSV pathology [86, 87, 89]. Thus, with recombinant IFN-I intranasal instillation prior to mouse infection, Cormier et al. suggested that boosting the antiviral response of pDCs during the neonatal period limits RSV pathology [86]. Additionally, the treatment of neonatal mice with the Flt3-L, a growth factor for hematopoietic cells, before RSV infection increases pDCs in the lungs, partially restores the IFN-I pathway, and reduces the long-term pathological pulmonary consequences of RSV infection [87]. However, AMs have been identified as predominant producers of IFN-I in RSV-infected adult mice [70]. Therefore, the role of these cells in neonates and in the development

TABLE 1: Biological therapeutic interventions to modulate neonatal innate immunity following RSV infection.

Strategy	Target	Design	Biological product	Category	Administration	Models	Ref.
Counteracting the ineffective IFN- $\gamma$ secretion	IFN- $\gamma$ -producing cells	Activation & recruitment	IFN- $\gamma$ and Flt3-L	rIFN- $\alpha$ and growth factor	Inhalation & injection	Mouse (N)	[86, 87]
	IFN- $\gamma$ signalling	Activation	CpG and SB 9200	TLR or RLR agonist	Oral	Mouse (A & N)	[100, 102]
Modulating the pulmonary T <sub>H</sub> 2 bias	Th2-polarizing cytokines	Blocking	Anti-IL-13, anti-TSLP, anti-IL-33	Antibodies	Injection	Human (A) & mouse (A & N)	[39, 96, 98, 103–105]
	Signalling pathways	Blocking	Anti-IL-4R $\alpha$ and anti-STAT6	Antisense oligonucleotide and inhibitory peptide	Inhalation	Mouse (N)	[107, 108]
	Alveolar macrophages	Activation	IFN $\gamma$	rIFN $\gamma$	Inhalation	Mouse (N)	[90, 95, 110]
Modulating the mucosal microbiota	Respiratory & intestinal mucosa	Maturation	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	Live or heat-killed bacteria	Oral or inhalation	Human (C) & mouse (N)	[112–115]
	Respiratory mucosa	Maturation	Primocolonizing lung bacteria strains	Live bacteria	Inhalation	Mouse (N)	[43]

A: adult; C: children; N: neonate.

of pulmonary anti-RSV immunity in the long term should not be ignored.

**4.1.2. Promoting IFN-I Signalling Via TLR/RLR Agonists.** By targeting PRRs, several groups propose the use of TLR or RLR agonists to boost antiviral responses. Thus, the preexposure of neonates to CpG (TLR9 ligand) prior to the first RSV infection reduces RSV pathology observed in the second RSV exposure at adult age. TLR9 stimulation induces the alteration of neonatal  $T_H2$  skewing, probably by accelerating maturation of neonatal antigen-presenting cells as well as NK cell recruitment in the lungs [100]. In an adult mouse model, others propose to target TLR3 with the synthetic dsRNA agonist poly IC stabilized with poly-L-lysine carboxymethyl cellulose (poly ICLC). However, the administration of poly ICLC fails to induce an appropriate innate immune response following RSV infection in the cotton rat model, which is not the case in BALB/c mice [101]. These results highlight the importance of the choice of an animal model used for therapeutic evaluation in the context of RSV infection. Recently, SB 9200, a dinucleotide prodrug targeting RIG-I and NOD2 activation, has been presented as a novel prophylactic and therapeutic anti-RSV immunomodulatory agent by Spring Bank Pharmaceuticals. In the mouse model, it has been observed that SB 9200 reduces viral load and lung inflammation while increasing IRF3-dependent IFN-I production [102]. To our knowledge, it is the first immunomodulation strategy targeting RLRs that could be considered in RSV treatment. However, because of the known dissimilarities in PRRs and cell immune responses according to age, it would be necessary to test SB 9200 in a neonatal model for assessing innate immune response following RSV infection.

#### 4.2. Modulating the Activation of Cells Promoting the Pulmonary $T_H2$ Environment in the Neonatal Period

**4.2.1. Modulating by Blocking  $T_H2$ -Polarizing Cytokines.** Several studies point out the major role of IL-13 in airway hyperresponsiveness of adult mice during RSV infection [20, 103]. Thus, IL-13 targeting could represent a good strategy to modulate neonatal responses to RSV infection. In adult mice, anti-IL-13 treatment prior to RSV infection reduces both viral load and mucus hypersecretion and increases IL-12 production in the lungs [103]. It would be interesting to study the effect of anti-IL-13 treatment on neonatal mice because it has been shown that IL-13 is highly secreted in the lungs upon neonatal RSV infection [96].

A recent study suggests that TSLP might also represent a therapeutic target for IL-13-driven immunopathology to RSV. Indeed, Stier et al. showed in adult mice that TSLP signalling is required for IL-13 production by ILC2. RSV-infected adult mice receiving an anti-TSLP neutralizing antibody presented a reduction in IL-13 production as well as a decrease in viral load and airway mucus secretion [98]. Furthermore, administration of anti-TSLP before neonatal RSV infection has been shown to reduce OX40-L expression on DCs thereby reducing their capacity to promote  $T_H2$  polarization and to decrease eosinophil numbers in the bronchoalveolar lavage fluids [39]. Both strategies (anti-IL-13 and

anti-TSLP) are currently under clinical trial evaluation for adult patients with asthma [104, 105]. In the same way, the administration of an IL-33-neutralizing antibody during primary RSV infection in neonatal mice reduces IL-13 production and ILC2 numbers in the lungs and consequently decreases disease severity after reinfection at adult age [96].

**4.2.2. Modulating by Blocking Signalling Pathways Involved in the Type 2 Immunity Induction.** Several groups propose to interfere with the  $T_H2$ -biased immunopathogenesis of neonatal RSV infection by targeting receptors of  $T_H2$ -type cytokines or proteins involved in their downstream signalling. Recently, Shrestha et al. have revealed that cDCs and pDCs downregulate their IL-4 receptor  $\alpha$  (IL-4R $\alpha$ ) with age. Interestingly, the elevated IL-4R $\alpha$  expression on CD11b<sup>+</sup> cDCs is related to the immunopathology upon RSV reinfection [106]. Accordingly, the downregulation of pulmonary IL-4R $\alpha$  expression with antisense oligonucleotides (ASO) enhances the presence of maturation markers (CD80 and CD86) at the membrane of CD11b<sup>+</sup> cDCs and leads to a shift of T cell responses toward  $T_H1$  cells producing IFN $\gamma$ . Besides, IL-4R $\alpha$  ASO-treated neonates display higher level of  $T_H1$ -like IgG2a antibodies in response to RSV exposure than nontreated mice, while viral load is unchanged. Subsequently, long-term respiratory disorders associated with RSV reinfection are reduced by the neonatal administration of IL-4R $\alpha$  ASO [107]. In accordance with these results, the inhibition of STAT6 activity, an essential transcription factor in IL-4R $\alpha$  signalling, by a specific inhibitory peptide during neonatal RSV infection, decreases IL-4 secretion and AAM number in the lungs and prevents from pulmonary eosinophil recruitment and airway hyperresponsiveness upon adult RSV reinfection [108].

**4.2.3. Modulating by Activation of Neonatal AMs.** Several studies have reported that neonatal AMs present an immature phenotype upon RSV infection [90, 95] and this has been associated with  $T_H2$ -biased airway immunopathology upon adult reinfection [108]. AM differentiation is controlled by local IL-4 or IFN $\gamma$  secretion [94]. However, in neonatal mice, IFN $\gamma$  production is absent following RSV infection [95]. Furthermore, it has been demonstrated that IFN $\gamma$  production during neonatal infection influences the outcome of RSV pathology upon adult reinfection [109]. Indeed, it has been shown that intranasal injection of recombinant IFN $\gamma$  in neonatal RSV-infected mice induces a better AM activation characterized by the expression of CAM markers (CD86<sup>+</sup>, MHC II<sup>+</sup> and CCR7<sup>+</sup>, and mannose receptor<sup>-</sup>) on neonatal AMs and reduced viral load in the lungs [90, 95, 110].

**4.3. Promoting the Maturation of the Pulmonary Immune System by Modulating the Microbiota.** Several groups focused their research on the capacity of probiotic microorganisms to stimulate the lung immune system and to prevent RSV infection during the first years of life [111]. Studies were carried out with *Lactobacillus rhamnosus* isolated from goat milk in order to control RSV infection via TLR3 modulation [112–114]. Oral treatment of 3-week-old BALB/c mice with *L. rhamnosus* CRL1505 significantly reduces viral load and

pulmonary tissue damage due to inflammation following RSV infection with respect to the control group [114]. Hence, *L. rhamnosus* CRL1505 administered orally is able to beneficially modulate the respiratory mucosal immunity to RSV infection. The nasal administration of heat-killed probiotic *L. rhamnosus* CRL1505 is also able to increase the resistance of adult mice to the challenge with RSV [115]. Moreover, oral administration of this probiotic has reduced the frequency and severity of respiratory infections in a randomized clinical trial involving 298 children aged from two to five years in Argentina [112].

In parallel with the gut microbiota, a lung microbiota gradually colonizes the airways during the neonatal period [42, 43]. Its composition and diversity can affect host physiology and the immune capacity of the airway tissue [23, 111]. Thus, it has been observed that the nasopharyngeal microbiota of young children can influence the spread of RSV infection to the lower respiratory tract and can modulate the host immune response to virus [116, 117]. Thomas's group has recently isolated different primocolonizing bacterial strains of the mouse neonatal lungs in order to propose a new approach to modulate the immune response to respiratory pathologies. Thus, Remot et al. showed in a neonatal mouse model of asthma that the repeated administration of one strain of these primocolonizing lung bacteria positively or negatively impacts the outcome of pathology [43]. Therefore, it will be interesting to evaluate this strategy on RSV disease in neonates.

All these results indicate that the control of type 2 immune responses during primary RSV infection in the neonatal period can prevent RSV-mediated long-term respiratory problems. Altogether, the existence of the pulmonary neonatal environment displaying specific immunological properties must be considered in order to develop relevant therapeutic approaches against RSV infection.

## 5. Conclusion

In conclusion, the early response to RSV infection is closely associated with specific immunological characteristics of the developing lungs. That is why the RSV researches of new preventive or curative treatments against RSV must take advantage of experimental models in young animals. A better understanding of anti-RSV innate immune responses in neonates, and their relative contributions to long-term pulmonary immunopathology, is required to develop new immunomodulation—but also vaccination—strategies specific to this early period of life.

## Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Isabelle Schwartz-Cornil (INRA, Jouy-en-Josas) for the helpful discussion and critically reading the manuscript. Carole Drajac was the recipient of a PhD

fellowship of Région Ile-de-France (DIM Malinf). Daphné Laubreton was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV3-0016 SyncBreg).

## References

- [1] R. E. Blount Jr., J. A. Morris, and R. E. Savage, "Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with goryza," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 92, no. 3, pp. 544–549, 1956.
- [2] R. Chanock and L. Finberg, "Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). Epidemiologic aspects of infection in infants and young children," *American Journal of Epidemiology*, vol. 66, no. 3, pp. 291–300, 1957.
- [3] R. Chanock, B. Roizman, and R. Myers, "Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). Isolation, properties and characterization," *American Journal of Epidemiology*, vol. 66, no. 3, pp. 281–290, 1957.
- [4] C. L. Afonso, G. K. Amarasinghe, K. Bánayai et al., "Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016," *Archives of Virology*, vol. 161, no. 8, pp. 2351–2360, 2016.
- [5] M. Connors, P. L. Collins, C. Y. Firestone, and B. R. Murphy, "Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived," *Journal of Virology*, vol. 65, no. 3, pp. 1634–1637, 1991.
- [6] S. Jain, W. H. Self, R. G. Wunderink, and CDC EPIC Study Team, "Community-acquired pneumonia requiring hospitalization," *New England Journal of Medicine*, vol. 373, no. 24, p. 2382, 2015.
- [7] A. Jha, H. Jarvis, C. Fraser, and P. J. M. Openshaw, "Respiratory syncytial virus," in *SARS, MERS and Other Viral Lung Infections*, D. S. Hui, G. A. Rossi and S. L. Johnston, Eds., vol. 72, pp. 84–109, European Respiratory Society, Sheffield UK, 2016.
- [8] T. Shi, D. A. McAllister, K. L. O'Brien et al., "Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study," *The Lancet*, vol. 390, no. 10098, pp. 946–958, 2017.
- [9] N. Sigurs, F. Aljassim, B. Kjellman et al., "Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life," *Thorax*, vol. 65, no. 12, pp. 1045–1052, 2010.
- [10] H. W. Kim, J. G. Canchola, C. D. Brandt et al., "Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine," *American Journal of Epidemiology*, vol. 89, no. 4, pp. 422–434, 1969.
- [11] M. Connors, N. A. Giese, A. B. Kulkarni, C. Y. Firestone, H. C. Morse 3rd, and B. R. Murphy, "Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10," *Journal of Virology*, vol. 68, no. 8, pp. 5321–5325, 1994.
- [12] M. E. Waris, C. Tsou, D. D. Erdman, S. R. Zaki, and L. J. Anderson, "Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern," *Journal of Virology*, vol. 70, no. 5, pp. 2852–2860, 1996.

- [13] R. Janssen, L. Bont, C. L. Siezen et al., "Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 196, no. 6, pp. 826–834, 2007.
- [14] L. Lambert, A. M. Sagfors, P. J. Openshaw, and F. J. Culley, "Immunity to RSV in early-life," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, p. 466, 2014.
- [15] S. A. Cormier, D. You, and S. Honnegowda, "The use of a neonatal mouse model to study respiratory syncytial virus infections," *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 8, no. 12, pp. 1371–1380, 2010.
- [16] R. Ochola, C. Sande, G. Fegan et al., "The level and duration of RSV-specific maternal IgG in infants in Kilifi Kenya," *PLoS One*, vol. 4, no. 12, article e8088, 2009.
- [17] C. J. Sande, P. A. Cane, and D. J. Nokes, "The association between age and the development of respiratory syncytial virus neutralising antibody responses following natural infection in infants," *Vaccine*, vol. 32, no. 37, pp. 4726–4729, 2014.
- [18] M. O. Blanken, M. M. Rovers, J. M. Molenaar et al., "Respiratory syncytial virus and recurrent wheeze in healthy preterm infants," *New England Journal of Medicine*, vol. 368, no. 19, pp. 1791–1799, 2013.
- [19] F. J. Culley, J. Pollott, and P. J. Openshaw, "Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 196, no. 10, pp. 1381–1386, 2002.
- [20] A. Dakhama, J. W. Park, C. Taube et al., "The enhancement or prevention of airway hyperresponsiveness during reinfection with respiratory syncytial virus is critically dependent on the age at first infection and IL-13 production," *Journal of Immunology*, vol. 175, no. 3, pp. 1876–1883, 2005.
- [21] J. C. Schittny, "Development of the lung," *Cell and Tissue Research*, vol. 367, no. 3, pp. 427–444, 2017.
- [22] S. I. Mund, M. Stapanoni, and J. C. Schittny, "Developmental alveolarization of the mouse lung," *Developmental Dynamics*, vol. 237, no. 8, pp. 2108–2116, 2008.
- [23] E. S. Gollwitzer and B. J. Marsland, "Impact of early-life exposures on immune maturation and susceptibility to disease," *Trends in Immunology*, vol. 36, no. 11, pp. 684–696, 2015.
- [24] C. M. Lloyd and B. J. Marsland, "Lung homeostasis: influence of age, microbes, and the immune system," *Immunity*, vol. 46, no. 4, pp. 549–561, 2017.
- [25] M. Guilliams, I. De Kleer, S. Henri et al., "Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 210, no. 10, pp. 1977–1992, 2013.
- [26] C. Schneider, S. P. Nobs, M. Kurrer, H. Rehrauer, C. Thiele, and M. Kopf, "Induction of the nuclear receptor PPAR- $\gamma$  by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages," *Nature Immunology*, vol. 15, no. 11, pp. 1026–1037, 2014.
- [27] I. M. de Kleer, M. Kool, M. J. de Bruijn et al., "Perinatal activation of the interleukin-33 pathway promotes type 2 immunity in the developing lung," *Immunity*, vol. 45, no. 6, pp. 1285–1298, 2016.
- [28] B. L. Manroe, A. G. Weinberg, C. R. Rosenfeld, and R. Browne, "The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells," *The Journal of Pediatrics*, vol. 95, no. 1, pp. 89–98, 1979.
- [29] H. S. Deshmukh, Y. Liu, O. R. Menkiti et al., "The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice," *Nature Medicine*, vol. 20, no. 5, pp. 524–530, 2014.
- [30] S. Saluzzo, A. D. Gorki, B. M. J. Rana et al., "First-breath-induced type 2 pathways shape the lung immune environment," *Cell Reports*, vol. 18, no. 8, pp. 1893–1905, 2017.
- [31] A. M. Miller, "Role of IL-33 in inflammation and disease," *Journal of Inflammation*, vol. 8, no. 1, p. 22, 2011.
- [32] J. Lu, J. Kang, C. Zhang, and X. Zhang, "The role of IL-33/ST2L signals in the immune cells," *Immunology Letters*, vol. 164, no. 1, pp. 11–17, 2015.
- [33] H. Spits, D. Artis, M. Colonna et al., "Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature," *Nature Reviews Immunology*, vol. 13, no. 2, pp. 145–149, 2013.
- [34] G. Gasteiger, X. Fan, S. Dikiy, S. Y. Lee, and A. Y. Rudensky, "Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs," *Science*, vol. 350, no. 6263, pp. 981–985, 2015.
- [35] C. H. Kim, S. Hashimoto-Hill, and M. Kim, "Migration and tissue tropism of innate lymphoid cells," *Trends in Immunology*, vol. 37, no. 1, pp. 68–79, 2016.
- [36] C. Gregoire, L. Chasson, C. Luci et al., "The trafficking of natural killer cells," *Immunological Reviews*, vol. 220, pp. 169–182, 2007.
- [37] M. Greter, J. Helft, A. Chow et al., "GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells," *Immunity*, vol. 36, no. 6, pp. 1031–1046, 2012.
- [38] X. Roux, A. Remot, A. Petit-Camurdan et al., "Neonatal lung immune responses show a shift of cytokines and transcription factors toward Th2 and a deficit in conventional and plasmacytoid dendritic cells," *European Journal of Immunology*, vol. 41, no. 10, pp. 2852–2861, 2011.
- [39] J. Han, A. Dakhama, Y. Jia et al., "Responsiveness to respiratory syncytial virus in neonates is mediated through thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 130, no. 5, pp. 1175–1186.e9, 2012.
- [40] C. M. Sun, E. Deriaud, C. Leclerc, and R. Lo-Man, "Upon TLR9 signaling, CD5<sup>+</sup> B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs," *Immunity*, vol. 22, no. 4, pp. 467–477, 2005.
- [41] D. Zhivaki, S. Lemoine, A. Lim et al., "Respiratory syncytial virus infects regulatory B cells in human neonates via chemokine receptor CX3CR1 and promotes lung disease severity," *Immunity*, vol. 46, no. 2, pp. 301–314, 2017.
- [42] E. S. Gollwitzer, S. Saglani, A. Trompette et al., "Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1," *Nature Medicine*, vol. 20, no. 6, pp. 642–647, 2014.
- [43] A. Remot, D. Descamps, M. L. Noordine et al., "Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice," *The ISME Journal*, vol. 11, no. 5, pp. 1061–1074, 2017.
- [44] Y. Yun, G. Srinivas, S. Kuenzel et al., "Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, article e113466, 2014.
- [45] T. Olszak, D. An, S. Zeissig et al., "Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function," *Science*, vol. 336, no. 6080, pp. 489–493, 2012.

- [46] T. Gensollen, S. S. Iyer, D. L. Kasper, and R. S. Blumberg, "How colonization by microbiota in early life shapes the immune system," *Science*, vol. 352, no. 6285, pp. 539–544, 2016.
- [47] C. Johansson, "Respiratory syncytial virus infection: an innate perspective," *F1000Research*, vol. 5, p. 2898, 2016.
- [48] T. H. Kim and H. K. Lee, "Innate immune recognition of respiratory syncytial virus infection," *BMB Reports*, vol. 47, no. 4, pp. 184–191, 2014.
- [49] N. Marr, S. E. Turvey, and N. Grandvaux, "Pathogen recognition receptor crosstalk in respiratory syncytial virus sensing: a host and cell type perspective," *Trends in Microbiology*, vol. 21, no. 11, pp. 568–574, 2013.
- [50] R. Zeng, Y. Cui, Y. Hai, and Y. Liu, "Pattern recognition receptors for respiratory syncytial virus infection and design of vaccines," *Virus Research*, vol. 167, no. 2, pp. 138–145, 2012.
- [51] E. A. Kurt-Jones, L. Popova, L. Kwinn et al., "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus," *Nature Immunology*, vol. 1, no. 5, pp. 398–401, 2000.
- [52] L. M. Haynes, D. D. Moore, E. A. Kurt-Jones, R. W. Finberg, L. J. Anderson, and R. A. Tripp, "Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus," *Journal of Virology*, vol. 75, no. 22, pp. 10730–10737, 2001.
- [53] S. Ehl, R. Bischoff, T. Ostler et al., "The role of Toll-like receptor 4 versus interleukin-12 in immunity to respiratory syncytial virus," *European Journal of Immunology*, vol. 34, no. 4, pp. 1146–1153, 2004.
- [54] L. Armstrong, A. R. Medford, K. M. Uppington et al., "Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 31, no. 2, pp. 241–245, 2004.
- [55] K. Suzuki, T. Suda, T. Naito, K. Ide, K. Chida, and H. Nakamura, "Impaired toll-like receptor 9 expression in alveolar macrophages with no sensitivity to CpG DNA," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 171, no. 7, pp. 707–713, 2005.
- [56] M. Vareille, E. Kieninger, M. R. Edwards, and N. Regamey, "The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 24, no. 1, pp. 210–229, 2011.
- [57] K. A. Shirey, L. M. Pletneva, A. C. Puche et al., "Control of RSV-induced lung injury by alternatively activated macrophages is IL-4R $\alpha$ -, TLR4-, and IFN- $\beta$ -dependent," *Mucosal Immunology*, vol. 3, no. 3, pp. 291–300, 2010.
- [58] M. R. Murawski, G. N. Bowen, A. M. Cerny et al., "Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2," *Journal of Virology*, vol. 83, no. 3, pp. 1492–1500, 2009.
- [59] G. F. Sonnenberg and D. Artis, "Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation," *Nature Medicine*, vol. 21, no. 7, pp. 698–708, 2015.
- [60] T. Ishii, K. Hosoki, Y. Niikura, T. Nagase, and N. Yamashita, "The activation of pulmonary type2 innate lymphoid cells through toll-like receptors," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 195, article AS284, 2017.
- [61] B. D. Rudd, E. Burstein, C. S. Duckett, X. Li, and N. W. Lukacs, "Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 6, pp. 3350–3357, 2005.
- [62] L. Guillot, R. Le Goffic, S. Bloch et al., "Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 7, pp. 5571–5580, 2005.
- [63] F. Qi, D. Wang, J. Liu et al., "Respiratory macrophages and dendritic cells mediate respiratory syncytial virus-induced IL-33 production in TLR3- or TLR7-dependent manner," *International Immunopharmacology*, vol. 29, no. 2, pp. 408–415, 2015.
- [64] T. Demoor, B. C. Petersen, S. Morris et al., "IPS-1 signaling has a nonredundant role in mediating antiviral responses and the clearance of respiratory syncytial virus," *Journal of Immunology*, vol. 189, no. 12, pp. 5942–5953, 2012.
- [65] N. W. Lukacs, J. J. Smit, S. Mukherjee, S. B. Morris, G. Nunez, and D. M. Lindell, "Respiratory virus-induced TLR7 activation controls IL-17-associated increased mucus via IL-23 regulation," *Journal of Immunology*, vol. 185, no. 4, pp. 2231–2239, 2010.
- [66] S. Phipps, C. E. Lam, S. Mahalingam et al., "Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus," *Blood*, vol. 110, no. 5, pp. 1578–1586, 2007.
- [67] J. Schlender, V. Hornung, S. Finke et al., "Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 9, pp. 5507–5515, 2005.
- [68] Y. M. Loo, J. Fornek, N. Crochet et al., "Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity," *Journal of Virology*, vol. 82, no. 1, pp. 335–345, 2008.
- [69] N. Marr, T. I. Wang, S. H. Kam et al., "Attenuation of respiratory syncytial virus-induced and RIG-I-dependent type I IFN responses in human neonates and very young children," *Journal of Immunology*, vol. 192, no. 3, pp. 948–957, 2014.
- [70] M. Goritzka, S. Makris, F. Kausar et al., "Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 212, no. 5, pp. 699–714, 2015.
- [71] A. Sabbah, T. H. Chang, R. Harnack et al., "Activation of innate immune antiviral responses by Nod2," *Nature Immunology*, vol. 10, no. 10, pp. 1073–1080, 2009.
- [72] V. G. Bhoj, Q. Sun, E. J. Bhoj et al., "MAVS and MyD88 are essential for innate immunity but not cytotoxic T lymphocyte response against respiratory syncytial virus," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 37, pp. 14046–14051, 2008.
- [73] S. Makris, M. Bajorek, F. J. Culley, M. Goritzka, and C. Johansson, "Alveolar macrophages can control respiratory syncytial virus infection in the absence of type I interferons," *Journal of Innate Immunity*, vol. 8, no. 5, pp. 452–463, 2016.
- [74] A. A. Awomoyi, P. Rallabhandi, T. I. Pollin et al., "Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 5, pp. 3171–3177, 2007.
- [75] G. Tal, A. Mandelberg, I. Dalal et al., "Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 189, no. 11, pp. 2057–2063, 2004.

- [76] M. K. Tulic, R. J. Hurrelbrink, C. M. Prêle et al., "TLR4 polymorphisms mediate impaired responses to respiratory syncytial virus and lipopolysaccharide," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 1, pp. 132–140, 2007.
- [77] M. Ramet, M. Korppi, and M. Hallman, "Pattern recognition receptors and genetic risk for rsv infection: value for clinical decision-making?," *Pediatric Pulmonology*, vol. 46, no. 2, pp. 101–110, 2011.
- [78] N. Marr, A. F. Hirschfeld, A. Lam, S. Wang, P. M. Lavoie, and S. E. Turvey, "Assessment of genetic associations between common single nucleotide polymorphisms in RIG-I-like receptor and IL-4 signaling genes and severe respiratory syncytial virus infection in children: a candidate gene case-control study," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, article e100269, 2014.
- [79] M. T. Caballero, M. E. Serra, P. L. Acosta et al., "TLR4 genotype and environmental LPS mediate RSV bronchiolitis through Th2 polarization," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 125, no. 2, pp. 571–582, 2015.
- [80] T. R. Kollmann, O. Levy, R. R. Montgomery, and S. Goriely, "Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly," *Immunity*, vol. 37, no. 5, pp. 771–783, 2012.
- [81] K. Gabehart, K. A. Correll, J. E. Loader, C. W. White, and A. Dakhama, "The lung response to ozone is determined by age and is partially dependent on toll-like receptor 4," *Respiratory Research*, vol. 16, p. 117, 2015.
- [82] K. Harju, M. Ojaniemi, S. Rounioja et al., "Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period," *Pediatric Research*, vol. 57, no. 5, Part 1, pp. 644–648, 2005.
- [83] J. S. Tregoning, Y. Yamaguchi, J. Harker, B. Wang, and P. J. Openshaw, "The role of T cells in the enhancement of respiratory syncytial virus infection severity during adult reinfection of neonatally sensitized mice," *Journal of Virology*, vol. 82, no. 8, pp. 4115–4124, 2008.
- [84] A. F. Christiaansen, C. J. Knudson, K. A. Weiss, and S. M. Varga, "The CD4 T cell response to respiratory syncytial virus infection," *Immunologic Research*, vol. 59, no. 1–3, pp. 109–117, 2014.
- [85] T. J. Ruckwardt, A. M. Malloy, K. M. Morabito, and B. S. Graham, "Quantitative and qualitative deficits in neonatal lung-migratory dendritic cells impact the generation of the CD8+ T cell response," *PLoS Pathogens*, vol. 10, no. 2, article e1003934, 2014.
- [86] S. A. Cormier, B. Shrestha, J. Saravia et al., "Limited type I interferons and plasmacytoid dendritic cells during neonatal respiratory syncytial virus infection permit immunopathogenesis upon reinfection," *Journal of Virology*, vol. 88, no. 16, pp. 9350–9360, 2014.
- [87] A. Remot, D. Descamps, L. Jouneau et al., "Flt3 ligand improves the innate response to respiratory syncytial virus and limits lung disease upon RSV reexposure in neonate mice," *European Journal of Immunology*, vol. 46, no. 4, pp. 874–884, 2016.
- [88] M. Goritzka, L. R. Durant, C. Pereira, S. Salek-Ardakani, P. J. Openshaw, and C. Johansson, "Alpha/beta interferon receptor signaling amplifies early proinflammatory cytokine production in the lung during respiratory syncytial virus infection," *Journal of Virology*, vol. 88, no. 11, pp. 6128–6136, 2014.
- [89] T. R. Johnson, S. E. Mertz, N. Gitiban et al., "Role for innate IFNs in determining respiratory syncytial virus immunopathology," *Journal of Immunology*, vol. 174, no. 11, pp. 7234–7241, 2005.
- [90] K. M. Eichinger, L. Egaña, J. G. Orend et al., "Alveolar macrophages support interferon gamma-mediated viral clearance in RSV-infected neonatal mice," *Respiratory Research*, vol. 16, p. 122, 2015.
- [91] P. K. Pribul, J. Harker, B. Wang et al., "Alveolar macrophages are a major determinant of early responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development," *Journal of Virology*, vol. 82, no. 9, pp. 4441–4448, 2008.
- [92] D. Kolli, M. R. Gupta, E. Sbrana et al., "Alveolar macrophages contribute to the pathogenesis of human metapneumovirus infection while protecting against respiratory syncytial virus infection," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 51, no. 4, pp. 502–515, 2014.
- [93] T. Hussell and T. J. Bell, "Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context," *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, no. 2, pp. 81–93, 2014.
- [94] D. M. Mosser and J. P. Edwards, "Exploring the full spectrum of macrophage activation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 12, pp. 958–969, 2008.
- [95] K. M. Empey, J. G. Orend, R. S. Peebles Jr. et al., "Stimulation of immature lung macrophages with intranasal interferon gamma in a novel neonatal mouse model of respiratory syncytial virus infection," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, article e40499, 2012.
- [96] J. Saravia, D. You, B. Shrestha et al., "Respiratory syncytial virus disease is mediated by age-variable IL-33," *PLoS Pathogens*, vol. 11, no. 10, article e1005217, 2015.
- [97] M. L. Garcia-Garcia, C. Calvo, A. Moreira et al., "Thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and periostin in hospitalized infants with viral bronchiolitis," *Medicine*, vol. 96, no. 18, article e6787, 2017.
- [98] M. T. Stier, M. H. Bloodworth, S. Toki et al., "Respiratory syncytial virus infection activates IL-13-producing group 2 innate lymphoid cells through thymic stromal lymphopoietin," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 138, no. 3, pp. 814–824.e11, 2016.
- [99] S. Sattler, G. S. Ling, D. Xu et al., "IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg<sup>IL-33</sup>) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut," *Journal of Autoimmunity*, vol. 50, pp. 107–122, 2014.
- [100] Y. Yamaguchi, J. A. Harker, B. Wang, P. J. Openshaw, J. S. Tregoning, and F. J. Culley, "Preexposure to CpG protects against the delayed effects of neonatal respiratory syncytial virus infection," *Journal of Virology*, vol. 86, no. 19, pp. 10456–10461, 2012.
- [101] M. S. Boukhvalova, T. B. Sotomayor, R. C. Point, L. M. Pletneva, G. A. Prince, and J. C. Blanco, "Activation of interferon response through toll-like receptor 3 impacts viral pathogenesis and pulmonary toll-like receptor expression during respiratory syncytial virus and influenza infections in the cotton rat *Sigmodon hispidus* model," *Journal of Interferon & Cytokine Research*, vol. 30, no. 4, pp. 229–242, 2010.
- [102] S. Challa, A. Sheri, S. Padmanabhan et al., "Prophylactic and therapeutic anti-RSV activity of SB 9200 – a novel agent that activates RIG-I and NOD2," in *Spring Bank Pharmaceuticals Presents Data on Immunomodulatory Agent SB 9200 at the 29th International Conference on Antiviral Research*, La Jolla, CA, 2016.

- [103] K. K. Tekkanat, H. F. Maassab, D. S. Cho et al., "IL-13-induced airway hyperreactivity during respiratory syncytial virus infection is STAT6 dependent," *Journal of Immunology*, vol. 166, no. 5, pp. 3542–3548, 2001.
- [104] G. M. Gauvreau, P. M. O'Byrne, L. P. Boulet et al., "Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses," *New England Journal of Medicine*, vol. 370, no. 22, pp. 2102–2110, 2014.
- [105] E. H. De Boever, C. Ashman, A. P. Cahn et al., "Efficacy and safety of an anti-IL-13 mAb in patients with severe asthma: a randomized trial," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 133, no. 4, pp. 989–996, 2014.
- [106] B. Shrestha, D. You, J. Saravia et al., "IL-4R $\alpha$  on dendritic cells in neonates and Th2 immunopathology in respiratory syncytial virus infection," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 102, no. 1, pp. 153–161, 2017.
- [107] M. J. Ripple, D. You, S. Honnegowda et al., "Immunomodulation with IL-4R $\alpha$  antisense oligonucleotide prevents respiratory syncytial virus-mediated pulmonary disease," *Journal of Immunology*, vol. 185, no. 8, pp. 4804–4811, 2010.
- [108] B. T. Srinivasa, K. H. Restori, J. Shan et al., "STAT6 inhibitory peptide given during RSV infection of neonatal mice reduces exacerbated airway responses upon adult reinfection," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 101, no. 2, pp. 519–529, 2017.
- [109] Y. M. Lee, N. Miyahara, K. Takeda et al., "IFN- $\gamma$  production during initial infection determines the outcome of reinfection with respiratory syncytial virus," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 177, no. 2, pp. 208–218, 2008.
- [110] K. M. Eichinger, E. Resetar, J. Orend, K. Anderson, and K. M. Empey, "Age predicts cytokine kinetics and innate immune cell activation following intranasal delivery of IFN $\gamma$  and GM-CSF in a mouse model of RSV infection," *Cytokine*, vol. 97, pp. 25–37, 2017.
- [111] J. P. Lynch, M. A. Sikder, B. F. Curren et al., "The influence of the microbiome on early-life severe viral lower respiratory infections and asthma—food for thought?," *Frontiers in Immunology*, vol. 8, p. 156, 2017.
- [112] J. Villena, S. Salva, M. Núñez et al., "Probiotics for everyone! The novel immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and the beginning of social probiotic programs in Argentina," *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, vol. 1, no. 3, pp. 189–198, 2012.
- [113] J. Villena, E. Chiba, Y. Tomosada et al., "Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C)," *BMC Immunology*, vol. 13, p. 53, 2012.
- [114] E. Chiba, Y. Tomosada, M. G. Vizoso-Pinto et al., "Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice against respiratory syncytial virus infection," *International Immunopharmacology*, vol. 17, no. 2, pp. 373–382, 2013.
- [115] Y. Tomosada, E. Chiba, H. Zelaya et al., "Nasally administered *Lactobacillus rhamnosus* strains differentially modulate respiratory antiviral immune responses and induce protection against respiratory syncytial virus infection," *BMC Immunology*, vol. 14, p. 40, 2013.
- [116] W. A. de Steenhuijsen Piters, S. Heinonen, R. Hasrat et al., "Nasopharyngeal microbiota, host transcriptome, and disease severity in children with respiratory syncytial virus infection," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 194, no. 9, pp. 1104–1115, 2016.
- [117] S. M. Teo, D. Mok, K. Pham et al., "The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development," *Cell Host & Microbe*, vol. 17, no. 5, pp. 704–715, 2015.

## Author(s) Name(s)

It is very important to confirm the author(s) last and first names in order to be displayed correctly on our website as well as in the indexing databases:

**Author 1**

Given Names: Carole

Last Name: Drajac

**Author 2**

Given Names: Daphné

Last Name: Laubreton

**Author 3**

Given Names: Sabine

Last Name: Riffault

**Author 4**

Given Names: Delphyne

Last Name: Descamps

It is also very important for each author to provide an ORCID (Open Researcher and Contributor ID). ORCID aims to solve the name ambiguity problem in scholarly communications by creating a registry of persistent unique identifiers for individual researchers.

To register an ORCID, please go to the Account Update page (<http://mts.hindawi.com/update/>) in our Manuscript Tracking System and after you have logged in click on the ORCID link at the top of the page. This link will take you to the ORCID website where you will be able to create an account for yourself. Once you have done so, your new ORCID will be saved in our Manuscript Tracking System automatically.



**Titre :** Caractérisation et modulation de la réponse immunitaire innée au cours de l'infection par le Virus Respiratoire Syncytial en période néonatale

**Mots clés :** VRS - Immunité innée - Nouveau-nés - Macrophages alvéolaires - IRAP - Microbiote pulmonaire

**Résumé :** Le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) est responsable de 70 % des cas de bronchiolite chez les enfants de moins de cinq ans. La survenue de bronchiolites sévères chez le nourrisson est un facteur de risque de développement d'asthme en grandissant. Aucun vaccin contre le VRS n'est disponible chez l'Homme.

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense de l'organisme contre les infections. De plus, en interaction avec la flore bactérienne commensale des poumons, l'immunité innée participe à la maturation de la réponse immunitaire adaptative qui confère à l'individu une protection sur le long terme vis-à-vis des pathogènes.

Afin d'expliquer la susceptibilité néonatale au VRS, nous avons caractérisé un nouveau mécanisme de contrôle de la réponse innée antivirale lors de l'infection de souris. Nous avons également testé une nouvelle approche de modulation de la réponse immunitaire au VRS par le microbiote pulmonaire.

Ainsi, mieux comprendre les mécanismes immunologiques et virologiques responsables de bronchiolites sévères en période néonatale permettra de développer des moyens de lutte sûrs et efficaces contre l'infection par le VRS.

**Title :** Characterization and modulation of the innate immune response following Respiratory Syncytial Virus infection during the neonatal period

**Keywords :** RSV - Innate immunity - Neonates - Alveolar macrophages - IRAP - Lung microbiota

**Abstract :** Respiratory Syncytial Virus (RSV) is responsible for 70 % of bronchiolitis in children under five years old. Severe bronchiolitis in infants is a risk factor for asthma development. No vaccine against RSV is available in humans.

The innate immune system is the first line of defense against infections. Moreover, in interaction with lung microbiota, innate immunity shapes adaptive immune response responsible for long-term protection against pathogens.

To explain the susceptibility of young children

to RSV, we characterized a novel regulatory mechanism of the innate antiviral response during neonatal RSV infection in the murine model.

We also tested a new approach for modulating immune responses to RSV by the pulmonary microbiota.

Thus, a better understanding of immunological and virological mechanisms responsible for severe bronchiolitis during the neonatal period will allow the development of safe and effective therapeutic strategies against RSV infection.