



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la muqueuse pulmonaire et des réponses immunitaires innées associées à l'infection au début de la vie par le Virus Respiratoire Syncytial

Delphyne Descamps

► **To cite this version:**

Delphyne Descamps. Caractérisation de la muqueuse pulmonaire et des réponses immunitaires innées associées à l'infection au début de la vie par le Virus Respiratoire Syncytial. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris-Saclay, 2023. tel-04208294

**HAL Id: tel-04208294**

**<https://hal.inrae.fr/tel-04208294>**

Submitted on 15 Sep 2023

**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 de la muqueuse pulmonaire  
et des réponses immunitaires innées  
associées à l'infection au début de la vie  
par le Virus Respiratoire Syncytial

**Habilitation à diriger des recherches  
de l'Université Paris-Saclay**

**présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 28 juin 2023, par**

**Delphyne DESCAMPS**

**Composition du jury**

<b>Sophie BROUARD</b> DR, CNRS, Nantes	Rapporteuse
<b>Sonia LACROIX-LAMANDE</b> CRCN, INRAE, Nouzilly	Rapporteuse
<b>François TROTTEIN</b> DR, CNRS, Institut Pasteur de Lille	Rapporteur
<b>Karim BENIHOUD</b> PR, CNRS, Université Paris-Saclay	Examineur
<b>Antoine MAGNAN</b> PU-PH, Foch-UVSQ, INRAE	Examineur
<b>Mustapha SI-TAHAR</b> DR, INSERM, Université de Tours	Examineur

# SOMMAIRE

<b>1. CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>3</b>
<b>2. TRAVAUX DE RECHERCHE ANTERIEURS.....</b>	<b>9</b>
2.1 INFLAMMATION HEPATIQUE ET VECTOROLOGIE ADENOVIRALE (DOCTORAT) .....	9
2.1.1 <i>Développement d'antagonistes de récepteurs de la famille du TNF/TNFR.....</i>	10
2.1.2 <i>Rôle du TNF-<math>\alpha</math> et de l'IL-6 dans les réponses anti-adénovirus.....</i>	11
2.1.3 <i>Contrôle du tropisme hépatique de l'adénovirus par modification de la capsid.....</i>	11
2.2 ROLE DU TLR5 DANS L'ELIMINATION DE P.A. PAR LES MACROPHAGES (POST-DOC 1) .....	12
2.3 CONTROLE DE L'ACTIVATION DE TLRs ENDOSOMAUX PAR DES PEPTIDASES (POST-DOC 2) .....	14
2.3.1 <i>Contrôle de l'activation du TLR7 lors d'une infection par le virus de la grippe .....</i>	14
2.3.2 <i>Implication d'IRAP dans le contrôle de la maturation phagosomale et de l'activation du TLR9.....</i>	16
<b>3. PROJETS DE RECHERCHE MENES A L'INRAE .....</b>	<b>17</b>
3.1 CONTEXTE SCIENTIFIQUE .....	18
3.1.1 <i>La muqueuse pulmonaire en période perinatale : un environnement particulier en pleine evolution.....</i>	18
3.1.2 <i>Le virus respiratoire syncytial (VRS) et les bronchopneumopathies chez le jeune. ....</i>	20
3.1.3 <i>L'hyper-sensibilité du nouveau-né à l'infection pulmonaire par le VRS. ....</i>	20
3.2 RESULTATS OBTENUS .....	22
3.2.1 <i>Thématique 1 : Caractérisation des cellules composant la muqueuse pulmonaire et de leur réactivité lors de l'infection par le VRS. ....</i>	23
3.2.2 <i>Thématique 2 : Implication des protéines IRAP et TAX1BP1 dans le contrôle de la production des IFN-I et des cytokines au cours de l'infection par le VRS. ....</i>	26
3.2.3 <i>Thématique 3 : Identification des interactions fonctionnelles entre microbiote pulmonaire &amp; immunité perinatale. ....</i>	29
3.3 PROJETS EN COURS & PERSPECTIVES .....	31
3.3.1 <i>Thématique 1 : L'autophagie comme mécanisme de régulation de la réponse IFN-I par la protéines IRAP &amp; TAX1BP1 au cours de l'infection par le VRS dans les AMs. ....</i>	31
3.3.2 <i>Thématique 2 : Impact &amp; modulation du microbiote pulmonaire sur l'immunité néonatale et la sensibilité à l'infection par le VRS .....</i>	32
3.3.3 <i>Thématique 3 : Developpement d'outils et caractérisation de la reactivité des cellules epitheliales et des AMs composant la muqueuse pulmonaire des veaux. ....</i>	35
<b>4. CONCLUSION.....</b>	<b>41</b>
4.1 PARCOURS SCIENTIFIQUE .....	41
4.2 ENCADREMENT DEPUIS MON RECRUTEMENT A L'INRAE .....	42
<b>5. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>43</b>

# 1. CURRICULUM VITAE

## Delphyne DESCAMPS

43 ans, 2 enfants  
Nationalité française

✉ : [delphyne.descamps@inrae.fr](mailto:delphyne.descamps@inrae.fr)

☎ : 01 34 65 26 10

## SITUATION ACTUELLE

---

### Chargée de Recherche Classe Normale, INRAE Jouy-en-Josas

Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires  
Equipe Vaccins, Immunopathologie, Immunomodulation (V2I)  
INRAE – Centre de Recherche Ile-de-France – Jouy-en-josas  
78352 Jouy-en-josas

## PARCOURS ACADEMIQUE

---

**2007 DOCTORAT Thérapeutiques Biotechnologiques.** Ecole doctorale Biologie et biotechnologies Université Denis Diderot - PARIS VII, *mention Très Honorable avec félicitations orales du jury.*

Financements : Allocation de recherche MENRT (2002-2005) et Vaincre la Mucoviscidose (2006) puis Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (2007).

**2002 DEA Thérapeutiques Biotechnologiques,** Université Denis Diderot - PARIS VII, *mention Bien (3<sup>e</sup>/12).*

**2001 Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie,** Université PARIS XII, *mention Bien (5<sup>e</sup>/80).*

**2000 Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie,** Université PARIS XII, *mention Assez Bien (11<sup>e</sup>/140).*

**1999 DUT de Génie Biologique,** analyses biologiques et biochimiques, I.U.T. PARIS XII, *rang 8<sup>e</sup>/45.*

## PARCOURS PROFESSIONNEL

---

**Depuis 2018- : Chargée de Recherche Classe Normale (Ex niveau CR 1 – INRAE UMR892, Jouy-en-Josas.** Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, Equipe Vaccins, Immunopathologie, Immunomodulation (V2I).

Sujet : *Mécanismes immunologiques et inflammatoires associés à la sévérité des infections pulmonaires par le VRS chez le jeune animal.*

**2013-2017 : Chargée de Recherche 2 – INRAE UMR892, Jouy-en-Josas.** Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, Equipe Vaccins, Immunopathologie, Immunomodulation (V2I).

Sujet : *Mécanismes immunologiques associés à la sensibilisation immunopathologique et à la sévérité des infections pulmonaires par le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) chez le jeune animal (modèles murins et bovins).*

**2011-2013 : Chercheur post-doctorant – INSERM U1013 – Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris,** Dr B. Manoury.

Sujet : *Identification de peptidases endosomales impliquées dans l'activation des Toll-Like Recepteurs lors de pneumopathies infectieuses d'origines virales (virus de la grippe) ou bactériennes (Pseudomonas aeruginosa).*

**2008-2011 : Chercheur post-doctorant – INSERM U874, Institut Pasteur, Paris, Dr J-M. Sallenave.**

Sujet : *Importance du Toll-Like Recepteur 5 dans l'élimination de Pseudomonas aeruginosa par les macrophages alvéolaires.*

**2002-2007 : Chercheur doctorant et ATER – CNRS UMR8121, Institut Gustave Roussy, Villejuif, Pr K. Benihoud.**

Sujet : *Rôle des molécules d'apoptose de la famille du TNF dans l'hépatite auto-immune induite par la concanavaline A et l'hépatite associée au transfert de gènes par les adénovirus recombinants.*

## **ACTIVITES TRANSVERSALES & RESPONSABILITES ADMINISTRATIVES**

---

- **Membre nommée du jury pour le prix Michel Chignard** (Association Vaincre La Mucoviscidose, depuis 2022).
- **Jury de INRAE concours CRCN sur profil** (2021).
- **Évaluatrice pour la Fondation du Souffle** (2022), **Société Française d'Allergologie** (2022) et **l'agence ANR** (2021).
- **Animation scientifique :**
  - o Organisation de réunions hebdomadaires inter-équipes de l'unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, depuis janvier 2015.
  - o Comité d'organisation des « Journées d'Animations Scientifiques » du département Santé Animale. 18 au 20 Octobre 2022
  - o Comité d'organisation du « séminaire interne SAPS 2021 ». 6 au 8 septembre 2021
  - o Comité d'organisation du séminaire « Organoïdes INRAE ». 22 juin 2021 et 23 et 24 juin 2022.
  - o Comité d'organisation de la journée d'animation du Projet Phare 3 « Nouvelles stratégies pour la santé animale et la santé publique » de l'Institut Sciences Animales Paris Saclay (SAPS). Septembre 2018.
- **Membre du groupe de travail « encadrants Ecole Doctorale ABIÉS »** (2014-2018).
- **Représentante au Conseil Académique – Département Sciences de la Vie – Université Paris-Saclay** (2015-2019)
- **Experte scientifique** pour des projets menés par les sociétés LFB Biotechnologies et Pileje.
- **Co-responsable scientifique du plateau technique d'imagerie *in vivo* L2-IVIS** (INRAE, Emerg'in, Centre de recherche de Jouy-en-Josas).
- **Habilitation d'expérimentation animale** (Niveau 1), 2007.
- **Relectrice** pour les journaux : *Immunotherapy, Frontiers in Immunology : Comparative Immunology, Microorganisms.*

## **ENSEIGNEMENTS & ENCADREMENT**

---

### **Enseignements**

**2006/07 : Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche** (temps complet).

**2002/06 et depuis 2008 : Agent vacataire d'enseignements** (446 heures équivalent TD).

Universités de Cergy-Pontoise, Paris-Sud et Paris-Est

Cours magistraux, travaux dirigés et pratiques, niveau Licence 3, Licence Professionnelle, Master 1 et 2

Disciplines : Immunologie, Biologie Cellulaire et Moléculaire, Thérapie Génique, Bureautique

### **Activités d'encadrement et de formation**

- Co-encadrement de doctorantes : C. Drajac (2014-2018), C. Chottin (2021-2024).
- Encadrement de 6 étudiantes de Master 2 ou d'école d'ingénieurs depuis 2013 (C. Drajac 2013, V. Graf 2016, S. Madrières 2017, M. Prost 2019, A. Mialet 2020, A. Dubard 2023).

## **Activités d'accompagnement de la formation doctorale**

- **Jury de concours de l'école doctorale Science de la Vie et de la Santé (SVS).** Université Paris-Est-Créteil (Juillet 2021).
- **Jury de thèse (Examinatrice) :**
  - o Nicolas Sailliet, Université de Nantes. « Caractérisation transcriptomique et fonctionnelle des lymphocytes B régulateurs ». Soutenance en avril 2023 au Centre de Recherche Translationnelle en Transplantation et Immunologie (CR2TI), Soutenance Avril 2023, Nantes.
  - o Eléonore Dijoux, Université de Nantes. Soutenance en juillet 2022 au CR2TI, Nantes.
  - o Linda Ramdani. Université Paris-Saclay, Ecole Doctorale Cancérologie : biologie-médecine-santé. Soutenance décembre 2019 à l'Institut Gustave Roussy.
  - o Patricia Cunha. Thèse EPHE Septembre 2019 à l'INRAE Nouzilly.
- **Comité de suivi de thèse :**
  - o Salomé Laurans (2021 - en cours) : « Etude des interactions phagocytes-adénovirus ». CNRS, Université Paris-Saclay.
  - o Angélique Corser (2022 – en cours). Unité PEGASE, INRAE, Rennes.
  - o Braga Cohen Sarah (2021 – en cours) : IRSN
  - o Carla Gouin (2020 – en cours) : « Etude des interactions du virus SARS-Cov2 sur les cellules immunitaires du poumon lors des premières heures d'exposition ». INRAE, Université Paris-Saclay.
  - o Marion Rambault (2020- 2023) : « Rôle des neutrophiles dans le contrôle des mammites chez l'animal cible et modèle ». Unité ISP, INRAE, Nouzilly, Université de Tours.
- **Tuteur de projet de recherche en master 1** depuis 2018 – Immunologie Moléculaire et Cellulaire, Université Paris-Saclay.

## **FINANCEMENTS**

---

### **Contrats de recherche obtenus en tant qu'investisseur principal :**

- Projet Recherche « Vaincre la Mucoviscidose » (2022) : projet RESPIBIOTE.
- Projet créativité – Département Santé Animale INRAE (2020) : projet MetaBov.
- DIM OneHealth Ile-de-France gros équipement (2019) : financement d'un appareil IVIS-Spectrum.
- Donation de la Fondation Air Liquide (2019-2020) : projet RESPIBIOTE.
- DIM OneHealth Ile-de-France projet collaboratif (2018-2020) : financement contrat post-doctoral pour projet RESPIBIOTE.
- DIM OneHealth Ile-de-France équipement (2018) : financement d'un appareil Luminex MagPix.
- Projet Jeune Chercheur – Département Santé Animal INRA (2014).

### **Contrats de recherche obtenus en tant que partenaire :**

- ANR Générique projet SARDINN (2022-2026)
- ANR Flash Covid 19 (2020-2022)
- APIGENE projet HealthyCalf (2018-2020)
- ANR Blanc projet EpiLungCell (2018-2021)
- ANR Blanc SyncBreg (2013-2016)

## **PUBLICATIONS ET AUTRES VALORISATION DE CONNAISSANCES ORIGINALES**

---

### **Articles publiés dans des revues à comité de lecture**

1. Fix J, **Descamps D**, Galloux M, Ferret C, Bouguyon E, Zohari S, Näslund K, Hägglund S, Altmeyer R, Valarcher J-F, Riffault S & Eléouët J-F. A mCherry-expression recombinant Bovine REspiratory Syncytial Virus for antiviral screening: a proof of concept using cyclopamine. **Vet Research**. **2023**, *in press*.
2. Mathieu E, Marquant Q, Chain F, Bouguyon E, Saint-Criq V, Le-Goffic R, **Descamps D**, Langella P, Tompkins T, Binda S & Thomas M. An isolate of Streptococcus mitis Displayed In Vitro Antimicrobial Activity and Deleterious Effect in a Preclinical Model of Lung Infection. **Nutrients**. **2023**, 15, 263. <https://doi.org/10.3390/nu15020263>.
3. Mathieu E, Marquant Q, **Descamps D**, Riffault S, Saint-Criq V & Thomas M. The lung is governed by its own local microbiota and the distant intestinal microbiota. **NCM**. **2021**, 35:242-252.
4. **Descamps D**, Peres de Oliveira A, Gonnin L, Madrières S, Fic D, Drajac C, Marquant Q, Bouguyon E, Pietralunga V, Iha H, Morais Ventura A, Tangy F, Vidalain P-O, Eléouët J-F & Galloux M. Depletion of TAX1BP1 amplifies innate immune responses during respiratory syncytial virus infection. **J Virol**. **2021**, Aug 25;JV10091221. <https://doi: 10.1128/JVI.00912-21>. PMID: 34431698.

5. Remot A, Carreras F, Coupé A, Doz Deblauwe E, Boschiroli M L, Browne J, Marquant Q, **Descamps D**, Archer F, Aseffa A, Germon P, Gordon S, Winter N. *Mycobacterial infection of precision cut lung slices reveals that the type 1 interferon pathway is locally induced by Mycobacterium bovis but not M. tuberculosis in different cattle breeds.* **Front. Vet. Science.** **2021**, 8:696525. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.696525>. PMID: 34307535.
6. Jacque E, Chottin C, Laubretton D, Nogre M, Ferret C, de Marcos S, Baptista L, Drajac C, Mondon P, De Romeuf C, Rameix-Welti M-A, Eléouët J-F, Chtourou S, Riffault S, Perret G & **Descamps D**. *Hyper-enriched anti-RSV Immunoglobulins nasally administered: a promising approach for Respiratory Syncytial Virus prophylaxis.* **Front. Immunol.** **2021**, Jun 7;12:683902. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683902>. eCollection 2021. PMID: 34163482.
7. Drajac C, Laubretton D, Marquant Q, Chottin C, Ferret C, Bouguyon E, Schwartz-Cornil I, Saveanu L, Riffault S, **Descamps D**. *Control of IFN- $\gamma$  responses by the aminopeptidase IRAP in neonatal C57BL/6 alveolar macrophages during RSV infection.* **Mucosal Immunol.** **2021**, Apr 12. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00402-w>. PMID: 3846534.
8. Marquant Q, Laubretton D, Drajac C, Mathieu E, Bouguyon E, Noordine ML, Remot A, Riffault S, Thomas M, **Descamps D**. *The microbiota plays a critical role in the reactivity of lung immune components to innate ligands.* **FASEB J.** **2021**, Apr;35(4):e21348. <https://doi.org/10.1096/fj.202002338R>. PMID: 33715218.
9. Frétaud M, **Descamps D**, Laubretton D, Rameix-Welti M-A, Eléouët J-F, Larcher T, Galloux M and Langevin C. *New look at RSV infection : tissue clearing and 3D imaging of the entire mouse lung at cellular resolution.* **Viruses.** **2021**, Janv 28;13(2):201. <https://doi.org/10.3390/v13020201>. PMID: 33525646.
10. **Descamps D**, Evnouchidou I, Caillens V, Drajac C, Riffault S, Van Endert P & Saveanu L. *The Role of Insulin Regulated Aminopeptidase in Endocytic Trafficking and Receptor Signaling Immune Cells.* **Front. Mol. Biosci.** **2020**, 7:583556. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.583556>. PMID:33195428.
11. Laubretton D, Drajac C, Eléouët JF, Rameix-Welti MA, Lo-Man R, Riffault S\*, **Descamps D\***. *Regulatory B Lymphocytes Colonize the Respiratory Tract of Neonatal Mice and Modulate Immune Responses of Alveolar Macrophages to RSV Infection in IL-10-Dependant Manner.* **Viruses.** **2020** Jul 29;12(8):822. <https://doi.org/10.3390/v12080822>. PMID: 32751234
12. Sesterhenn F\*, Yang C\*, Bonet J, Cramer J, Wen X, Wang Y, Chiang C, Abriata L, Kucharska I, Castoro G, Vollers S, Galloux M, Dheilly E, Rosset S, Corthésy P, Georgeon S, Villard M, Richard C-A, **Descamps D**, Delgado T, Oricchio E, Rameix-Welti M-A, Más V, Ervin S, Eléouët J-F, Riffault S, Bates J, Julien J-P, Li Y, Jardetzky T, Krey T, Correia B. *De novo protein design enables the precise induction of RSV-neutralizing antibodies.* **Science.** **2020**. 368, eaay5051. <https://doi.org/10.1126/science.aay5051>. PMID: 32409444.
13. **Descamps D\***, Calzas C\*, Chignard M & Chevalier C. *Editorial: Innovative Therapeutic and Vaccine Approaches Against Respiratory Pathogens.* **Front. Immunol.** **2019**, 10:2960. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02960>.
14. Bryche B, Fretaud M, Saint-Albin Deliot A, Galloux M, Sedano L, Langevin C, **Descamps D**, Rameix-Welti M-A, Eléouët J-F, Le Goffic R & Meunier N. *Respiratory syncytial virus tropism for olfactory sensory neurons in mice.* **J Neurochem.** **2019**. Dec 7:e14936. <https://doi.org/10.1111/jnc.14936>. PMID:31811775
15. Sesterhenn F, Galloux M, Vollers SS, Csepregi L, Yang C, **Descamps D**, Bonet J, Friedensohn S, Gainza P, Corthésy P, Chen M, Rosset S, Rameix-Welti MA, Eléouët JF, Reddy ST, Graham BS, Riffault S & Correia BE. *Boosting subdominant neutralizing antibody responses with a computationally designed epitope-focused immunogen.* **PLoS Biol.** **2019**. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000164>. PMID:30789898.
16. Mathieu E, Escribano-Vazquez U, **Descamps D**, Cherbuy C, Langella P, Riffault S, Remot A & Thomas M. *Paradigms of lung microbiota functions in health and disease, particularly, in asthma.* **Front Physiol.** **2018**. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01168>. PMID:30246806.
17. Bordet E, Maisonnasse P, Renson P, Bouguyon E, Crisci E, Tiret M, **Descamps D**, Bernelin-Cottet C, Urien C, Lefèvre F, Jouneau L, Bourry O, Leplat JJ, Schwartz-Cornil I & Bertho N. *Porcine Alveolar Macrophage-like cells are pro-inflammatory Pulmonary Intravascular Macrophages that produce large titers of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.* **Sci Rep.** **2018**, 8(1) :10172. PMID:29977043.
18. Drajac C, Laubretton D, Riffault S & **Descamps D**. *Pulmonary susceptibility of neonates to respiratory syncytial virus infection : a problem of perinatal innate immunity.* **J Immunol Res.** **2017**, 2017:8734504. <https://doi.org/10.1155/2017/8734504>. PMID:29250560.
19. **Descamps D\***, Babdor J\*, Adiko AC, Tohmé M, Maschalidi S, Evnouchidou I, Vasconcellos LR, De Luca M, Mauvais FX, Garfa-Traore M, Brinkmann MM, Chignard M, Manoury B, Saveanu L. *IRAP<sup>+</sup> endosomes restrict TLR9 activation and signaling.* **Nat Immunol.** **2017**, 18(5) :509-518. PMID:28319098.
20. 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(5) :1061-1074. PMID:28045458.
21. Zhivaki D, Lemoine S, Lim A, Morva A, Vidalain PO, Schandene L, Casartelli N, Rameix-Welti MA, Hervé PL, Dériaud E, Beitz B, Ripaux-Lefevre M, Miatello J, Lemercier B, Lorin V, **Descamps D**, Fix J, Eléouët JF, 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(2) :301-314. PMID:28228284.
22. Hervé P- L, Deloizy C, **Descamps D**, Rameix Welti M-A, Fix J, McLellan J. S, Eléouët J-F., Riffault S. *RSV Nanorings fused to palivizumab-targeted neutralizing epitope as a nanoparticle RSV vaccine.* **Nanomedicine.** **2017**, 13(2) :411-420. PMID:27553073.

23. Hervé PL, **Descamps D\***, Deloizy C\*, Dhelft V, Laubret D, Bouguyon E, Boukadiri A, Dubuquoy C, Larcher T, Benhamou PH, Eléouët JF, Bertho N, Mondoulet L, Riffault S. *Non-invasive epicutaneous vaccine against respiratory syncytial virus : preclinical proof of concept.* **J Control Release.** **2016**, 243 :146-159. PMID:27720994.
24. Remot A, **Descamps D**, Jouneau L, Laubret 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(4) : 874-84. PMID:26681580.
25. Le Gars M, **Descamps D**, Roussel D, Sausseure E, Guillot L, Ruffin M, Tabary O, Hong S-S, Boulanger P, Paulais M, Malleret L, Belaouaj A, Edelman A, Huerre M, Chignard M & Sallenave J-M. *Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo.* **Am J Respir Crit Care Med.** **2013**, 187:170-179.
26. **Descamps D** & Manoury B. *Detection of influenza viruses by Toll-like receptors: major interactions in the control of responses to flu shots.* **Virologie.** **2013**, 17 (5) : 369-378.
27. Maschalidi S, Hassler S, Blanc F, Sepulveda F, Tohme M, Chignard M, Van Endert P, Si-Tahar M, **Descamps D** & Manoury B. *Aparagine endopeptidase controls anti-influenza virus immune responses through TLR7 activation.* **PLoS Pathog.** **2012**, 8(8): e1002841.
28. Barbier D, Garcia-Verdugo I, Pothlichet J, Khazen R, **Descamps D**, Rousseau K, Thornton D, Si-Tahar M, Touqui L, Chignard M & Sallenave J-M. *Influenza A induces the major secreted airway mucin MUC5AC in a protease-EGFR-ERK-Sp1 dependent pathway.* **Am J Respir Cell Mol Biol.** **2012**, 47(2):149-57.
29. **Descamps D**, Le Gars M, Balloy V, Barbier D, Maschalidi S, Tohme M, Chignard M, Ramphal R, Manoury B & Sallenave JM. *TLR5, IL-1 $\beta$  secretion and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophages phagocytosis & bacterial killing.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** **2012**, 109:1619-24.
30. Le Goffic R, Leymarie O, Chevalier C, Rebours E, Da Costa B, Vidic J, **Descamps D**, Sallenave J-M, Rauch M, Samson M & Delmas B. *Transcriptomic analysis of the host immune and cell death responses associated to the Influenza A virus PB1-F2 protein.* **PLoS Pathog.** **2011**, 7(8): e1002202.
31. Motta J-P, Magne L, **Descamps D**, Rolland C, Squarzone-Dale C, Rousset P, Balloy V, Huerre M, Jenne D, Wartelle J, Belaouaj A, Mas E, Vinel J-P, Iric L, Chignard M, Vergnolle N & Sallenave J-M. *Modifying the protease/anti-protease pattern protects from colitis in mice: benefits from elafin over-expression.* **Gastroenterology.** **2011**, 140:1272-82.
32. Denys A, Thiolat A, **Descamps D**, Lemeiter D, Benihoud K, Bessis N & Boissier MC. *Intraarticular electrotransfer of mouse soluble TNF receptor in a mouse model of rheumatoid arthritis.* **J. Gene Med.** **2010**, 12:659-68.
33. Garcia-Verdugo I, **Descamps D**, Chignard M, Touqui L & Sallenave JM. *Lung protease/antiprotease network and modulation of mucus production and surfactant activity.* **Biochimie.** **2010**, 92:1608-17.
34. **Descamps D** & Benihoud K. *Two key challenges for effective adenovirus-mediated liver gene therapy: innate immune responses and hepatocyte-specific transduction.* **Current Gene Therapy.** **2009**, 9:115-27.
35. Vigant F, **Descamps D**, Julienne B, Esselin S, Connault E, Opolon P, Tordjmann T, Vigne E, Perricaudet M & Benihoud K. *Substitution of hexon hypervariable region 5 of adenovirus serotype 5 abrogates blood factor binding and limits gene transfer to liver.* **Molecular Therapy.** **2008**, 16:1474-80.
36. Benihoud K, Esselin S, **Descamps D**, Salone B, Bobé P, Bonardelle D, Connault P, Opolon P, Saggio I, & Perricaudet M. *Respective roles of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the immune response-elicited by Adenovirus-mediated gene transfer in mice.* **Gene Therapy.** **2007**, 14:533-544.
37. **Descamps D**, Vigant F, Esselin S, Connault E, Opolon P, Perricaudet M & Benihoud K. *Mice protection from hepatitis provided by liver expression of non-signaling membrane-anchored death receptors.* **Hepatology.** **2006**, 44:399-409.

### **Ouvrages et chapitres d'ouvrages**

**Descamps D**, Sallenave JM & Manoury B. *Pseudomonas aeruginosa: a model of pathogen with multiple virulence factors for the study of innate immune defense in lung.* In book: **Bacterial Pathogens: Virulence Mechanisms, Diagnosis and Management.** Nova Publishers. **2012.**

### **Produits, documents et publications destinés à des utilisateurs de la recherche, à un public large, ou à des étudiants**

- Remot A, **Descamps D**, Erny A, Chottin C, Drajac C, Carreras F, Ferret C & Archer F. Méthodes alternatives in vitro pour l'étude des interactions hôte-pathogène du poumon. **La revue INRAE Productions Animales.** A paraître.
- Chottin C, Marquant Q, Saint-Criq V, Thomas M, Riffault S & **Descamps D**. La muqueuse pulmonaire en période périnatale : un monde à comprendre pour lutter contre la sensibilité du jeune à la bronchiolite. **Revue des Maladies Respiratoires** **39 (2022) 104-107.**
- **Descamps D**, Manoury B & Sallenave JL. Le TLR5 : un partenaire crucial pour la phagocytose et l'élimination de *Pseudomonas aeruginosa* par les macrophages alvéolaires impliquant l'IL-1 $\beta$  et l'asparagine endopeptidase. Brève. **Bulletin de la Société Française d'Immunologie.** **2012**, n°126.



## **Liste des conférences invitées, conférences autres, affiches/posters (depuis 2019)**

### **Communication orale (invitation)**

- 1<sup>er</sup> Workshop de l'AC Viroses Respiratoires – ANRS – Maladies infectieuses émergentes, Mars 2023, Paris. *La muqueuse pulmonaire chez le nouveau-né : un environnement particulier à comprendre pour prévenir les bronchiolites au VRS.*
- Séance plénière du 24<sup>e</sup> Congrès de Pneumologie de Langue Française, Janvier 2020, Paris, France. *Les fonctions du microbiote pulmonaire dans l'asthme : vers une approche thérapeutique basée sur l'utilisation des bactéries primo-colonisatrices du poumon.*

### **Communication orale (sélection)**

- Journées d'animations scientifiques du département Santé Animale, Octobre 2022, Anglet, France. *Immunomodulation par des bactéries primo-colonisatrices du poumon de la sensibilité néonatale à l'infection par le Virus Respiratoire Syncytial.*

### **Communication poster**

- Chottin C, Marquant Q, Saint-Criq V, Laubretton D, Drajac C, Remot A, Riffault S, Thomas & **Descamps D**. Modulation de la sensibilité néonatale au Virus Respiratoire Syncytial par des bactéries primo-colonisatrices du poumon **Colloque Français des jeunes Chercheurs 2023, Février 2023, Paris, France.**
- Remot A, Sallé G, Ferret C, Baillou A, Fernandez M, Carreras F, Le Vern Y, Bouguyon E, Castelli F, Laurent F, Riffault S, Winter N, Lacroix-Lamandé S & **Descamps D**. Signatures métabolomiques des cellules immunitaires innées bovines. **Journées d'animations scientifiques Département Santé Animale INRAE, Octobre 2022, Anglet, France.**
- Ferret C, Carreras F, Chottin C, Jouneau L, Laurent F, Winter N, Riffault S, Lacroix-Lamandé S, Remot A & **Descamps D**. Comparaison des signatures cytokiniques innées des compartiments pulmonaire et sanguin chez le veau. **Journées d'animations scientifiques Département Santé Animale INRAE, Octobre 2022, Anglet, France.**
- Marquant Q, Laubretton D, Drajac C, Riffault S, Thomas & **Descamps D**. La présence du microbiote permet de modérer la réponse immunitaire innée du poumon. **Journée de la recherche respiratoire, Octobre 2021, Brest, France.**
- Marquant Q, Chottin C, Saint-Criq V, Laubretton D, Drajac C, Remot A, Riffault S, Thomas & **Descamps D**. Immunomodulation de la sensibilité néonatale au Virus Respiratoire Syncytial par des bactéries primo-colonisatrices du poumon **Journée de la recherche respiratoire, Octobre 2021, Brest, France.**
- Marquant Q, Laubretton D, Drajac C, Riffault S, Thomas & **Descamps D**. Microbiota impacts the susceptibility of the airway inflammatory responses. **21<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs Vaincre la Mucoviscidose, février 2020, Paris, France.**
- Marquant Q, Laubretton D, Drajac C, Riffault S, Thomas & **Descamps D**. Microbiota impacts the susceptibility of the airway inflammatory responses. **European Respiratory Society, September 2019, Madrid, Spain.**
- Drajac C, Laubretton D, Saveanu L, Schwartz-Cormil I, Riffault S, **Descamps D**. Control of IFN-I responses by the aminopeptidase IRAP in neonatal alveolar macrophages upon RSV infection. **November 2019, USA.**

## 2. TRAVAUX DE RECHERCHE ANTERIEURS

Particulièrement intéressée par l'Immunologie et plus précisément par le domaine de la physiopathologie des réponses immunitaires, mes travaux de recherche depuis le début de ma carrière scientifique gravitent autour de l'étude des interactions hôte-pathogène. L'objectif est d'acquérir une meilleure connaissance des mécanismes de défenses d'un organisme dirigées contre l'agent infectieux afin de proposer des nouvelles stratégies d'immuno-intervention. Après mon stage de DEA à l'Institut Gustave Roussy dans l'unité CNRS UMR8121 (Dr. Michel Perricaudet), j'ai réalisé ma thèse au sein de l'équipe du Pr. Karim Benihoud. J'ai décrypté la réaction immunitaire déclenchée par les adénovirus recombinants (Ads) et leur tropisme hépatique afin d'améliorer le transfert de gènes de ces vecteurs. A la fin de la thèse, j'ai souhaité parfaire mon expérience sur l'inflammation en m'ouvrant au déclenchement de la réponse innée des cellules des poumons lors d'infection par des pathogènes respiratoires. J'ai donc rejoint l'unité INSERM U874 - Défense Innée et Inflammation à l'Institut Pasteur (Paris, Dr. Michel Chignard), reconnue pour ses recherches sur les récepteurs de l'immunité innée activés lors de pneumopathies. Au-delà des retombées scientifiques, ces projets m'ont permis d'acquérir des compétences précieuses dans le domaine des modèles infectieux pulmonaires et de l'immunité innée. Ces expertises ont été un atout pour conduire mes travaux de recherche de mon second contrat post-doctoral dans l'unité INSERM U1013 (Hôpital Necker, Pr. Peter van Endert) plus orientés sur l'aspect mécanistique du contrôle de l'activation de la réponse immunitaire innée par des peptidases intracellulaires dans différents contextes pathologiques. Ainsi, j'ai acquis une solide expérience sur l'arsenal immunitaire déclenché au cours d'infections pulmonaires bactériennes ou virales.

### 2.1 INFLAMMATION HEPATIQUE ET VECTOROLOGIE ADENOVIRALE (DOCTORAT)

Les Ads sont largement utilisés pour transférer des gènes d'intérêt dans des études pré-cliniques et cliniques à visée anti-tumorale. Cependant, l'utilisation de ces vecteurs est restreinte par leur immunogénicité et leur dissémination vers des organes non ciblés<sup>1</sup>. Il a été observé que l'injection intraveineuse (i.v.) des Ads permet un transfert de gènes dans le foie qui s'accompagne d'une forte inflammation caractérisée notamment par la production de TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*), de l'interleukine-6 (IL-6) et de l'IL-1 $\beta$ <sup>2</sup>. Cet état inflammatoire conduit à une toxicité hépatique délétère pour l'expression du transgène<sup>3</sup>. L'équipe de Pr. K. Benihoud (CNRS UMR9018, ex 8121) s'intéresse à comprendre la réponse immunitaire anti-Ad et le tropisme hépatique de ces vecteurs afin d'améliorer l'efficacité du transfert de gènes *in vivo* des Ads. Le but de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle des ligands et des récepteurs de la famille du TNF/TNFR dans les réponses immunitaires déclenchées suite à l'administration i.v. d'Ad.

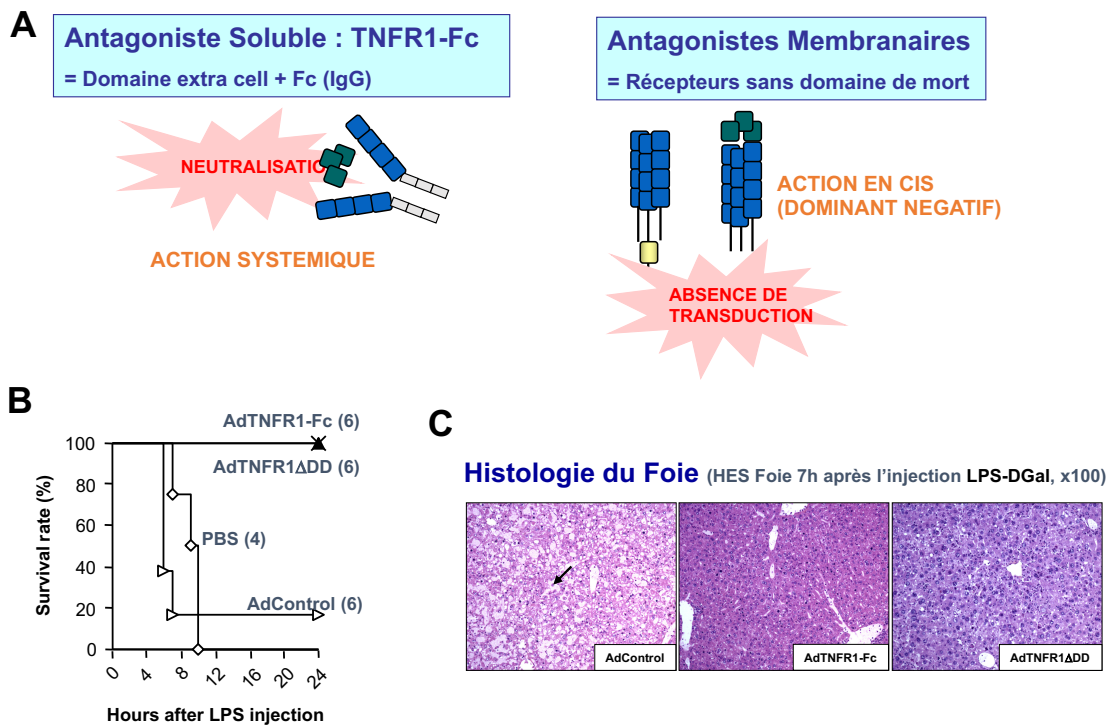
#### **L'ensemble de mes travaux de thèse ont conduit à :**

- 4 articles : Descamps *et al.*, *Hepatology*, 2006 ; Benihoud *et al.*, *Gene Therapy*, 2007 ; Vigant *et al.*, *Molecular Therapy*, 2008 ; Denys *et al.*, *J. Gene Med*, 2010.
- 1 revue : Descamps *et al.*, *Current Gene Therapy*, 2009.
- 1 communication orale lors d'un congrès national (2006).
- 8 posters présentés en congrès.
- Enseignements : participation à différents modules d'immunologie et de biologie moléculaire à partir de 2002 en tant que vacataire puis ATER (2006-2007).

### 2.1.1 DEVELOPPEMENT D'ANTAGONISTES DE RECEPTEURS DE LA FAMILLE DU TNF/TNFR

Pour analyser le rôle des ligands de la famille du TNF (TNF- $\alpha$ , le ligand de Fas (FasL), TRAIL) au cours des réponses immunitaires anti-Ad, j'ai construit et caractérisé des Ads codant pour deux classes de récepteurs inhibiteurs pour bloquer différemment les voies dépendantes de TNFR1, Fas et DR5, respectivement. Une première classe d'inhibiteurs correspond à des récepteurs sécrétés suite à la fusion du domaine extracellulaire d'un récepteur de la famille du TNF à la partie constante d'une immunoglobuline (Fc). Ces antagonistes solubles sécrétés se lient à un ligand de la famille du TNF et neutralisent sa capacité à activer les récepteurs d'apoptose correspondants. Une seconde classe d'inhibiteurs correspond à des récepteurs leurres ancrés dans la membrane, capables de se trimériser après fixation du ligand mais qui sont incapables de transduire le signal. Les antagonistes membranaires constituent une nouvelle classe d'inhibiteurs et exercent un effet dominant négatif sur les récepteurs sauvages à la surface de la cellule qui les exprime.

En injectant par i.v. les Ads pour permettre une expression des antagonistes par les hépatocytes, j'ai démontré que ces outils étaient capables *in vivo* de bloquer spécifiquement la mort induite par les ligands d'apoptose correspondant (TNF- $\alpha$ , FasL ou TRAIL). En particulier, l'expression hépatique des antagonistes membranaires de récepteurs de la famille du TNF permet de protéger, de façon aussi efficace que les antagonistes solubles, les souris contre le développement d'hépatites aiguës et la mort induites par l'administration d'anticorps anti-Fas ou de LPS. Ainsi, ces antagonistes membranaires présentent l'avantage d'inhiber localement l'apoptose et pourraient constituer une alternative thérapeutique à l'utilisation d'inhibiteurs solubles dont l'action systémique peut provoquer des effets secondaires.



**Figure 1 : Protection contre l'hépatite induite par l'anticorps anti-Fas (Jo2) par sur-expression d'antagonistes du récepteur Fas par des Ad recombinants injectés en intraveineuse dans des souris. A. Courbe de survie des animaux après administration du Jo2. B. Analyse histologique de coupes de foie colorées au MGG 4 heures après l'injection du Jo2.**

**PUBLICATION :**

[Descamps D, Vigant F, Esselin S et al. Mice protection from hepatitis provided by liver expression of non-signaling membrane-anchored death receptors. \*Hepatology\*, 2006, 44:399-409.](#)

### **2.1.2 RÔLE DU TNF- $\alpha$ ET DE L'IL-6 DANS LES RÉPONSES ANTI-ADÉNOVIRUS**

L'hépatite associée au transfert de gènes par les Ads limite l'efficacité de ces vecteurs<sup>3</sup>. Il est donc nécessaire de comprendre la réponse immunitaire anti-Ad afin de proposer des stratégies d'immuno-intervention pour améliorer le transfert de gènes. Les antagonistes solubles et membranaires que j'ai construits ont servi d'outils pour analyser le rôle des récepteurs Fas, TNFR1 et DR5 (et des ligands correspondants) dans cette réponse anti-Ad déclenchée suite au transfert de gènes dans le foie par les vecteurs Ads. Ces expériences ont été réalisées dans des souris déficientes ou non pour l'expression de l'IL-6 afin d'identifier également le rôle de cette cytokine dans les réponses anti-Ad.

En co-injectant à des souris un Ad codant pour un récepteur soluble au TNF avec un Ad recombinant pour un gène rapporteur à des souris, nous avons montré que la neutralisation du TNF- $\alpha$  augmentait l'expression des transgènes. J'ai caractérisé que la persistance de l'ADN viral était associée à une diminution de la production des cytokines et de l'infiltrat inflammatoire précocement après l'administration des vecteurs. Chez toutes les souris injectées avec l'Ad codant pour un récepteur soluble au TNF- $\alpha$ , nous avons observé une réduction transitoire des réponses anticorps anti-Ads et anti-transgènes. Cette réduction des réponses anticorps était plus importante si les souris étaient également déficientes pour l'expression de l'IL-6. Ces résultats démontrent que le TNF- $\alpha$  contrôle le recrutement des cellules inflammatoires dans le foie et qu'il est nécessaire, avec l'IL-6, à l'établissement des réponses anticorps anti-Ads et anti-transgènes.

#### **PUBLICATION :**

*Benihoud K, Esselin S, Descamps D et al. Respective roles of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the immune response-elicited by Adenovirus-mediated gene transfer in mice. **Gene Therapy**, 2007, 14:533-544.*

### **2.1.3 CONTRÔLE DU TROPISME HÉPATIQUE DE L'ADÉNOVIRUS PAR MODIFICATION DE LA CAPSIDE**

Parallèlement à mes travaux de thèse, j'ai aussi contribué à un autre projet du laboratoire s'intéressant au tropisme hépatique des Ads et au rôle de l'hexon, protéine de la capsid adénovirale, dans l'entrée des vecteurs dans les hépatocytes<sup>1</sup>. Ce projet m'a permis de regarder l'aspect biologie moléculaire du virus et son interaction avec l'hôte, complémentaire à l'aspect immunologique dans la science de la vectorologie des Ads.

Mon travail a consisté à caractériser la nocivité hépatique (réaction inflammatoire et cytotoxicité hépatique) de vecteurs modifiés dans l'hexon par insertion de peptides. Ces Ads sont incapables de transduire *in vivo* de façon efficace les hépatocytes et n'induisent qu'une faible toxicité hépatique contrairement aux vecteurs à capsid non modifiée. Cette faible transduction cellulaire est liée à l'incapacité de ces vecteurs à utiliser les facteurs sanguins pour infecter les hépatocytes. Ces résultats démontrent un rôle de l'hexon dans le tropisme hépatique des Ads. Ces vecteurs modifiés dans l'hexon restent toutefois capables d'infecter des tumeurs pré-établies chez la souris et d'y exprimer leur transgène, et constituent une base de départ pour la mise au point de vecteurs à tropisme modifié présentant une faible hépatotoxicité.

#### **PUBLICATION :**

*Vigant F, Descamps D, Julienne B, et al. Substitution of hexon hypervariable region 5 of adenovirus serotype 5 abrogates blood factor binding and limits gene transfer to liver. **Molecular Therapy**, 2008, 16:1474-80.*

Mes travaux de thèse m'ont permis d'acquérir une solide expérience dans les domaines des réponses immunitaires dirigées contre les Ads et la vectorologie adénovirale qui s'est concrétisée par la rédaction d'une revue. Ils m'ont aussi ouvert sur l'importance des interactions hôte-pathogène pour comprendre le déclenchement des réponses immunitaires et pour proposer de nouvelles stratégies d'immuno-intervention.

#### **PUBLICATION :**

*Descamps D & Benihoud K. Two key challenges for effective adenovirus-mediated liver gene therapy: innate immune responses and hepatocyte-specific transduction. **Current Gene Therapy**, 2009, 9:115-27.*

## 2.2 RÔLE DU TLR5 DANS L'ÉLIMINATION DE *P.A.* PAR LES MACROPHAGES (POST-DOC 1)

Désireuse d'enrichir mon expérience sur l'implication des récepteurs de l'immunité innée, et notamment les Toll-like Recepteurs (TLRs), dans les réponses de l'hôte contre une infection, j'ai effectué un stage post-doctoral de 2008 à 2011 supervisé par Pr. J-M. Sallenave au sein de l'unité Défense Innée et Inflammation (D2I) à l'Institut Pasteur (INSERM U874, Dr. M. Chignard). L'unité D2I s'intéressait aux mécanismes de l'immunité innée déclenchés lors de pneumopathies infectieuses. Ce projet m'a ainsi conduit à m'intéresser aux mécanismes physiopathologiques, et notamment les défenses innées, activés lors d'une infection pulmonaire par *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a.*), bactérie opportuniste impliquée dans les pneumonies nosocomiales et les maladies pulmonaires chroniques, telle que la mucoviscidose<sup>4</sup>.

### L'ensemble de mes travaux de post-doc dans l'unité D2I ont conduit à :

- 5 articles : Motta *et al.*, *Gastroenterology*, 2011 ; Le Goffic *et al.*, *PLoS Pathogen*, 2011 ; Descamps *et al.*, *PNAS*, 2012 ; Barbier *et al.*, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012 ; Le Gars *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med*, 2013.
- 1 revue : Garcia-Verdugo *et al.*, *Biochimie*, 2010.
- 1 chapitre de livre : Descamps *et al.*, *Bacterial Pathogens: Virulence Mechanisms, Diagnosis and Management* (2012).
- 1 revue de vulgarisation scientifique : Descamps *et al.*, *Bulletin de la SFI* (2012).
- 2 communications orales lors de congrès nationaux (2009 et 2012) et 3 présentations lors de congrès internationaux (2008, 2010 et 2011).
- 8 posters présentés en congrès.
- Co-encadrement d'un étudiant en Master 2 puis lors de son doctorat : M. Le Gars (2012).
- Enseignements : participation à différents modules d'immunologie à l'Université de Cergy-Pontoise.

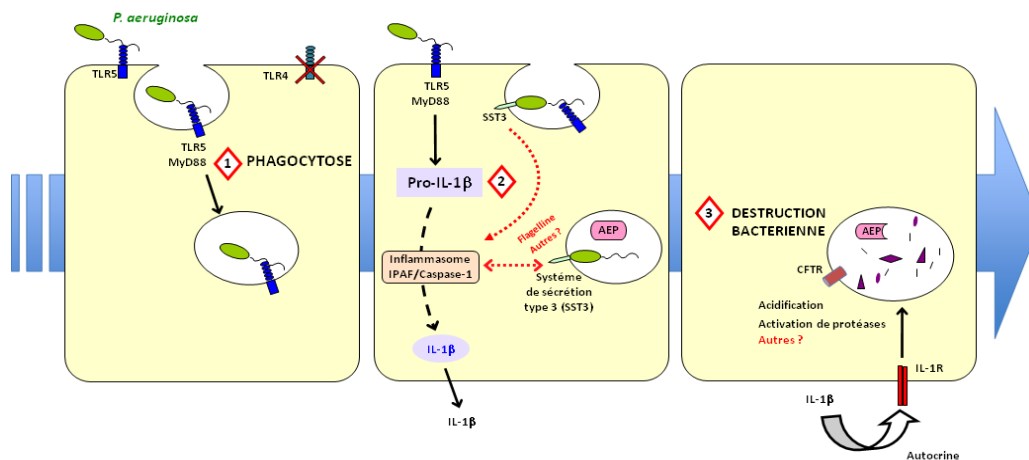
Les macrophages alvéolaires (MAs) sont les premières sentinelles immunitaires des poumons. Ils expriment différents TLRs capables de reconnaître spécifiquement des motifs conservés à la surface des pathogènes. De nombreuses études associent l'activation des TLRs par leurs ligands à la production de cytokines et de chimiokines par les phagocytes. Comparativement, peu de travaux décrivent l'importance de l'engagement des TLRs dans la phagocytose, la maturation du phagosome et la clairance des bactéries par les MAs. Dans le cadre d'un projet financé par l'association Vaincre la Mucoviscidose (VLM), j'ai décrit de façon originale l'implication du TLR5, récepteur impliqué dans la reconnaissance de la flagelline qui est le monomère constituant le flagelle de *P.a.*<sup>5</sup>, dans la phagocytose et l'activation des MAs par la bactérie.

Au cours de ce projet, j'ai établi et mis en application différents protocoles pour mettre en culture et tester les capacités des MAs primaires de souris déficientes pour l'expression du TLR5 (TLR5<sup>-/-</sup>), ou TLR4 ou MyD88 (molécule impliquée dans la signalisation des TLRs). J'ai également collaboré avec le Dr. Ruben Ramphal (Université de Floride), microbiologiste, qui a produit différentes souches mutantes de *P.a.* dépourvues de flagelle ou exprimant des flagellines mutées incapables d'interagir avec le TLR5. A travers différentes séries d'expériences, j'ai mis en évidence que des bactéries non-flagellées ou exprimant une flagelline présentant un défaut d'activation du TLR5, ne sont pas éliminées par les MAs. De la même façon, des MAs issus de souris TLR5<sup>-/-</sup> sont incapables de tuer *P.a.* *In vivo*, nous avons confirmé un déficit de la clairance bactérienne dans les poumons des souris dépourvues de TLR5. Ce différentiel observé sur l'élimination bactérienne entre la souche WT et les mutants s'explique par une différence d'internalisation de la bactérie par les MAs. Nos résultats ont démontré que les MAs ne phagocytent pas les bactéries non-flagellées et de façon beaucoup moins efficace les souches

de *P.a.* exprimant des flagellines mutées. Cette observation a ensuite été validée par l'utilisation des MAs de souris TLR5<sup>-/-</sup> ou MyD88<sup>-/-</sup> qui présentent également un déficit de 50% d'entrée de *P.a.* dans les cellules. Au contraire, l'absence d'expression du TLR4 par les MAs ne modifie pas leurs capacités à phagocyter ni à tuer *P.a.* De plus, l'engagement du TLR5 par *P.a.*, à travers l'activation de MyD88, entraîne une production d'IL-1 $\beta$  qui est importante pour l'élimination bactérienne. En effet, la présence dans les surnageants de culture d'un inhibiteur naturel de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-1RA, empêche les MAs de tuer la souche sauvage de *P.a.* L'ensemble de nos travaux montre que l'interaction TLR5/flagelle est une reconnaissance hôte/pathogène cruciale pour déclencher la phagocytose et la destruction de *P.a.* par les MAs.

Nous avons ensuite exploré les mécanismes moléculaires nécessaires à l'élimination de *P.a.* par les MAs et déclenchés par cette sécrétion de l'IL-1 $\beta$ . Le sort bactérien se joue dans les compartiments acides des phagolysosomes des MAs. Grâce à l'utilisation de la bafilomycine A, un inhibiteur de la pompe à protons (la v-ATPase), j'ai confirmé que l'acidification des phagolysosomes est nécessaire pour permettre aux MAs de tuer la bactérie *P.a.* En utilisant des sondes spécifiques pour mesurer le pH des endolysosomes par cytométrie en flux (collaboration avec Dr B. Manoury, INSERM U1013), nous avons mis en évidence que l'IL-1 $\beta$  augmentait l'acidification des phagolysosomes des MAs. Cette acidification des phagolysosomes active l'asparagine endopeptidase (AEP), une cystéine-protéase présente dans les compartiments endo/lysosomaux (dosage de l'activité enzymatique par un substrat fluorogénique spécifique), pour laquelle nous avons démontré un rôle clé dans la clairance de *P.a.* par les MAs.

Nos données apportent une vue mécanistique des événements qui suivent l'interaction des MAs avec *P.a.* et révèlent un rôle déterminant du TLR5 dans les défenses du poumon contre ce pathogène (**Figure 2**).



**Figure 2 : Phagocytose et destruction de *Pseudomonas aeruginosa* par les macrophages alvéolaires** (adaptée de Descamps et al, Brève SFI, 2012, n°126, et PNAS. 2012, 109:1619-24).

Ces travaux ont été valorisés par l'invitation à publier une brève dans le bulletin de la Société Française d'Immunologie (SFI) et par une présentation orale à un congrès international (10<sup>th</sup> World Congress of Inflammation, 2011) et au congrès annuel des jeunes chercheurs de l'association VLM (2012, prix de la meilleure présentation).

**PUBLICATION :**

[Descamps D, Le Gars M, Balloy V et al. TLR5, IL-1 \$\beta\$  secretion and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophages phagocytosis & bacterial killing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012, 109:1619-24.](#)

**Article de vulgarisation scientifique :**

[Descamps D, Manoury B & Sallenave JL. Le TLR5: un partenaire crucial pour la phagocytose et l'élimination de \*Pseudomonas aeruginosa\* par les macrophages alvéolaires impliquant l'IL-1 \$\beta\$  et l'asparagine endopeptidase. Brève. Bulletin de la SFI. 2012, n°126.](#)

En travaillant sur l'infection respiratoire bactérienne, j'ai acquis une maîtrise de la culture primaire de MAs et des modèles infectieux chez la souris, ainsi que des connaissances sur les mécanismes de l'immunité innée en appréciant l'importance des interactions hôte-pathogène dans le déclenchement du processus inflammatoire. Ce savoir s'est concrétisé par la rédaction d'un chapitre de livre sur les facteurs de virulence et les mécanismes de défense innée activés lors d'une infection des poumons par *P.a.* Mes compétences m'ont aussi permises de former et de collaborer avec un étudiant (Mathieu Le Gars) dans la conduite de son projet de master 2 puis de thèse portant sur l'effet de l'élastase libérée par les neutrophiles sur l'intégrité et les fonctions du canal chlore, le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) qui est important pour l'homéostasie des fluides dans les poumons<sup>6</sup>.

#### PUBLICATION :

- [Descamps D, Sallenave JM & Manoury B. Pseudomonas aeruginosa: a model of pathogen with multiple virulence factors for the study of innate immune defense in lung. In book: Bacterial Pathogens: Virulence Mechanisms, Diagnosis and Management. Nova Publishers. 2012.](#)

- [Le Gars M, Descamps D, Roussel D et al. Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. Am J Respir Crit Care Med. 2013, 187: 170-179.](#)

## 2.3 CONTROLE DE L'ACTIVATION DE TLRs ENDOSOMAUX PAR DES PEPTIDASES (POST-DOC 2)

J'ai continué à me spécialiser sur les TLRs et leur implication dans les défenses de l'hôte après mon post-doctorat à l'Institut Pasteur. Je souhaitais comprendre plus finement leur activation et leur régulation au cours d'une infection. C'est dans cet objectif que j'ai effectué un second stage post-doctoral supervisé par Dr. B. Manoury au sein de l'unité INSERM U1013 (Hôpital Necker, Pr. P. van Endert) de mars 2011 jusqu'à mon recrutement à l'INRAE en juillet 2013. Cette unité, à l'expertise reconnue sur le contrôle moléculaire de la présentation antigénique dans les cellules dendritiques, cherchait à décrire en 2011 le rôle et le contrôle de l'activation des TLRs dans ce type de réponse immunitaire. J'ai apporté mon expertise sur les modèles infectieux *in vitro* et *in vivo* dans des études montrant l'importance des protéases endo/lysosomales dans l'activation des TLRs endosomaux lors de pneumopathies virales ou bactériennes.

### **L'ensemble de mes travaux de post-doc dans l'unité INSERM U1013 ont conduit à :**

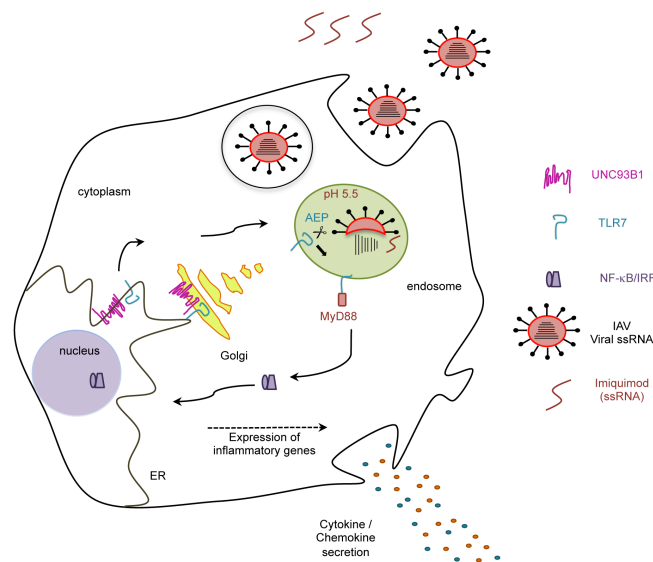
- 2 articles : Maschalidi *et al.*, *PLoS Pathogen*, 2012 ; Descamps\* *et al.*, *Nat Immunol*, 2017.
- 1 revue : Descamps *et al.*, *Virologie*, 2013.
- 1 communication orale lors d'un congrès national (2012).
- 1 poster présenté en congrès (2013).
- Enseignements : participation au module d'immunologie fondamentale à l'Université de Cergy-Pontoise.

### **2.3.1 CONTROLE DE L'ACTIVATION DU TLR7 LORS D'UNE INFECTION PAR LE VIRUS DE LA GRIPPE**

Le virus de la grippe (IAV) est un virus à ARN simple brin négatif capable d'être détecté par différents récepteurs de l'immunité innée, notamment le TLR7<sup>7</sup>. Lors d'une infection grippale, ce récepteur participe à la production des cytokines inflammatoires et des interférons et favorise l'activité de la présentation croisée des Ags exogènes des cellules dendritiques (CDs) aux lymphocytes T (LTs) CD8<sup>+8</sup>. Le TLR7, présent dans les endosomes, nécessite un pH acide et l'activation de protéases pour être clivé et libéré sous une forme mature capable de signaler<sup>7</sup>. L'endopeptidase AEP, avait précédemment été impliqué par le groupe du Dr B. Manoury dans la maturation et l'activation du TLR9 présent dans les endo/lysosomes<sup>9</sup>. J'ai contribué à une étude montrant l'importance de l'AEP dans la maturation du TLR7 et le développement des réponses

immunitaires anti-virales déclenchée lors de l'infection par l'IAV (collaboration avec les Drs. M. Si-Tahar et M. Chignard, unité D2I, Institut Pasteur).

A l'aide de souris sauvages ou déficientes pour l'expression de l'AEP ( $AEP^{-/-}$ ) ou du TLR7, j'ai caractérisé la réponse inflammatoire au niveau des poumons au cours de l'infection par l'IAV. De façon similaire aux souris  $TLR7^{-/-}$ , nous avons constaté que des souris  $AEP^{-/-}$  infectées par l'IAV présentaient une sécrétion diminuée de cytokines inflammatoires et une activation du facteur NF- $\kappa$ B retardée dans les poumons par rapport à des souris sauvages. Toutefois, nous n'avons pas observé de différence dans les populations cellulaires infiltrant les poumons suite à l'infection virale. De plus, j'ai participé aux expériences montrant que les souris  $AEP^{-/-}$  présentaient une capacité à faire la présentation croisée des Ags exogènes aux LT  $CD8^{+}$  diminuée par rapport aux souris WT infectées. Enfin, pour aborder l'aspect moléculaire dans notre étude, nous avons préparé des CD différenciés de la moelle osseuse et des CD plasmacytoides à partir des souris  $AEP^{-/-}$  ou  $TLR7^{-/-}$ . Nous avons prouvé que des cellules issues des souris  $AEP^{-/-}$  avaient un défaut de stimulation du TLR7 et de production des cytokines en raison d'une maturation défectueuse de ce récepteur. En effet, le TLR7 nécessite un clivage protéolytique par l'AEP pour générer un fragment C-terminal compétent pour la signalisation (**Figure 3**). Nos travaux démontrent une fonction majeure d'une protéase, l'AEP, dans le déclenchement des réponses innées anti-virales dépendantes du TLR7.



**Figure 3 :** Participation de l'endopeptidase AEP dans la maturation et l'activation du TLR7 lors d'une infection par le virus de la grippe (adaptée de Maschalidi et al., 2012).

**PUBLICATION :**

Maschalidi S, Hassler S, Blanc F, Sepulveda F, Tohme M, Chignard M, van Ender P, Si-Tahar M, Descamps D & Manoury B. *Aparagine endopeptidase controls anti-influenza virus immune responses through TLR7 activation.* **PLoS Pathog.** 2012, 8(8): e1002841.

Ces travaux ont aussi été valorisés par l'invitation à publier une revue dans le journal « Virologie » que j'ai rédigé autour de l'importance des TLRs endosomaux dans l'activation de la réponse immunitaire lors d'une infection par l'IAV.

**PUBLICATION :**

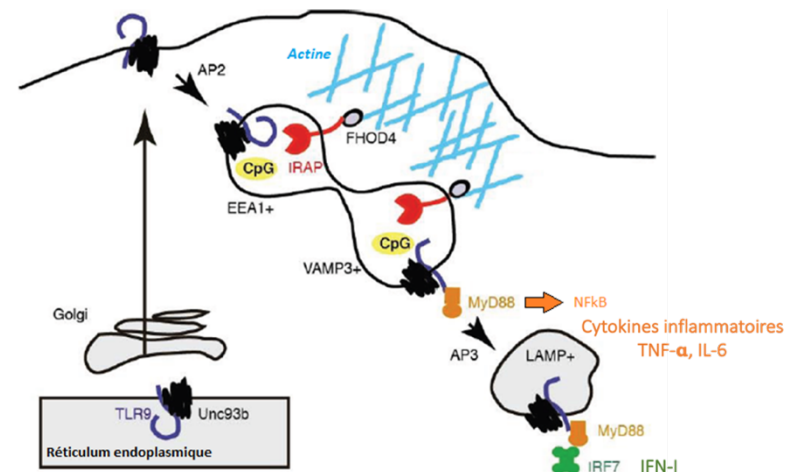
Descamps D & Manoury B. *Detection of influenza viruses by Toll-like receptors: major interactions in the control of responses to flu shots.* **Virologie.** 2013, 17 (5) : 369-378.



### 2.3.2 IMPLICATION D'IRAP DANS LE CONTROLE DE LA MATURATION PHAGOSOMALE ET DE L'ACTIVATION DU TLR9

Parallèlement à mes travaux sur le TLR7, j'ai collaboré avec le Dr Loredana Saveanu sur l'implication de l'aminopeptidase endosomale IRAP ("insulin responsive aminopeptidase") dans la signalisation du TLR9. Rapidement recrutée dans les phagosomes, IRAP interagit avec les molécules de classe I du CMH et participe à la présentation croisée d'antigènes exogènes<sup>10</sup>. En absence d'IRAP, les endosomes de stockage à recyclage lent des CDs sont quasi-absents et la maturation des phagosomes des CDs IRAP<sup>-/-</sup> est accélérée par rapport aux cellules WT<sup>11</sup>. Cette maturation accélérée des phagosomes des CDs IRAP<sup>-/-</sup> pourrait affecter la signalisation des TLRs endosomaux, tel que le TLR9. J'ai contribué à vérifier cette hypothèse notamment dans un modèle murin d'infection pulmonaire par la bactérie *P.a.*

En absence de stimulus, les TLRs endosomaux 3, 7 et 9 sont présents dans le réticulum endoplasmique. Sous stimulation CpG (ADN non-méthylé), le TLR9 migre vers les endo/lysosomes pour signaler après avoir été clivé et activé par l'AEP<sup>9</sup>. La translocation de TLR9, à partir du réticulum endoplasmique vers les lysosomes, est un phénomène séquentiel : le récepteur atteint d'abord une sous-population endosomale VAMP3<sup>+</sup>, et ensuite il est transporté dans les lysosomes LAMP<sup>+</sup> grâce à l'adaptateur AP3<sup>12</sup>. Nous avons démontré que les endosomes VAMP3<sup>+</sup> sont identiques aux endosomes de stockage IRAP<sup>+</sup> (colocalisation) et qu'en absence d'IRAP, le TLR9 a un trafic accéléré vers les lysosomes LAMP<sup>+</sup>. Cette translocation accélérée de TLR9 vers les lysosomes dans les CDs IRAP<sup>-/-</sup> est accompagnée *in vitro* d'une production augmentée de cytokines. *In vivo*, j'ai mis en évidence que les souris IRAP<sup>-/-</sup> présentaient au cours d'une infection pulmonaire par *P.a.* une inflammation et une mortalité à la mort plus importantes que celles des souris WT (collaboration avec Dr. M. Chignard, unité D2I, Institut Pasteur). Ces résultats montrent qu'IRAP joue un rôle essentiel dans l'organisation des endosomes de stockage qui affecte la maturation des phagosomes et la signalisation du TLR9 (**Figure 4**), et pourrait potentiellement contrôler d'autres vésicules ou processus intracellulaires, comme l'autophagie ou l'activation du TLR7.



**Figure 4 :** Modélisation du trafic de TLR9 dans les cellules dendritiques et de la participation de l'aminopeptidase IRAP (adaptée de Descamps D\* et al., 2017).

#### PUBLICATION :

[Descamps D\\*](#), Babdor J\*, Adiko AC, Tohmé M, Maschalidi S, Evnouchidou I, Vasconcellos LR, De Luca M, Mauvais FX, Garfa-Traore M, Brinkmann MM, Chignard M, Manoury B, Saveanu L. IRAP<sup>+</sup> endosomes restrict TLR9 activation and signaling. *Nat Immunol.* 2017, 18(5) :509-518. PMID:28319098.

L'ensemble de mes travaux au sein de l'unité INSERM m'a permis d'affiner mes connaissances mécanistiques sur la régulation de l'activation des réponses innées TLR-dépendantes. J'ai aussi consolidé ma maîtrise des modèles infectieux pulmonaires et établi des collaborations adaptées aux besoins de mes projets de recherche.

### 3. PROJETS DE RECHERCHE MENES A L'INRAE

A travers mes précédents travaux de recherche, je me suis intéressée aux réactions de différentes cellules de l'immunité innée des poumons (macrophages, cellules épithéliales, CDs), aux mécanismes moléculaires inflammatoires déclenchés par des pathogènes pulmonaires, ainsi qu'à leurs conséquences sur les réponses cellulaires. En travaillant dans différents contextes pathologiques, j'ai consolidé ma polyvalence sur les modèles infectieux pulmonaires, atout majeur à mon intégration dans l'unité Virologie et Immunologie Moléculaires (VIM) en tant que CR2 à l'INRAE de Jouy-en-Josas. Ainsi, j'ai rejoint en 2013 l'équipe Vaccins, Immunomodulation, Immunopathologie (V2I) dirigée par le Dr. Isabelle Schwartz-Cornil, et plus précisément le groupe du Dr. Sabine Riffault, que je co-anime depuis 2018. Nos thématiques de recherche s'attachent à comprendre les spécificités et la réponse immunitaire de la muqueuse pulmonaire en période périnatale impliquées dans l'hypersensibilité encore mal comprise du jeune à des infections respiratoires sévères, et notamment au virus respiratoire syncytial (VRS), afin d'améliorer les stratégies vaccinales ou proposer de nouvelles stratégies prophylactiques.

#### **Depuis mon recrutement à l'unité VIM, mes travaux ont conduit à :**

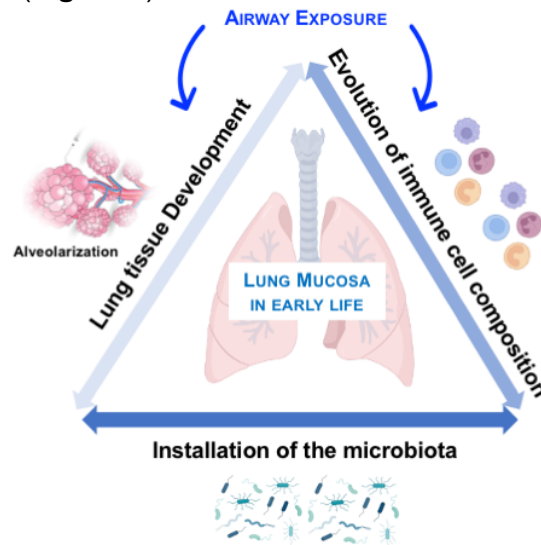
- 17 articles dont 4 en tant que responsable du projet.
- 4 revues : Drajac *et al.*, *J Immunol Research*, 2017 ; Mathieu *et al.*, *Front Physiology*, 2018 ; Descamps *et al.*, *Front Mol Biosci*, 2020. Mathieu *et al.*, *NCM*, 2021.
- 1 éditorial : Descamps\* *et al.*, *Front Immunol* (2019).
- Financements : *en tant que coordinatrice* (7) : VLM-PR2022 RESPIBIOTE (2022), projet créativité – SA-INRAE (2020), DIM OneHealth Gros équipement IVIS-Spectrum (2019), donation de la Fondation Air Liquide (2019), DIM OneHealth projet collaboratif RESPIBIOTE (2018), DIM OneHealth petit équipement Luminex MagPix (2018), projet Jeune Chercheur – SA INRA (2014) ; *en tant que partenaire* (4) : ANR Générique SARDINN (2022), ANR Flash Covid 19 ICARE (2020), APIGENE HealthyCalf (2018), ANR Blanc projet EpiLungCell (2018).
- Encadrements : 6 étudiantes en Master 2 depuis 2014 (C. Drajac 2013, S. Madrières 2017, M. Prost 2019, A. Mialet 2020, A. Dubard 2023), 1 étudiante en école d'ingénieurs (V. Graf 2016) et 2 co-encadrements de thèses : C. Drajac (2014-2018) et C. Chottin (2021-2024).
- Enseignements : tuteur de projet de recherche en Master 1 depuis 2018 – Immunologie Moléculaire et Cellulaire, Université Paris-Saclay.

Parallèlement à mes activités de recherche, j'ai pris en charge la co-animation de séminaires scientifiques internes à l'unité et participé à l'organisation de journées d'animations de notre département INRAE Santé Animale (2022), des séminaires du groupe INRAE Organoïdes (2021 et 2022) ainsi que de l'institut SAPS (Santé Animale Paris Saclay, 2018, 2021 et 2022). Je suis également co-responsable scientifique du plateau technique d'imagerie *in vivo* L2-IVIS (INRAE, Emerg'in) actuellement hébergé dans l'une de nos structures L2 à la VIM. J'ai également apporté mes expertises et mobilisé mes connaissances auprès de la communauté scientifique nationale dans des dispositifs collectifs (jury de concours INRAE ; groupe de travail des encadrants ABIES 2014-2018 ; représentante au conseil académique de l'université Paris Saclay 2015-2019) ou en participant à différents jurys de thèse, de comités de suivi de thèse ou de projets tuteurés.

### 3.1 CONTEXTE SCIENTIFIQUE

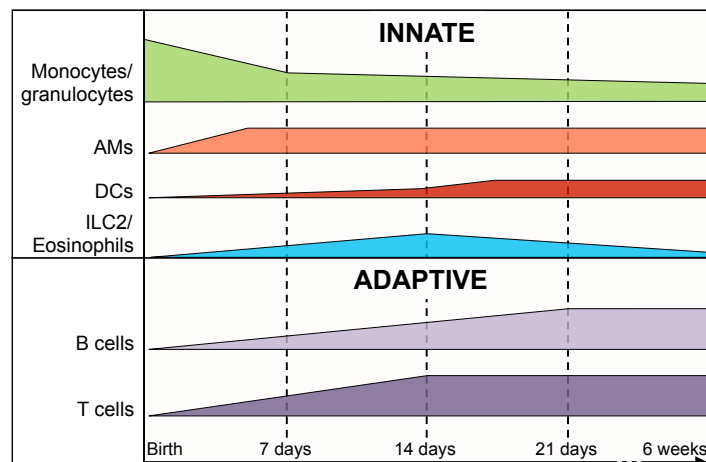
#### 3.1.1 LA MUQUEUSE PULMONAIRE EN PERIODE PERINATALE : UN ENVIRONNEMENT PARTICULIER EN PLEINE EVOLUTION.

Le début de la vie est une période dynamique d'initiation pour l'homéostasie de la muqueuse pulmonaire. Après la naissance, les caractéristiques biologiques de la muqueuse pulmonaire sont rapidement soumises à des expositions environnementales et microbiennes. Cette période est donc importante pour les premières interactions hôte-pathogène et pour établir la sensibilité du nouveau-né à développer des pathologies pulmonaires<sup>13,14</sup>. La maturation périnatale de la muqueuse pulmonaire dépend de l'établissement progressif de trois constituants principaux et interconnectés : (i) l'épithélium des voies respiratoires<sup>15</sup>, (ii) les cellules immunitaires<sup>16-18</sup>, et (iii) un microbiote spécifique<sup>19</sup> (**Figure 6**).



**Figure 6 :** Les principaux événements interconnectés de la muqueuse pulmonaire au début de la vie.

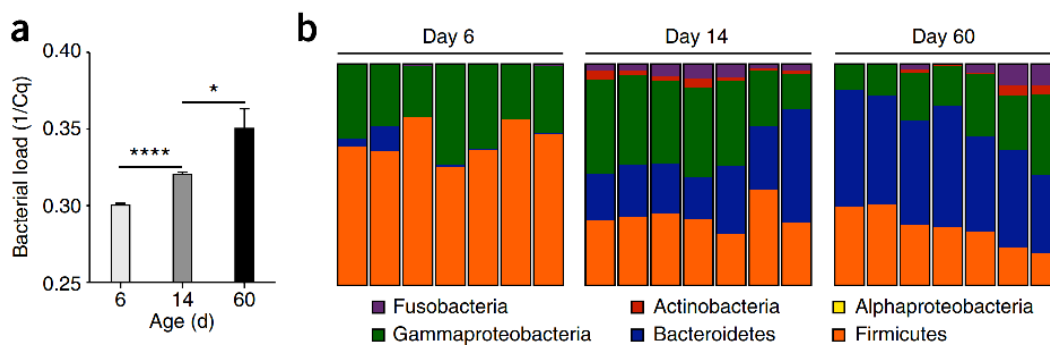
A l'aide des données obtenues dans le modèle murin, il apparaît de plus en plus clairement que le tissu pulmonaire périnatal est orienté vers une immunité de type 2. Rapidement après la naissance, pendant la phase d'alvéolarisation, des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2), des éosinophiles et des basophiles s'accumulent spontanément dans les poumons des souriceaux<sup>16</sup> (**Figure 7**).



**Figure 7 :** Les cellules immunitaires colonisant les poumons des souriceaux pendant la période périnatale (schématisation de la fréquence cellulaire dans les cellules CD45<sup>+</sup> des poumons). Figure issue de la revue Drajac et al.<sup>20</sup>, d'après des données personnelles non publiées et des publications de De Kleer et al.<sup>16</sup>, et Saluzzo et al.<sup>21</sup>.

A l'homéostasie, le tissu pulmonaire de souris BALB/c de 6 jours est pauvre en cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) et conventionnelles (DCs) par rapport à un poumon adulte, mais riche en lymphocytes exprimant le facteur de transcription GATA3 qui semblent être à l'origine du biais des réponses Th2 néonatales<sup>22</sup>. Il a été rapporté que les premières inspirations provoquent une libération de l'IL-33 par les cellules épithéliales pulmonaires. L'IL-33 induit l'expansion et l'activation des ILC2 dans les poumons, lesquels vont sécréter de l'IL-13 conduisant à la polarisation des macrophages alvéolaires (AMs) vers un phénotype de type 2 (M2) ou des DCs pulmonaires à l'état basal ou dans le modèle d'asthme induit par les acariens<sup>16,21</sup>. Ainsi, les ILC2 résidents du poumon semblent orchestrer la caractéristique du tissu pulmonaire du nouveau-né à favoriser des réponses immunes de type 2.

La période périnatale, en plus de constituer une fenêtre immunologique particulière, correspond à la mise en place des microbiotes au niveau des muqueuses<sup>19</sup>. Le microbiote intestinal est le plus étudié et son impact sur la maturation de l'épithélium et le système immunitaire des intestins est largement reconnu<sup>23</sup>. Longtemps considéré comme un organe stérile, le poumon présente aussi une flore bactérienne commensale qui se constitue et se diversifie progressivement mais rapidement dès la naissance (**Figure 8**)<sup>24-26</sup>. Une étude menée par le groupe du Dr. Benjamin Marsland a permis d'établir que le microbiote pulmonaire s'installe pendant les deux premiers mois de vie du nourrisson<sup>24</sup>.



**Figure 8 : Colonisation de la muqueuse pulmonaire de souris par un microbiote.** a. Cinétique d'installation du microbiote pulmonaire selon l'âge des souris. b. Evolution des phyla bactériens selon l'âge des souris. Figures adaptées des données de Gollwitzer et al<sup>25</sup>.

Ce processus de colonisation du poumon par un microbiote pose la question de son influence sur la maturation de la barrière épithéliale, sur le développement de l'immunité, et sa contribution à la sensibilité du nouveau-né à des pathologies respiratoires<sup>19,27,28</sup>. La présence du microbiote dans les poumons de souris contribue fortement à la tolérance immunitaire des animaux dans un modèle d'asthme déclenché par des expositions précoces aux allergènes des acariens, via la signalisation PD-1/PD-L1 entre les cellules T régulatrices et les DCs<sup>25</sup>. L'association de dysbioses à des pathologies pulmonaires est avérée mais le rôle causal de ces dysbioses dans la survenue de pathologies pulmonaires n'est pas clairement établi. Le microbiote nasopharyngé de jeunes enfants peut influencer la propagation de l'infection aux voies respiratoires inférieures et moduler la réponse immunitaire de l'hôte à l'infection par le virus respiratoire syncytial (VRS)<sup>29,30</sup>. Inversement, à travers une étude multi-omique sur des échantillons nasopharyngés de jeunes enfants, suivis de la naissance jusqu'à 1 an, il a été mis en évidence que les premières infections virales (asymptomatiques) en début de vie précèdent le développement de profils défavorables du microbiote respiratoire et d'infections respiratoires récurrentes<sup>31</sup>. L'ensemble de ces données pointent l'association étroite entre la mise en place de l'immunité de la muqueuse et le microbiote pulmonaire en période périnatale, et donc la sensibilité du nouveau-né aux infections respiratoires<sup>19</sup>.

### **3.1.2 LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL (VRS) ET LES BRONCHOPNEUMOPATHIES CHEZ LE JEUNE.**

Les maladies respiratoires pédiatriques constituent un problème majeur de santé publique car elles restent la première cause de décès des jeunes enfants (< 5 ans) dans le monde<sup>34</sup>. Chez le nourrisson, la principale infection respiratoire est la bronchiolite causée dans la grande majorité des cas par le VRS humain qui se caractérise par une réaction inflammatoire et une production excessive de mucus au niveau des bronchioles entraînant leur obstruction<sup>35,36</sup>. Les bronchiolites sévères du nourrisson sont également associées à un risque accru de développer de l'asthme en grandissant<sup>37</sup>. Si l'infection par le VRS peut provoquer des atteintes sévères des voies respiratoires inférieures chez le nouveau-né, elle est généralement asymptomatique et cantonnée aux voies respiratoires supérieures chez l'adulte. Cependant, l'infection au VRS peut être mortelle chez les personnes âgées. Le VRS bovin (VRSb) est le principal agent étiologique de la bronchopneumonie bovine chez les veaux. L'infection par le VRS peut-être une cause majeure de morbidité (retard de croissance) et de mortalité chez les bovins, entre 3 à 20% des cas lors d'épidémies particulièrement sévères<sup>38</sup>, et prédispose les veaux aux surinfections. Le VRSb a donc un fort impact sur la filière bovine et constitue un problème indirect de santé publique en raison de l'utilisation massive d'antibiotiques.

À l'échelle mondiale, l'infection par le VRS représente 33,8 millions de nouveaux épisodes d'infection aiguë des voies respiratoires inférieures chez les jeunes enfants, ce qui représente environ 3,4 millions d'hospitalisations par an. On estime que le VRS est responsable de 66 000 à 199 000 décès chez les enfants de moins de 5 ans en 2005, la plupart des décès survenant dans les pays en voie de développement<sup>39</sup>. Par ailleurs, les dépenses médicales liées aux infections causées par le VRS ont été estimées à plus 4,8 milliards d'euros en 2017<sup>40</sup>. Une étude épidémiologique française à partir de données de réseaux hospitaliers principalement d'Île de France, concluait que le nombre d'enfants atteints de bronchiolite augmente régulièrement depuis 1992<sup>41</sup>. Des candidats vaccin contre le VRS sont en cours de développement par Moderna et Janssen pour les personnes de plus de 60 ans et les essais en phase 3 montrent des taux d'efficacité à plus de 80%. Actuellement il n'existe pas de vaccin disponible pour l'enfant (priorité de l'OMS). Deux anticorps monoclonaux, Synagis® (Palivizumab), et plus récemment Beyfortus® (Nirsevimab), sont autorisés dans le cadre d'un traitement préventif pour limiter principalement les formes sévères chez les nourrissons les plus à risque (*i.e.* prématurés). Ces traitements restent onéreux. L'efficacité et la tolérance du Synagis® notamment sont encore débattues<sup>42</sup>. Des vaccins vétérinaires contre le VRSb existent mais leur efficacité est limitée (réduction des signes cliniques) et surtout, ils n'empêchent pas la dissémination du virus dans les élevages. Il est donc nécessaire de comprendre les spécificités de la muqueuse pulmonaire en période périnatale pour développer de nouvelles stratégies prophylactiques contre l'infection par le VRS.

### **3.1.3 L'HYPER-SENSIBILITE DU NOUVEAU-NE A L'INFECTION PULMONAIRE PAR LE VRS.**

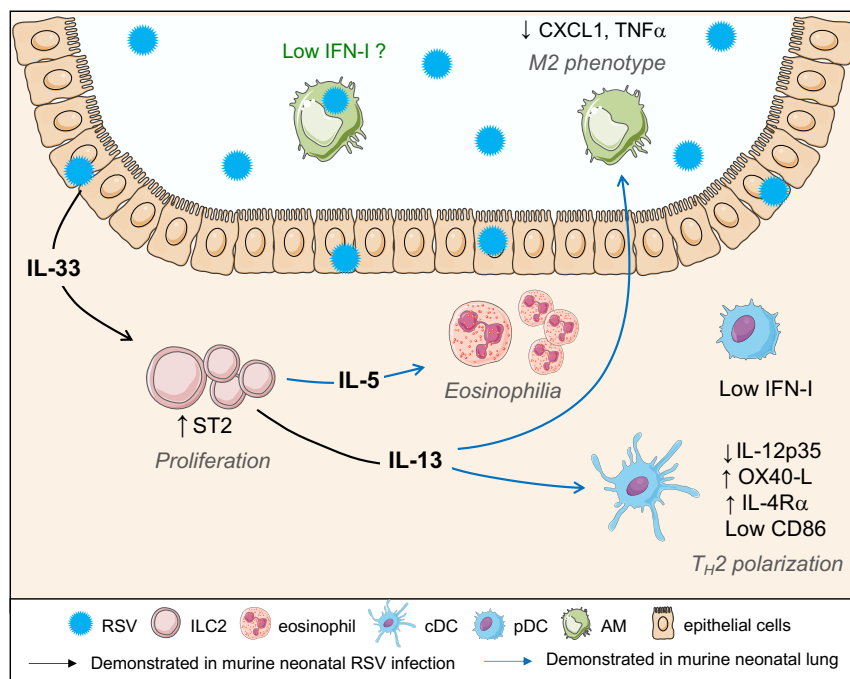
Les spécificités des défenses immunitaires contre les viroses respiratoires chez les jeunes enfants sont peu documentées par rapport à celles relatives à un environnement adulte. Toutefois, la littérature s'accorde à dire qu'une forme sévère de bronchiolite chez l'enfant est associée à une réponse immunitaire excessive de type 2 avec une sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 ou un défaut de mobilisation de la réponse de type 1 caractérisée par une faible production IFN $\gamma$ <sup>43</sup>. A l'inverse chez l'adulte, l'infection virale provoque la sécrétion d'IFN $\gamma$  ainsi que la présence de cellules Natural Killer (NK) et de lymphocytes T cytotoxiques, signatures immunologiques d'un profil de réponse de type 1<sup>44</sup>.

Les facteurs immunologiques expliquant cette hypersensibilité du nouveau-né au VRS commencent à être décryptés, et notamment grâce à un modèle d'infection chez le souriceau BALB/c. Les études sur le VRS ont longtemps focalisé sur l'immunité adaptative et ont démontré

une prédisposition au développement d'une réponse type 2 et un défaut d'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (déficience en production d'IFN $\gamma$ ) lors de l'infection du souriceau par le VRS<sup>46</sup>. Toutefois, ce modèle expérimental a permis de montrer l'importance de l'âge dans les conséquences sur le long terme d'une première infection par le VRS. Lorsque les souriceaux sont infectés par le VRS avant l'âge de 7 jours de vie, ils montrent au cours d'une réinfection à l'âge adulte une perte de poids plus sévère, un recrutement de cellules inflammatoires (éosinophiles et neutrophiles) et une production d'IL-4 augmentés<sup>45</sup>. L'ensemble de ces observations suggèrent que la primo-infection par le VRS pendant la période périnatale chez la souris laisse une empreinte immunopathologique qui conditionne la sévérité de la maladie lors d'une réinfection des voies respiratoires à l'âge adulte.

Lors d'une première exposition au VRS, l'infection provoque une libération d'IL-33 dans les poumons des souriceaux, ce qui n'est pas le cas chez les individus adultes (**Figure 5**). L'IL-33 exercerait une fonction majeure dans l'immuno-pathogénèse de l'infection au VRS chez les souriceaux en engendrant une plus grande présence dans les poumons des ILC2 qui favorisent l'immunité de type 2<sup>47</sup>. Récemment, il a été montré que des niveaux élevés d'ILC2 sont associés à la gravité de l'infection par le VRS chez le nourrisson. Ces résultats soulignent la prédominance des réponses de type 2 à l'infection par le VRS chez les nourrissons et suggèrent un rôle important de l'ILC2 dans l'élaboration de la réponse immunitaire au début de l'infection par le VRS<sup>48</sup>.

Notre équipe a contribué à établir que les souriceaux infectés par le VRS présentent aussi des lacunes importantes dans la mobilisation pulmonaire des CD4, cellules importantes pour l'orientation de la réponse des lymphocytes T, ainsi que dans la production des IFN de type I (IFN-I)<sup>32,52</sup>. Parallèlement, les AMs ont été identifiés comme étant la source principale d'IFN-I dans les poumons adultes infectés par le VRS<sup>51</sup>. Le rôle des AMs lors de l'infection par le VRS chez le souriceau reste peu décrit. Ces cellules font l'objet de sujets de recherche que j'ai développé depuis mon recrutement à l'INRAE (voir §3.2). Des interventions immuno-modulatrices visant cette période de la vie ont donc un fort potentiel d'induire des modifications de la réponse immune et par conséquent, d'agir sur la sensibilité d'un individu à des pathogènes<sup>13</sup>. Notre équipe V2I a démontré qu'il est possible de moduler les défenses immunitaires pulmonaires pendant la période périnatale pour modifier la sensibilité au VRS. Ainsi, le traitement des souriceaux avec le facteur de croissance des CD4, le Flt3-ligand, améliore la sécrétion d'IFN-I *via* une augmentation de la présence des CD4 dans les poumons et permet de limiter les conséquences pathologiques de l'infection par le VRS<sup>32</sup>. La sensibilité du nourrisson à une infection VRS est donc intrinsèquement liée aux caractéristiques physiologiques, immunologiques et microbiologiques de la muqueuse pulmonaire en période périnatale. La compréhension de ces caractéristiques des poumons des nouveau-nés et des facteurs externes qui les régulent pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies prophylactiques en faveur de la santé des jeunes. Ces pistes de stratégie d'immunomodulation font l'objet d'un de mes sujets de recherche (voir §3.2).



**Figure 5 : Les réactions immunitaires immédiates de la muqueuse pulmonaire du souriceau à l'infection par le VRS.** Figure adaptée de la revue Drajac C, et al<sup>20</sup>. L'exposition néonatale au VRS entraîne une sécrétion précoce d'IL-33 par les cellules épithéliales respiratoires<sup>47</sup>. L'IL-33 signale par son récepteur ST2 localisé à la membrane des ILC2. Cette alarmine favorise l'augmentation du nombre d'ILC2 et la production d'IL-13 dans les poumons de souriceaux infectés par le VRS<sup>49</sup>. Les ILC2 peuvent favoriser le passage à un phénotype de type 2 des macrophages alvéolaires (AMs) ou des cellules dendritiques (DCs) pulmonaires à l'état basal ou dans le modèle d'asthme induit par les acariens<sup>16,21</sup>. Les plasmacytoïdes DCs (pDCs) néonataux ainsi que la voie de l'IFN-I sont faiblement mobilisés dans les poumons des souriceaux infectés par le VRS<sup>50</sup>. Les AMs sont la principale source d'IFN-I dans les poumons adultes infectés par le VRS mais la question reste ouverte pendant la période périnatale<sup>51</sup>. Par conséquent, il est fortement soupçonné que les cellules ILC2 soient indirectement responsables de l'incapacité des souriceaux à monter une réponse IFN-I efficace pour contrer l'infection par le VRS.

### 3.2 RESULTATS OBTENUS

J'ai la responsabilité scientifique des projets caractérisant l'immunité mucale et l'immunopathologie associée à l'infection par le VRS en période périnatale. Cette sensibilité du jeune à une infection par le VRS est intrinsèquement liée aux particularités immunologiques de la muqueuse pulmonaire en période néonatale qui dépendent de la mise en place de l'immunité et de la colonisation du poumon par un microbiote bactérien. Ainsi, mes projets visent à décrire les caractéristiques immunologiques pulmonaires chez le jeune pour comprendre les mécanismes physiopathologiques déclenchés lors de l'infection par le VRS afin de proposer de nouvelles stratégies d'immuno-intervention adaptées à cette période particulière de la vie. Mon activité de recherche s'articule autour de trois thématiques :

- La caractérisation des cellules composant la muqueuse pulmonaire et de leur réactivité lors de l'infection par le VRS.
- L'implication des protéines IRAP et TAX1BP1 dans le contrôle de la production des IFN-I et des cytokines au cours de l'infection par le VRS.
- L'identification des interactions fonctionnelles entre microbiote pulmonaire-immunité néonatale.

Le développement de ces thématiques de recherche a impliqué l'encadrement d'étudiants à différents niveaux (Master, thèse), d'une ingénieure d'études et d'un jeune chercheur post-

doctorant et a été réalisé dans le cadre de projets financés au sein de l'équipe ou de collaborations nationales.

### **3.2.1 THEMATIQUE 1 : CARACTERISATION DES CELLULES COMPOSANT LA MUQUEUSE PULMONAIRE ET DE LEUR REACTIVITE LORS DE L'INFECTION PAR LE VRS.**

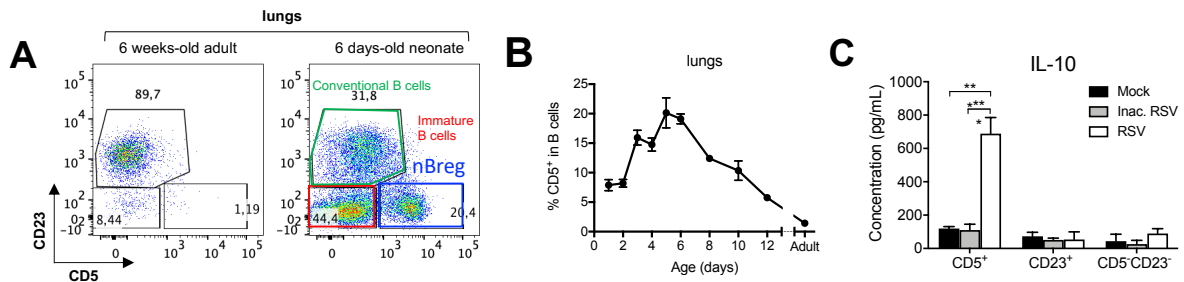
A mon arrivée dans le groupe du Dr. Sabine Riffault, j'ai pris en charge la réalisation d'une tâche dans le projet SyncBreg financé par l'ANR (2014/2017). Une étude clinique a montré que dans des formes fatales de bronchiolites, la pathologie est associée à une infiltration pulmonaire massive de lymphocytes B<sup>53</sup>. L'équipe du Dr. Richard Lo-Man (coordinateur du projet ANR SyncBreg, Institut Pasteur, Paris) a mis en évidence un mécanisme régulateur important dans l'inefficacité des souriceaux à induire une réponse Th1. En effet, chez le nouveau-né, la réponse des CD5<sup>+</sup> à une stimulation microbienne est sous le contrôle des lymphocytes néonataux B régulateurs CD5<sup>+</sup> (nBreg CD5<sup>+</sup>) qui, en réponse à une stimulation TLR-9 (injection du ligand CpG), produisent une forte quantité d'IL-10 réduisant la capacité des CD5<sup>+</sup> à sécréter de l'IL-12 et donc à induire une réponse Th1<sup>54,55</sup>. Cette population de nBreg CD5<sup>+</sup>, est particulièrement abondante dans les deux premières semaines de la vie et décroît rapidement au profit des lymphocytes B conventionnels (CD5<sup>-</sup>). Des résultats menés en collaboration avec notre groupe ont montré que les nBreg CD5<sup>+</sup> humains purifiés du sang de cordon produisaient de l'IL-10 uniquement en présence du VRS, contrairement aux lymphocytes B conventionnels CD5<sup>-</sup>. De plus, la fréquence de ces lymphocytes nBreg CD5<sup>+</sup> semble corrélée à des formes sévères de bronchiolites chez les jeunes patients. La présence de ces cellules nBreg pourrait donc être un paramètre prédictif de la sévérité de la maladie chez le nourrisson<sup>56</sup>.

#### **PUBLICATION :**

*Zhivaki D, Lemoine S, Lim A, Morva A, Vidalain PO, Schandene L, Casartelli N, Rameix-Welti MA, Hervé PL, Dériaud E, Beitz B, Ripaux-Lefevre M, Miatello J, Lemerrier B, Lorin V, Descamps D, Fix J, Eléouët JF, 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(2) :301-314. PMID:28228284.*

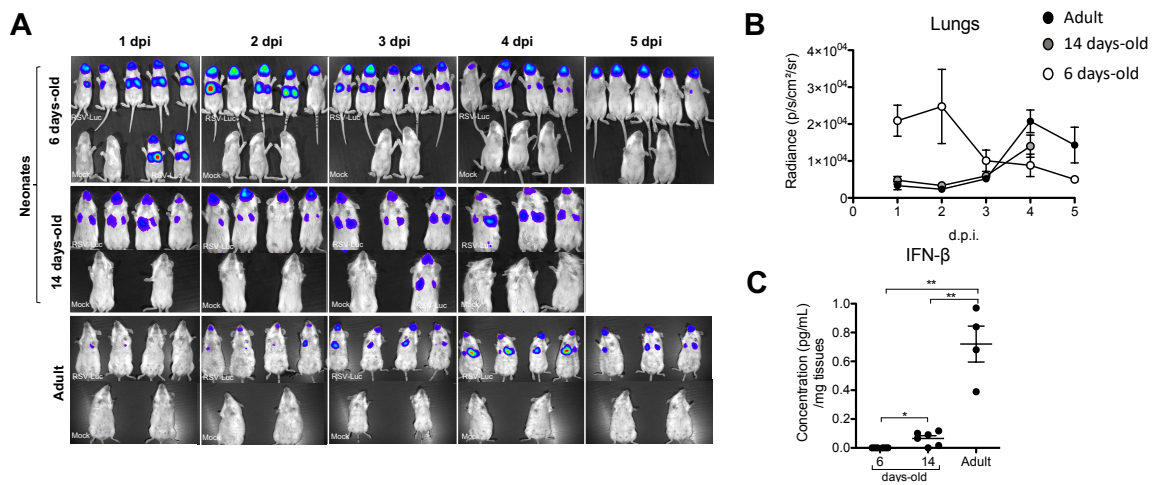
Au sein de ce projet ANR SyncBreg, j'ai eu la charge d'étudier la présence et le rôle des lymphocytes nBregs CD5<sup>+</sup> dans les poumons de souriceaux BALB/c dont la fonction n'était alors pas décrite au cours de l'infection par le VRS chez la souris. Notre groupe a bénéficié pour ce projet de l'activité d'une ingénieure d'études, Daphné Laubretton (CDD 2015-2017), dont j'ai supervisé le travail, notamment toutes les études de cytométrie en flux (FORTESSA, BD Bioscience) nécessaires à cette caractérisation. Ainsi, nous avons confirmé la présence de cette population de lymphocytes nBregs CD5<sup>+</sup> dans les poumons des souriceaux (**Figure 9**). Fortement représentées dans la population des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> pulmonaires en début de vie du souriceau, les cellules nBregs CD5<sup>+</sup> décroissent rapidement au profit de l'apparition d'une population de lymphocytes B CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup> matures (**Figure 9B**). Toutefois les cellules CD5<sup>+</sup> restent encore détectables dans les poumons des nouveau-nés de 14 jours. De façon intéressante, cette population est plus fortement représentée dans le poumon des souriceaux que dans la rate et les ganglions. Dans un contexte d'exposition *ex vivo* des différentes populations des lymphocytes B des poumons au VRS, les cellules nBreg CD5<sup>+</sup> sont les seules à produire significativement l'IL-10, confirmant les données obtenues avec les cellules humaines<sup>56</sup> (**Figure 9C**).





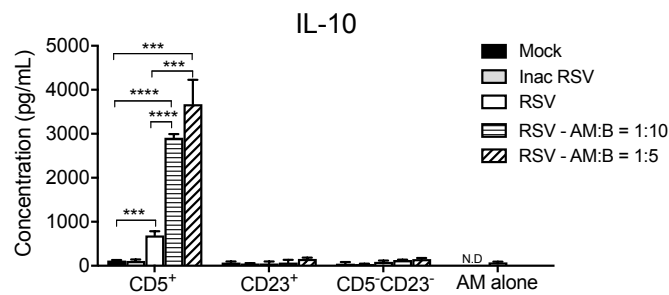
**Figure 9 : Caractérisation de la présence des lymphocytes nBregs CD5<sup>+</sup> dans les poumons des souris.** **A.** Présentation de la stratégie de gating des différents lymphocytes B. **B.** Evolution du % de lymphocytes nBregs CD5<sup>+</sup> (CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>CD5<sup>+</sup>) dans la population des lymphocytes B (CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) présents dans les poumons des nouveau-nés en fonction de l'âge. Les poumons ont été récupérés à différents temps de vie afin de réaliser le marquage cellulaire et l'analyse au cytomètre en flux. **C.** Production de l'IL-10 par les différentes populations de lymphocytes B après exposition ex-vivo au VRS pendant 24h. Les différents types de lymphocytes B ont été isolés des poumons de souris âgées de 6 jours et triés au cymomètre. Les cellules ont ensuite été infectées par le VRS. L'IL-10 sécrétée dans les surnageants a été dosée par ELISA 24h après l'infection par le VRS.

Comme nous avons précédemment observé qu'une fréquence élevée de nBregs CD5<sup>+</sup> était corrélée avec un mauvais contrôle de l'infection par le VRS<sup>56</sup>, nous avons profité de la disponibilité du virus recombinant exprimant la luciférase (VRS-luciférase, obtenus par génétique inverse)<sup>57</sup> pour réaliser un suivi complet par imagerie bioluminescente *in vivo* de la réplication virale en fonction de l'âge de l'infection chez des souris BALB/c. Ainsi en infectant les souris à 6 jours de vie par le VRS-luciférase, nous avons mis en évidence une cinétique de réplication virale chez le nouveau-né très différente de celle observée chez l'adulte (**Figure 10A**). En effet, l'infection par le VRS induit immédiatement l'expression de la luciférase, et donc la réplication virale dans les poumons des souris, alors que l'infection est retardée chez les souris adultes et atteint son pic de réplication 4 jours post-infection (p.i.) (**Figure 10B**). En accord avec des données antérieures montrant des réponses IFN-I très faibles chez les nouveau-nés infectés par le VRS<sup>32,52</sup>, les protéines IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$  ne sont pas détectables à 1 jours p.i. dans les homogénats pulmonaires contrairement à ce qui est observé dans les mêmes conditions chez les souris adultes (**Figure 10C**). Par ailleurs, nous n'avons pas observé de modification de la cinétique de présence des lymphocytes nBregs CD5<sup>+</sup> suite à l'infection VRS chez les souris.



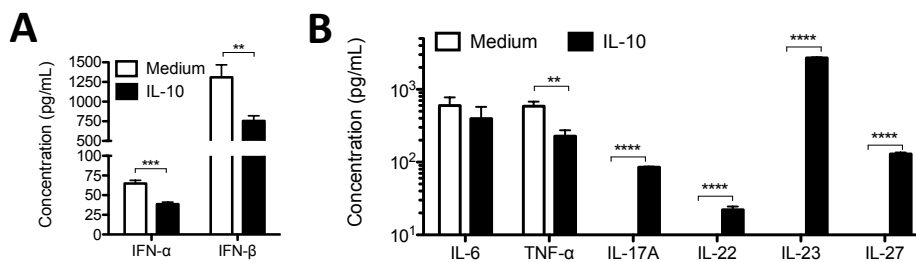
**Figure 10 : La cinétique de réplication du VRS et la production des interférons de type I dans des souris ou des souris adultes infectés par le VRS-luciférase sont différentes.** Les souris de 6 ou 14 jours de vie et les souris adultes ont reçu par voie nasale du VRS recombinant codant pour la luciférase (VRS-Luc, 10 $\mu$ L et 50 $\mu$ L, respectivement). **A.** Images prises au Xenogene (IVIS) de la bioluminescence émise suite à la réplication du VRS-luciférase dans les poumons des souris nouveau-nés ou adultes à différents temps post-infection. **B.** Quantification de la bioluminescence induite par le VRS-luciférase dans les poumons des souris nouveau-nés ou adultes. **C.** Quantification de la production de l'IFN- $\beta$  dans les poumons des animaux infectés par le VRS-Luciférase à 1 jours p.i.

En revanche, les souriceaux infectés à l'âge de 14 jours de vie par le VRS-luciférase présentent une cinétique de réplication virale similaire à celle des souris adultes infectées (**Figures 10A-B**) avec une réponse IFN-I modérée (**Figure 10C**). Ainsi, entre 6 et 14 jours de vie, les jeunes souris sont devenues capables de contenir la réplication virale à un stade précoce post-infection. A la même période de vie, elles commencent à produire une petite quantité d'IFN- $\beta$ , confirmant une réponse antivirale à l'infection par le VRS qui dépend de l'âge<sup>32,52</sup>. Il est intéressant de noter que cette âge (14 jours de vie) est associé à une diminution du nombre de nBregs CD5<sup>+</sup> dans le poumon pour atteindre des nombres proches de ceux des adultes (**Figure 9B**). Ces données suggèrent que la période périnatale de la vie est caractérisée par une permissivité précoce à la réplication du VRS qui se perd progressivement avec l'âge, en relation avec une capacité croissante à monter des réponses IFN-I à 1 jour p.i.. Ce phénomène pourrait également être associé à la diminution du taux de nBregs CD5<sup>+</sup> dans la muqueuse pulmonaire. Nous avons donc cherché à étudier comment et avec quel partenaire cellulaire ces lymphocytes nBregs CD5<sup>+</sup> pourraient intervenir dans la réponse anti-virale au cours de cette période périnatale. Les AMs ayant été identifiés comme étant la source principale d'IFN-I dans les poumons adultes infectés par le VRS<sup>51</sup>, c'est naturellement, et après adaptation des protocoles aux souriceaux<sup>58</sup>, que nous avons analysé la relation potentielle entre les lymphocytes nBregs CD5<sup>+</sup> et les AMs des animaux à 6 jours de vie. Nous avons mis en évidence que la production d'IL-10 par les lymphocytes nBregs CD5<sup>+</sup> isolés de poumons de souriceaux augmente en présence des AMs dans le contexte de l'infection par le VRS (**Figure 11**).



**Figure 11:** Augmentation de la production de l'IL-10 des lymphocytes nBregs CD5<sup>+</sup> des poumons des souriceaux en présence des AMs lors de l'infection par le VRS. Les 3 types de lymphocytes B des poumons ont été triés puis infectés par le VRSmCherry ou le virus inactivé par les UV (Inac RSV) en présence ou non des AMs (1 AM pour 10 lymphocytes B ou 1 AM pour 5 lymphocytes B). L'IL-10 a été dosé dans le surnageant de culture 48h après l'infection.

De plus, nous avons fait l'observation que la présence d'IL-10 dans le surnageant de culture réduit la production des IFN-I des AMs lors d'une infection par le VRS (**Figure 12A**). L'IL-10 conduit également à un changement du profil de sécrétion des cytokines par des AMs infectés qui produisent alors de l'IL-17A, IL-22, IL-23 et IL-27 (**Figure 12B**). L'impact de cette orientation IL-10-dépendante sur la réponse cytokinique des AMs infectés par le VRS reste à comprendre.



**Figure 12:** Modification de la production de cytokines des AMs isolés de souriceaux de 6 jours et infectés *ex vivo* par le VRS en présence de l'IL-10. Les AMs ont été isolés des poumons des souriceaux, mis en culture, puis infectés par le VRS (MOI = 5) en présence ou non de l'IL-10 (0,5 mg/mL). **A.** Dosages des interférons de type I dans les surnageants de culture 24h après l'infection par le VRS. **B.** Dosages multiplexés de différentes cytokines produites dans les surnageants de culture 24h après l'infection par le VRS.

### PUBLICATION :

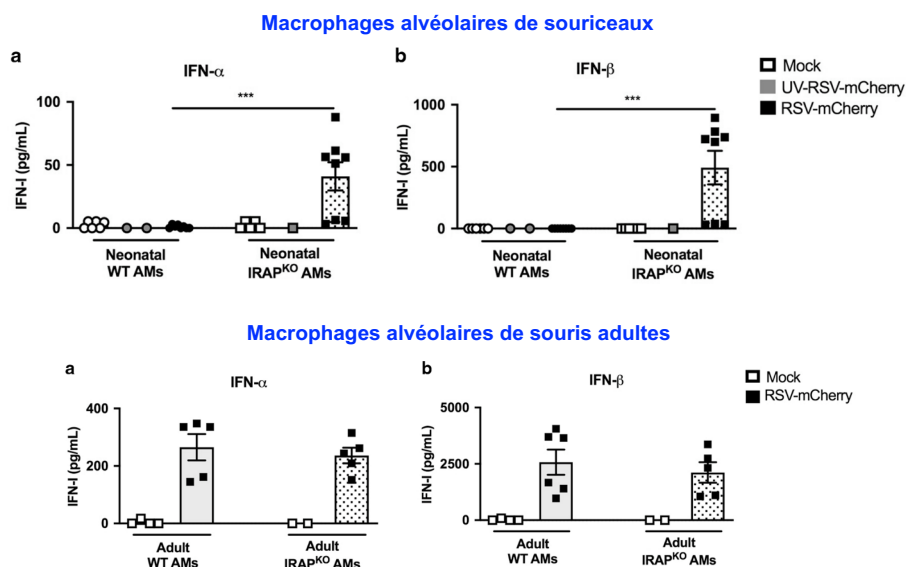
Laubreton D, Drajac C, Eléouët JF, Rameix-Welti MA, Lo-Man R, Riffault S\*, Descamps D\*. Regulatory B Lymphocytes Colonize the Respiratory Tract of Neonatal Mice and Modulate Immune Responses of Alveolar Macrophages to RSV Infection in IL-10-Dependent Manner. *Viruses*. 2020 Jul 29;12(8):822. <https://doi.org/10.3390/v12080822>. PMID: 32751234.

### 3.2.2 THEMATIQUE 2 : IMPLICATION DES PROTEINES IRAP ET TAX1BP1 DANS LE CONTROLE DE LA PRODUCTION DES IFN-I ET DES CYTOKINES AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VRS.

Mes recherches m'ont également conduite à regarder le rôle de molécules intracellulaires importantes dans la régulation de la réponse immunitaire innée des AMs, et notamment la production des IFN-I.

#### La protéase IRAP (Insulin Responsive Aminopeptidase).

Dans le cadre d'un financement « projet collaboratif région Ile de France DIM-Malinf » (2014/2017) obtenu avec le Dr. Loredana Saveanu (U1149, INSERM, Paris), nous avons cherché à décrire le rôle de la protéase IRAP lors de l'infection par le VRS. Cette protéase est un régulateur majeur dans la signalisation des TLRs et des voies interférons dans les CDs<sup>59</sup>. Compte tenu du défaut de production des IFN-I lors d'une infection VRS chez le nouveau-né, nous avons proposé d'étudier l'implication d'IRAP dans la régulation de la production des IFN-I par les AMs lors d'une infection par le VRS. Ces aspects ont été abordés dans le cadre de la thèse de Carole Drajac que j'ai co-dirigé avec le Dr. Sabine Riffault (financement DIM-Malinf, 2014/2017) et à l'aide de souris transgéniques dont l'expression d'IRAP a été invalidée (IRAP<sup>KO</sup>) dans un fond génétique C57Bl6. Pour mener à bien cette étude, j'ai fait introduire la lignée dans l'animalerie de notre centre de recherche en 2014. Bien que moins permissives à l'infection par le VRS, j'ai montré que les souris C57Bl6 (adultes et souriceaux) présentent des cinétiques de réplication du VRS comparables aux animaux BALB/C. La faible mobilisation de la voie des IFN-I lors de l'infection par le VRS a également été retrouvée aussi bien chez les souriceaux que dans les AMs issus d'animaux C57Bl6 (**Figure 13**).

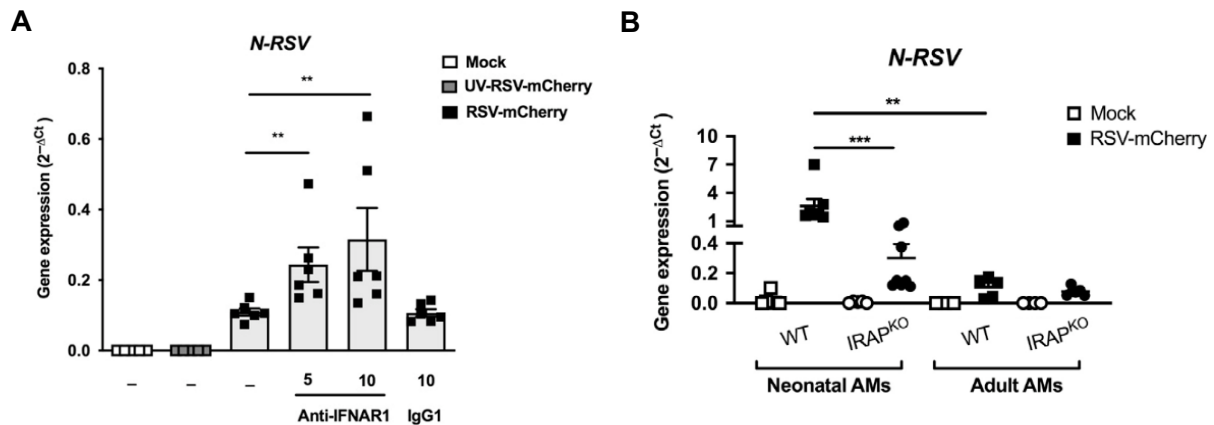


**Figure 13 :** Les AMs de souriceaux IRAP<sup>KO</sup> produisent des IFN-I suite à l'infection par le VRS. Les AMs ont été isolés des poumons de souriceaux ou de souris adultes WT ou IRAP<sup>KO</sup>, mis en culture, puis infectés par le VRS-Cherry (MOI = 5) ou le virus inactivé par les UV (UV-RSV-mCherry). Le dosage des interférons de type I a été réalisé dans les surnageants de culture 24h après l'infection par le VRS.

En revanche, nous avons constaté que l'absence d'expression de la protéase IRAP conduit à une augmentation substantielle de la production des IFN-I ainsi que des gènes stimulés par les IFN-I par les AMs issus de souriceaux IRAP<sup>KO</sup> (**Figure 13**), avec des niveaux d'expression plus

forts que ceux de type sauvage C57BL/6. Il est intéressant de noter que la déplétion d'IRAP n'affecte pas les réponses des AMs de souris adultes. En revanche, la réplication virale est nécessaire pour produire les IFN-I puisque qu'un VRS inactivé par les UV (UV-RSV-mCherry) est incapable d'engendrer cette réponse dans les AMs IRAP<sup>KO</sup> (**Figure 13**).

Nous avons également démontré l'importance de l'action des IFN-I produits par les AMs pour limiter la réplication du VRS dans ces cellules. En effet, l'inhibition du signal dépendant des IFN-I par un anticorps (anti-IFNAR1) entraîne une augmentation de la réplication virale mesurée ici par l'expression du gène N du VRS (PCR quantitative, **Figure 14A**). Dans cette logique, nous avons constaté que les AMs des souriceaux IRAP<sup>KO</sup> qui produisent des IFN-I, présentent une expression du gène N, et donc une réplication virale, plus faible que leurs homologues WT (**Figure 14A**).



**Figure 14 : Importance de la voie des IFN-I dans le contrôle de la réplication du VRS dans les macrophages alvéolaires. A.** La réplication virale est augmentée dans les AMs de souris adultes lorsque la voie induite par les IFN-I est inhibée par l'anticorps anti-IFNAR1. Les AMs ont été isolés des poumons des souris adultes WT, mis en culture, puis infectés par le VRS-Cherry (MOI = 5) ou le virus inactivé par les UV (UV-RSV-mCherry) en présence ou non d'une dose croissante de l'anticorps anti-IFNAR1. La réplication virale a été évaluée par PCR quantitative du gène N 24h après l'infection dans les lysats cellulaires. **B.** La réplication virale est diminuée dans les AMs de souriceaux IRAP<sup>KO</sup> par rapport aux AMs WT. Les AMs ont été isolés des poumons des souris adultes ou de souriceaux WT ou IRAP<sup>KO</sup>, mis en culture, puis infectés par le VRS-Cherry (MOI = 5). La réplication virale a été évaluée par PCR quantitative du gène N 24h après l'infection dans les lysats cellulaires.

*In vivo*, nous avons démontré que les souriceaux IRAP<sup>KO</sup> infectés par le VRS avaient plus d'IFN-I dans leurs poumons et éliminaient le virus plus efficacement que les animaux WT. Dans l'ensemble, nous avons démontré que la susceptibilité à l'infection par le VRS au début de la vie peut être liée à une action suppressive originale de la protéase IRAP sur les réponses antivirales induites par l'IFN-I dans les AMs néonatales.

#### PUBLICATIONS : #corresponding auteur

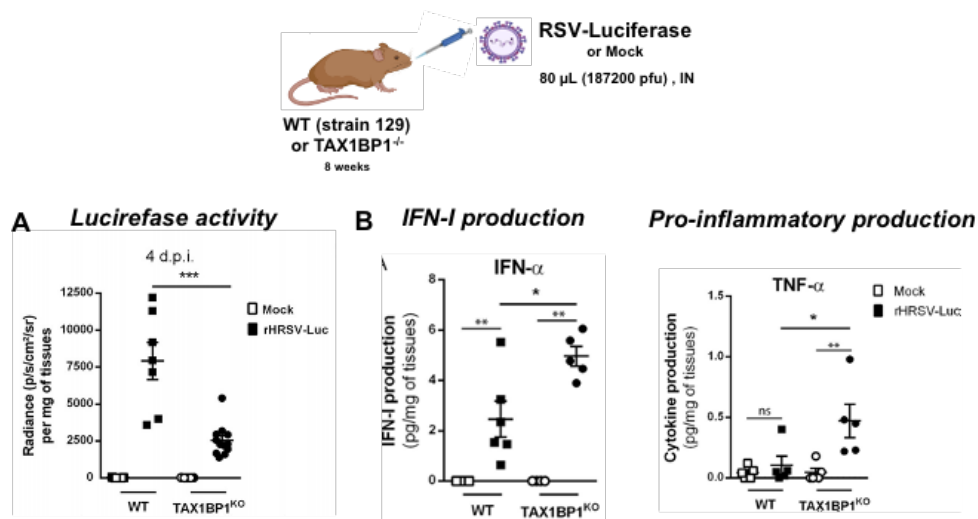
- Drajac C, Laubret D, Marquant Q, Chottin C, Ferret C, Bouguyon E, Schwartz-Cornil I, Saveanu L, Riffault S, Descamps D#. Control of IFN-I responses by the aminopeptidase IRAP in neonatal C57BL/6 alveolar macrophages during RSV infection. *Mucosal Immunol.* 2021, Apr 12. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00402-w>. PMID: 3846534.  
 - Descamps D#, Evnouchidou I, Caillens V, Drajac C, Riffault S, Van Endert P & Saveanu L#. The Role of Insulin Regulated Aminopeptidase in Endocytic Trafficking and Receptor Signaling Immune Cells. *Front. Mol. Biosci.* 2020, 7:583556. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.583556>. PMID:33195428.

#### La protéine TAX1BP1.

Récemment, j'ai apporté mon expertise sur le modèle d'infection par le VRS et mes compétences en immunologie dans un travail collaboratif au sein de mon unité avec le Dr. Marie Galloux (équipe BMP, VIM, INRAE, Jouy-en-Josas) sur le rôle original de la protéine cellulaire TAX1BP1 au cours de l'infection par le VRS.

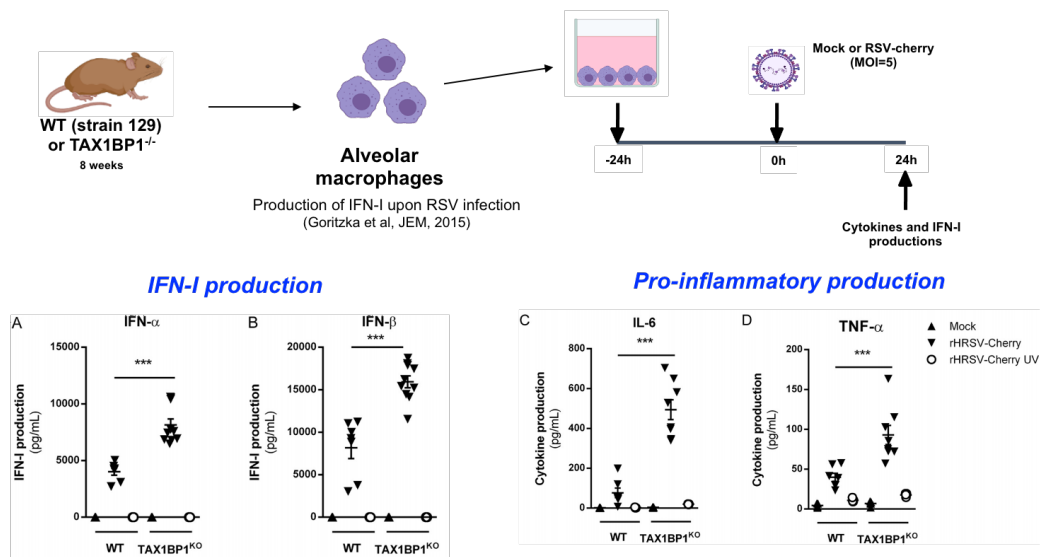
Par une analyse double hybride (collaboration avec le Dr. Pierre-Olivier Vidalain, Institut Pasteur), l'équipe BMP a mis en évidence l'interaction entre la protéine N du VRS et la protéine

cellulaire TAX1BP1. Cette protéine est connue pour être impliquée dans des mécanismes de régulation des voies de l'immunité innée (facteur NF- $\kappa$ B et IRF3) et aussi de l'autophagie<sup>60</sup>. Ces mécanismes peuvent être détournés au cours d'une infection virale. Cette interaction N-TAX1BP1 a été validée *in vitro* par des essais de pull-down et d'immunoprécipitation. Nous avons montré que la suppression de TAX1BP1 n'a qu'un impact limité sur la réplication du VRS dans les cultures cellulaires. Cette collaboration a conduit au co-encadrement d'un stage 2<sup>ème</sup> année d'école ingénieur (Venice Graf, AgroParisTech) où nous avons mis en évidence une induction de l'expression de la protéine TAX1BP1 au cours d'une infection VRS chez des souris adultes BALB/C. De plus, j'ai introduit au sein de notre animalerie la lignée de souris transgéniques dont l'expression de TAX1BP1 a été invalidée (TAX1BP1<sup>KO</sup>, Dr. Hidekatsu, Japon), ainsi que la lignée contrôle pour permettre d'établir la relevance de l'interaction N-TAX1BP1 sur l'infection VRS *in vivo*. Les expérimentations d'infection virale chez les souris adultes ont été effectuées dans le cadre du stage d'une étudiante en Master 2 (Sarah Madrieres, Université Paris Diderot). Nous avons alors observé une réduction significative de la réplication virale, 4 jours post-infection, chez les souris TAX1BP1<sup>KO</sup> par rapport aux animaux sauvages alors que les productions de cytokines inflammatoires et les IFN-I sont augmentées (**Figure 15**).



**Figure 15 :** La réplication virale du VRS est réduite dans les souris dépourvues de l'expression de la protéine cellulaire TAX1BP1. Les souris adultes ont été instillées par le VRS-Luc (80 $\mu$ L). **A.** Quantification de la bioluminescence induite par le VRS-Luc dans les poumons des souris adultes à 4 jours post-infection d.p.i.). **B.** Quantification de la production de l'IFN- $\alpha$  et du TNF- $\alpha$  dans les poumons des animaux infectés par le VRS-Luc à 1 jours p.i.

J'ai ensuite caractérisé la réponse à l'infection par le VRS des AMs des souris TAX1BP1<sup>KO</sup> par rapport aux cellules préparées à partir des animaux exprimant TAX1BP1 (WT). Les AMs TAX1BP1<sup>KO</sup> produisent plus d'IFN-I et de cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-6) que les cellules sauvages (WT) suite à l'infection par le VRS (**Figure 16**). L'infection *in vitro* de AMs TAX1BP1<sup>KO</sup> confirme donc que la réponse immunitaire innée à l'infection par le VRS est renforcée en l'absence de TAX1BP1.



**Figure 16 :** La réponse immunitaire innée des AMs  $TAX1BP1^{KO}$  est augmentée par rapport à des cellules sauvages lors de l'infection VRS. Les AMs ont été isolés des poumons des souris adultes  $TAX1BP1^{KO}$  ou WT, mis en culture, puis infectés par le VRS-Cherry (MOI = 5) ou le virus inactivé par les UV (RSV-Cherry UV). Les IFN-I et les cytokines inflammatoires (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) ont été dosés par luminex 24h après l'infection dans le surnageant.

Dans cette étude, nous avons décrit une interaction originale de la protéine virale N avec TAX1BP1 et démontré que l'absence la protéine TAX1BP1 chez la souris entraîne une production augmentée des IFN-I et une réduction significative de la réplication virale. L'interaction N-TAX1BP1 participe donc au contrôle de la réponse immunitaire innée au cours de l'infection chez l'adulte et représente une nouvelle cible pour le développement d'antiviraux. L'impact de l'interaction N-TAX1BP1 reste à être démontrée dans le modèle souriceau.

**PUBLICATION :** #corresponding auteur

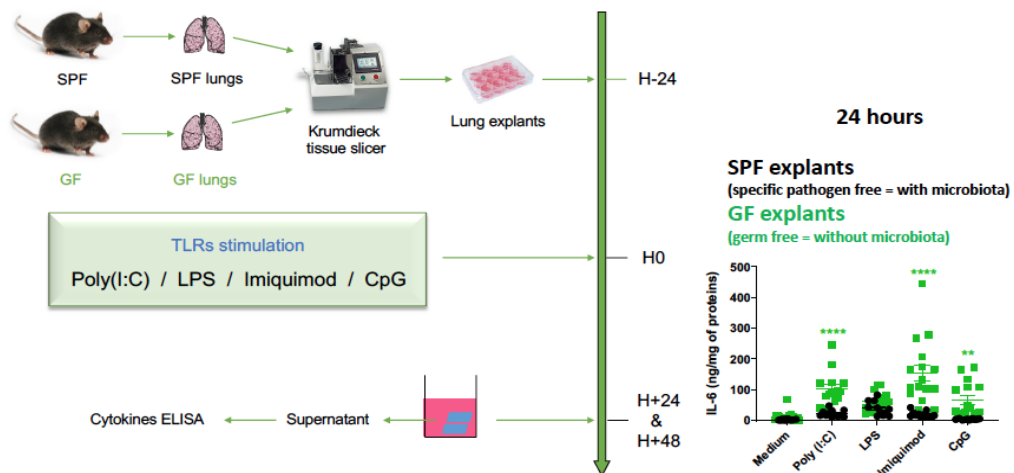
**Descamps D#, Peres de Oliveira A, Gonnin L, Madrières S, Fic D, Drajac C, Marquant Q, Bouguyon E, Pietralunga V, Iha H, Morais Ventura A, Tangy F, Vidalain P-O, Eléouët J-F & Galloux M#.** Depletion of TAX1BP1 amplifies innate immune responses during respiratory syncytial virus infection. *J Virol.* 2021, Aug 25; JVI0091221. [https://doi: 10.1128/JVI.00912-21](https://doi.org/10.1128/JVI.00912-21).

**3.2.3 THEMATIQUE 3 : IDENTIFICATION DES INTERACTIONS FONCTIONNELLES ENTRE MICROBIOTE PULMONAIRE & IMMUNITE PERINATALE.**

L'exploration de l'influence du microbiote pulmonaire sur les compétences de la muqueuse des poumons fait l'objet d'une collaboration avec le Dr. Muriel Thomas (MICALIS, INRAE, Jouy-en-Josas) depuis 2014 suite à la mise en évidence de l'installation progressive et rapide d'une flore bactérienne pulmonaire au cours du temps chez les souriceaux<sup>26</sup>. Le processus de colonisation du poumon par un microbiote pose la question de son influence sur la maturation de la barrière épithéliale pulmonaire et sur le développement de l'immunité en période périnatale. Au démarrage de cette collaboration, l'effet d'un microbiote pulmonaire sur la physiologie du poumon était encore peu décrit. J'ai donc développé cette thématique dans l'équipe V2I qui a fait l'objet des travaux de recherche du Dr Quentin Marquant, post-doctorant que j'ai encadré (financement DIM-OneHealth 2018/2020), et dont les résultats ont fait l'objet d'une communication orale à l'European Respiratory Society (septembre 2019, Madrid).

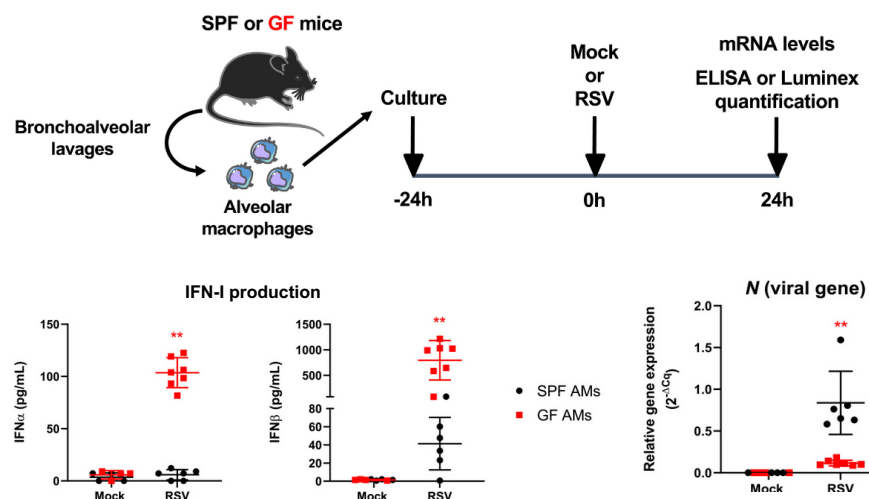
Nous avons d'abord cherché à établir si la présence d'un microbiote pulmonaire modulait la réactivité du tissu pulmonaire à différents ligands mimant ou issus de pathogènes (appelés PAMPs). Ainsi nous avons mis en évidence que des stimulations par différents PAMPs *ex vivo* d'explants pulmonaires (coupes de poumons obtenus en utilisant un microtome, « Krumdieck Tissue Slicer ») de souris axéniques (animaux dépourvus de flores microbiennes) par différents PAMPs entraînent des productions de cytokines plus rapides et plus fortes que celles engendrées

par des coupes issues de poumons de souris conventionnelles (animaux pourvus de flores microbiennes) (**Figure 17**).



**Figure 17 :** Exemple de dosages par ELISA de sécrétion de cytokines (IL-6) d'explants de poumons de souris axéniques (vert, GF) et de souris conventionnelles (noir, SPF) exposés à différents PAMPs. Les poumons des souris ont été instillés par l'agarose « low-melting point » afin de procéder à la coupe des tissus en explants dans l'appareil Tissue Slicer. Mis en culture à 37°C, les explants sont débarrassés de l'agarose par des lavages successifs. Le lendemain, les explants sont exposés via le milieu de culture à différents ligands. Les cytokines sont ensuite dosées dans les surnageants de culture cellulaire au cours du temps.

Cette réactivité exacerbée du tissu pulmonaire dépourvu de flore microbienne à des stimuli de l'immunité innée a été confirmée *in vivo*. Des souris axéniques (Animalerie Anaxem, INRAE, Jouy-en-Josas) instillées par voie nasale avec du LPS, un composant de la paroi des bactéries Gram<sup>-</sup>, présentent une réaction inflammatoire du tissu pulmonaire et un recrutement des neutrophiles plus rapides que ceux observés chez les souris conventionnelles. Nous avons également montré que des AMs isolés du poumon de souris axéniques réagissaient à une exposition au VRS par une synthèse plus intense d'IFN-I et étaient moins permissifs à la réplication virale que des AMs isolés de poumon de souris conventionnelles (**Figure 18**).



**Figure 18 :** Les AMs issus de souris axéniques infectés par le VRS produisent plus d'IFN-I et sont moins permissifs à la réplication virale que les cellules venant de souris conventionnelles. Les AMs ont été isolés des poumons des souris adultes axéniques (rouge, GF) ou conventionnelles (noir, SPF), mis en culture, puis infectés par le VRS (MOI = 5). Les IFN-I ont été dosés par luminex 24h après l'infection dans le surnageant. Les ARN des lysats cellulaires ont été préparés pour mesurer l'expression du gène N par PCR quantitative afin d'évaluer la réplication virale.

L'ensemble de ces résultats démontre que le microbiote pulmonaire est un élément participant à la modulation des effecteurs de la réponse immunitaire innée des poumons et par conséquent, peut affecter la sensibilité d'un individu à des pathogènes.

#### **PUBLICATIONS :**

- Marquant Q, Laubretton D, Drajac C, Mathieu E, Bouguyon E, Noordine ML, Remot A, Riffault S, Thomas M & Descamps D. *The microbiota plays a critical role in the reactivity of lung immune components to innate ligands. FASEB J. 2021, Apr;35(4):e21348. <https://doi.org/10.1096/fj.202002338R>. PMID: 33715218.*

- Mathieu E, Escribano-Vazquez U, Descamps D, Cherbuy C, Langella P, Riffault S, Remot A & Thomas M. *Paradigms of lung microbiota functions in health and disease, particularly, in asthma. Front Physiol. 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01168>. PMID:30246806.*

### **3.3 PROJETS EN COURS & PERSPECTIVES**

Mes travaux actuels s'inscrivent dans la continuité de l'expertise développée sur les spécificités de l'immunité mucoale des poumons en période périnatale et s'articulent autour des trois thématiques de recherche précédemment décrites. Je les poursuis pour décrire les caractéristiques tissulaires et immunologiques de la muqueuse pulmonaire, notamment chez le veau, et pour définir quelles sont les interactions hôtes-VRS impliquées dans l'hypersensibilité des nouveau-nés à l'infection.

#### **3.3.1 THÉMATIQUE 1 : L'AUTOPHAGIE COMME MÉCANISME DE RÉGULATION DE LA RÉPONSE IFN-I PAR LA PROTEINES IRAP & TAX1BP1 AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VRS DANS LES AMs.**

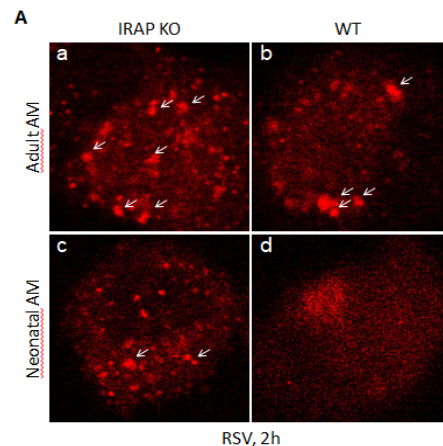
##### **La protéine IRAP.**

Originellement connue comme un processus physiologique d'autodigestion nécessaire à la survie cellulaire en cas de carence énergétique, l'autophagie est aussi mise en avant dans de nombreux travaux pour son rôle 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<sup>65</sup>. 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. Ainsi, en absence d'autophagie (drogues ou souris chimériques *Atg5<sup>-/-</sup>*), des CD<sup>s</sup> plasmacytoïdes ne produisent pas d'IFN-I lors de la reconnaissance et de l'activation du TLR7 par des virus à ARN simple brin<sup>66</sup>. En revanche, l'autophagie induite dans des CD<sup>s</sup> dérivées de moelle osseuse par carence nutritive associée à l'infection par le VRS exacerbe leurs 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<sup>67</sup>. Dans des macrophages dérivés de moelle osseuse, l'autophagie est aussi impliquée dans la production d'IFN- $\beta$  par ces cellules exposées au VRS<sup>68</sup>.

Etant 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 périnatale 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 au cours du travail de thèse de Carole Drajac en analysant le processus de l'autophagie lors de l'exposition au VRS dans des AMs de souriceaux et d'adultes et en évaluant si ce processus biologique est dépendant de la présence de la protéine IRAP dans les cellules. Ainsi, nous avons testé dans des AMs, isolés à partir des lavages broncho-alvéolaires réalisés chez des souriceaux et des adultes C57BL6 WT et IRAP<sup>KO</sup>, l'expression de la protéine beclin-1, une protéine de l'autophagie dont le rôle est indispensable au début de la formation de l'autophagosome. Nos images confocales (collaboration avec le Dr. Loredana Saveanu,



INSERM) montre des spots beclin<sup>+</sup> en quantité plus importante dans les AMs adultes WT que les AMs de souriceaux (**Figure 23b et d**, conditions 2h/WT). En l'absence de la protéine IRAP, le nombre de spots beclin<sup>+</sup> augmente significativement dans les AMs néonataux IRAP<sup>KO</sup> par rapport aux WT, 2h après l'infection virale (**Figure 23c et d** conditions 2h/IRAP<sup>KO</sup>). Ces données préliminaires montrent une mobilisation du processus autophagique plus importante dans les AMs adultes que dans les cellules des nouveaux-nés, processus qui augmente significativement en absence d'IRAP. La prochaine étape serait de tester l'effet d'inhibiteurs de l'autophagie comme la wortmannine ou la 3-méthyladenine sur la production des IFN-I par les AMs suite à l'infection par le VRS. J'ambitionne pour faire avancer ce projet de proposer un sujet de stage de Master 2 en 2024.



**Figure 23 :** Détection de la protéine beclin-1 analysée 2h après l'infection ex vivo par le VRS dans des AMs isolés à partir de souris adultes ou nouveau-nés C57BL6 ou IRAP<sup>KO</sup>. Images prises en microscopie confocale (grossissement x63).

### La protéine TAX1BP1.

Nous avons précédemment démontré avec le Dr. Marie Galloux que l'interaction des protéines N-TAX1BP1 participe au contrôle des IFN-I par les AMs<sup>69</sup>. Dans la logique d'une implication de l'autophagie dans la production des IFN-I par les AMs, nous avons constaté que l'infection par le VRS des souris TAX1BP1<sup>KO</sup> entraîne une expression plus importante des transcrits des gènes de l'immunité innée (*IL-6*, *Iftm3*) et, de façon significative, des gènes de l'autophagie (*Lc3*, *Atg5*) au jour 2 post-infection (données non publiées). Ces données suggèrent que l'interaction de la protéine virale N avec TAX1BP1 soit un moyen pour le VRS de limiter l'induction de l'autophagie afin de limiter la réponse antivirale de l'hôte. Cette hypothèse fait l'objet d'un workpackage que je coordonne avec le Dr. Marie Galloux dans l'ANR SARDINN retenue pour financement à l'appel d'offre en 2022. En partenariat avec les Drs. Chloé Journo, Audrey Escalantine et Arnaud Moris, l'ANR SARDINN s'intéressera à différents récepteurs de l'autophagie sélective dans la signalisation de l'immunité innée et de la présentation antigénique. Grâce au travail d'un assistant-ingénieur à recruter pour notre tâche, nous essaierons de préciser le rôle de TAX1BP1 dans la production des IFN-I par les AMs infectés par le VRS et comment l'interaction de cette molécule avec la protéine N du virus est perturbée dans cette fonction.

L'ensemble de ces nouvelles données potentielles sur les protéines cellulaires IRAP et TAX1BP1 constitue un prérequis pour le développement rationnel de stratégies antivirales.

### 3.3.2 THEMATIQUE 2 : IMPACT & MODULATION DU MICROBIOTE PULMONAIRE SUR L'IMMUNITE NEONATALE ET LA SENSIBILITE A L'INFECTION PAR LE VRS

Dans le cadre du projet Prématuration IDEX – ALRIGT auquel j'ai contribué, le groupe du Dr. Muriel Thomas (MICALIS, INRAE) a généré une collection de bactéries commensales primo-colonisatrices du poumon des souriceaux<sup>26</sup>. En particulier, il a été établi que l'inoculation

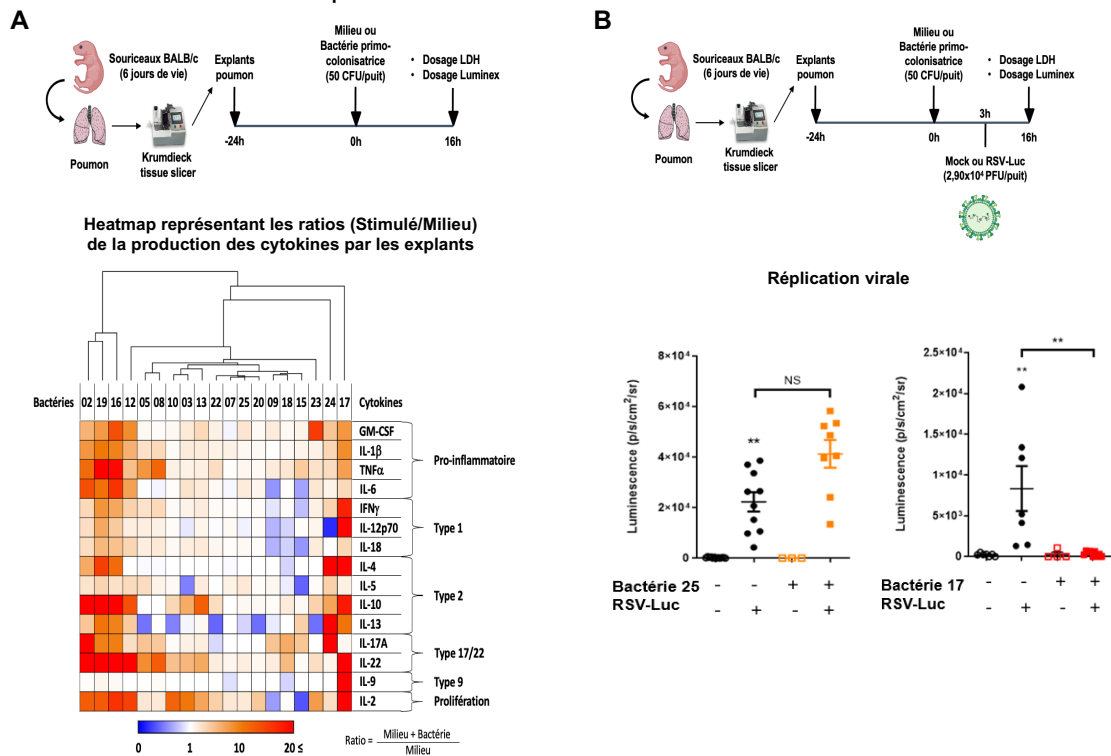
intranasale de ces souches administrées plusieurs fois séparément et précocement à des souriceaux peuvent influencer positivement ou négativement le développement de l'asthme des animaux (modèle d'induction d'une sensibilisation par exposition à des débris d'acariens). Cette étude apporte la preuve qu'une intervention sur le microbiote pulmonaire en période périnatale peut moduler la sensibilité des nouveau-nés à des pathologies pulmonaires, et donc potentiellement à l'infection par le VRS. Dans cette hypothèse, je continue mes investigations sur le microbiote pulmonaire et la sensibilité du souriceau à l'infection par le VRS à travers l'utilisation de cette collection de souches primo-colonisatrices isolées des poumons chez les souriceaux ou d'animaux axéniques dépourvues de flore microbienne ou gnotoxéniques à flore contrôlée. Le projet RESPIBIOTE, que je développe en collaboration avec les Drs. Muriel Thomas et Vinciane Saint-Criq (MICALIS, INRAE), a été initié avec les travaux de recherche du Dr. Quentin Marquant, post-doctorant que j'ai encadré (financement DIM-OneHealth 2018/2020), et continue dans le cadre de la thèse de Claire Chottin (co-encadrement avec le Dr. Sabine Riffault, bourse de l'école doctorale ABIES 2021-2024) dont certains résultats ont été sélectionnés pour des communications orales aux Journées de la Recherche Respiratoire (Octobre 2021, Brest) à l'International RSV Symposium (Octobre 2022, Belfast). Le projet RESPIBIOTE a reçu le soutien financier la fondation Air Liquide.

### **Modulation de la sensibilité néonatale au VRS par des bactéries primo-colonisatrices.**

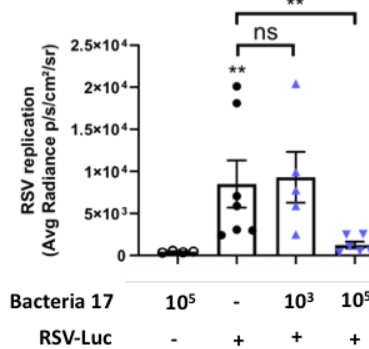
Notre hypothèse est que les bactéries commensales primo-colonisatrices du poumon, qui sont les premiers micro-organismes à « conquérir » le tractus respiratoire, participeraient à la maturation de l'immunité de la muqueuse pulmonaire et donc à la sensibilité du nouveau-né à des pathologies pulmonaires. La manipulation de ces souches permettrait d'orienter la réponse immunitaire vers une immunité de type 1 protectrice contre l'infection VRS. Notre projet vise à faire la preuve de concept qu'il est possible par l'utilisation de souches primo-colonisatrices de la flore commensale du poumon de limiter la sévérité de l'infection par le VRS en période néonatale.

Nous avons déterminé le profil de croissance et réalisé l'identification (séquençage des produits de PCR de l'ARN 16s et spectrométrie de masse par la plateforme CIRM INRAE, Nouzilly) des 25 souches composant notre collection de bactéries primo-colonisatrices des poumons des souriceaux. Notre collection de bactéries se compose majoritairement de deux phyla prépondérants du microbiote pulmonaire chez le nouveau-né, soit le phylum des *Gammaproteobacteria* (28%) et le phylum des *Firmicutes* (72%) avec une prédominance pour ce dernier. Ces 25 souches primo-colonisatrices ont été caractérisées sur des explants de poumons de souriceaux par la nature des cytokines sécrétées et par leur effet sur la réplication du VRS. Ainsi, nous avons identifié plusieurs bactéries non cytotoxiques pour le tissu pulmonaire avec la capacité de faire sécréter, par les explants, des cytokines d'immunité de type 1 (Interleukine-12, IFN $\gamma$ ) et/ou à interférer avec la réplication virale (**Figure 24A**). La bactérie 17 a été sélectionnée pour avoir généré une signature cytokinique originale (immunité de type 1 et IL-9) et pour son effet inhibiteur sur la réplication du VRS *ex vivo* (**Figure 24B**). La pré-exposition à la bactérie 17 améliore l'activité anti-virale des AMs de souriceaux infectés par le VRS en augmentant leur production d'IFN-I. Ces données nous ont encouragé à tester l'effet bénéfique de la bactérie 17 dans un modèle murin d'infection VRS chez le souriceau. Nos résultats préliminaires montrent que l'inoculation préventive de la bactérie 17 entraîne une réduction de la réplication virale dans les poumons des souriceaux 2 jours post-infection par le VRS (**Figure 25**). L'analyse de l'infiltration cellulaire des poumons des souriceaux traités avec la souche 17 révèle une augmentation du nombre de cellules présents dans les lavages broncho-alvéolaires dont la nature reste à caractériser. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que la bactérie 17 exerce aussi un effet protecteur contre la primo-infection virale *in vivo* chez le souriceau.

Dans le cadre du travail de thèse de Claire Chottin, nous tenterons de définir la nature de l'infiltration pour caractériser les cellules immunitaires recrutées par le traitement afin de définir le type d'immunité induit par la souche 17 *in vivo*. Le mécanisme d'action de la bactérie et les métaboliques qu'elle peut produire feront l'objet aussi d'études pour comprendre comment et par quoi cette souche primo-colonisatrice exerce son effet bénéfique chez le souriceau contre l'infection par le VRS. Par ailleurs, j'ai établi une collaboration avec la Pr. Isabelle Sermet-Gaudelus (INSERM, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris) pour valider l'action bénéfique anti-VRS des souches de vie primo-colonisatrices sélectionnées dans un modèle de cellules épithéliales nasales de jeunes patients atteints de mucoviscidose (Biobanque nationale mise à disposition pour les travaux de thèse de Claire Chottin). Notre but est de développer une recherche translationnelle basée sur des probiotiques du poumon anti-VRS à action bénéfique conservée dans le contexte de la mucoviscidose. J'ai obtenu en 2022 à un financement de l'association « Vaincre La Mucoviscidose » pour soutenir cette recherche.



**Figure 24 : Caractérisation des signatures cytokiniques et anti-répliquatives des souches primo-colonisatrices.** **A.** Heatmap des cytokines dosées au Luminex pour toutes les bactéries étudiées réalisée à partir de calculs de ratio entre les médianes des différents échantillons par rapport à la condition contrôle. Plus le ratio est important plus la couleur du ratio est rouge foncé et donc la cytokine produite. **B.** Réplication virale dans des explants pré-exposés à la bactérie 17 ou 25 analysée par dosage de l'activité luciférase dans les broyats des explants à 16 h post-infection.



**Figure 25 : Réplication virale dans les poumons de souriceaux BALB/C pré-traités à la bactérie 17.** Réplication virale du VRS-luc en présence de la bactérie 17 (10<sup>3</sup> ou 10<sup>5</sup> CFU/institutions administrées préventivement à J2 et J5 de vie de l'animal) analysée par dosage de l'activité luciférase dans les broyats des poumons à J2 post-infection.

## **Des souriceaux axéniques aux souriceaux gnotoxéniques pour comprendre la contribution du microbiote sur la sensibilité du nouveau-né à l'infection par le VRS.**

Le microbiote nasopharyngé de jeunes enfants peut influencer la propagation de l'infection par le VRS aux voies respiratoires inférieures et moduler la réponse immunitaire de l'hôte<sup>29,30</sup>. Bien que l'association de dysbioses (un déséquilibre du microbiote associé à des conséquences néfastes pour l'hôte) à des pathologies pulmonaires est avérée, le rôle causal de ces dysbioses dans la survenue de pathologies pulmonaires n'est pas clairement établi. Fort de notre expérience sur les souris axéniques adultes<sup>70</sup>, j'aimerais profiter de l'opportunité d'accès à des souriceaux dépourvus de flore microbienne (souriceaux axéniques) sur notre centre de recherche, pour étudier finement comment l'absence ou la perturbation du microbiote au début de la vie pourrait entraîner un dérèglement des réponses immunitaires et une altération de la défense contre les infections par le VRS, et générer une empreinte anormale du système immunitaire à long terme. Pour cela, j'ai établi une collaboration avec les Drs. Elisabeth Menu et Nabila Seddiki (IDMIT, CEA/INSERM, Fontenay-aux-roses) qui développent actuellement un modèle translationnel de primate non humain (PNH) chez le nouveau-né qui partage avec l'homme une organisation du système immunitaire et une composition du microbiote très similaires. En utilisant le modèle de souriceaux axéniques qui permettra une manipulation et un contrôle spécifiques des espèces de microbiote, et le modèle translationnel de PNH nouveau-nés, nous souhaitons mener de manière concomitante les objectifs suivants dans le nouveau projet NEOMIS :

1) Déchiffrer les conséquences de l'absence de microbiote sur la compétence immunitaire pulmonaire des souris nouveau-nés et leur susceptibilité à l'infection par le VRS. Nous utiliserons aussi notre collection de souches bactériennes primocolonisatrices isolées des poumons de souris nouveau-nés dont les propriétés immunostimulantes ont été caractérisées. Par l'inoculation d'animaux axéniques avec des souches primocolonisatrices sélectionnées (souriceaux gnotoxéniques), nous établirons également comment l'orientation de la composition du microbiote pulmonaire influence les réponses immunitaires et les défenses contre l'infection par le VRS.

2) Evaluer la réponse à l'infection par le VRS chez les nouveau-nés PNH traités aux antibiotiques pour créer une dysbiose (deux groupes de nouveau-nés allaités seront traités ou non aux antibiotiques puis infectés par le VRS). L'équipe du CEA suivra l'évolution longitudinale et la comparaison de la composition du microbiote/métabolite dans les compartiments de la muqueuse respiratoire et intestinale, et étudierons en parallèle le montage et la régulation d'une réponse immunitaire anti-VRS dans les compartiments de la muqueuse, des organes lymphoïdes et du sang périphérique.

Le projet NEOMIS sera déposé au prochain appel ANR et ambitionne d'établir un modèle préclinique pédiatrique du VRS, dont les résultats scientifiques ouvriront de nouvelles perspectives à des fins cliniques futures (validation chez les bébés exposés au VRS des biomarqueurs identifiés au cours de cette étude, développement de stratégies pour inverser l'effet délétère des perturbations du microbiote...).

### **3.3.3 THEMATIQUE 3 : DEVELOPPEMENT D'OUTILS ET CARACTERISATION DE LA REACTIVITE DES CELLULES EPITHELIALES ET DES AMS COMPOSANT LA MUQUEUSE PULMONAIRE DES VEAUX.**

#### **Développement de nouveaux outils pour étudier le VRSb.**

Notre compréhension de la réaction des cellules composant la muqueuse pulmonaire chez le veau lors d'une infection par le VRSb est limitée par le peu d'outils de culture cellulaire disponibles. Il est donc nécessaire de développer des outils cellulaires et moléculaires pour étudier le VRSb afin d'améliorer nos connaissances immunologiques chez le veau ou des tester des nouvelles drogues thérapeutiques pour mieux gérer la santé respiratoire dans nos élevages.

C'est dans cette objectif que j'ai participé au projet ANR EpiLungCell (coordinateur Dr. Bertrand Pain, INSERM, U1208, Lyon) qui a permis de développer un nouveau modèle de culture primaire en interface air-liquide de cellules épithéliales pulmonaires différenciées à partir de poumons de fœtus de veaux (collaboration Dr. Fabienne Archer, IVPC, INRAE, Lyon). En collaboration avec le Dr. Jean-François Eléouët (VIM, INRAE, Jouy-en-Josas), j'ai contribué à générer un virus bovin fluorescent (mCherry) par génétique inverse afin de faciliter le suivi du virus dans les cellules. J'ai supervisé les différentes expériences menées par l'ingénieure d'étude de l'équipe V2I (Cécile Ferret) qui ont permis de caractériser la réplication virale du VRSb-mCherry et la réactivité cytokinique du nouveau modèle cellulaire développé par nos collaborateurs. Deux articles sont en préparation sur ces nouveaux outils d'analyse de la réponse de l'épithélium pulmonaire à l'infection par le VRSb.

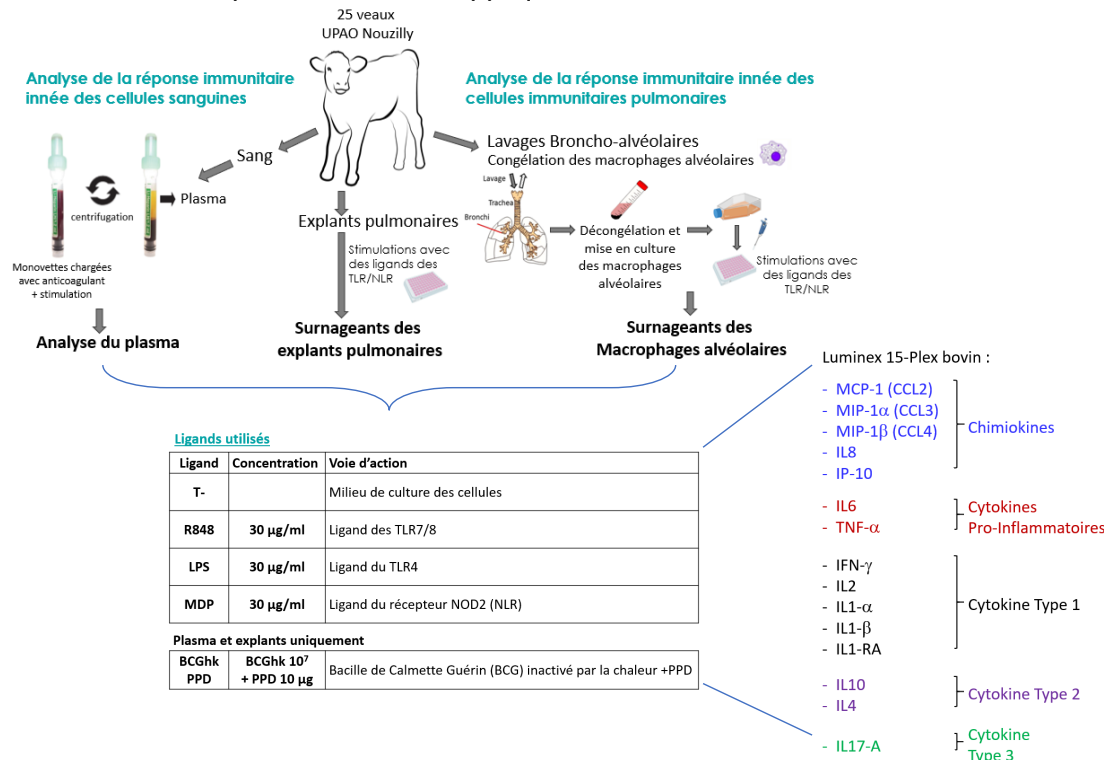
### **Etude de l'effet de l'infection des cellules épithéliales et les AMs par le VRSb.**

Parallèlement, j'ai entrepris d'aborder la question de la pathogénèse de l'infection par le VRSb en développant des modèles expérimentaux *ex vivo* adaptés soit à partir d'explants de poumons ou des AMs chez le veau. Financée par mon projet Jeune Chercheur (Département Santé Animal – INRAE), j'ai commencé à analyser la réactivité du tissu pulmonaire du veau en comparaison à un individu adulte à différentes stimulations dont l'infection par le VRSb. Pour ce projet, j'ai relancé dans notre unité la production et la titration de différentes souches de VRSb obtenues par le Pr. G. Meyer (ENVT, Toulouse). Grâce à la collaboration avec le Dr. Aude Remot (ISP, INRAE, Nouzilly), j'ai pu avoir accès à différents abattoirs de ville pour lesquels son équipe possède les autorisations d'accès. Les expérimentations ont lieu conjointement dans les locaux d'ISP pour optimiser l'utilisation des prélèvements. Ensemble, nous avons validé le système expérimental de culture des explants pulmonaires chez la vache et le veau (viabilité au cours du temps) et démontré que ce modèle est pertinent pour comparer la réactivité du tissu pulmonaire selon l'âge de l'animal lors d'infections virales (VRSb) ou bactériennes (*Mycobacterium bovis*)<sup>61</sup>.

Nos résultats nous ont encouragé à participer au projet HealthyCalf, consortium de 8 partenaires pluridisciplinaires et impliquant les unités expérimentales INRAE du Pins (Gouffern-en-Auge) et de l'UPAO (Nouzilly), financé par APIGENE et coordonné par le Dr. Fabrice Laurent (ISP, INRAE, Nouzilly). Ce projet propose d'identifier chez les jeunes bovins des biomarqueurs génétiques de sensibilité aux infections digestives et respiratoires à partir d'une signature cytokinique prédictive des cellules du sang exposées à différents ligands de l'immunité innée. Les cytokines ont été dosées par des dosages multiplexés au luminex MagPix pour lequel j'ai obtenu le financement par la région Ile-de-France (DIM OneHealth). J'ai formé à cette technologie et encadré le travail d'un assistant-ingénieur (Vincent Pietralunga) puis d'ingénieures d'étude (Claire Chottin puis Cécile Ferret) pour mener à bien ces analyses. L'intégration de ces données a été réalisées et les analyses avec les données génétiques sont en cours auprès de nos collaborateurs (Drs. Didier Boichard et Pauline Martin, GABI, INRAE).

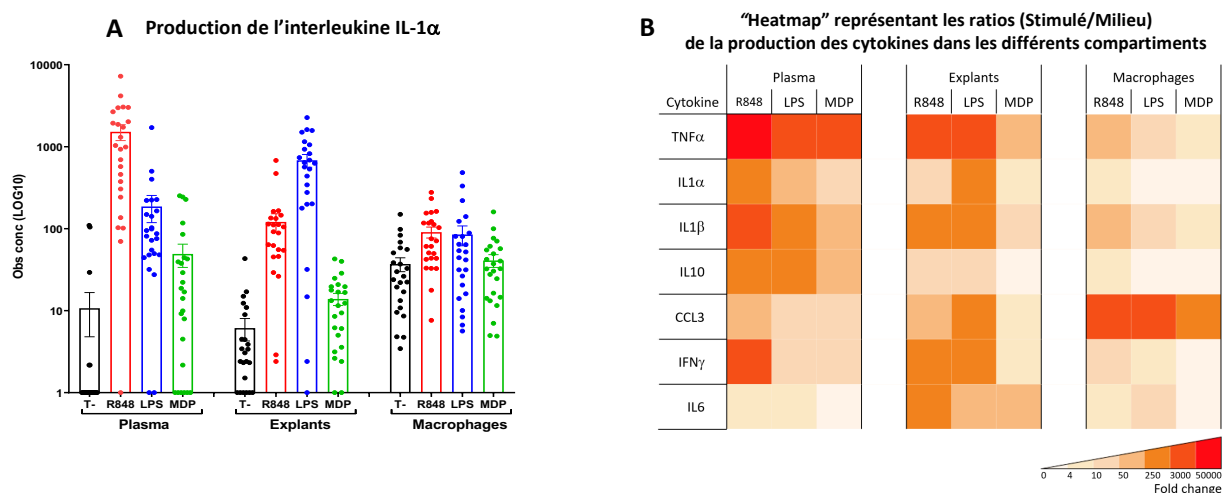
Parallèlement dans ce projet, j'ai eu la co-responsabilité d'un workpackage dont l'objectif était de définir et de comparer la signature immunitaire innée de différents types cellulaires chez des veaux après stimulation par des ligands des récepteurs de l'immunité innée sur des très jeunes veaux. Le but est de mettre en évidence l'existence d'une signature cytokinique commune entre le compartiment sanguin et le compartiment pulmonaire pour établir si la réponse des cellules du sang pourrait refléter la réponse de la muqueuse pulmonaire à une infection. Le sang de 25 veaux de moins de 10 jours de vie (élevage de l'UPAO) a été prélevé dans des monovettes chargées avec des ligands synthétiques de récepteurs de l'immunité innée (R848 pour le TLR7/8, LPS pour le TLR4 et MDP pour NOD2) pour analyser la sécrétion des cytokines dans le plasma après 24h d'incubation à 37°C. Des explants de poumons ont été préparés avec l'appareil « Krumdieck Tissue Slicer » sur ces même veaux et stimulés directement post-mortem. Des lavages broncho-

alvéolaires ont également été réalisés pour isoler les AMs, les congeler pour étudier leur réponse extemporanément. Les stimulations ont été réalisées avec les mêmes ligands que ceux utilisés dans les monovettes. Les explants et le sang ont également été exposés à du Bacille de Calmette Guérin (BCG) inactivé. Les échantillons ont par la suite été analysés par la technologie Luminex afin de doser la sécrétion de 15 cytokines/chimiokines dans chaque échantillon (**Figure 19**). Ce travail a nécessité la coordination des équipes ISP, VIM et l'UPAO, et j'ai supervisé le travail de Cécile Ferret sur les expérimentations s'appliquant aux AMs.



**Figure 19 :** Démarche expérimentale de la comparaison des signatures cytokiniques innées des compartiments pulmonaire et sanguin chez le veau.

Ainsi, nous avons pu définir une signature cytokinique de la réponse innée des cellules du sang, des explants pulmonaires et des macrophages alvéolaires de 25 veaux. Nous avons comparé le niveau moyen de production des cytokines dans les différentes conditions (**Figure 20A**, illustration de la détection de l'IL-1α) et en particulier leur ratio (Fold Change) par rapport à la condition témoin. On observe une variation des réponses aux trois ligands par rapport à la condition témoin dans tous les compartiments tissulaires (**Figure 20A**). Les conditions LPS/R848 stimulent la synthèse des cytokines IL-1α, IL-10, CCL3, IL-1β, TNFα, IL-6 et IFNγ par rapport au témoin principalement pour les explants et le sang. La stimulation par le ligand MDP entraîne des productions cytokiniques plus faibles et proches du niveau du contrôle. Les AMs répondent en moyenne plus faiblement à l'ensemble des conditions de stimulation que les autres cellules (sang et explants).



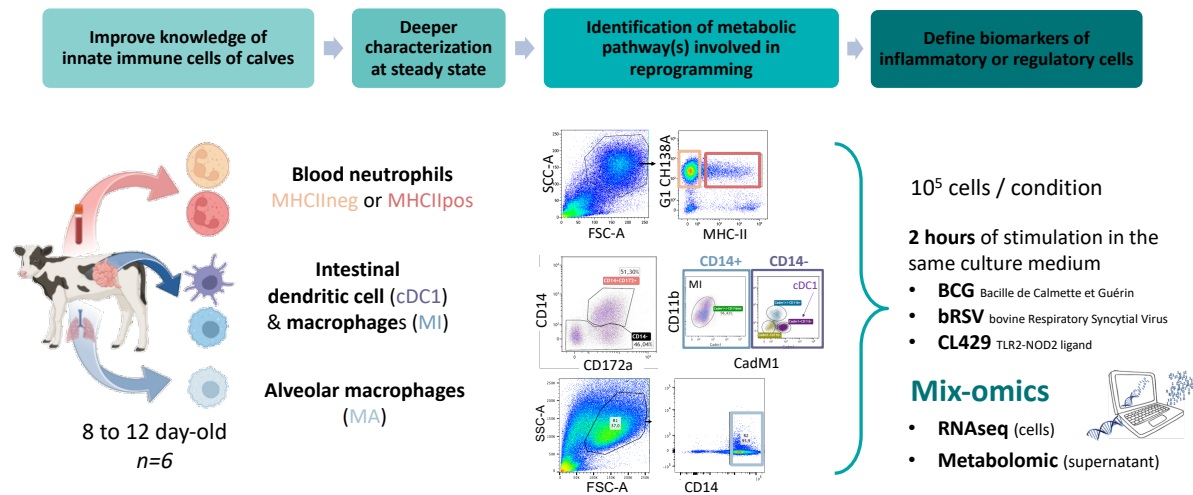
**Figure 20 :** Comparaison du profil cytokinique suite à une stimulation par les ligands de l'immunité innée des cellules du sang, des explants pulmonaires et des AMs issus des veaux. **A.** Exemple du profil de sécrétion de l'IL-1 $\alpha$ . **B.** Représentation en Heatmap de la production des cytokines exprimés en ratio de la concentration produite dans la condition stimulée sur celle dans la condition contrôlée).

Actuellement, nous finalisons les analyses biostatistiques de ces jeux de données (collaboration avec Luc Jouneau, VIM) en vue de publier les résultats. Nos premières observations tendent à établir que le compartiment sanguin et le compartiment pulmonaire présentent des réponses cytokiniques comparables pour différentes stimulations. La réactivité des cellules du sang à différentes stimulations pourrait donc être prédictive de la réponse des cellules de la muqueuse pulmonaire chez le veau.

### **Signatures immuno-metabolomiques des cellules immunitaires innées bovines.**

L'immunométabolisme est un domaine de recherche émergent qui explore le dialogue dynamique entre les voies métaboliques bioénergétiques et les cellules du système immunitaire au cours de la défense de l'hôte. De telles études ont permis d'établir que les fonctions et les réponses des cellules immunitaires à leur environnement ou lors d'infections sont façonnées par des changements dans les voies métaboliques, telles que la glycolyse, le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), la voie des pentoses phosphatés, l'oxydation des acides gras, la synthèse ou l'oxydation des acides gras (AG), et le métabolisme des acides aminés<sup>62</sup>. Ces changements, nommés reprogrammation ou remodelage métabolique, sont nécessaires aux cellules pour favoriser leur survie cellulaire, leur différenciation et leur fonction. Par ailleurs, l'orientation du métabolisme cellulaire est différente selon les expositions microbiennes, comme démontré avec des monocytes humains exposés à différents activateurs des récepteurs de l'immunité innée<sup>63</sup>. La reprogrammation métabolique constitue donc un événement régulateur majeur de la réponse immunitaire, en particulier la réponse innée, à la fois à l'état basal et dans des contextes pathologiques. Bien qu'étant un champ de recherche en pleine expansion en santé humaine, l'immunométabolisme reste très peu exploré chez les cellules immunitaires innées des bovins.

En collaboration avec les Drs. Aude Remot et Sonia Lacroix-Lamandé (ISP, INRAE), je coordonne le projet MetaBov (financement département Santé Animale INRAE) dont le but est de caractériser les signatures transcriptomiques et métaboliques de différents types cellulaires de l'immunité innée d'intérêt dans les pathologies bovines : les AMs du poumon, les neutrophiles sanguins et les macrophages et CD4 de l'intestin. Chacune d'entre nous a pu isoler ses cellules d'intérêt à partir de 6 veaux Holstein âgés d'environ une semaine, animaux dont nous disposons dans le cadre du projet HealthyCalf. Ainsi, j'ai travaillé sur les AMs mis en culture (**Figure 21**).



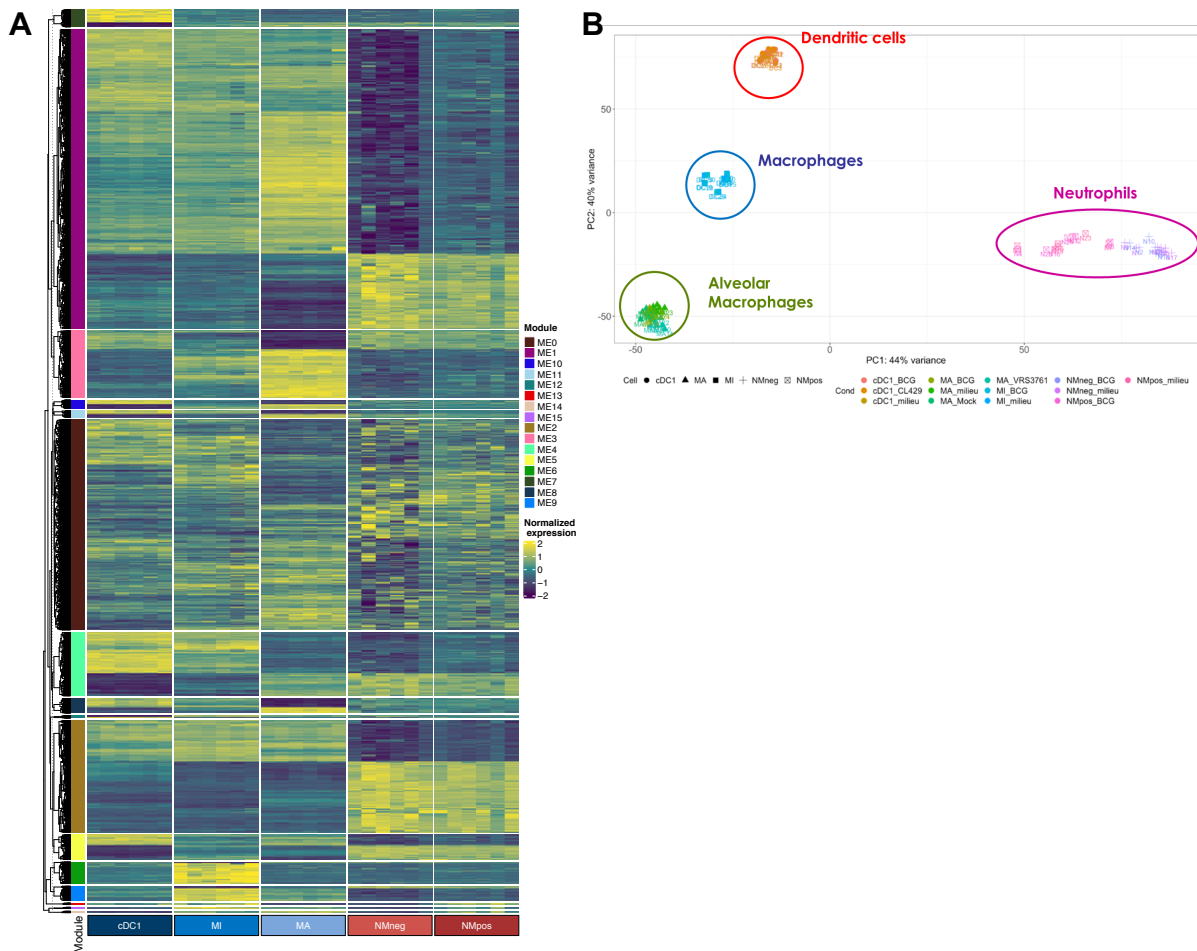
**Figure 21 : Objectifs et méthodologie du projet MetaBov.**

Le transcriptome et le profil métabolique de ces types cellulaires ont été analysés à l'état basal et suite à une exposition au vaccin vivant atténué Bacille de Calmette Guérin (BCG), connu pour modifier le profil métabolique des cellules immunitaires<sup>64</sup>. Selon la pertinence du type cellulaire, des stimulations par le VRSb ou par un ligand ciblant les récepteurs de l'immunité innée TLR2-NOD2 ont été réalisées pendant 2h *ex vivo*. Grâce aux données de RNAseq obtenues à partir des culots cellulaires (analyses effectuées par le Dr. Guillaume Sallé, ISP, INRAE) et des métabolites dosés dans les surnageants de culture par spectrométrie LC-MS (collaboration avec le Dr. Florence Castelli, CEA, Saclay), nous prévoyons de :

- 1- Définir les signatures transcriptomiques et métabolomiques de chaque type cellulaire à l'état basal ;
- 2- Comparer les signatures des différents types cellulaires circulants ou dans différents organes (poumon vs intestin) ;
- 3- Analyser les similarités et différences entre ces types cellulaires pour les voies biologiques modifiées par une exposition à un agent infectieux ou un immunostimulant.

Nos premières analyses mettent en avant des caractéristiques transcriptionnelles discriminantes et des différences majeures à l'état basal entre les cellules immunitaires innées. L'analyse pondérée des réseaux de co-expression des gènes (analyse WGCNA) a permis de détecter des modules ou groupes de gènes exprimés de manière différentielle et significativement associée aux types de cellules (**Figure 22A**). Ainsi, 16 modules spécifiques aux cellules ont été trouvés, ce qui suggère une capacité de réponse différentielle entre ces types de cellules. L'étude de la réponse transcriptomique et des modifications du métabolisme des cellules immunitaires bovines dans un contexte d'exposition au BCG, ou au VRS ou au ligand TLR2-NOD2 est en cours. Nos premières analyses multivariées en composantes principales sur les données transcriptomiques tendent à confirmer que les types cellulaires répondent différemment à l'exposition au BCG (**Figure 22B**). Ces données sont par ailleurs en cours d'intégration dans le logiciel « Ingenuity Pathways Analysis » afin de modéliser et comprendre les systèmes biologiques modifiés. Des analyses plus approfondies des réponses transcriptomiques et métabolomiques sont prévues au sein de chaque type cellulaire et entre type de cellules proches d'un point de vue fonctionnel (AMs et macrophages intestinaux) ou tissulaire (macrophages et CD<sub>s</sub> intestinaux).





**Figure 22 :** Analyses statistiques des données transcriptomiques collectées sur les différents types de cellules de veaux étudiés (AMs, neutrophiles du sang, macrophages et CD des intestins). **A.** Analyse pondérée de réseaux de co-expression de gènes (analyse WGCNA) et modules associés selon le type de cellules. **B.** L'analyse multivariée en composante principale sur les données transcriptomiques des cellules à l'état basal ou stimulés conduit à des clustering différentiels par type de cellules.

Ces analyses sont un prérequis indispensable pour comprendre les modifications du métabolisme des cellules immunitaires bovines dans un contexte infectieux, ou dans des approches d'immunostimulation. Elles seront un élément important pour proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes dirigées vers l'hôte notamment en orientant l'induction des voies métaboliques pour lutter contre les agents infectieux.

## 4. CONCLUSION

### 4.1 PARCOURS SCIENTIFIQUE

Mon parcours universitaire et les travaux de recherche que j'ai pu mener avant mon recrutement m'ont permis d'acquérir des compétences tant théoriques qu'expérimentales dans les domaines de l'immunologie, de la biologie cellulaire et moléculaire, et notamment une solide expérience sur l'arsenal immunitaire mobilisé au cours d'infections pulmonaires bactériennes ou virales. Ces expertises ont été un atout pour mon intégration et conduire mes travaux de recherche dans le groupe du Dr. Sabine Riffault de l'équipe V2I, que je co-anime depuis 2018, pour comprendre les réponses immunitaires pulmonaires impliquées dans l'hypersensibilité des nouveau-nés vis-à-vis du VRS. L'ensemble de mes travaux repose sur des approches pluridisciplinaires ayant nécessité l'établissement de nombreuses collaborations avec des collègues virologistes, immunologistes, ou bio-informaticien au sein de l'unité, de notre institut ainsi qu'avec des laboratoires nationaux et internationaux concrétisées par des demandes de financement.

Depuis presque 10 ans, j'ai participé à l'ensemble des projets du groupe portant aussi sur la vaccination anti-VRS. J'ai la responsabilité scientifique des projets caractérisant l'immunité pulmonaire et l'immunopathologie associée à l'infection par le VRS en période périnatale aussi bien dans le modèle murin que dans le modèle bovin. L'immunité mucoale et le microbiote des poumons en période périnatale sont des acteurs de la santé animale encore peu décrits. Dès mon arrivée, j'ai porté un intérêt particulier pour les réponses immunitaires innées de la muqueuse pulmonaire dans cette période si particulière que constitue le début de la vie. Ainsi, mes travaux de recherche ont permis de mettre en évidence le rôle inédit des lymphocytes nBregs CD5<sup>+</sup> et leur interaction moléculaire avec les AMs lors de l'infection par le VRS. Mon expertise sur les AMs dans la réponse des poumons face à des pathogènes m'a permis de développer cette nouvelle thématique, notamment chez les souris et le veau, dans notre groupe. Ainsi, à travers les études moléculaires, nous avons démontré notamment l'implication de différentes protéines cellulaires telles que IRAP et TAX1BP1 dans le contrôle de la production des IFN-I par les AMs. L'ensemble de ces études a mis en lumière la fonction clé des AMs dans l'environnement de la muqueuse pulmonaire en période périnatale et la régulation fine de leur capacité à produire les IFN-I lors d'une infection par le VRS. Elles démontrent les multiples interactions entre les cellules composant la muqueuse des poumons qui évolue rapidement après la naissance. Enfin, un objectif majeur de mes travaux vise à explorer le rôle du développement et l'influence du microbiote pulmonaire sur la sensibilité des jeunes à l'infection par le VRS. L'exploration du microbiote pulmonaire ouvre une perspective originale pour améliorer nos connaissances de l'immunité périnatale et proposer de nouvelles cibles pour moduler la santé des nouveau-nés. Je souhaite soutenir mes activités de recherche sur l'identification des interactions entre la muqueuse pulmonaire et le microbiote, et la réponse immune de l'hôte dictant la sévérité de l'infection par le VRS. Une meilleure caractérisation des aspects cellulaires et moléculaires de la muqueuse pulmonaire spécifiques à cette période de la vie, permettra de comprendre cette fenêtre de vulnérabilité et de proposer des stratégies d'intervention pour en faire une période d'opportunité de lutte contre les agents pathogènes. Mes différents axes de recherche reflètent la complexité des interactions entre les composants de l'immunité mucoale des poumons dont les fonctions et les compétences restent sous l'influence de l'exposome du jeune, perspective de recherche à intégrer pour une complète compréhension de la sensibilité du jeune à l'infection par le VRS.

## 4.2 ENCADREMENT DEPUIS MON RECRUTEMENT A L'INRAE

Depuis mon recrutement à l'INRAE en 2013, j'ai eu l'opportunité d'encadrer plusieurs étudiants en Master 2 ou en école d'ingénieurs, deux étudiantes en thèse et un post-doctorant qui ont activement participé à l'avancement de ces travaux. J'ai aussi supervisé le travail de plusieurs ingénieures d'études et d'assistantes-ingénieurs qui ont très fortement contribué à l'élaboration de protocoles inédits et le développement de nouvelles technologies dans mes projets. Cette activité d'encadrement et de formation est résumée dans le tableau suivant.

Personne	Formation ou poste	Année	Thématiques de recherche	Evolution professionnelle
Carole Drjac	Master 2 puis Doctorat	2014 - 2018	Macrophages alvéolaires, régulation moléculaire, IRAP & voie des IFN-I	Cheffe de produit Biologie Moléculaire (Eurobio, CDI)
Daphné Laubreton	Ingénieure d'études	2015 - 2017	nBreg & effet âge dans l'infection VRS	Ingénieure d'études (INSERM, titulaire)
Vénice Graf	Etudiante en école d'ingénieurs	2015 - 2016	Caractérisation de l'interaction TAX1BP1 & VRS	Responsable RSE (Sanders, CDI)
Vincent Pietralunga	Assistant-Ingénieur	2017 - 2019	Immunocompétence innée des jeunes bovins	Responsable de l'information scientifique (NetCancer, CDD)
Sarah Madrières	Master 2	2016 - 2017	Caractérisation du rôle de TAX1BP1 dans l'infection VRS	Conseillère scientifique ANSM, CDI)
Quentin Marquant	Post-doctorat	2018 - 2021	Immunomodulation par le microbiote pulmonaire & VRS	Ingénieure de Recherche (Hôpital Foch, CDI)
Marion Prost	Master 2	2018 - 2019	Propriétés immunostimulantes de souches du microbiote pulmonaire	Ingénieure d'études (ICAN, CDD)
Andréa Mialet	Master 2	2019 - 2020	Caractérisation de l'action anti-VRS de souches du microbiote pulmonaire	Doctorante au CEA Paris-Saclay
Edwige Bouguyon	Assistante-Ingénieur	2018 - 2021	Production des VRS bovins et caractérisation	Retraîtée
Claire Chottin	Ingénieure d'études puis Doctorat	2019 - 2021 2021 - 2024	Microbiote pulmonaire, immunité périnatale et sensibilité à l'infection VRS	-
Cécile Ferret	Ingénieure d'études	Depuis 2021	Immunocompétence innée des jeunes bovins, macrophages & VRS bovin	Recrutement dans l'équipe V2I
Anneline Dubard	Master 2	2022 - 2023	Exposition aux nanoparticules métalliques & incidences pulmonaires	-

## 5. BIBLIOGRAPHIE

1. Arnberg, N. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol* **19**, 165-178 (2009).
2. Benihoud, K., *et al.* The role of IL-6 in the inflammatory and humoral response to adenoviral vectors. *J Gene Med* **2**, 194-203 (2000).
3. Schagen, F.H., Ossevoort, M., Toes, R.E. & Hoeben, R.C. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**, 51-70 (2004).
4. Curran, C.S., Bolig, T. & Torabi-Parizi, P. Mechanisms and Targeted Therapies for Pseudomonas aeruginosa Lung Infection. *Am J Respir Crit Care Med* **197**, 708-727 (2018).
5. Feuillet, V., *et al.* Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12487-12492 (2006).
6. Nichols, D.P. & Chmiel, J.F. Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **50 Suppl 40**, S39-56 (2015).
7. Lund, J.M., *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5598-5603 (2004).
8. Wei, J., *et al.* Influenza A infection enhances cross-priming of CD8+ T cells to cell-associated antigens in a TLR7- and type I IFN-dependent fashion. *J Immunol* **185**, 6013-6022 (2010).
9. Sepulveda, F.E., *et al.* Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity* **31**, 737-748 (2009).
10. Saveanu, L., *et al.* IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* **325**, 213-217 (2009).
11. Weimershaus, M., *et al.* IRAP Endosomes Control Phagosomal Maturation in Dendritic Cells. *Front Cell Dev Biol* **8**, 585713 (2020).
12. Sasai, M., Linehan, M.M. & Iwasaki, A. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* **329**, 1530-1534 (2010).
13. Gollwitzer, E.S. & Marsland, B.J. Impact of Early-Life Exposures on Immune Maturation and Susceptibility to Disease. *Trends Immunol* **36**, 684-696 (2015).
14. Torow, N., Marsland, B.J., Hornef, M.W. & Gollwitzer, E.S. Neonatal mucosal immunology. *Mucosal Immunol* **10**, 5-17 (2017).
15. Schittny, J.C. Development of the lung. *Cell Tissue Res* **367**, 427-444 (2017).
16. de Kleer, I.M., *et al.* Perinatal Activation of the Interleukin-33 Pathway Promotes Type 2 Immunity in the Developing Lung. *Immunity* **45**, 1285-1298 (2016).
17. Drajac, C., *et al.* Control of IFN-I responses by the aminopeptidase IRAP in neonatal C57BL/6 alveolar macrophages during RSV infection. *Mucosal Immunol* **14**, 949-962 (2021).
18. Laubretton, D., *et al.* Regulatory B Lymphocytes Colonize the Respiratory Tract of Neonatal Mice and Modulate Immune Responses of Alveolar Macrophages to RSV Infection in IL-10-dependant Manner *Viruses* **12**(2020).
19. Di Simone, S.K., Rudloff, I., Nold-Petry, C.A., Forster, S.C. & Nold, M.F. Understanding respiratory microbiome-immune system interactions in health and disease. *Sci Transl Med* **15**, eabq5126 (2023).
20. 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**, 8734504 (2017).
21. Saluzzo, S., *et al.* First-Breath-Induced Type 2 Pathways Shape the Lung Immune Environment. *Cell Rep* **18**, 1893-1905 (2017).
22. Roux, X., *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. *Eur J Immunol* **41**, 2852-2861 (2011).
23. Al Nabhani, Z. & Eberl, G. Imprinting of the immune system by the microbiota early in life. *Mucosal Immunol* **13**, 183-189 (2020).
24. Pattaroni, C., *et al.* Early-Life Formation of the Microbial and Immunological Environment of the Human Airways. *Cell Host Microbe* **24**, 857-865 e854 (2018).
25. Gollwitzer, E.S., *et al.* Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med* **20**, 642-647 (2014).
26. Remot, A., *et al.* Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *ISME J* **11**, 1061-1074 (2017).
27. de Steenhuijsen Pijters, W.A.A., Binkowska, J. & Bogaert, D. Early Life Microbiota and Respiratory Tract Infections. *Cell Host Microbe* **28**, 223-232 (2020).

28. Man, W.H., de Steenhuijsen Piters, W.A. & Bogaert, D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* **15**, 259-270 (2017).
29. de Steenhuijsen Piters, W.A., *et al.* Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am J Respir Crit Care Med* **194**, 1104-1115 (2016).
30. Teo, S.M., *et al.* The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe* **17**, 704-715 (2015).
31. de Steenhuijsen Piters, W.A.A., *et al.* Early-life viral infections are associated with disadvantageous immune and microbiota profiles and recurrent respiratory infections. *Nat Microbiol* **7**, 224-237 (2022).
32. Remot, A., *et al.* Flt3 ligand improves the innate response to respiratory syncytial virus and limits lung disease upon RSV reexposure in neonate mice. *Eur J Immunol* **46**, 874-884 (2016).
33. Mathieu, E., *et al.* Le poumon est sensible aux effets locaux et à distance des microbiotes. *Nutrition clinique et métabolisme* **35**, 242-252 (2021).
34. Liu, L., *et al.* Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet* **388**, 3027-3035 (2016).
35. Hall, C.B., *et al.* The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* **360**, 588-598 (2009).
36. Shi, T., *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. *Lancet* **390**, 946-958 (2017).
37. Esteban, I., Stein, R.T. & Polack, F.P. A Durable Relationship: Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis and Asthma past Their Golden Anniversary. *Vaccines (Basel)* **8**(2020).
38. Valarcher, J.F. & Taylor, G. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet Res* **38**, 153-180 (2007).
39. Nair, H., *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **375**, 1545-1555 (2010).
40. Zhang, S., *et al.* Cost of Respiratory Syncytial Virus-Associated Acute Lower Respiratory Infection Management in Young Children at the Regional and Global Level: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Infect Dis* **222**, S680-S687 (2020).
41. Grimprel, E. [Epidemiology of infant bronchiolitis in France]. *Arch Pediatr* **8 Suppl 1**, 83S-92S (2001).
42. Kua, K.P. & Lee, S.W.H. Systematic Review of the Safety and Efficacy of Palivizumab among Infants and Young Children with Cystic Fibrosis. *Pharmacotherapy* **37**, 755-769 (2017).
43. Barnes, M.V.C., Openshaw, P.J.M. & Thwaites, R.S. Mucosal Immune Responses to Respiratory Syncytial Virus. *Cells* **11**(2022).
44. Russell, C.D., Unger, S.A., Walton, M. & Schwarze, J. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin Microbiol Rev* **30**, 481-502 (2017).
45. Culley, F.J., Pollott, J. & Openshaw, P.J. Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood. *J Exp Med* **196**, 1381-1386 (2002).
46. Tregoning, J.S., Yamaguchi, Y., Harker, J., Wang, B. & Openshaw, P.J. The role of T cells in the enhancement of respiratory syncytial virus infection severity during adult reinfection of neonatally sensitized mice. *J Virol* **82**, 4115-4124 (2008).
47. Saravia, J., *et al.* Respiratory Syncytial Virus Disease Is Mediated by Age-Variable IL-33. *PLoS Pathog* **11**, e1005217 (2015).
48. Vu, L.D., *et al.* Elevated Levels of Type 2 Respiratory Innate Lymphoid Cells in Human Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* **200**, 1414-1423 (2019).
49. Awomoyi, A.A., *et al.* Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children. *J Immunol* **179**, 3171-3177 (2007).
50. Deshmukh, H.S., *et al.* The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to Escherichia coli K1 sepsis in neonatal mice. *Nat Med* **20**, 524-530 (2014).
51. Armstrong, L., *et al.* Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**, 241-245 (2004).
52. Cormier, S.A., *et al.* Limited type I interferons and plasmacytoid dendritic cells during neonatal respiratory syncytial virus infection permit immunopathogenesis upon reinfection. *J Virol* **88**, 9350-9360 (2014).
53. Reed, J.L., *et al.* Innate immune signals modulate antiviral and polyreactive antibody responses during severe respiratory syncytial virus infection. *J Infect Dis* **199**, 1128-1138 (2009).
54. Sun, C.M., Deriaud, E., Leclerc, C. & Lo-Man, R. Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity* **22**, 467-477 (2005).
55. Zhang, X., *et al.* Type I interferons protect neonates from acute inflammation through interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* **204**, 1107-1118 (2007).

56. Zhivaki, D., *et al.* Respiratory Syncytial Virus Infects Regulatory B Cells in Human Neonates via Chemokine Receptor CX3CR1 and Promotes Lung Disease Severity. *Immunity* **46**, 301-314 (2017).
57. Rameix-Welti, M.A., *et al.* Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nat Commun* **5**, 5104 (2014).
58. Descamps, D., *et al.* Toll-like receptor 5 (TLR5), IL-1beta secretion, and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophage phagocytosis and bacterial killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1619-1624 (2012).
59. Babbior, J., *et al.* IRAP+ endosomes restrict TLR9 activation and signaling. *Nat Immunol* **18**, 509-518 (2017).
60. White, J., Suklabaidya, S., Vo, M.T., Choi, Y.B. & Harhaj, E.W. Multifaceted roles of TAX1BP1 in autophagy. *Autophagy* **19**, 44-53 (2023).
61. Remot, A., *et al.* Mycobacterial Infection of Precision-Cut Lung Slices Reveals Type 1 Interferon Pathway Is Locally Induced by Mycobacterium bovis but Not M. tuberculosis in a Cattle Breed. *Front Vet Sci* **8**, 696525 (2021).
62. O'Neill, L.A., Kishton, R.J. & Rathmell, J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* **16**, 553-565 (2016).
63. Lachmandas, E., *et al.* Microbial stimulation of different Toll-like receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes. *Nat Microbiol* **2**, 16246 (2016).
64. Arts, R.J.W., *et al.* Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep* **17**, 2562-2571 (2016).
65. Deretic, V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism. *Immunity* **54**, 437-453 (2021).
66. Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N. & Iwasaki, A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* **315**, 1398-1401 (2007).
67. Morris, S., *et al.* Autophagy-mediated dendritic cell activation is essential for innate cytokine production and APC function with respiratory syncytial virus responses. *J Immunol* **187**, 3953-3961 (2011).
68. 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* **6**, 174 (2016).
69. Descamps, D., *et al.* Depletion of TAX1BP1 amplifies innate immune responses during respiratory syncytial virus infection. *J Virol*, JVI0091221 (2021).
70. Marquant, Q., *et al.* The microbiota plays a critical role in the reactivity of lung immune components to innate ligands. *FASEB J* **35**, e21348 (2021).

**Titre :** Caractérisation de la muqueuse pulmonaire et des réponses immunitaires innées associées à l'infection au début de la vie par le Virus Respiratoire Syncytial

**Mots clés :** Immunité mucoale, macrophages alvéolaires, poumons, nouveau-né, microbiote, VRS

**Résumé :**

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est l'agent étiologique principal des broncho-pneumonies bovines (VRS bovin) et des bronchiolites du nourrisson (VRS humain). L'infection VRS peut provoquer des atteintes sévères des voies respiratoires inférieures chez les jeunes, contrairement à l'adulte où elles sont généralement asymptomatiques et cantonnées aux voies respiratoires supérieures.

La sensibilité du nourrisson à une infection VRS est intrinsèquement liée aux caractéristiques physiologiques, immunologiques et microbiologiques de la muqueuse pulmonaire en période périnatale.

L'immunité mucoale et le microbiote des poumons

en période périnatale sont des acteurs de la santé animale encore peu détaillés dans la littérature.

La compréhension de ces caractéristiques des poumons des nouveau-nés et des facteurs externes qui les régulent pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies prophylactiques en faveur de la santé des jeunes. Aussi, j'ai développé des projets de recherche qui visent à décrire les caractéristiques immunologiques et l'influence du microbiote pulmonaires en période périnatale pour comprendre les mécanismes physiopathologiques déclenchés lors de l'infection du jeune par le VRS afin de proposer des stratégies d'immuno-intervention pour moduler la réponse immunitaire anti-VRS.

**Title :** Characterization of the lung mucosa and innate immune responses to RSV infection in early life

**Keywords :** Mucosal immunity, alveolar macrophages, lungs, neonates, microbiota, RSV

**Abstract :**

Respiratory syncytial virus (RSV) is the main etiologic agent of bovine bronchopneumonia (bovine RSV) and infant bronchiolitis (human RSV). RSV infection can cause severe lower respiratory tract disease in infants, unlike in adults where it is usually asymptomatic and confined to the upper respiratory tract.

The infant susceptibility to RSV infection is intrinsically linked to the physiological, immunological and microbiological characteristics of the lung mucosa during the perinatal period. Mucosal immunity and pulmonary microbiota in the perinatal period are players in animal health that are not yet well documented in the literature.

Understanding these characteristics of the neonatal lung and the external factors that regulate them could pave the way for new prophylactic strategies.

Therefore, I have developed research projects aimed at describing the immunological characteristics and influence of the lung microbiota in the perinatal period to understand the pathophysiological mechanisms triggered by RSV infection in young people and to propose immuno-intervention strategies to modulate the immune response to RSV.