



HAL
open science

Microbiote pulmonaire et immunomodulation de la sensibilité néonatale au Virus Respiratoire Syncytial : vers le développement d'une approche thérapeutique basée sur des bactéries primo-colonisatrices du poumon

Claire Chottin

► To cite this version:

Claire Chottin. Microbiote pulmonaire et immunomodulation de la sensibilité néonatale au Virus Respiratoire Syncytial : vers le développement d'une approche thérapeutique basée sur des bactéries primo-colonisatrices du poumon. Immunologie. Université Paris-Saclay, 2025. Français. <NNT : 2025UPASB093>. <tel-05575946>

HAL Id: tel-05575946

<https://pastel.hal.science/tel-05575946v1>

Submitted on 1 Apr 2026

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.



HAL Authorization

Microbiote pulmonaire et immunomodulation de la
sensibilité néonatale au Virus Respiratoire Syncytial : vers
le développement d'une approche thérapeutique basée
sur des bactéries primo-colonisatrices du poumon

*Pulmonary microbiota and immunomodulation of the neonatal
susceptibility to Respiratory Syncytial Virus infection: towards the
development of a therapeutic approach with lung commensal bacteria*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581 agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé
Graduate School : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans **l'UMR VIM** (Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE), sous la
direction de **Sabine RIFFAULT**, Directrice de Recherche, la co-direction de **Delphine
DESCAMPS**, Directrice de Recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 17 décembre 2025, par

Claire CHOTTIN

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Karim BENIHOUD Professeur (Université Paris-Saclay)	Président
Véronique FLAMAND Professeure (Université Libre de Bruxelles)	Rapporteur et Examinatrice
Loïc GUILLOT Directeur de recherche, INSERM (Sorbonne Université)	Rapporteur et Examineur
Sonia LACROIX-LAMANDE Chargée de recherche, INRAE (Université de Tours)	Examinatrice
Aurore VIDY-ROCHE Maîtresse de conférences (Université Paris Cité)	Examinatrice

Titre : Microbiote pulmonaire et immunomodulation de la sensibilité néonatale au Virus Respiratoire Syncytial : vers le développement d'une approche thérapeutique basée sur des bactéries primo-colonisatrices du poumon.

Mots clés : Période néonatale, VRS, Immunomodulation, Microbiote, Immunité innée, Poumon

Résumé : La bronchiolite est la principale infection respiratoire chez le nourrisson causée par le virus respiratoire syncytial (VRS) et les formes sévères augmentent le risque de développer de l'asthme chez l'enfant. Cette sensibilité du nourrisson est intrinsèquement liée aux caractéristiques 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.

Notre hypothèse est que les bactéries commensales primo-colonisatrices, qui sont les premiers micro-organismes à « conquérir » le tractus respiratoire, participeraient à la maturation des défenses immunitaires de la muqueuse pulmonaire, et donc à la sensibilité du nouveau-né à des pathologies pulmonaires.

La manipulation de ces souches (isolées par notre partenaire à MICALIS) en période néonatale permettrait d'orienter la réponse immunitaire vers une immunité protectrice contre l'infection VRS.

Les résultats obtenus ont montré qu'il est possible de limiter l'invasion virale et de réduire la sévérité de la pathologie grâce à l'utilisation de bactéries primo-colonisatrices de la flore commensale pulmonaire, capables d'interférer avec les mécanismes d'infection du virus.

Ce projet apporte ainsi les premiers éléments de la preuve de concept vers une nouvelle alternative thérapeutique contre la bronchiolite par la modulation du microbiote pulmonaire.

Title : Pulmonary microbiota and immunomodulation of the neonatal susceptibility to Respiratory Syncytial Virus infection: towards the development of a therapeutic approach based on commensal lung bacteria.

Keywords : Neonate, RSV, Immunomodulation, Microbiota, Innate immunity, Lung

Abstract : Respiratory syncytial virus (RSV) is the commonest viral agent causing acute lower respiratory infection in infants, a disease usually named bronchiolitis. Severe forms of the disease increase the risk of developing asthma later in childhood. This susceptibility in infants is intrinsically linked to the characteristics of the pulmonary mucosa during the neonatal period, which depend on both the establishment of immunity and the colonization of the lungs by a bacterial microbiota.

Our hypothesis is that the primo-colonizing commensal lung bacteria, which are the first microorganisms to colonize the respiratory tract, contribute to the maturation of immune defenses in the pulmonary mucosa, and consequently, to individual's susceptibility to respiratory diseases.

Manipulating these bacterial strains (isolated by our partner of MICALIS Unit) during the neonatal period could help shape the immune responses toward protective immunity against RSV infection.

The results obtained showed that it is possible to limit viral invasion and reduce disease severity through the use of pioneer commensal bacteria of the pulmonary microbiota, capable of interfering with viral infection mechanisms.

This project ultimately provides the first evidence of concept for a new therapeutic alternative against bronchiolitis through modulation of the pulmonary microbiota.

Table des matières

REMERCIEMENTS	6
LISTES	8
Abréviations	8
Figures	11
Tableaux	13
A. INTRODUCTION	14
1- Le Virus Respiratoire Syncytial	14
1-1 Epidémiologie	14
1-2 Description du VRS	14
1-3 Mécanismes d'infection	15
1-3-1 Entrée du virus dans l'organisme	15
1-3-2 Attachement et entrée dans la cellule.....	17
1-3-3 Réplication virale.....	19
1-4 Prise en charge thérapeutique	21
1-5 Modèles expérimentaux pour étudier l'infection par le VRS	24
1-5-1 Modèle d'étude chez l'hôte naturel	25
1-5-2 Modèle d'étude chez les gros animaux.....	26
1-5-3 Modèle d'étude chez les petits animaux.....	26
2- Les déterminants de la sensibilité de la muqueuse pulmonaire néonatale	29
2-1 Le compartiment tissulaire et sa composante épithéliale en période néonatale	29
2-1-1 Organisation anatomique de l'arbre respiratoire	29
2-1-2 Développement du tissu.....	31
2-1-3 Epithélium respiratoire	32
2-2 Le compartiment respiratoire et sa composante immunologique en période néonatale ..	35
2-2-1 Immunité innée pulmonaire : première ligne de défense à la naissance.....	36
2-2-2 Entre immunité innée et adaptative.....	38
2-2-3 Immunité adaptative du poumon néonatal : réponse spécialisée et conséquences	
immunologiques.....	41
2-2-4 Au-delà d'une simple barrière : le rôle immunitaire de l'épithélium respiratoire.....	43
2-2-5 Les cellules recrutées en réponse à l'inflammation pulmonaire en période néonatale	44
2-3 Apports du modèle néonatal murin à l'étude des défenses immunitaires antivirales	47
3- Le microbiote : un élément clé dans la modulation des défenses immunitaires pulmonaires .	48
3-1 Le microbiote associé aux voies respiratoires	49
3-2 Composition du microbiote des voies aériennes	50
3-3 Cinétique de colonisation des voies respiratoires	53
3-4 Le microbiote pulmonaire, 4 grandes fonctions	55
3-4-1 Architecture du tissu.....	55

3-4-2 Rôle de barrière.....	56
3-4-3 Participation aux réponses anti-infectieuses.....	57
3-4-4 Education du système immunitaire inné et adaptatif.....	58
4- Conséquences des infections respiratoires sur le microbiote : un déséquilibre aux multiples facettes.....	60
4-1 Dysbiose des voies aériennes et vulnérabilité pulmonaire.....	61
4-1-1 Réduction des commensaux protecteurs.....	61
4-1-2 Enrichissement en bactéries pathogènes ou inflammatoires.....	61
4-1-3 Conséquences cliniques et implications immunitaires.....	62
4-2 Infections respiratoires et dysbiose intestinale.....	62
4-2-1 Caractéristiques générales de la dysbiose intestinale.....	62
4-2-2 Effet à distance des dysbioses microbiennes : implication de l'axe intestin-poumon.....	63
4-3 Infection VRS et dysbiose.....	65
4-4 Le microbiote comme stratégie d'intervention : immunomodulation.....	66
B. OBJECTIFS DE LA THESE.....	69
C. RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	70
1- Impact de l'absence de microbiote sur les cinétiques de réplication du VRS et des réponses immunitaires pulmonaires chez des souriceaux.....	70
1-1 Introduction.....	70
1-2 Matériel et méthode.....	71
1-2-1 Vérification de la colonisation des animaux par quantification des bactéries.....	71
1-2-2 Infections <i>in vivo</i>	71
1-2-3 Analyse des lavages broncho-alvéolaires.....	71
1-2-4 Quantification de la réplication virale par mesure de la bioluminescence <i>in vitro</i>	72
1-2-5 Mesure de la charge virale (gène N) et de l'expression des gènes par RT-qPCR.....	72
1-2-6 Cytométrie en flux.....	72
1-3 Résultats.....	74
1-3-1 Colonisation passive de souris axéniques adultes.....	74
1-3-2 Influence du microbiote sur la cinétique de réplication du VRS chez les souriceaux axéniques et EOPS.....	76
1-3-3 Influence du microbiote sur la réponse inflammatoire pulmonaire au cours de l'infection par le VRS-Luc chez les souriceaux axéniques et EOPS.....	77
1-3-4 Influence du microbiote sur la réponse immunitaire innée pulmonaire au cours de l'infection par le VRS-Luc chez les souriceaux axéniques et EOPS.....	79
1-3-5 Influence du microbiote sur la composition en cellules immunitaires de la muqueuse pulmonaire néonatale.....	79
1-4 Conclusions.....	83
2- Immunomodulation de la réponse immunitaire pulmonaire par les bactéries primo-colonisatrices du poumon de souriceaux dans l'infection VRS.....	84
2-1 Introduction.....	84

2-2 Article : Early-Life Commensal Lung Bacteria Shape Immune Responses and RSV Susceptibility in Neonatal Mice	85
2-3 Résultats supplémentaires non publiés	116
2-3-1 Étude du paysage immunitaire pulmonaire néonatal en réponse à l'exposition à une bactérie primo-colonisatrice des poumons.....	116
2-3-2 Effets de l'administration d'une souche de bactérie primo-colonisatrice des poumons sur la réplication du VRS-Luc et la réponse immunitaire chez la souris adulte.....	118
2-3-3 Conclusion.....	120
3-Effets de l'administration d'un postbiotique en période néonatale sur l'évolution de l'infection par le VRS.....	121
3-1 Introduction	121
3-2 Résumé de conférence "13th Probiotics, Prebiotics and New Foods"	122
3-3 Conclusion	125
D. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	126
1- Modification de la réplication virale et la réponse immunitaire à l'infection par le VRS chez des souriceaux en absence de microbiote	126
1-1 Impact du statut axénique sur la cinétique de réplication virale	126
1-2 Rôle du microbiote dans l'activation précoce de la réponse antivirale	127
1-3 Le microbiote contribue-t-il à façonner le paysage immunitaire pulmonaire néonatal ?	127
1-4 Limites et spécificités des modèles animaux utilisés	129
1-5 Approches méthodologiques et perspectives d'analyse à résolution cellulaire	131
2- Modulation de l'immunité de la muqueuse pulmonaire périnatale par le microbiote pour prévenir de la bronchiolite du nourrisson.....	131
2-1 Compréhension des mécanismes d'action et de l'origine de l'effet protecteur de la bactérie 17	132
2-2 Diversité et spécificité de souche.	132
2-3 Sécurité et conditions d'administration de la bactérie 17.....	133
3- Vers des stratégies postbiotiques de modulation immunitaire néonatale contre l'infection par le VRS.....	134
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	136
BIBLIOGRAPHIE	138
ANNEXE	154
Annexe 1 : Stratégie d'identification des Lc NK.....	154
Annexe 2 : Participation à des congrès.....	155
Annexe 3 : Formations suivies pendant le doctorat.....	156
Annexe 4 : Publication d'une mini-revue	157

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à mes directrices de thèse, Sabine et Delphyne, pour leur confiance, leur accompagnement et leurs conseils tout au long de ces années. Leur disponibilité, leurs orientations scientifiques et leurs encouragements ont été essentiels à la réalisation de ce travail.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Geneviève Hery-Arnaud, Rachel Golub Vinciane Saint-Criq et Damien Vitour pour leurs remarques constructives et l'intérêt porté à ce projet.

Je suis reconnaissante envers l'ensemble des membres de mon jury, Véronique Flamand, Loïc Guillot, Sonia Lacroix-Lamande, Aurore Vidy-Roche et Karim Benihoud pour avoir accepté de consacrer leur temps et leur expertise à l'évaluation de ce manuscrit.

Je souhaite également remercier l'École doctorale ABIES et plus particulièrement Pierre Larraufie pour son soutien et l'encadrement apporté tout au long de ma formation.

J'adresse mes remerciements à nos collaborateurs. En particulier Vinciane pour son expertise et son investissement au sein de ce projet. Je remercie chaleureusement les animaleries IERP et Anaxem pour leur disponibilité, leur professionnalisme et leur soutien technique indispensable à la réalisation des expériences. Enfin, je remercie Isabelle Sermet, Aurélie Hatton et Elise Dreano pour leur accueil à Necker et leur implication sincère dans notre projet commun.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe V2I. Merci pour votre accueil, votre bienveillance et la qualité des échanges scientifiques qui ont enrichi ce travail. J'ai eu la chance d'évoluer au sein d'un groupe enthousiaste, disponible et toujours prêt à partager ses connaissances. Ces années au laboratoire ont été autant formatrices sur le plan scientifique que fédératrices sur le plan humain et je garderai en mémoire les discussions, l'entraide et le quotidien partagé au sein de l'équipe. Merci à l'unité VIM, pour l'accueil chaleureux, les parts de gâteaux et les cafés dans les couloirs, tout autant nécessaires à l'accompagnement de ce projet.

Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude envers celles et ceux qui m'ont offert une opportunité à un moment où mon avenir professionnel semblait incertain. En premier lieu, au Professeur Roland Quentin, qui m'a ouvert les portes du monde de la recherche. Ta passion inépuisable pour la médecine et la science, ta bienveillance et ton humanité sont des valeurs précieuses dont je me suis inspirée et que j'essaie à mon tour de transmettre. Je pense aussi au Docteur François Villinger, grâce à qui l'histoire a pu se poursuivre, à plusieurs milliers de kilomètres mais quelle incroyable expérience ! Et bien sûr au Docteur Delphyne Descamps, merci d'avoir fait irruption au P2 pour savoir si « par hasard je ne serais pas intéressée pour faire une thèse ? ». Merci à vous trois d'avoir façonné mon parcours scientifique et personnel, et d'avoir contribué à ce qu'il est devenu aujourd'hui.

Je tiens également à remercier ma famille et mes amis pour leur soutien, leur patience et leur présence constante, qui m'ont permis d'avancer sereinement dans cette aventure scientifique et humaine jusqu'à l'aboutissement de ce travail.

J'ai une pensée émue pour celles qui sont parties trop tôt, et qui ne pourront pas partager ce moment, mais dont la mémoire m'accompagne chaque jour.

Enfin, merci à toi d'être entré dans ma vie, d'une façon tellement inattendue mais parfaite, tu fais de chaque jour une aventure, puisse-t-elle durer toujours.

LISTES

Abréviations

-A-

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGCC : Acides gras à chaînes courtes

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANSM : Agence nationale de sécurité et du médicament

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

-B-

BALT: Bronchus associated lymphoid tissue

-C-

CAP-18 : Cathelicidin antimicrobial protein-18

CCL2 (MCP-1) : CC motif chemokine ligand 2

CCR7 : C-C chemokine receptor type 7

CD : Cellule dendritique

CDp/c : Cellule dendritique plasmacytoïde/conventionnelle

CFU: Colony forming unit

CX3CR1: CX3C motif chemokine receptor 1

CXCL1/CXCL10: CXC motif chemokine ligand 1/10

-E-

EGFR: Epithelial growth factor receptor

EOPS : Exempt d'organisme pathogène spécifique

-F-

FcγRII/FcγRIII: Fc fragment of IgG low affinity IIa/III receptor

FDA: Food and drug administration

FFAR3: Free fatty acid receptor 3

-G-

GALT: Gut associated lymphoid tissue

G-CSF: Granulocyte colony stimulating factor

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GMDSC/MMDSC: Granulocytic/monocytic myeloid-derived suppressor cell

-H-

hMPV: Human metapneumovirus

HSP 90/HSP 70: Heat shock protein 90/70

HSPG: Heparan sulfate proteoglycan

-I-

ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1

ICOS: Inducible T-cell costimulator

IFN-I: Interferon de type I

IFN- γ : Interféron gamma

Ig: Immunoglobuline

IGF1R: Insulin like growth factor 1 receptor

IL : Interleukine

ILC : Innate lymphoid cell

iNOS : Nitric oxide synthase, inducible

IRR : Infections respiratoires récurrentes

IRV : Infections respiratoires virales

ITGAE : integrin alpha E

ISG : IFN-stimulated gene

IVRS : Infections des voies respiratoires supérieures

-J-

jpi: Jour post-infection

-K-

KLRG1: Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1

-L-

LBA : Liquide broncho-alvéolaire

Lc B reg : Lymphocyte B régulateur

Lc B : Lymphocyte B

Lc T reg : Lc T régulateur

LPS : Lipopolysaccharide bactérien

-M-

MA : Macrophage alvéolaire

MAVS: Mitochondrial antiviral signaling protein

MDA5: Melanoma differentiation associated gene 5

MDSC: Myeloid-derived suppressor cell

MI: Macrophage interstitiel

mig-DC: Migratory dendritic cells

MOI: Multiplicity of infection

MPO: Myéloperoxydase

-N-

NETs: Neutrophil extracellular traps

NK: Natural-Killer

NOD2: Nucleotide-binding oligomerization domain 2
NS1/NS2 : Non structural protein 1/2
-O-
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
-P-
PAM : Peptides antimicrobien
PBS : Phosphate buffer saline
PD-L1 : Programmed death-ligand 1
PFU : Plaque forming unit
PNB : Polynucléaire basophile
PNH : Primate non humain
PNN/PNE : Polynucléaire neutrophile/éosinophile
poly(I;C): Acide polyinosinique-polycytidylique
PPAR- γ : Peroxisome proliferator activated receptor gamma
PVM: Pneumonia virus of mice
-R-
RNP: Ribonucléoprotéine
ROS: Reactive oxygen species
-S-
SLPI: Secretory Leucocyte Proteinase Inhibitor
SP-A/SP-D : Surfactant protein A/D
spc : semaine post-conception
-T-
TLR: Toll like receptor
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
-V-
VRS : Virus respiratoire syncytial
VRSb : Virus respiratoire syncytial bovin
VRSh : Virus respiratoire syncytial humain

Figures

Figure 1 : Représentation schématique de la particule virale du VRS et de l'organisation de son génome

Figure 2 : Cycle de réplication du VRS

Figure 3 : Représentation graphique du nombre de passages et d'hospitalisations pour bronchiolite en France chez les enfants de moins de deux ans pour les saisons épidémiques entre 2018 et 2023

Figure 4 : Représentation schématique des différents vaccins et anticorps monoclonaux en développement contre le VRS

Figure 5 : Principaux modèles animaux d'études précliniques de l'infection par le VRS et leurs recommandations d'usage

Figure 6 : Représentation schématique de l'utilisation prédominante du modèle murin parmi les modèles d'étude d'infection par le VRS chez les petits animaux

Figure 7 : Organisation anatomique du système respiratoire

Figure 8 : Organisation anatomique de l'arbre trachéo-bronchique

Figure 9 : Chronologie du développement du poumon chez l'Homme et la souris

Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation générale de la muqueuse respiratoire et du système mucociliaire

Figure 11 : Représentation schématique des alvéoles pulmonaires

Figure 12 : Représentation schématique de la fréquence relative des principales cellules immunitaires et leurs sous-types dans la muqueuse pulmonaire néonatale murine à l'homéostasie

Figure 13 : Localisation de l'hématopoïèse pendant le développement embryonnaire

Figure 14 : Homologies fonctionnelles entre les ILC et les sous-types de Lc T Helper

Figure 15 : Représentation schématique des mécanismes contribuant à la polarisation Th2 de l'environnement pulmonaire néonatal

Figure 16 : Les mécanismes de défense des cellules épithéliales

Figure 17 : Influence de l'âge lors de la primo-infection par le VRS sur le type de réponse immunitaire

Figure 18 : composition des différents microbiotes chez l'Homme à l'homéostasie

Figure 19 : Principales caractéristiques du microbiote pulmonaire sain

Figure 20 : Composition des microbiotes bactériens des voies aéro-digestives chez l'Homme sain

Figure 21 : Mécanismes influençant la composition du microbiote pulmonaire sain et pathologique

Figure 22 : Distribution des microbiotes des voies aériennes en fonction de l'âge gestationnel et du mode de naissance

Figure 32 : Représentation graphiques du nombre et de la taille des alvéoles pulmonaires en fonction de l'origine environnemental des souris

Figure 24 : Représentation schématique de l'impact du microbiote pulmonaire sur l'homéostasie de la muqueuse pulmonaire

Figure 25 : Synthèse des principales corrélations entre les variations de l'abondance relative des micro-organismes des microbiotes intestinaux et respiratoires chez l'enfant lors d'infections respiratoires, d'allergies ou d'asthme

Figure 26 : Représentation schématique des principales interactions composant l'axe intestin-poumon

Figure 27 : Colonisation passive de souris axéniques adultes

Figure 28 : Installation d'un microbiote intestinal par colonisation passive de souris axéniques mises en cohabitation avec de souris EOPS

Figure 29 : Quantification de la réplication virale dans les poumons des souriceaux axéniques et contrôles

Figure 30 : Réponse inflammatoire pulmonaire des souriceaux axéniques et EOPS suite à l'infection par le VRS-Luc

Figure 31 : Profil d'expression des gènes de l'immunité innée des souriceaux EOPS et axéniques en réponse à l'infection par le VRS-Luc

Figure 32 : Différence de composition en cellules immunitaires de la muqueuse pulmonaire néonatale entre des souriceaux axéniques et EOPS à l'état basal

Figure 33 : Identification des cellules immunitaires de la muqueuse pulmonaire suite à l'exposition à la bactérie 17 chez les souriceaux Balb/c

Figure 34 : L'administration préventive de la bactérie 17 chez les souris adultes interfère avec la réplication du VRS-Luc et modifie le recrutement des cellules inflammatoires pulmonaires

Figure 35 : L'administration préventive de *Bifidobacterium breve* LA708 chez les souris permet une élimination plus rapide du VRS-Luc et oriente la réponse immunitaire pulmonaire vers un profil Th1

Figure 36 : Caractéristiques de la muqueuse pulmonaire en période néonatale

Figure 37. Analyse de la composition du microbiote intestinal des élevages des lignées C57BL/6

Tableaux

Tableau 1 : Récepteurs potentiels pour l'entrée du VRS dans les cellules cibles

Tableau 2 : Caractéristiques selon l'âge de la réponse immunitaire au VRS

Tableau 3 : Effets des stratégies microbiennes thérapeutiques dans les infections virales respiratoires

A. INTRODUCTION

1- Le Virus Respiratoire Syncytial

1-1 Épidémiologie

Le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) est un virus ubiquitaire et endémique qui circule sous forme d'épidémies hivernales dans l'hémisphère Nord alors que dans l'hémisphère Sud, le nombre d'infection est plus important pendant la saison des pluies. Deux études, conduites au niveau mondial en 2010 et 2017, estiment à 33,2 millions le nombre de bronchiolites causées par le VRS et à 3,2 millions le nombre d'hospitalisations chez les enfants de moins de 5 ans (Nair et al. 2010; Shi et al. 2017). En France, les données de l'Agence Nationale de Sécurité et du Médicament (ANSM) estiment à 30% le nombre de nourrissons infectés chaque hiver, ce qui représente environ 480 000 cas par an. Parmi ce nombre d'individus infectés, 2 à 3% seraient hospitalisés pour bronchiolites sévères (Stockman et al. 2012)¹. Des facteurs de risque tels que la prématurité, le faible poids de naissance, le tabagisme passif, les pathologies cardiaques et pulmonaires ainsi que des polymorphismes génétiques associées au système immunitaire ont été identifiés dans la survenue de bronchiolites sévères. Cependant, la présence d'un facteur de risque n'a été identifiée que chez 4% des enfants hospitalisés pour une infection avec le VRS (Stockman et al. 2012). Ainsi, à l'âge de deux ans, il est considéré que tous les enfants ont été infectés au moins une fois par le VRS. Les réinfections sont fréquentes tout au long de la vie avec une expression clinique variable selon l'âge.

1-2 Description du VRS

Le VRS est un *Mononegavirales* appartenant à la famille des *Pneumoviridae* et au genre *Orthopneumovirus*, où l'on retrouve le VRS bovin et le virus de la pneumonie murine (Amarasinghe et al. 2019). En culture cellulaire, les particules virales sont majoritairement produites sous forme de longs filaments (10 µm de long pour 60-200 nm de diamètre) mais également sous forme sphériques de 100 à 350 nm de diamètre (Jeffrey et al. 2003).

Le virion est constitué d'une enveloppe renfermant une nucléocapside. L'enveloppe virale, dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte, présente une organisation identique : une bicouche phospholipidique au sein de laquelle sont enchâssées trois protéines virales : la glycoprotéine G, la protéine de fusion F et la protéine SH pour « Small Hydrophobic ». La face interne de l'enveloppe est tapissée par la protéine M de matrice. La nucléocapside est un complexe ribonucléoprotéique (RNP) comprenant le génome viral, entouré par la nucléoprotéine N, le tout étant associé à la phosphoprotéine P et à l'ARN polymérase ARN dépendante L (**Figure 1A**). Le génome du VRS est un ARN monocaténaire non segmenté de polarité négative d'environ 15 kb constitué de 10 gènes codant pour 11 protéines (**Figure 1B**). Parmi ces protéines, deux sont non-structurales (NS1 et NS2) et neuf sont structurales (N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 et L).

¹ <https://ansm.sante.fr/dossiers-thematiques/le-virus-respiratoire-syncytial-vrs>

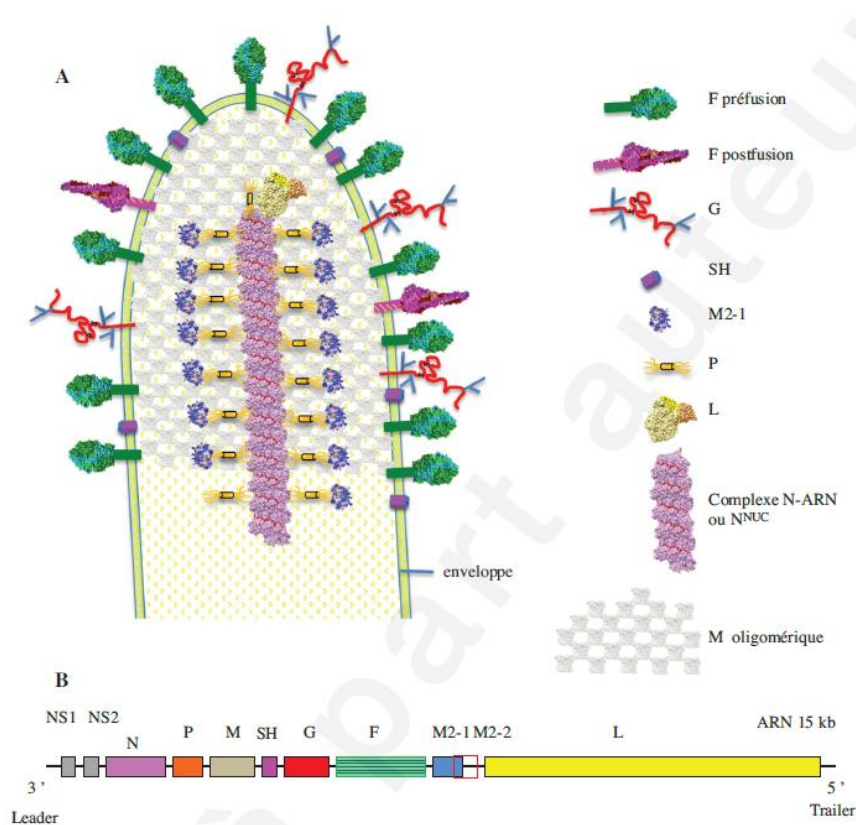


Figure 1 : Représentation schématique de la particule virale du VRS (A) et de l'organisation de son génome (B). La particule virale, enveloppée, renferme la nucléocapside. Sa face interne est tapissée par la protéine M et la face externe est recouverte par les protéines F (sous une conformation pré-fusion et/ou sous une conformation post-fusion) et G. Son génome est un constitué par un brin d'ARN comportant 10 gènes codant pour 11 protéines : le gène M2 code pour les protéines M2-1 et M2-2 (Eléouët 2020).

Il existe deux sous-types de VRS : le VRS/A et le VRS/B. Cette distinction repose sur la variabilité de séquence de la glycoprotéine de surface G (moins de 53% d'identité). Les deux sérotypes co-circulent pendant les épidémies, le sous-groupe A étant plus prévalent et plus pathogène que le sous-groupe B.

1-3 Mécanismes d'infection

1-3-1 Entrée du virus dans l'organisme

1-3-1-1 Transmission : voie respiratoire

Le VRS est capable d'infecter les voies aériennes supérieures de tous les individus avec une contagiosité majeure. La dose infectante étant de 100 à 600 particules virales en cas de contact par voie nasale avec un taux d'attaque² en milieu familial de 62% chez les nourrissons de moins d'un an. La transmission est interhumaine et se fait par inhalation de gouttelettes émises lors de la toux, des éternuements ou de la parole d'une personne infectée. Elle peut aussi survenir par contact des

² Taux d'attaque (TA) : indicateur épidémiologique de mesure de l'intensité d'une épidémie permettant d'établir des comparaisons entre différents lieux et avec les épidémies précédentes. Le TA, exprimé en pourcentage est calculé selon la formule : Nombre de cas pendant une période / population exposée pendant la même période x 100 (<https://medicalguidelines.msf.org/fr>)

muqueuses respiratoires avec les sécrétions d'une personne contaminée, déposées sur les mains ou sur des objets contaminés ³.

Après une période d'incubation de deux à huit jours, la réplication du virus débute dans les cellules ciliées de l'épithélium nasal puis se propage aux voies aériennes inférieures, en infectant les cellules ciliées des bronchioles et les pneumocytes de type I au niveau des alvéoles (Zhang et al. 2002).

L'expression clinique de l'infection, en lien direct avec les zones infectées, varie selon l'âge des individus. L'infection présente une diffusion limitée, sous forme de rhinopharyngite chez les adultes sains alors que chez les enfants, la diffusion est plus étendue (rhinopharyngite, laryngite, bronchite). De plus, chez les nourrissons, il y a une diffusion possible vers les bronchioles, à l'origine de bronchiolites et de pneumonies.

La Haute Autorité de Santé ⁴ définit la bronchiolite comme :

- un premier épisode épidémique chez un nourrisson de plus d'un mois et de moins de deux ans,
- quarante-huit à soixante-douze heures après un épisode de rhinorrhée peu ou pas fébrile,
- associant une toux, une dyspnée obstructive avec polypnée à prédominance expiratoire, un tirage, une distension thoracique, un sifflement (râle sibilant audible à distance) et/ou des râles sibilants et/ou des râles sous-crépitants à prédominance expiratoire
- l'état général est conservé, la fièvre, inconstante, est modérée et les troubles digestifs sont fréquents.

1-3-1-2 Cible primaire : cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures

Une fois au contact de l'épithélium, le VRS va infecter préférentiellement les cellules épithéliales ciliées mais également les pneumocytes de type I (Johnson et al. 2007). Chez l'enfant, il a été montré l'infection par le VRS d'une sous-population de lymphocyte B régulateurs (Lc B reg) (Zhivaki et al. 2017). Une étude récente réalisée chez la souris a mis en évidence la présence du VRS, à trois jours post-infection, dans des macrophages, des lymphocytes B (Lc B) ainsi que dans une sous-population de cellules dendritiques (CD103⁺ CD11b⁺) (Fonceca et al. 2023). Dans ces dernières, le signal a pu être mesuré jusqu'à vingt et un jours post-infection (Fonceca et al. 2023). Par ailleurs, il a été montré, *in vitro* et *in vivo*, que l'infection des cellules immunitaires (monocytes, cellules dendritiques et macrophages alvéolaires – MA-) conduit à une production très faible de particules virales (Arnold et al. 1995; de Graaff et al. 2005; Franke-Ullmann et al. 1995; Schwarze et al. 2004). Bien que plusieurs types cellulaires puissent être infectés par le VRS, la susceptibilité des différents épithéliums respiratoires à l'infection n'est pas équivalente. En effet, si des cellules nasales et bronchiques humaines adultes présentent un pourcentage identique de cellules positives au VRS après vingt-quatre heures d'infection à la même MOI⁵, des différences ont été observées dans leur capacité à libérer des particules virales infectieuses (Becker et al. 1992). A une MOI de 0.1, les cellules bronchiques primaires ont une production virale dix fois inférieure à celle des cellules nasales primaires. A cette même MOI, les MA ont une production virale treize, quarante-six et cent fois

³ https://www.inrs.fr/publications/bdd/eficatt/fiche.html?refINRS=EFICATT_Infections%20C3%A0%20VRS

⁴ https://www.hassante.fr/upload/docs/application/pdf/201911/hascnpp_bronchiolite_argumentaire_2019_vd.pdf

⁵ Multiplicity of infection (MOI) : rapport entre l'agent infectieux et la cellule cible (Nang et al. 2023)

inférieure, respectivement, à celle des cellules bronchiques, des cellules nasales ou à la lignée BEAS-2B⁶ (Becker et al. 1992). Contrairement aux cellules épithéliales, l'infection des MA reste limitée aux cellules initialement infectées, car la proportion de cellules positives au virus est constante tout au long de la culture *in vitro* (Becker et al. 1992). Ces données suggèrent que la réplication virale et la propagation par réinfection sont limitées dans ces cellules immunitaires comparées aux cellules épithéliales primaires ou immortalisées.

Le cycle viral est exclusivement cytoplasmique et se décompose en cinq étapes (**Figure 2**) :

- 1) l'attachement de la particule virale à un récepteur cellulaire,
- 2) la fusion de l'enveloppe virale à la membrane plasmique permettant l'entrée de la nucléocapside dans la cellule hôte,
- 3) la production de protéines virales et la réplication du génome,
- 4) l'assemblage des virions à la membrane plasmique,
- 5) le bourgeonnement des particules virales néoformées.

1-3-2 Attachement et entrée dans la cellule

1-3-2-1 Identification de récepteurs spécifique du VRS

Actuellement, il n'y a pas de consensus sur l'identification d'un récepteur spécifique utilisé par le VRS pour infecter les cellules de l'hôte. Les différentes études s'intéressant à cette question ont permis d'identifier plusieurs candidats pour l'entrée et la pathogenèse du VRS (**Tableau 1**), notamment le récepteur de la chimiokine CX3C 1 (CX3CR1) (Tripp et al. 2001), la nucléoline (Tayyari et al. 2011), le facteur de croissance épidermique (EGFR) (Currier et al. 2016), le récepteur du facteur de croissance insulino-mimétique-1 (IGF1R) (Griffiths et al. 2020), les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) (Feldman et al. 1999) et la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) (Behera et al. 2001). Alors que la protéine G du VRS se lie à CX3CR1 et aux HSPG, la protéine F du VRS peut interagir avec la nucléoline, l'EGFR, l'IGF1R et l'ICAM-1. Parmi ces récepteurs, CX3CR1 est le candidat le plus probable, car son profil d'expression correspond au tropisme du VRS et l'interaction entre CX3CR1 et le motif CX3C de la protéine G du VRS contribue à la suppression de l'interféron de type I (IFN-I) et conduit à une réponse immunitaire polarisée de type Th2⁷, ce qui a été observé dans de nombreuses études (Isaacs 1989; Pinto et al. 2006; Cormier et al. 2014; Caballero et al. 2015; Hijano et al. 2019), bien que d'autres protéines virales participent également à ces processus.

Les HSPG sont les principaux récepteurs permettant l'entrée du VRS dans des lignées cellulaires immortalisées *in vitro*, mais ils pourraient ne pas être des récepteurs nécessaires dans l'épithélium humain *in vivo*, étant donné leur expression basale dans ces cellules. Les récepteurs se liant à la protéine F facilitent principalement l'infection des cellules hôtes en médiant l'attachement, la fusion et la macropinocytose. Il existe un certain chevauchement fonctionnel entre les protéines G et F.

⁶ BEAS-2B : cellules épithéliales isolées d'un épithélium bronchique humain non cancéreux (<https://www.atcc.org>)

⁷ Réponse immunitaire de type Th2, renvoie à la différenciation des lymphocytes T CD4+ (lymphocyte T helper) qui se caractérise par un profil spécifique de production de cytokines adaptées à leur fonction. La réponse Th2 s'oppose aux réponses Th1, Th17, Th9 et T régulateurs (<https://doi.org/10.1051/medsci/20122812003>)

Tableau 1 : Récepteurs potentiels pour l'entrée du VRS dans les cellules cibles

Récepteurs potentiels	Liaison à	Fonctions	Références
CX3CR1	protéine G	<ul style="list-style-type: none"> - attachement des virions - inhibe la production d'IFN-I - favorise réponse de type Th2 	(Imai et al. 1997; Tripp et al. 2001; Harcourt et al. 2006; Chirkova et al. 2013; 2015; Jeong et al. 2015; Johnson et al. 2015; Zhivaki et al. 2017; Anderson et al. 2020; Green et al. 2021)
Nucléoline	protéine F	<ul style="list-style-type: none"> - internalisation virale 	(Tayyari et al. 2011; Hegele 2012; Griffiths et al. 2020; Mastrangelo et al. 2021)
EGFR	protéine F	<ul style="list-style-type: none"> - induit la macropinocytose du VRS - facilite la fusion des membranes - augmente la production de mucus 	(Currier et al. 2016; Lingemann et al. 2019)
IGFR1	protéine F	<ul style="list-style-type: none"> - favorise la translocation de la nucléoline à la membrane cellulaire 	(Griffiths et al. 2020)
HSPGs	protéine G	<ul style="list-style-type: none"> - attachement des virions 	(Krusat et Streckert 1997; Bourgeois et al. 1998; Feldman et al. 1999; Hallak et al. 2000; Feldman et al. 2000)
ICAM-1	protéine F	<ul style="list-style-type: none"> - favorise l'adhésion des Polynucléaires Neutrophiles (PNN) et Eosinophiles (PNE) aux voies aériennes 	(Patel et al. 1995; Arnold et König 1996; Chini et al. 1998; Wang et al. 2000; Behera et al. 2001)

Dans une revue récente, les auteurs ont distingué les structures moléculaires correspondant à des facteurs de l'hôte facilitant l'infection par le VRS de celles pouvant être assimilées à des récepteurs (Feng et al. 2022). En effet, à l'exception de la nucléoline (Tayyari et al. 2011), aucune des structures citées précédemment ne possède les critères de définition d'un récepteur. A savoir, une inhibition de l'infection après incubation des cellules avec un anticorps dirigé contre le récepteur, un phénomène de compétition lorsque le virus est pré-incubé avec une forme soluble du récepteur avant d'être inoculé à des cellules, une inhibition de l'infection par abolition de l'expression du récepteur en utilisant un ARN interférent ou encore l'induction de l'infection par expression du récepteur à la surface de cellules non permissives (Osiowy et Anderson 1995)⁸. Dans le cas de la

⁸ <https://samicrobiology.wordpress.com/wp-content/uploads/2018/08/modern-virology.pdf>

nucléoline, des cellules issues de l'insecte *Spodoptera frugiperda*, ne possédant aucune structure de reconnaissance pour le VRS, ont été rendues permissives à l'infection après transfection de la forme humaine de la nucléoline (Osioy et Anderson 1995). Chez l'Homme, la nucléoline est exprimée dans toutes les cellules de l'organisme donc son identification comme récepteur spécifique du VRS n'est pas cohérente avec le tropisme du virus. C'est pourquoi l'intervention d'un co-récepteur, exprimé spécifiquement sur les cellules de l'épithélium respiratoire, semble nécessaire pour l'infection.

1-3-2-2 Mécanismes d'entrées dans les cellules épithéliales

La reconnaissance entre le virion et son récepteur conduit à l'internalisation du génome viral dans la cellule hôte, soit par fusion directe entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique, soit par l'entrée de la particule virale grâce aux voies d'endocytoses, dépendantes de la clathrine ou de la cavéoline, ou encore par macropinocytose (Cadena-Cruz et al. 2023). Ce deuxième mode d'entrée, initié par l'interaction entre la protéine F et son récepteur, avec le changement de conformation de la protéine F de pré à post-fusion, est suivi par la fusion entre l'enveloppe virale et la vésicule d'endocytose, sans acidification du pH ou intervention des lysosomes (Srinivasakumar et al. 1991). La nucléocapside libérée est composée de l'ARN polymérase L, de l'ARN viral associé à la protéine N et des protéines P et M2-1. Ces dernières sont des cofacteurs essentiels pour les étapes de transcription et de réplication qui vont débiter directement dans le cytoplasme de la cellule hôte.

1-3-3 Réplication virale

1-3-3-1 Cycle de réplication du VRS dans les cellules infectées

Pour la transcription, la polymérase se fixe à l'extrémité de 3' de l'ARN et progresse vers l'extrémité 5' (**Figure 2**). Chaque gène est encadré par une séquence promotrice et une séquence de fin de transcription, la polymérase va donc se fixer sur la séquence d'initiation, produire l'ARN messenger (ARNm) du gène et se détacher au niveau de la séquence de fin de transcription. Ainsi la transcription est réalisée de manière séquentielle et il a été décrit dans la famille des *Mononegavirales* une capacité de la polymérase à se détacher du génome et à progresser vers l'avant ou vers l'arrière. Ce phénomène aboutit à un gradient 3'-5' de transcription des ARNm des différents gènes, c'est-à-dire que la quantité de copies d'ARNm produites va diminuer selon l'ordre des gènes sur le génome. Ainsi les gènes placés en 3', NS1 et NS2, puis N, vont être produits rapidement et en quantité plus importante que les autres gènes. Les protéines NS1 et NS2 ont la capacité d'interférer avec les réponses immunitaires innées de la cellule hôte, en bloquant la signalisation de la voie interféron et en inhibant l'apoptose de la cellule infectée. Ainsi la production précoce et en grande quantité de ces deux protéines virales représente un mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire de la cellule hôte (Decool et al. 2021).

La réplication du génome est initiée par la fixation de l'ARN polymérase à l'extrémité 3' du génome et va progresser, de manière continue, jusqu'à l'extrémité 5', pour produire un brin d'ARN positif (anti-génome). Cet ARN est immédiatement encapsidé par la protéine N et pourra servir de matrice pour la fabrication de nouveaux génomes ARN négatif (Decool et al. 2021).

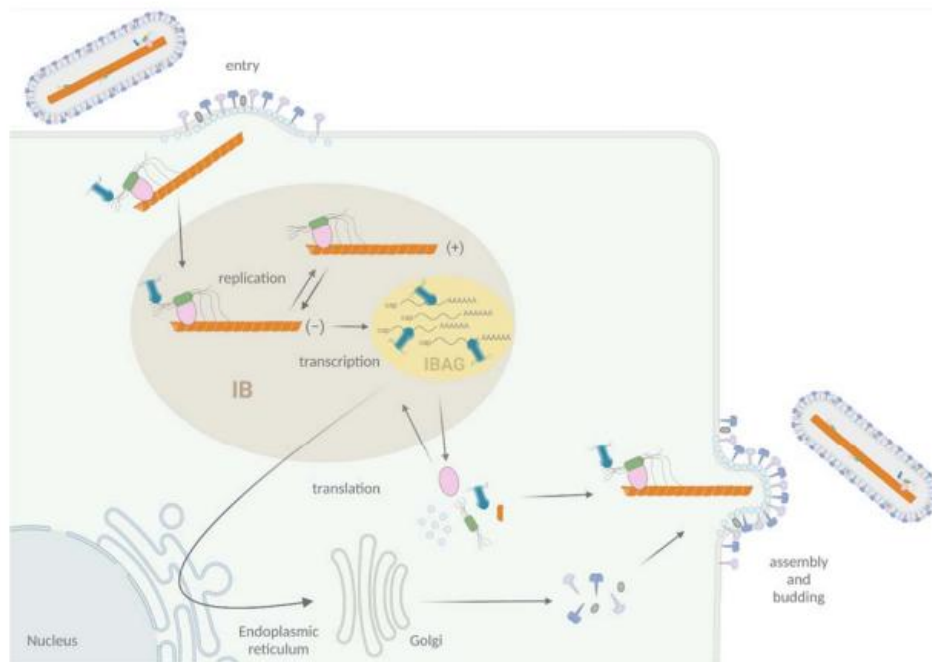


Figure 2 : Cycle de réplication du VRS. Après fixation des particules virales à la surface de la cellule cible via les glycoprotéines F et G, la protéine de fusion F déclenche la fusion des membranes virale et cellulaire, permettant l'entrée de la nucléocapside virale dans le cytoplasme. Les protéines du complexe polymérase, ainsi que le génome viral ARN, se regroupent au sein de structures appelées corps d'inclusion cytoplasmiques, où a lieu la transcription des gènes viraux et la réplication du génome. Les ARN messagers viraux rejoignent le cytoplasme pour permettre la synthèse des protéines virales. En fin de cycle, le génome subit une amplification par réplication avant d'être à nouveau encapsidé, formant ainsi de nouvelles particules virales qui bourgeonneront à la membrane plasmique (Decool et al. 2021).

Grâce à des techniques de microscopie, il a été montré une colocalisation de différentes protéines virales (L, N, P, M2-1, M2-2, NS2 et M) ainsi que de l'ARN viral au niveau de structures cytoplasmiques dépourvues de membranes. Ces structures de formes sphériques, appelées corps d'inclusion, sont le lieu de la transcription et de la réplication. Les corps d'inclusion contiennent également des protéines appartenant à la cellule hôte, telles que les protéines chaperonnes HSP 90 et HSP 70 impliquées dans la stabilisation du complexe polymérase (Munday et al. 2015) mais aussi des protéines telles que MDA5 et MAVS (Lifland et al. 2012), impliquées dans l'induction de la voie interféron. Ainsi, la séquestration de ces éléments de signalisation constitue un mécanisme viral d'interférence avec la réponse de l'hôte.

1-3-3-2 Production et relargage de nouveaux virions

Les génomes viraux, à ARN négatifs, encapsidés par la nucléoprotéine (nucléocapside), ainsi que les protéines virales néosynthétisées, vont rejoindre la membrane plasmique pour permettre l'assemblage de nouveaux virions et leur bourgeonnement sous forme de longs filaments, à la surface de la cellule infectée.

Dans des lignées cellulaires, l'infection par le VRS produit des syncytia, qui ne sont pas observés dans les cellules épithéliales différenciées et polarisées. Dans le cas du VRS, d'autres modes de transmission du virus ont été récemment décrits, notamment par contact direct entre cellules adjacentes *via* des filopodes. Ces structures cytoplasmiques permettraient le transfert direct des

corps d'inclusion ou du génome viral d'une cellule à une autre, évitant ainsi la détection du virus par les récepteurs cellulaires et l'initiation d'une réponse immunitaire de l'hôte (Zhang et al. 2024).

1-4 Prise en charge thérapeutique

Dans la majorité des cas, l'infection par le VRS connaît une résolution spontanée après une à deux semaines. Le traitement est symptomatique avec l'utilisation d'analgésique et d'antipyrétique, à des fins de réduction de la douleur et de la fièvre. Il existe deux antiviraux commercialisés : le Palivizumab et le Nirsevimab, destinés aux populations pédiatriques, afin de prévenir les formes graves d'infection par le VRS.

Le Palivizumab a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en août 1999. Il est uniquement administré en établissement de santé, à une fréquence d'une fois par mois durant toute la saison d'épidémie à VRS, chez des enfants nés à trente-cinq semaines de gestation ou moins, âgés de moins de six mois au début de l'épidémie saisonnière ou chez des enfants de moins de deux ans ayant reçu un traitement pour dysplasie bronchopulmonaire au cours des six derniers mois. L'étude IMPact-RSV, portant sur les résultats de la prophylaxie associée au Palivizumab, a montré une réduction statistiquement significative du nombre et de la durée d'hospitalisation ainsi qu'une diminution de la durée d'oxygénation supplémentaire requise dans le groupe traité comparé au groupe placebo (« Palivizumab, a Humanized Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, Reduces Hospitalization From Respiratory Syncytial Virus Infection in High-Risk Infants » 1998). Cependant, en raison de l'efficacité partielle de ce traitement onéreux, nécessitant des injections répétées, l'utilisation du Palivizumab n'a pas pu être généralisée à toute la population pédiatrique mais restreinte aux enfants présentant des facteurs de risque. Or, comme précisé en début de chapitre, les cas d'infections sévères n'étant pas corrélés à l'existence de facteurs de risque, cette stratégie a été peu efficace pour réduire les cas de bronchiolites dans la population générale.

Le Nirsevimab, autorisé depuis octobre 2022, montre une efficacité jusqu'à cinq mois après l'injection. De ce fait, une seule injection est nécessaire par saison épidémique, pouvant être réalisée par les médecins, les sages-femmes et les infirmiers, sur prescription médicale. Suite à l'augmentation du nombre d'infection causée par le VRS sur la saison 2022-2023 (**Figure 3**), une campagne nationale d'immunisation a été mise en place, destinée à tous les nourrissons nés depuis le 6 février 2023 ainsi qu'à tous les nouveau-nés, dès leur naissance et avant leur sortie de maternité. Le suivi de l'efficacité de l'administration préventive du Nirsevimab a été réalisé grâce au réseau de surveillance PICURe (Pediatric Intensive Care Unit Registry) qui a recensé les cas graves de bronchiolites à VRS chez les enfants de moins de deux ans, dans les services volontaires de réanimations pédiatrique ou néonatale, dans chaque région de France. Les données recueillies auprès de deux cent quatre-vingt-huit nourrissons sur la période du 15 septembre 2023 au 31 janvier 2024 montrent des résultats positifs de l'administration préventive du Nirsevimab avec une baisse significative du nombre de nourrissons hospitalisés (Brault et al. 2024) associée à une efficacité du traitement estimée entre 76% et 81% pour les nourrissons admis en service de réanimation (Paireau et al. 2024).

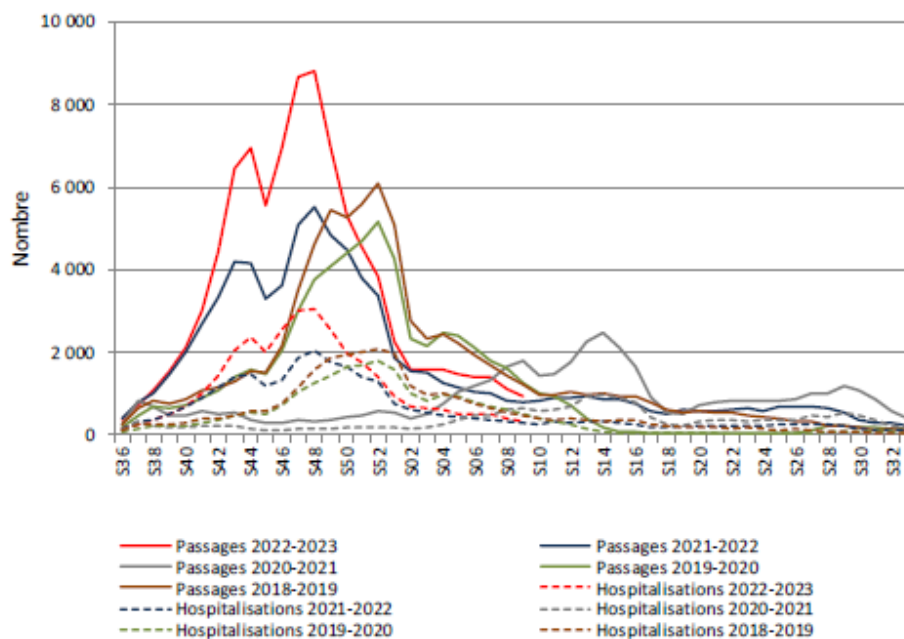
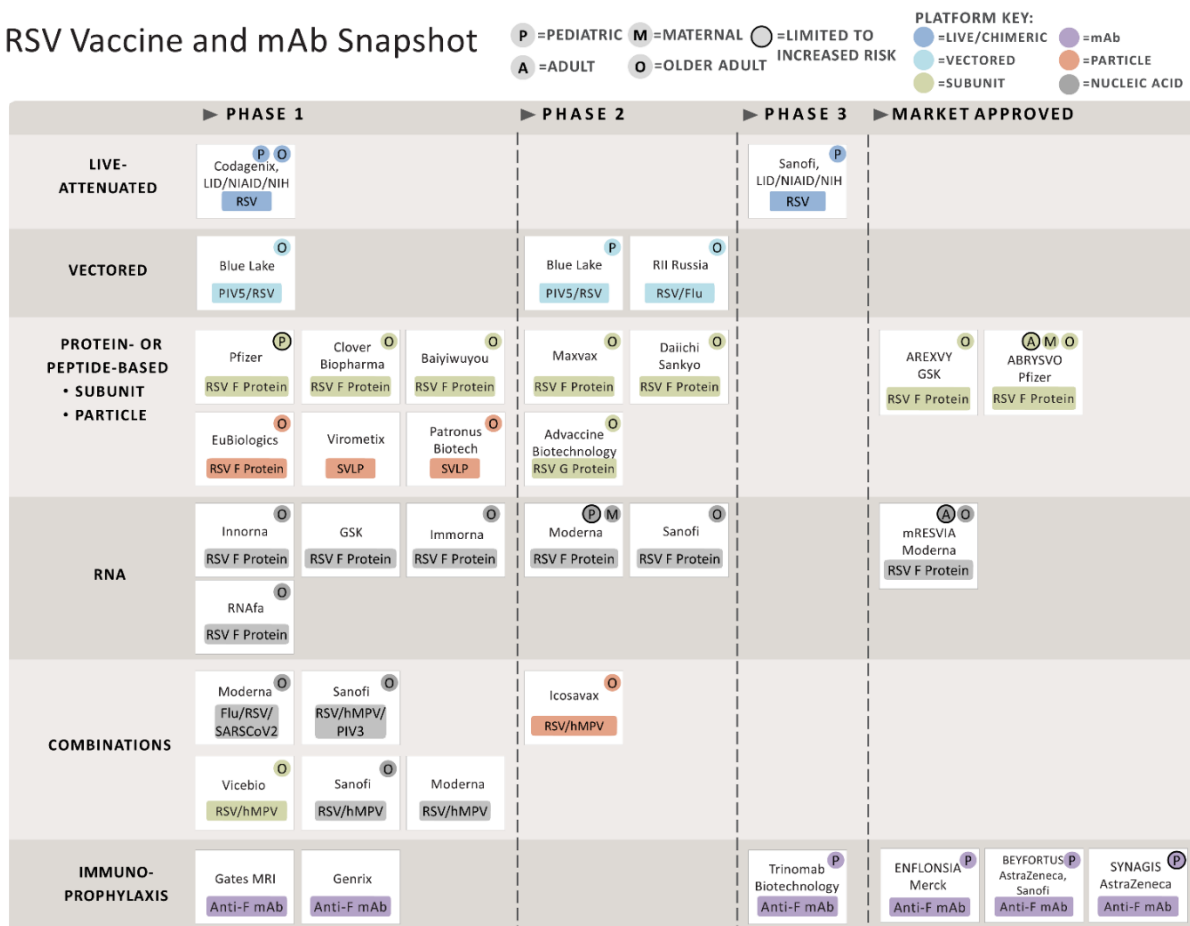


Figure 3 : Représentation graphique du nombre de passages et d'hospitalisations pour bronchiolite en France chez les enfants de moins de deux ans pour les saisons épidémiques entre 2018 et 2023. La saison 2020-2021 (courbe en gris) est caractérisée par une épidémie tardive et de faible intensité, en raison de la perturbation de la circulation du VRS due aux mesures de gestion de la COVID-19 (confinement, gestes barrières, distanciation sociale). À l'inverse, les saisons 2021-2022 (courbe en bleu) et 2022-2023 (courbe en rouge) sont marquées par des épidémies précoces et d'intensité élevée (<https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/bronchiolite/documents/bulletin-national/bulletin-epidemiologique-bronchiolite.-bilan-de-la-surveillance-2022-2023>).

Près de soixante ans après l'échec marquant du premier essai de vaccination contre le VRS, le développement d'un vaccin demeure une priorité de santé publique établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). En 2023, deux vaccins : Arexvy® et Abrysvo® ont reçu l'AMM. L'administration d'Arexvy®, vaccin associant l'antigène RSVPreF3 (protéine F recombinante sous forme préfusion) à l'adjuvant AS01E, qui favorise le recrutement et l'activation des cellules présentatrices d'antigènes, est recommandée chez les personnes âgées de soixante-quinze ans et plus, ainsi que chez celles de soixante-cinq ans et plus atteintes de pathologies respiratoires chroniques ou cardiovasculaires. Le vaccin Abrysvo®, développé par Pfizer, est un vaccin bivalent recombinant, formulé à base d'antigène F sous forme préfusion, ciblant les VRS des sous-groupes A et B. Son autorisation prévoit deux indications : la protection active des personnes âgées de plus de soixante ans et l'immunisation passive des nouveau-nés, par transfert transplacentaire des anticorps maternels après vaccination de la femme enceinte entre trente-deux et trente-six semaines d'aménorrhée, offrant une protection aux nourrissons sur une période de six mois (**Figure 4**). Bien que ces avancées récentes sont encourageantes, le développement d'un vaccin à destination de la population pédiatrique demeure un véritable challenge. En effet, en décembre 2024, la FDA (Food and drug administration) a suspendu tous les essais cliniques de vaccination chez les enfants en raison d'une suspicion de manque de sécurité concernant les vaccins à ARNm développés par Moderna : « mRNA-1345 » et « mRNA-1365 » protégeant respectivement contre le VRS seul et le

VRS associé au métapneumovirus humain (hMPV). Dans son article paru le 13 décembre 2024 dans la revue Science⁹, Jon Cohen rapporte que cette alerte fait suite à l'apparition de symptômes sévères ou très sévères lors de l'infection naturelle par le VRS ou d'autres virus respiratoires post-vaccination. Bien que les chiffres soient faibles (cinq enfants sur quarante ayant reçu mRNA-1345 contre un enfant sur vingt dans le groupe contrôle et trois enfants sur vingt-sept ayant reçu mRNA-1365 contre aucun dans le groupe contrôle), la ressemblance avec l'échec vaccinal survenu dans les années soixante nécessite la plus grande prudence. En effet, cet essai vaccinal avait conduit au développement d'une pathologie sévère chez 80% des enfants vaccinés suite à l'infection naturelle avec le VRS. Ainsi, par mesure de précaution, tous les essais de vaccin protéique F ou à ARNm, parfaitement sûrs chez les adultes, sont interdits chez les enfants. Seuls les essais vaccinaux à base de virus vivants atténués peuvent continuer à être évalués. La maîtrise de la génétique inverse, en délétant des gènes codant pour des protéines essentielles au cycle de réplication viral, a permis de générer plusieurs virus atténués candidats pour les essais vaccinaux contre le hMPV (Buchholz et al. 2006) ou contre le VRS (Cunningham et al. 2022).

RSV Vaccine and mAb Snapshot



*SVLP = Synthetic virus-like particle **UPDATED: June 17, 2025**

<https://www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/>

PATH
10:11:00 #11210

⁹ <https://www.science.org/content/article/safety-signal-moderna-s-rsv-vaccine-studies-halts-trials-other-vaccines-childhood>

Figure 4 : Représentation schématique des différents vaccins et anticorps monoclonaux en développement contre le VRS. Elle met en évidence les stratégies explorées à l'échelle mondiale pour lutter contre les infections avec le VRS¹⁰.

1-5 Modèles expérimentaux pour étudier l'infection par le VRS

Le développement de produits immunoprophylactiques contre le VRS, avec la mise sur le marché en 2023 de deux vaccins à destination des personnes âgées et des femmes enceintes et un effort continu pour le développement de vaccins à destination de la population pédiatrique, s'accompagne d'une augmentation de la demande d'expériences précliniques et une pression accrue sur les modèles animaux. Néanmoins, le domaine de la recherche sur le VRS pâti de l'absence de modèles animaux reproduisant la pathologie sévère lors d'une infection expérimentale et permettant d'évaluer la sûreté des candidats vaccins pour la population pédiatrique. Bien que de nombreux candidats ont montré une efficacité au cours des études précliniques, peu ont progressé jusqu'aux essais cliniques ou n'ont obtenu qu'un succès limité. Cela s'explique, au moins en partie, par l'absence de modèles animaux reproduisant pleinement la pathogenèse de l'infection par le VRS chez l'humain (**Figure 5**). Ce paragraphe s'intéresse à la description des symptômes de la maladie, de la réplication virale et des lésions pathologiques dans différents modèles animaux. Il convient de distinguer les modèles permettant d'étudier le VRS ou des Pneumovirus non humain dans leur hôte naturel, des modèles de petits ou gros animaux permettant l'étude du VRS humain (VRSh) (espèces modèles).

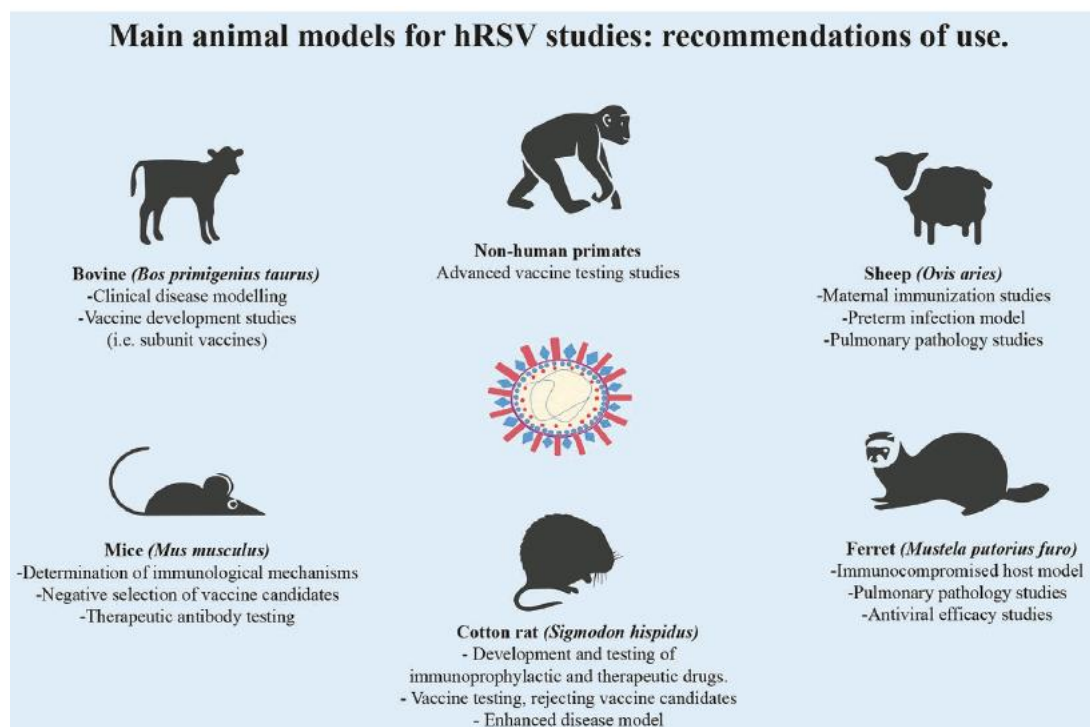


Figure 5 : Principaux modèles animaux d'études précliniques de l'infection par le VRSh et leurs recommandations d'usage. Aucun modèle animal ne permet de reproduire la pathologie humaine ainsi que la réponse aux traitements, le choix du modèle va dépendre de l'hypothèse de recherche ainsi que des avantages et des inconvénients spécifiques à chaque espèce (Altamirano-Lagos et al. 2019).

¹⁰ <https://www.path.org/our-impact/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/>

1-5-1 Modèle d'étude chez l'hôte naturel

Le risque d'infection grave par le VRS chez les adultes en bonne santé est minimal permettant l'utilisation de modèle d'infection contrôlée chez l'Homme, conformément à des normes réglementaires rigoureuses. Ces infections ciblent de jeunes adultes en bonne santé, généralement âgés de dix-huit à quarante-cinq ans, pour élucider la pathogenèse et évaluer les vaccins (Lee et al. 2004; Dayananda et al. 2024). Différents virus d'épreuve sont utilisés : la souche de VRS sauvage Memphis 37 (type VRS-A) est couramment utilisée, notamment pour évaluer l'efficacité du vaccin ABRYSCO de Pfizer (Schmoele-Thoma et al. 2022). Une autre option prometteuse est la souche virale RSV-NICA (Respiratory Syncytial Virus-Nasobronchial Infective Challenge Agent) récemment développé par SGS Belgium NV (Verstraelen et al. 2024).

Les données présentées par Robert Lambkin-Williams *et al.* ont montré que 77 % des adultes en bonne santé inoculés avec $10^{3,0}$ à $10^{5,4}$ unités formant des plages (PFU) de virus présentent une excrétion virale d'une durée moyenne de 7,4 jours ($\pm 2,5$ j), après une période d'incubation moyenne de 3,1 jours ($\pm 1,5$ j) et avec une charge virale nasale maximale moyenne d'environ $10^{4,5}$ PFU/mL (Verstraelen et al. 2024). De plus, une corrélation positive significative a été observée entre les charges virales et les concentrations intranasales de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'interleukine (IL) 6 et l'IL-8 (DeVincenzo et al. 2010). Néanmoins, ces infections expérimentales présentent des limitations : la population étudiée est composée d'adultes en bonne santé et non d'individus à haut risque, les conditions d'infection contrôlée ne reflètent pas les scénarios d'infection naturelle et il est impossible de collecter des échantillons invasifs dans les modèles humains.

En complément des modèles animaux d'infection par le VRSh, les études sur les Pneumovirus non humains dans leur hôte naturel ont offert une perspective plus large : le virus respiratoire syncytial bovin (VRSb) et le virus de la pneumonie murine (PVM) étant couramment étudiés. Les veaux sont naturellement sensibles au VRSb, et les symptômes ainsi que les manifestations pathologiques qui suivent l'infection ressemblent étroitement à ceux observés chez les humains infectés par le VRSh (West, Petrie, Konoby, et al. 1999). Notamment, la vaccination avec un VRSb inactivé peut entraîner une maladie exacerbée par le vaccin, similaire à celle observée avec le VRSh (West, Petrie, Haines, et al. 1999; Antonis et al. 2003). En effet, l'étude d'Antonis *et al.* montre que l'infection naturelle avec le VRS bovin suite à la vaccination avec une souche de VRSb inactivée au formol entraîne une réponse immunitaire inflammatoire de type 2, caractérisée par une infiltration cellulaire pulmonaire composée de PNE, associée à des titres sériques élevés d'Immoglobuline (Ig) E. Cette réponse immunopathologique étant comparable aux complications engendrées par l'infection naturelle par le VRS après la vaccination chez l'enfant. En raison de la forte similarité génétique et antigénique entre le VRSb et le VRSh, le modèle de veaux infectés par le VRSb peut être utilisé pour l'évaluation préclinique des candidats vaccins contre le VRSh.

De même, les souris Balb/c sont naturellement sensibles au PVM, un pathogène courant chez les souris de laboratoire. L'infection par le PVM chez ces souris entraîne des modifications pathologiques telles que l'alvéolite et la nécrose de l'épithélium bronchique. En outre, la vaccination avec du PVM inactivé au formol aggrave la maladie, provoquant une réponse immunitaire biaisée vers un profil Th2 et une augmentation des PNE dans les poumons. (Percopo et al. 2009).

1-5-2 Modèle d'étude chez les gros animaux

Principalement dans le but de tester l'efficacité et la sécurité des vaccins, plusieurs espèces de primates non humains (PNH) ont été utilisées comme modèles animaux pour l'infection par le VRSh, notamment les chimpanzés (Simoes et al. 1999), les singes verts d'Afrique, les macaques (Simoes et al. 1999; De Swart et al. 2002; Patton et al. 2015) et les singes nocturnes (Prince et al. 1979). Ces espèces partagent plusieurs similitudes anatomiques et physiologiques avec les humains mais seuls les chimpanzés sont entièrement permissifs à l'infection par le VRSh (Belshe et al. 1977; Crowe et al. 1993; Teng et al. 2000) qui est caractérisée par le développement de symptômes limités aux voies respiratoires supérieures. L'utilisation des PNH comme modèles animaux d'infection reste difficile en raison de contraintes économiques, techniques et éthiques. Ainsi, le recours aux ovins, et plus particulièrement aux agneaux a permis d'approfondir l'étude de l'infection par le VRSh.

Les agneaux nouveau-nés peuvent être infectés par de fortes doses de diverses souches de VRSh, notamment les souches Long, A2 et M37, les ovins étant plus sensibles à la souche M37 (Olivier et al. 2009; Derscheid et al. 2013). La dose infectieuse utilisée dans les études sur le VRSh chez les moutons dépasse généralement 10^7 PFU, provoquant des symptômes tels que fièvre, réduction de l'activité, toux, sifflements respiratoires et effort respiratoire accru dans les deux à six jours suivant l'infection (Larios Mora et al. 2015). Les observations pathologiques chez les agneaux infectés par le VRSh incluent une bronchite, une bronchiolite, des lésions des cellules épithéliales des bronchioles, la formation de cellules syncytiales, ainsi que l'accumulation de débris cellulaires, de mucine, de PNN et de macrophages dans les voies respiratoires (Larios Mora et al. 2015; Lehmkuhl et Cutlip 1979; Derscheid et al. 2013 ; 2014).

1-5-3 Modèle d'étude chez les petits animaux

Parmi les petits animaux, le modèle murin est le plus couramment utilisé pour les études portant sur les mécanismes immunitaires de l'infection, en raison de leur similarité immunologique avec les humains. De plus, la disponibilité en réactifs, en lignées génétiquement modifiées, ainsi que des coûts réduits pour l'élevage et l'hébergement des animaux expliquent l'usage prédominant de ce modèle.

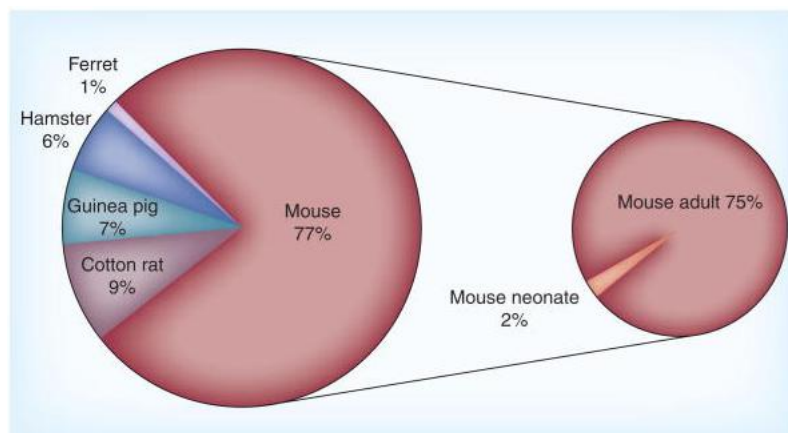


Figure 6 : Représentation schématique de l'utilisation prédominante du modèle murin parmi les modèles d'étude d'infection par le VRS chez les petits animaux. Au sein du modèle murin, le modèle néonatal est très peu représenté, la majorité des animaux utilisés étant des adultes (Cormier et al. 2010).

Il est important de noter que la majorité des études ont été réalisées sur des modèles murins adultes (**Figure 6**), à l'origine de divergences entre les données humaines et celles du modèle animal. L'utilisation d'un modèle murin néonatal apparaît plus pertinent pour se rapprocher des caractéristiques de l'infection chez le nourrisson humain. En effet, lors de l'infection avec le VRSh chez la souris adulte, la charge virale atteint son pic au quatrième jour, puis diminue progressivement jusqu'au huitième jour. Une inflammation péribronchovasculaire est détectée dès le troisième jour post-infection (jpi) et atteint son maximum au sixième jour, avec une implication marquée de l'espace alvéolaire (Graham et al. 1988). Les infiltrats inflammatoires sont principalement composés de lymphocytes (Lc) et de monocytes/macrophages (Graham et al. 1988). Les Lc Natural-Killer (NK) sont la première sous-population de lymphocytes à pénétrer dans les poumons lors d'une infection avec le VRS et sont responsables des niveaux élevés d'IFN- γ observés précocement dans l'infection. Par la suite, les Lc T CD4⁺ et CD8⁺ sont recrutés, accompagnés par la libération de cytokines de type 1 (IL-12 et IFN- γ) et de faibles niveaux de cytokines de type 2 (IL-4, -5 et -13). Les Lc T CD8⁺, associés à l'IFN- γ (Openshaw 2001) sont les principaux effecteurs responsables de l'élimination du virus, mais provoquent également des dommages aux tissus de l'hôte et sont responsables de la pathologie associée. En comparaison, l'infection chez le souriceau (avant sept jours de vie) permet de reproduire les caractéristiques immunologiques de l'infection chez les enfants, telles qu'un faible recrutement en cellules dendritiques CD) (Remot et al. 2016; Ruckwardt et al. 2014), un défaut de production d'IFN-I et d'activation des gènes stimulés par les IFN (ou ISG) (Drajac et al. 2021). Ces données concordent avec les taux faibles d'IFN-I mesurés dans des prélèvements d'aspirations nasales issus d'enfants infectés par le VRS (Hall et al. 1978). Bien que de nombreuses réponses immunologiques sont comparables entre le modèle murin et l'Homme, certaines différences imputables au modèle doivent être prises en compte, comme par exemple le lieu de réplication du VRS, l'histopathologie pulmonaire et la symptomatologie. En effet, chez la souris le VRSh se réplique peu et infecte les pneumocytes alvéolaires. De plus, peu de PNN sont recrutés et les animaux infectés ne présentent pas de signes cliniques respiratoires. Le **Tableau 2** ci-dessous synthétise les principales caractéristiques immunologiques suite à l'infection par le VRSh dans le modèle murin adulte et néonatal comparé à l'infection chez l'enfant.

Tableau 2 : Caractéristiques selon l'âge de la réponse immunitaire au VRS. (Cormier et al. 2010)

Immune responses	Adult mice	Neonatal mice	Human infants	
<i>Cellular</i>				
B cells/antibodies	IgG2a>IgG2b>IgG1> IgE [74]	IgG2a>IgG1>IgGA> IgE [50]	+/- IgA>IgG>IgM [75]; B-cell receptor lacks somatic mutation [76]	
CD4 ⁺ T cells	++: Th1>Th2 [77]	+: Th2>Th1 [50]	++: Th2>Th1 [78,79]	
CD8 ⁺ T cells	+++ [80]	+: less IFN- γ producing [80]	+++ [81,82]	
Dendritic cells	Both subsets increase after infection [83]	mDCs stay the same; pDCs decrease after infection [Cormier SA, Unpublished Data]	Both increase in nasal wash [84]	
Alveolar macrophages	+++ [49]	+++ [49]	Increase in the lung parenchyma and alveolar spaces [15]	
Neutrophils	+ [49]	+ [49]	+++ [85]	
Eosinophils	+/- [49]	+ [49]	+/- [85]	
Natural killer cells	+++ [86]	?	+/- [78]	
<i>Cytokines</i>				
Proinflammatory cytokines	IL-1 β	++ [87]	?	++ [88]
	IL-6	+ [15,87,89]	++ [Cormier SA, Unpublished Data]	++ [87,90,91]
	TNF- α	+ [15,89]	+ [Cormier SA, Unpublished Data]	++ [90,91]
Immunoregulatory cytokines	IFN- γ	+++ [49]	+/- [49]	- [92]
	IFN- α/β	+++ [93]	IFN- α ; +/- IFN- β [Cormier SA, Unpublished Data]	
	IL-9	++ [80]	+++ [80]	+ [90]
	IL-4	+ [80]	+ [50]	+ [94]
	IL-12 (p40)	++ [87]	+++ [50]	
	IL-12 (p70)	+ [87]	+	
	IL-13	+ [49]	++ [49]	+/- [94]
	IL-17	++ [87]	+	+ [94] Undetectable in nasopharyngeal secretions [20]
<i>Chemokines</i>				
CCL5	+++ [80]	+ [80]	+++ [90]	

--: Not detected; +/-: Very little; +: Low; ++: Medium; +++: High; ?: Unknown.

CCL: C-C motif chemokine ligand; DC: Dendritic cell; mDC: Myeloid dendritic cell; pDC: Plasmacytoid dendritic cell.

2- Les déterminants de la sensibilité de la muqueuse pulmonaire néonatale

2-1 Le compartiment tissulaire et sa composante épithéliale en période néonatale

Le poumon représente la partie terminale de l'appareil respiratoire et permet les échanges gazeux entre l'air et le sang. Ces échanges permettent d'une part d'éliminer le dioxyde de carbone produit par le métabolisme cellulaire et d'autre part d'absorber l'oxygène de l'air ambiant, nécessaire pour les réactions d'oxydation. Ces réactions produisent l'énergie permettant le fonctionnement de l'organisme. Ces échanges gazeux se produisent au niveau des alvéoles pulmonaires, qui sont les structures terminales de l'arbre respiratoire. L'air ambiant va ainsi être acheminé, depuis l'extérieur, par un réseau de canaux conducteurs, jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Les voies aériennes comprennent une partie supérieure et inférieure selon leur localisation en extra ou intrathoracique.

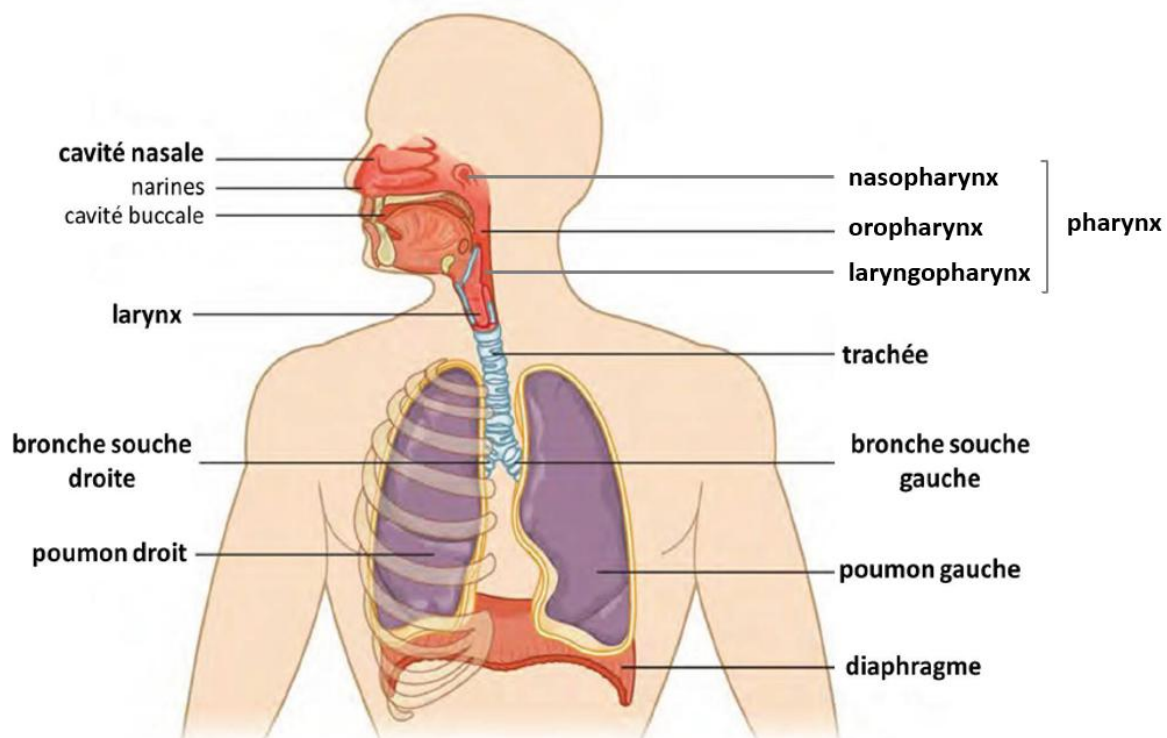


Figure 7 : Organisation anatomique du système respiratoire. Les voies aériennes supérieures comprennent la cavité nasale, le pharynx, le larynx et la partie extrathoracique de la trachée. Les voies aériennes inférieures sont constituées par la partie intrathoracique de la trachée qui se poursuit par l'arbre bronchique. Chaque structure se distingue par des caractéristiques anatomiques et fonctionnelles (figure adaptée de « Anatomy and Physiology College, 2013 »).

2-1-1 Organisation anatomique de l'arbre respiratoire

2-1-1-1 Les voies respiratoires supérieures

Les voies respiratoires supérieures comprennent les cavités nasales, la bouche, le pharynx et le larynx (**Figure 7**). Ces différentes structures vont assurer la filtration, le réchauffement et l'humidification de l'air, qui est ainsi transporté vers les voies respiratoires inférieures.

Les cavités nasales, également appelées fosses nasales, sont des structures internes situées à l'arrière du nez. Leurs parois internes sont recouvertes d'une muqueuse ciliée humide, richement

vascularisée et contenant de nombreuses cellules caliciformes sécrétrices de mucus. Les cavités nasales communiquent vers l'arrière avec le pharynx, assurant la continuité des voies respiratoires.

Le pharynx est considéré comme le carrefour aérodigestif car il relie les fosses nasales, la cavité buccale, l'œsophage et le larynx. Il est constitué de trois portions : le nasopharynx, dans le prolongement des fosses nasales, tapissé de tissus lymphoïdes (amygdales pharyngiennes), l'oropharynx, faisant saillie dans la cavité buccale également entouré de tissus lymphoïdes (amygdales palatines). La dernière portion ou laryngopharynx assure la déglutition et donne naissance, en avant aux voies aériennes (larynx et trachée) et en arrière aux voies digestives (œsophage).

Le larynx, première structure spécialisée dans la fonction de respiration, est un conduit ostéo-cartilagineux assurant le passage de l'air du pharynx à la trachée, la fermeture des voies aériennes lors de la déglutition mais aussi la phonation par vibration des cordes vocales sous l'impulsion de l'air inspiré.

2-1-1-2 Les voies respiratoires inférieures

A l'étage intrathoracique, la trachée et les bronches sont spécialisées dans la conduction de l'air et les poumons dans la réalisation des échanges gazeux (**Figure 8**). Comme pour le larynx, on retrouve la présence d'anneaux cartilagineux incomplets sous forme de fer à cheval, empilés et unis entre eux par du tissu conjonctif fibro-élastique. Dans sa partie postérieure, un muscle lisse ou muscle trachéal relie les extrémités postérieures des anneaux cartilagineux. Ce muscle permet de faire varier le diamètre de la lumière trachéale.

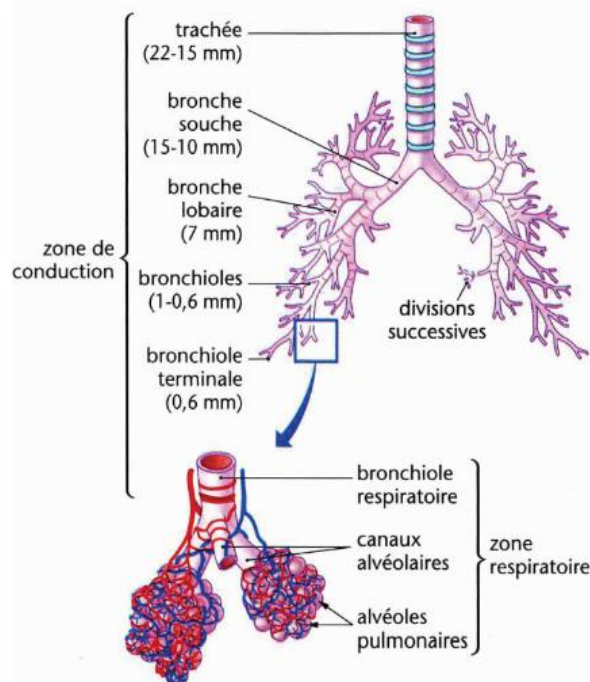


Figure 8 : Organisation anatomique de l'arbre trachéo-bronchique. L'arbre trachéo-bronchique comprend l'ensemble des structures assurant le transport de l'air inspiré entre le larynx et les alvéoles pulmonaires. Il est constitué de conduits ou bronche, se divisant successivement : une bronche mère donne naissance à deux bronches filles dont une est orientée dans le prolongement de la bronche mère, l'autre étant orientée dans une direction orthogonale. La distinction entre bronches et bronchioles repose sur la présence de cartilage, présent depuis la trachée jusqu'aux bronches alors que les bronchioles en sont dépourvues (Extrait de « Biologie et physiopathologie humaine, Nathan Technique, 2008 »).

L'organisation de l'arbre trachéo-bronchique repose sur la division dichotomique des conduits, ainsi la trachée donne naissance à deux bronches principales (1^{ère} génération de division) destinées aux poumons droit et gauche, puis chaque bronche primaire va se diviser au sein de chaque poumon. Au fur et à mesure des générations de divisions, les diamètres des conduits vont diminuer mais la somme des sections de deux bronches filles est supérieure à la section de la bronche mère, augmentant ainsi la surface de conduction. L'arbre bronchique humain totalise vingt-trois générations de divisions dont la dernière est constituée par les alvéoles pulmonaires. Le poumon humain compte cent millions d'alvéoles à la naissance et environ trois cent millions à l'âge de trois à quatre ans. Passé cet âge, le nombre d'alvéoles est stable, c'est leur surface qui augmente de taille pour aboutir à une surface d'échange de 90 m². Les poumons vont inhaler en moyenne trois cent millions de litres d'air au cours d'une vie, ce qui en fait un lieu de contact majeur avec le milieu extérieur.

2-1-2 Développement du tissu

Cette organisation complexe va nécessiter différentes phases de développement, débutant au cours de la vie intra-utérine et se poursuivant plusieurs années après la naissance. Ces différentes phases sont identifiées en fonction de critères morphologiques et reposent sur deux mécanismes différents : la ramification et la septation, qui vont se répéter successivement au cours du développement pour aboutir à un organe fonctionnel. On distingue cinq stades, communs à l'Homme et à la souris, lors du développement de l'arbre respiratoire qui sont identifiés histologiquement (**Figure 9**) :

Stade embryonnaire : formation des bronches souches à partir d'une invagination de la partie antérieure de l'intestin primitif, entre la 4^{ème} et 7^{ème} semaine post-conception (spc) chez l'Homme ;

Stade pseudoglandulaire : formation de la totalité des voies aériennes de conduction jusqu'aux bronchioles terminales (5^{ème} à 17^{ème} spc) ;

Stade canaliculaire : observation possible au microscope des futures régions d'échanges gazeux avec apparition des zones possédant une barrière air-sang (ou alvéolo-capillaire) (17^{ème} à 27^{ème} spc) ;

Stade sacculaire : trois nouvelles générations de subdivisions vont donner naissance dans chaque acinus aux canaux et sacs alvéolaires (27^{ème} à 36^{ème} spc) ;

Stade alvéolaire : cette phase de développement a lieu essentiellement après la naissance et va se poursuivre pendant plusieurs années. Elle est caractérisée par la formation de septa, permettant d'augmenter progressivement le nombre d'alvéoles, augmentant ainsi la surface d'échanges (36^{ème} spc à deux ans et jusqu'à dix-huit à vingt-deux-22 ans).

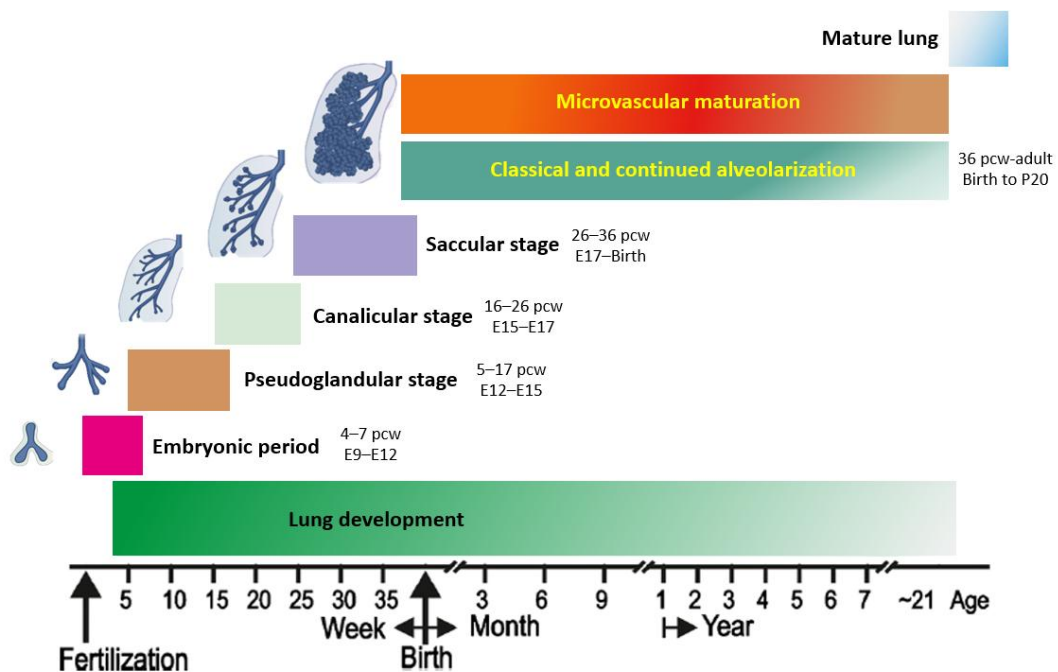


Figure 9 : Chronologie du développement du poumon chez l'Homme et la souris. Les différentes étapes du développement du poumon se chevauchent dans le temps car la plupart des processus débute de façon centrale et progressent vers la périphérie. Le démarrage et la fin de l'étape de microvascularisation sont incertains ainsi que la fin de la phase d'alvéolarisation. pcw : post conception week in Human, E : embryonic day in mice (figure adaptée à partir de (Schittny 2017)).

2-1-3 Epithélium respiratoire

L'arbre trachéo-bronchique est recouvert d'une muqueuse au contact de la lumière, dont la composition histologique va évoluer avec la diminution du diamètre du conduit. Cette muqueuse repose sur un chorion très vascularisé où l'on retrouve des glandes mixtes (séro-muqueuses), des infiltrats lymphoïdes variables, le réseau lymphatique et les éléments d'innervation. Au niveau de la trachée et des bronches principales, l'épithélium est prismatique, pseudostratifié, cilié (**Figure 10B**) et riche en cellules caliciformes sécrétrices de mucus. A ce niveau, le système muco-ciliaire permet de piéger et d'évacuer les particules de l'air (**Figure 10A**).

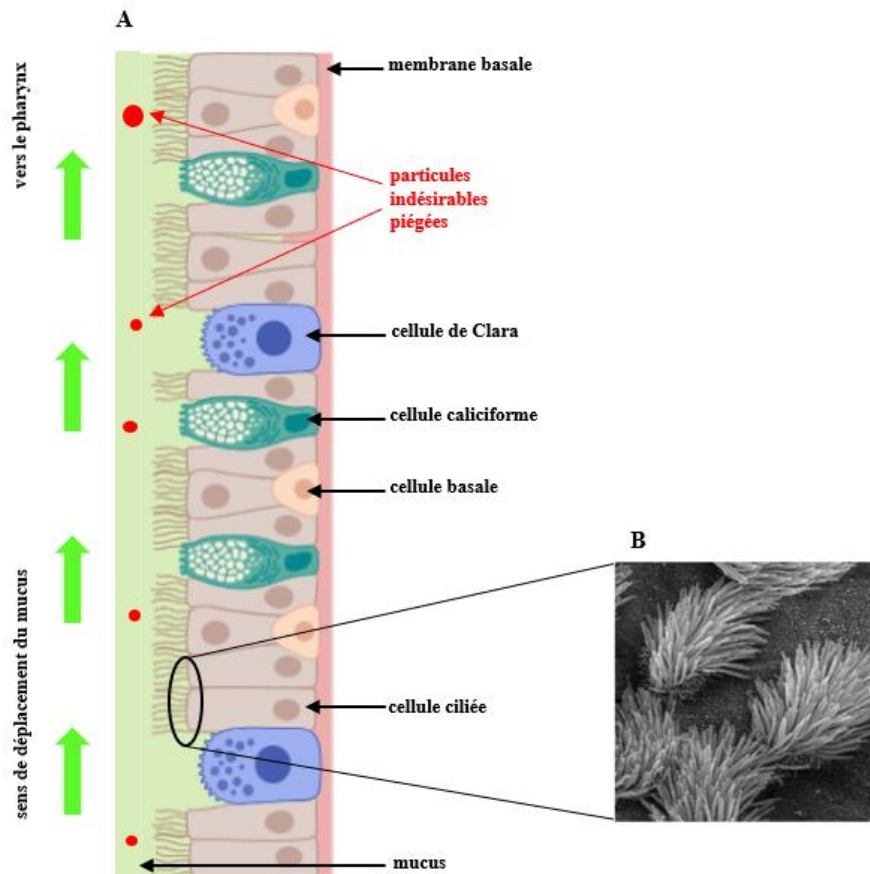


Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation générale de la muqueuse respiratoire et du système muco-ciliaire. (A) La muqueuse respiratoire est constituée d'un épithélium polarisé pseudostratifié qui repose sur une membrane basale. Sa composition va évoluer le long de l'arbre trachéo-bronchique. Il est principalement constitué de cellules caliciformes, sécrétrices de mucus et de cellules ciliées **(B)**, assurant l'élimination vers le pharynx des particules piégées dans le mucus. Les cellules basales assurent le renouvellement de l'épithélium et les cellules Club, de formes cuboïdes avec un dôme apical contenant de nombreuses granulation hétérogènes produisent une grande variété de protéines (A : créé avec Biorender, B : Louisa Howard, domaine public).

Au niveau du réseau bronchique, l'épithélium respiratoire va se modifier avec la diminution de diamètre des conduits, les cellules caliciformes seront moins nombreuses et les ilots lymphoïdes disparaissent. Au niveau du chorion on note une diminution du nombre de glandes séro-muqueuses. A l'étage bronchiolaire, on observe une transition progressive des structures histologiques. L'épithélium respiratoire s'amincit de prismatique pseudostratifié à prismatique bistratifié puis prismatique simple et enfin cubique simple. On ne trouve plus de cellules caliciformes ou de cellules ciliées qui sont remplacées par les cellules club ou cellules en dôme (anciennement appelées cellules de Clara). Ces cellules à pôle apical bombé assurent la production et l'élimination du surfactant pulmonaire. Le dernier niveau correspond aux alvéoles pulmonaires, constituées d'un épithélium pavimenteux simple au contact direct des capillaires.

L'épithélium alvéolaire se compose de deux types cellulaires : les pneumocytes de type I, cellules plates très étendues recouvrant 95% de la surface des sacs alvéolaires et les pneumocytes de type II, regroupés par deux ou trois aux angles de raccordement de plusieurs alvéoles **(Figure 11)**. Ces derniers ont une fonction sécrétrice (surfactant pulmonaire) et présentent un pôle apical recouvert de microvillosités.

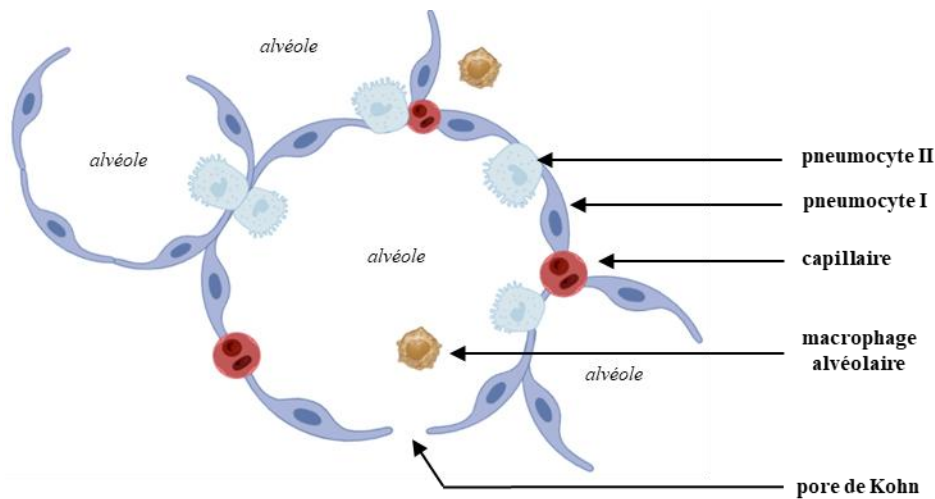


Figure 11 : Représentation schématique des alvéoles pulmonaires. La paroi alvéolaire est constituée d'un épithélium pavimenteux simple composé de deux types de pneumocytes : soit des cellules plates très étendue (type I), soit des cellules globuleuses avec un pôle apical présentant des microvillosités (type II) à l'origine de la secretion du surfactant. Les macrophages alvéolaires, assurant un rôle de défense, patrouillent d'une alvéole à l'autre grâce aux pores de Kohn. Le contact direct entre l'épithélium alvéolaire et les capillaires sanguins permet les échanges gazeux avec le sang (figure créée avec Biorender).

Conclusion

A la naissance le poumon contient toutes les structures anatomiques et cellulaires pour assurer l'hémostase, il est donc physiologiquement fonctionnel. Cependant il existe des différences avec le poumon adulte pouvant expliquer la plus grande fragilité du poumon néonatal. Le développement des alvéoles étant incomplet, la surface disponible pour les échanges gazeux est inférieure à celle du poumon adulte. Afin de compenser ce phénomène, la fréquence respiratoire est augmentée afin de permettre une oxygénation suffisante. Ainsi, chez les enfants âgés de moins d'un an, trente à quarante cycles de respiration par minute sont nécessaires contre douze à vingt pour les enfants de plus de douze ans (Biarent D. Bingham R., Réanimation Avancée Néonatale et Pédiatrique. ERC. 2009). En conséquence, le poumon du nouveau-né va être deux fois plus exposé à l'environnement extérieur, par une inhalation plus importante de microorganismes et de particules, comparé aux individus adultes. Ceci se traduit par une plus forte incidence des infections respiratoires hautes et basses : deux cent quarante pour mille chez les enfants de moins de un an contre trente-quatre pour mille chez les individus de plus de quinze ans (Brouard et al. 2020).

Si l'âge apparaît comme un facteur important dans la survenue d'une infection respiratoire, d'autres mécanismes physiologiques, comme le système immunitaire sont à prendre en considération. Face à une agression pathogène, la finalité du système immunitaire est d'éliminer l'agent infectieux tout en limitant les dommages collatéraux pour l'hôte. Le système immunitaire de l'adulte, mieux caractérisé et plus efficace, mobilise rapidement des réponses pro-inflammatoires qui permettent le contrôle de la majorité des infections. En revanche, celui du nouveau-né a évolué pour relever les défis spécifiques liés à la transition entre un environnement stérile *in utero* et un monde extérieur riche en micro-organismes. Cette adaptation conditionne ses réponses immunitaires précoces et contribue à sa vulnérabilité accrue face aux infections respiratoires.

2-2 Le compartiment respiratoire et sa composante immunologique en période néonatale

In utero, le fœtus se développe dans un environnement stérile et protégé des agents pathogènes grâce à l'immunité maternelle. Des mécanismes de tolérance, maternelle et fœtale, empêchent le rejet du fœtus semi-allogénique par les cellules immunitaires maternelles (pour revue Warning, McCracken, et Morris 2011). Après la naissance, le nouveau-né est progressivement colonisé par des microorganismes, ce qui expose son système immunitaire aux agents pathogènes potentiels tout en favorisant le développement du système immunitaire des muqueuses (pour revue Renz, Brandtzaeg, et Hornef 2011). Ainsi, cette phase de transition est à l'origine de l'orientation spontanée des réponses immunitaires pulmonaires vers des réponses anti-inflammatoires de type Th2. Cette orientation va contribuer à la réduction du risque de réponses inflammatoires délétères contre les nombreux micro-organismes commensaux rencontrés après la naissance (Forsthuber et al. 1996; Adkins et Du 1998). Toutefois, cette prédominance des réponses de type Th2 peut entraîner un retard dans la réponse à certains véritables agents pathogènes, ce qui a conduit à considérer le système immunitaire néonatal comme étant moins efficace par rapport à celui de l'adulte. Les paragraphes ci-dessous s'intéressent aux particularités de la composition en cellules immunitaires de la muqueuse pulmonaire néonatale à l'état basal, conduisant à l'orientation Th2 de la réponse immunitaire.

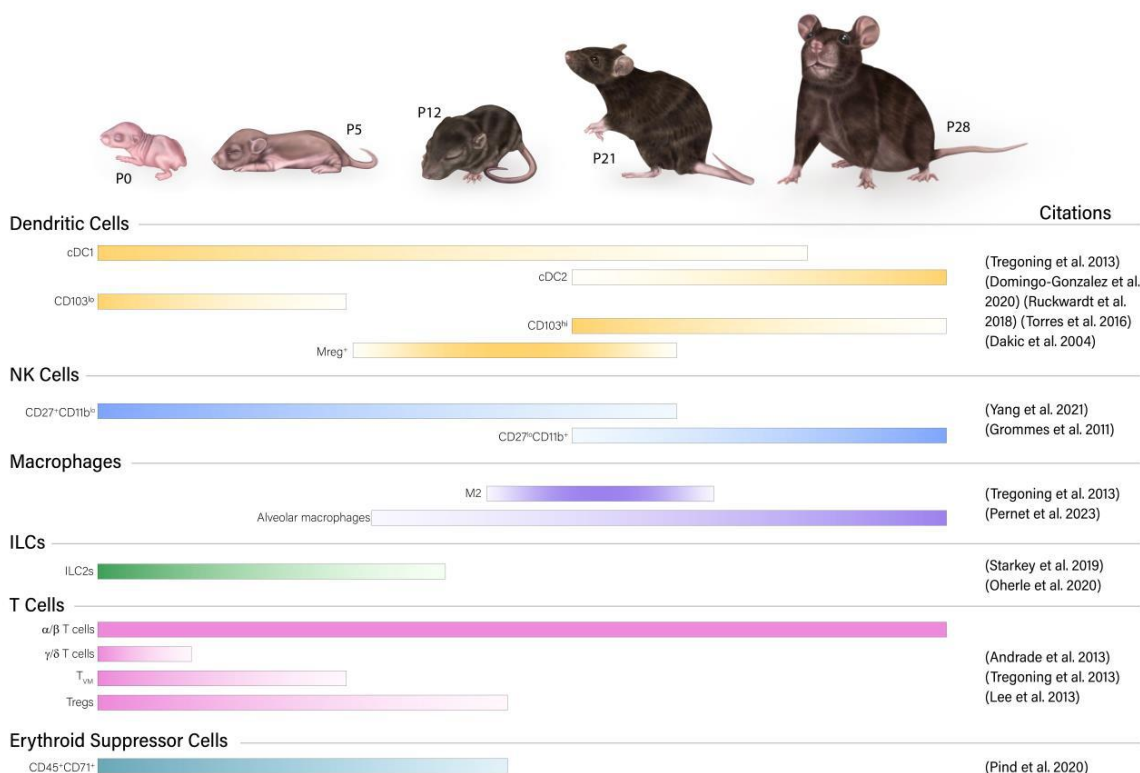


Figure 12 : Représentation schématique de la fréquence relative des principales cellules immunitaires et leurs sous-types dans la muqueuse pulmonaire néonatale murine à l'homéostasie. Les macrophages constituent la population myéloïde dominante, comprenant les MA localisés dans la lumière des alvéoles pulmonaires et les macrophages interstitiels (MI) situés dans le parenchyme. Les CD et les monocytes, bien que moins abondants, jouent un rôle essentiel dans la présentation antigénique et l'initiation des réponses adaptatives. Parmi les granulocytes, les PNN sont rares en l'absence d'inflammation, tandis que les PNE et basophiles (PNB) sont présents à de faibles fréquences.

Les cellules lymphoïdes sont majoritairement représentées par les cellules lymphoïdes innées (ILC), incluant les sous-populations de Lc NK et d'ILC2, ainsi que par les Lc T, et dans une moindre mesure, les Lc B. Cette composition globale reflète la prédominance des effecteurs de l'immunité innée et la faible proportion de lymphocytes adaptatifs matures dans le poumon néonatal, en contraste avec le poumon adulte (Sedney et Harvill 2023).

La compréhension limitée du système immunitaire du nouveau-né s'explique en grande partie par l'absence de modèles animaux appropriés pour étudier la réponse néonatale à l'infection. L'immunologie s'est largement appuyée sur le modèle murin, en raison de son faible coût, de sa reproductibilité et de la vaste gamme d'outils immunologiques disponibles. Ainsi, les données obtenues dans le modèle murin montrent que la muqueuse pulmonaire néonatale contient peu de cellules effectrices appartenant au système immunitaire adaptatif et une majorité de cellules de l'immunité innée (**Figure 12**). De plus, des cellules à l'interface entre immunité innée et adaptative sont également présentes, telles que les cellules dendritiques et les lymphocytes innés.

2-2-1 Immunité innée pulmonaire : première ligne de défense à la naissance

2-2-1-1 Macrophage alvéolaire : régulateur immunitaire clé de l'homéostasie pulmonaire

Dans le poumon, la défense immunitaire mucosale repose principalement sur des cellules appartenant au système immunitaire inné et plus particulièrement sur les macrophages. Deux types de macrophages sont présents : les macrophages interstitiels (MI) et les macrophages alvéolaires (MA) (Evren et al., 2020 ; Kopf et al., 2015). Ces cellules apparaissent à différents stades du développement embryonnaire et fœtal (**Figure 13**) :

- Macrophages issus du sac vitellin (dès le jour embryonnaire dix - E10), qui restent dans l'interstitium et ne prolifèrent que peu. Après la naissance, ces cellules sont continuellement renouvelées par des monocytes circulants dérivés de la moelle osseuse.
- Monocytes dérivés du foie fœtal (dès E12), qui prolifèrent activement pour devenir les MA à la naissance.
- Monocytes dérivés de la moelle osseuse, recrutés après la naissance pour maintenir les populations de MI tout au long de la vie.

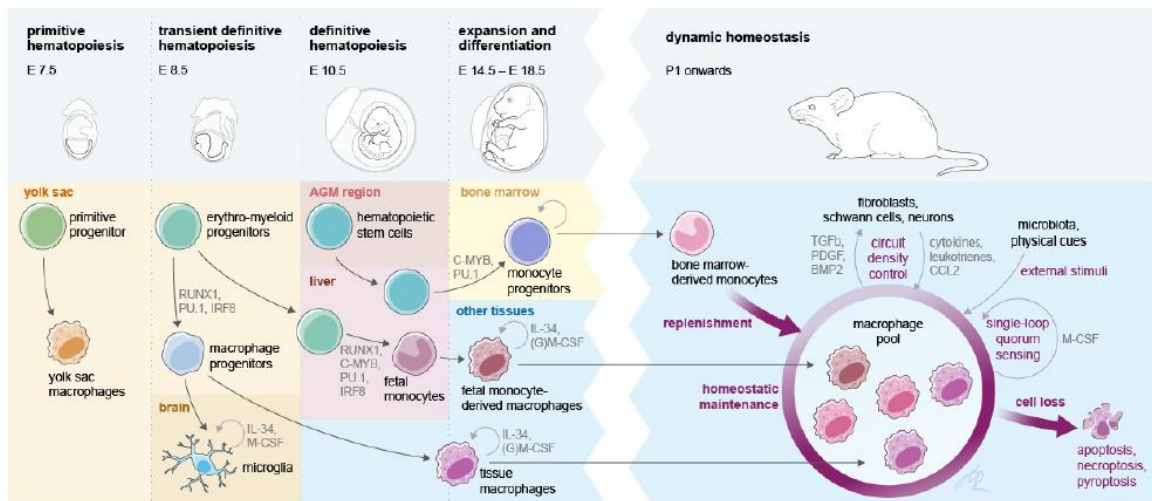


Figure 13 : Localisation de l'hématopoïèse pendant le développement embryonnaire. À la naissance, les macrophages tissulaires proviennent de trois sources distinctes qui colonisent les tissus en développement de manière séquentielle au cours de la période prénatale. Après la naissance, le maintien et le renouvellement des macrophages tissulaires est assuré par des monocytes dérivés de la moelle osseuse (Henneke et al., s. d.).

Les études réalisées dans le modèle murin n'ont pas permis de détecter de MA phénotypiquement matures avant la naissance mais la possibilité d'observer des cellules F4/80 high CD11b low (macrophages primitifs) au jour embryonnaire 12.5 (E12.5), puis des cellules Ly6C high CD11b high (monocytes primitifs) au jour E16.5. Les premiers signes de différenciation de ces cellules primitives en macrophages alvéolaires apparaissent au jour E18.5, correspondant au stade sacculaire et sont liés à la présence de GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Chez la souris adulte, il a été montré que les monocytes circulants contribuent peu au pool de MA (Guilliams et al. 2013).

Les MA jouent un rôle central dans la protection immédiate du poumon néonatal contre les infections et présentent un comportement territorial unique : chaque MA surveillant en moyenne trois alvéoles (Neupane et al., 2020). Les signaux guidant la fonction et la distribution des MA dans un organe qui quadruple de volume au cours des trois premières semaines de vie (chez la souris) restent en grande partie mal compris. Cependant, le positionnement des pré-MA dans les alvéoles et leur différenciation en MA dépend du GM-CSF produit par les cellules épithéliales alvéolaires (Kopf et al., 2015). Le GM-CSF, *via* sa liaison à son récepteur, active le facteur de transcription PPAR- γ , qui contrôle le programme de maturation et de maintien des MA (Schneider et al., 2014). Les MA conservent leur capacité d'auto-renouvellement tout au long de la vie postnatale (Epelman et al., 2014). Toutefois, ils peuvent être remplacés par des monocytes circulants en cas de destruction massive de la population de MA, par exemple à la suite d'une infection ou d'une irradiation pulmonaire (Machiels et al., 2017).

La capacité du micro-environnement pulmonaire à orienter la différenciation des macrophages est mise en évidence par la capacité de macrophages ectopiques transférés par voie intratrachéale à adopter un phénotype de MA (Lavin et al., 2014 ; van de Laar et al., 2016). Cette observation reflète la grande plasticité des MA leur conférant la capacité de s'adapter et de répondre en fonction des modifications de leur environnement. Deux phénotypes sont classiquement décrits en fonction de l'environnement cytokinique déclenchant leur activation : M1 et M2 correspondant respectivement à un phénotype inflammatoire et à un phénotype de réparation tissulaire.

A l'homéostasie, les MA éliminent les débris et maintiennent un environnement tolérant. Lors d'une infection, ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF α , l'IL-1 β ou l'IL-6 et contribuent à l'élimination des pathogènes ; après l'infection, ils participent à la résolution de l'inflammation (Hussell et Bell 2014). Les cellules en culture ont été utilisées pour comparer les fonctions antimicrobiennes des MA néonataux et adultes. La stimulation des MA de rongeurs ou d'ovins par du lipopolysaccharide (LPS) entraîne une augmentation similaire, voire supérieure, de la production de TNF α et des chimiokines CXC par les cellules néonatales par rapport aux cellules adultes (P. T. Lee, Holt, et McWilliam 2000; Empey, Hollifield, et Garvy 2007; Fach et al. 2010). Cependant dans un modèle murin d'infection *in vivo* par *pneumocystis* les MA néonataux ont montré un retard dans l'expression des marqueurs d'activation par rapport aux cellules adultes (Empey et al. 2004). De même, lors d'une infection néonatale par le VRS chez la souris, l'activation des MA est réduite et retardée par rapport à une infection adulte (Empey et al. 2012), mais l'administration intranasale d'IFN γ permet de promouvoir la maturation des MA (Empey et al. 2012). Peu d'informations sont disponibles sur les réponses des MA chez les nourrissons humains. Néanmoins, il a été montré que des MA isolés à partir de liquide broncho-alvéolaire (LBA) d'enfants de moins de deux ans produisent moins d'IL-1 et de TNF α , après stimulation par du LPS, que les mêmes cellules isolées chez des enfants âgés de deux à dix-sept ans (Grigg et al. 1999).

Les données relatives aux fonctions des MA en période néonatale montrent des différences avec celles observées chez les MA adultes dont le sens varie entre les études *in vitro* et *in vivo*, suggérant une influence de l'environnement pulmonaire sur les fonctions des MA.

2-2-2 Entre immunité innée et adaptative

2-2-2-1 Les cellules dendritiques

Les CD sont des cellules présentatrices d'antigènes capables d'induire l'activation des Lc T suite à la phagocytose des agents pathogènes. Il existe deux grandes catégories de CD : les plasmacytoïdes (CDp) et les conventionnelles (CDc). Les CDp sont spécialisées dans la sécrétion des IFN-I, tandis que les CDc (subdivisées en groupes 1 et 2) se spécialisent dans la présentation des antigènes pour activer les réponses Th1, Th2 et Th17. Bien que la plupart des CD appartiennent à ces catégories, il existe des sous-types supplémentaires, spécifiques à la période du développement embryonnaire ou chez les nouveau-nés.

Des analyses de séquençage de cellules isolées ont été réalisées chez des souris C57Bl/6 à divers stades de développement : E18,5 pour jour embryonnaire 18,5 et P1, P7 et P21 pour les jours postnataux 1, 7 et 21. Les résultats de cette étude ont révélé que les poumons des souris contiennent des CDc1 et des CDc2, les CDc1 étant le sous type le plus abondant de P1 à P7. Des études précédentes avaient déjà établi que les CDc1 sont le sous-type prédominant en période néonatale et qu'à l'inverse les CDc2 sont présentes en majorité dans les poumons de souris adultes (Ruckwardt et al. 2014; Sun et al. 2003; Dakic et al. 2004) . A partir de P21, les CDc1 et les CDc2 sont présentes en quantité égales. En plus de ces deux sous-types classiquement décrits, un sous-type supplémentaire a été mis en évidence : les mig-DC (pour migratory Dendritic Cells) en lien avec l'expression de CCR7, un récepteur permettant la migration des CD vers les ganglions lymphatiques. Les mig-DC ne sont pas détectées avant la naissance, mais sont présentes en grand nombre à P7

avant de diminuer à P21. Cela suggère l'existence d'un sous-type migratoire unique de CD dans les poumons de souris néonatales (Domingo-Gonzalez et al. 2020).

Les expressions d'Itgae (CDc1) et de Cd209a (CDc2) par les CD néonatales suggère qu'elles peuvent stimuler les Lc T dès la naissance pour générer une réponse immunitaire efficace (Domingo-Gonzalez et al. 2020). Bien que les CD néonatales ont la capacité de présenter les antigènes avec la même efficacité que les CD adultes, les molécules de co-stimulation CD28, CD80 et CD86 sont moins exprimées, ce qui entraîne une incapacité à stimuler la prolifération des Lc T CD8⁺ et une réponse limitée de ces cellules (Ruckwardt et al. 2018; 2014; Torres et al. 2016).

Enfin, la production de cytokine par les CD néonatales est influencée par leur environnement. Ainsi la présence de cellules produisant de l'IL-10 va entraver la capacité des CD à produire de l'IL-12 (**Figure 15**), nécessaire pour la mise en place de la réponse Th1 (Sun et al. 2005). Le changement dans la capacité à produire de l'IL-12 et à générer une réponse Th1 se produit à P6 chez la souris, lorsque les populations de CDs augmentent et que les sous-types s'éloignent du modèle néonatal pour s'approcher de celui des adultes. Cela provoque un changement de la réponse en faveur d'une réponse immunitaire de type Th1 (Lee et al. 2008).

2-2-2-2 Les lymphocytes innés

Les cellules lymphoïdes innées (ILC pour Innate Lymphoid Cells), présentes dans les tissus, sont des Lc effecteurs de la réponse immunitaire innée. Ils jouent un rôle important dans la production rapide de cytokines et se distinguent des Lc T et B par l'absence de récepteurs à l'antigène générés par recombinaison génique (TCR et BCR). Les ILC sont divisées en trois groupes, en fonction des facteurs de transcription exprimés et des cytokines qu'ils produisent (**Figure 14**). Le groupe 1 des ILC (ILC1 et Lc NK) se caractérise principalement par la production d'IFN γ et de TNF α et l'expression du facteur de transcription T-bet, alors que le groupe 2 des ILC (ILC2) se caractérise par la production d'IL-5 et d'IL-13 et l'expression de GATA-3. Enfin le groupe 3 des ILC (ILC3) se caractérise par la production d'IL-22 et d'IL-17A et expriment ROR γ t (pour revue Colonna 2018).

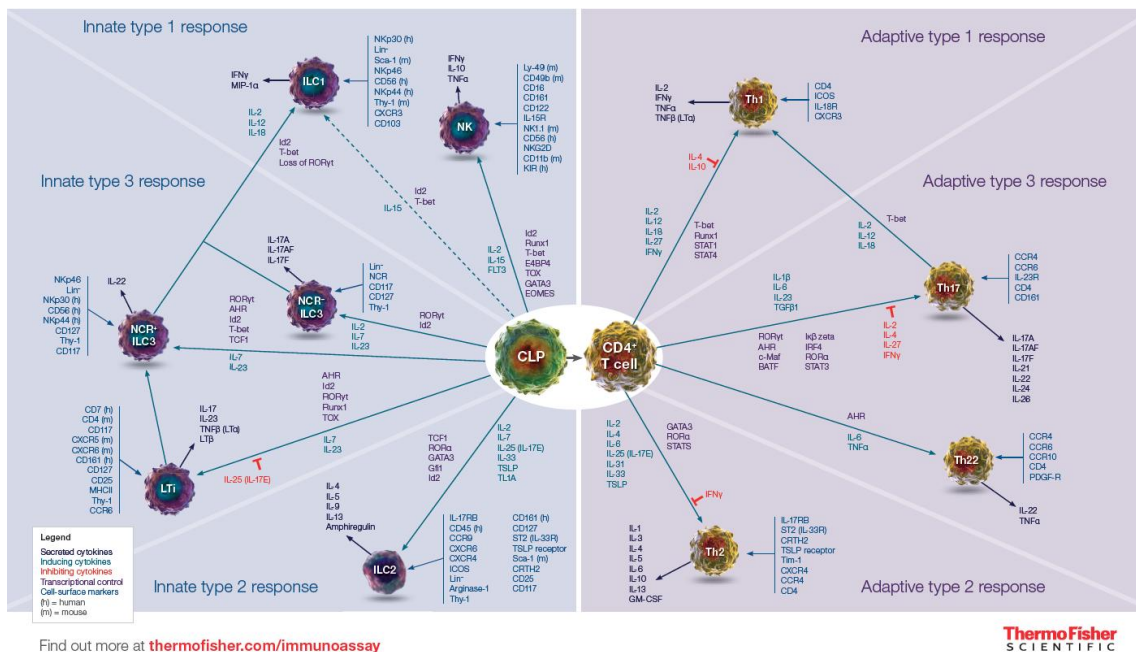


Figure 14 : Homologies fonctionnelles entre les ILC et les sous-types de Lc T Helper. Issus de progéniteurs lymphoïdes communs, les ILC se distinguent des Lc B et T par l'absence de récepteurs spécifiques à l'antigène. Ils comprennent les Lc NK, de nature cytotoxique, ainsi que trois sous-groupes non cytotoxiques, les ILC1, ILC2 et ILC3, définis par leurs cytokines et leurs facteurs de transcription caractéristiques. Situés principalement aux surfaces muqueuses, les ILC assurent une production rapide de cytokines immunorégulatrices et participent ainsi à la première ligne de défense contre les infections. Une fois activés, les lymphocytes T CD4⁺ entrent en prolifération et se différencient en cellules effectrices : les sous-types Th1, Th2, Th17 et Th22 se distinguent en fonction de leur profil de production de cytokines et de leurs fonctions (<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/global/forms/cytokine-network-posters.html>).

Les ILC2 sont le sous-type prédominant dans les poumons, où ils contribuent au maintien de l'homéostasie pulmonaire pendant la période néonatale mais aussi à la pathogenèse des maladies respiratoires comme l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique et lors d'infections virales (Monticelli et al. 2011; Donovan et al. 2019). Il a été démontré récemment que les ILC2 sont présents dans les poumons de souris peu de temps après la naissance et que leur nombre atteint un pic au cours des deux premières semaines de vie puis diminue à l'âge adulte (Domingo-Gonzalez et al. 2020). Deux études (Saluzzo et al. 2017; de Kleer et al. 2016) suggèrent que la première respiration induit la libération spontanée d'IL-33, qui se fixe sur son récepteur ST2 (Monticelli et al. 2011), exprimé sur plusieurs types cellulaires dont les ILC2, entraînant leur activation et prolifération dans la muqueuse pulmonaire du nouveau-né (**Figure 15**). Chez des souris néonatales déficientes en IL-33, les ILC2 sont toujours présentes, mais elles ne sont pas activées (Steer et al. 2020). En effet, une étude (Loering et al. 2021) a montré que les nouveau-nés ont un nombre plus élevé d'ILC résidents dans les poumons comparés aux adultes, avec une expression accrue des marqueurs associés aux ILC2 : ST2, ICOS et CD90.2. Des différences spécifiques au sexe ont également été observées, les femelles ayant plus d'ILC pulmonaires que les mâles, avec une expression plus élevée d'ICOS mais une expression plus faible de KLRG1. Le fond génétique des lignées de souris a également un impact sur le nombre d'ILC pulmonaires, les souris BALB/c ayant plus d'ILC2 que les souris C57BL/6J (Loering et al. 2021). Cette dernière observation est cohérente avec l'orientation privilégiée de la réponse immunitaire de type 2 connue chez les souris BALB/c comparées aux souris C57Bl/6 (Mills et al. 2000).

Plus récemment, des données similaires ont été obtenues chez l'Homme, en analysant les différences de composition cellulaire entre le sang de cordon et le sang d'adultes. Les auteurs ont pu montrer que les ILC étaient plus abondants dans le sang de cordon, alors que d'autres sous-populations telles que les Lc T CD4⁺, les Lc T CD8⁺ et les Lc NKT sont moins abondantes comparées aux données issues de sang d'individus adultes (Swieboda et al. 2024). Ces données suggèrent un rôle des ILC dans les réponses immunitaires en période néonatale.

2-2-3 Immunité adaptative du poumon néonatal : réponse spécialisée et conséquences immunologiques

2-2-3-1 Caractéristiques et dynamique des lymphocytes B pulmonaires chez le nouveau-né

Les Lc B sont des cellules spécialisées dans la production d'anticorps mais peuvent également exercer des fonctions d'initiation de la réponse immunitaire par la présentation antigénique ou des fonctions régulatrices. Produits en continu dans la moelle osseuse, les Lc B émergent sous forme de précurseurs immatures. Tout au long de leur développement, ils acquièrent progressivement des propriétés spécifiques : d'abord la capacité à tolérer les composants du « soi », puis celle de devenir des cellules matures, aptes à produire un anticorps dirigé contre un antigène donné. À l'état naïf, ces lymphocytes co-expriment à leur surface les immunoglobulines IgM et IgD, qui forment leur récepteur à l'antigène (BcR). Ils peuvent ensuite s'engager dans différentes voies de différenciation, aboutissant à la formation de sous-populations spécialisées. L'analyse de l'expression de divers marqueurs de surface permet d'identifier plusieurs sous-populations de Lc B, chacune jouant un rôle spécifique dans la réponse immunitaire.

Les souriceaux présentent un nombre inférieur de Lc B par rapport aux adultes. De plus, la composition des sous-types de Lc B diffère considérablement de celle des adultes avec la présence d'un sous-type particulier chez les souriceaux, les Lc B reg néonataux caractérisés par leur production d'IL-10 (Sun et al. 2005) (**Figure 15**). Ces Lc colonisent les poumons au cours de la première semaine de vie, puis leur proportion décroît pour n'être présents qu'en faible nombre dans les poumons adultes. La production d'IL-10 a de nombreux effets sur le système immunitaire néonatal, notamment une migration désorganisée des PNN, une activation des Lc T, des macrophages et des CD8 vers un profil Th2, ayant pour conséquence de limiter la réponse immunitaire néonatale aux agents pathogènes (Laubretton et al. 2020; Torres et al. 2016; Andrade et al. 2013; Sun et al. 2005). Par exemple, l'étude de Laubretton et al, a mis en évidence que des MA néonataux exposés *in vitro* au VRS sont capables de produire des IFN- γ et que ce processus est inhibé par l'IL-10 produite par les Lc B reg (Laubretton et al. 2020). L'analyse d'échantillons d'aspiration nasopharyngée d'enfants infectés par le VRS met en évidence une corrélation entre la fréquence des Lc B reg infectés et la sévérité de la maladie, suggérant l'implication directe de ces cellules dans l'inhibition de la réponse Th1 et, par conséquent, dans la pathogénicité de l'infection à VRS (Zhivaki et al. 2017). Le rôle de ces cellules régulatrices a été étudié au niveau de la muqueuse intestinale grâce à l'analyse du répertoire exprimé par les Lc B reg intestinaux. En effet, leurs récepteurs montrent une réactivité envers des bactéries appartenant à six phyla différents colonisant les nouveau-nés. Ces observations suggèrent que les Lc B reg participeraient au processus de colonisation précoce au niveau de la muqueuse intestinale (Gu et al. 2024).

2-2-3-2 Les lymphocytes T : adaptation à la muqueuse pulmonaire néonatale

Les Lc T sont des cellules clés du système immunitaire adaptatif, jouant un rôle central dans la reconnaissance et l'élimination des agents pathogènes. Issus de précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, ils migrent vers le thymus, où ils subissent une maturation complexe leur permettant d'acquérir le récepteur de reconnaissance des antigènes (TCR) ainsi que divers marqueurs de surface définissant différentes sous-populations fonctionnelles matures. Selon leur spécialisation, ils peuvent exercer des fonctions cytotoxiques (Lc T CD8⁺), favoriser la réponse immunitaire par la sécrétion de cytokines, ou encore réguler l'activité des autres cellules immunitaires (Lc T CD4⁺). Les Lc T ayant des fonctions spécifiques sont classés en différents sous-groupes et sont à l'origine de réponses distinctes. La plupart des Lc T néonataux sont activés pour générer des réponses de type Th2, caractérisées par la production d'IL-4 et d'IL-13. Ces cytokines induisent une orientation des macrophages vers un profil M2 et inhibent la production d'IFN γ .

Chez l'Homme, des données issues d'analyses de LBA d'enfants montrent une relative rareté des Lc T CD4⁺ (dos Santos et al. 2013; Ratjen et al. 1995), ainsi qu'une abondance moindre des Lc T mémoires dans les poumons des nourrissons comparés aux adultes (Thome et al. 2016). De plus, les Lc T régulateurs (Lc T reg) sont relativement abondants (Thome et al. 2016; Kollmann et al. 2017), et une augmentation transitoire de ces cellules, associée à la colonisation microbienne, protège contre l'hyperréactivité aux allergènes (Gollwitzer et al. 2014). Par ailleurs, d'autres études ont montré que les Lc T reg issus de tissus pédiatriques ont une capacité suppressive plus élevée que celle des adultes (Thome et al. 2016; Kollmann et al. 2017).

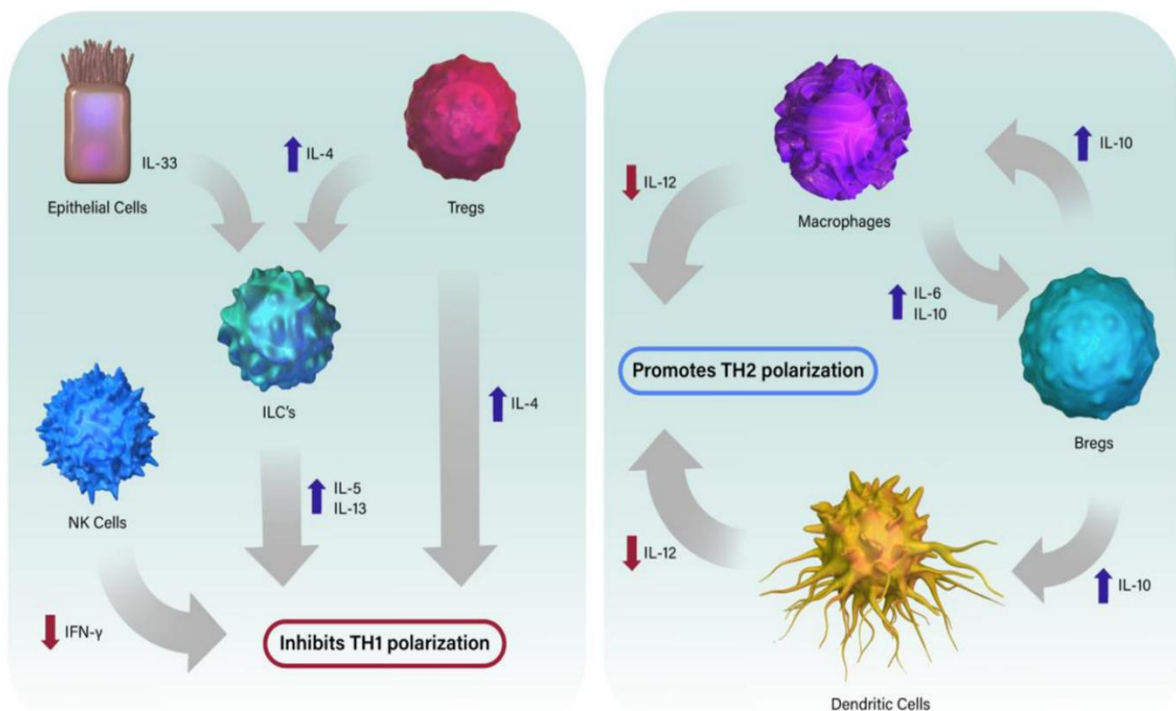


Figure 15 : Représentation schématique des mécanismes contribuant à la polarisation Th2 de l'environnement pulmonaire néonatal. La présence de Lc B reg producteurs d'IL-10 entrave la capacité des macrophages et des CD à produire de l'IL-12, nécessaire à la mise en place de la réponse Th1. La muqueuse pulmonaire néonatale est riche en Lc T reg et en ILC2. La prolifération des ILC2 est favorisée par la présence d'IL-33 provenant des cellules épithéliales de la muqueuse pulmonaire (flèches rouges = production diminuée, flèches bleues = production accrue) (Sedney et Harvill 2023).

2-2-4 Au-delà d'une simple barrière : le rôle immunitaire de l'épithélium respiratoire

Les voies respiratoires sont intégralement recouvertes d'un épithélium, en contact direct avec l'environnement extérieur. Il est constitué de cellules jointives, capables de détecter et réagir en réponse à l'exposition à des composants allergènes, toxiques ou infectieux via un ensemble de récepteur extra et intra-cellulaires. Ainsi, en plus d'un rôle passif de barrière, l'épithélium peut être considéré comme un acteur contribuant activement aux réponses immunitaires.

L'épithélium des voies respiratoires supérieures, qui comprend la cavité nasale, le pharynx et le larynx, est généralement en contact avec un grand nombre de micro-organismes, principalement commensaux (Frank et al. 2010). La signalisation, induite par la reconnaissance de motifs partagés par les microorganismes, dans ces épithéliums entraîne la production de mucus (Bautista et al. 2009) ainsi que de substances antimicrobiennes (**Figure 16**), comme les défensines, qui jouent un rôle clé dans les mécanismes de défense aussi bien en cas de maladies qu'en situation d'allergie (Ryu et al. 2013).

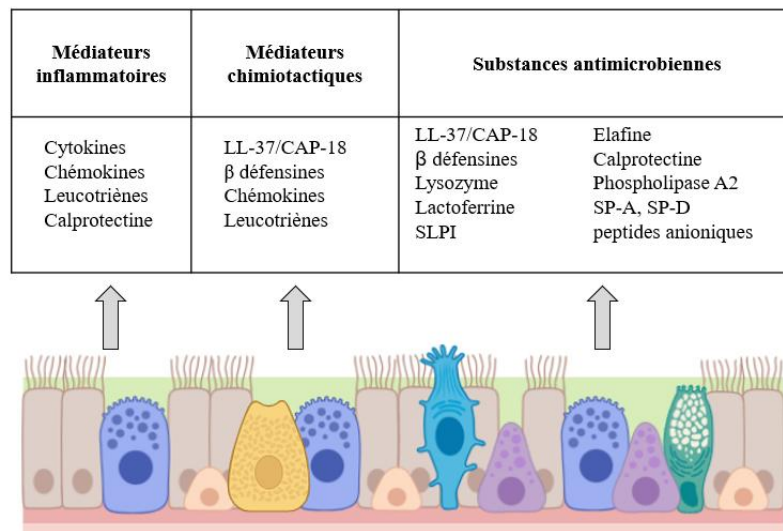


Figure 16 : Les mécanismes de défense des cellules épithéliales. L'épithélium pulmonaire est constitué d'une couche unique de cellules jointives recouvert par une couche de mucus et exprimant des récepteurs de surface permettant la reconnaissance des microorganismes. La liaison des ligands à leur récepteur entraîne une cascade d'activation de protéines intracellulaires qui conduit à l'activation de différents gènes. L'expression de ces gènes entraîne la production de médiateurs inflammatoire, chimiotactique et de substances antimicrobiennes ayant une action directe ou indirecte en permettant le recrutement de cellules immunitaires. (SLPI : Secretory Leucocyte Proteinase Inhibitor, SP-A et SP-D : Surfactant Protein A et D, CAP-18 : cathelicidin antimicrobial protein-18). Adapté de (Bals et Hiemstra 2004).

Les peptides antimicrobiens (PAM) vont aussi avoir une action directe sur les agents pathogènes. Par exemple, la détection d'ARN double brins viraux (rhinovirus) ou synthétiques (poly(I;C)) entraîne la production de cytokines mais aussi des β -défensines 2 et 3 par les cellules épithéliales (Duits et al. 2003). L'attraction électrostatique entre les charges positives des β -défensines et les charges négatives des membranes va permettre l'association de ces peptides avec la membrane du pathogène. L'action antimicrobienne résulte d'un mécanisme de déstabilisation des membranes, soit par agrégation à la surface de la membrane (Hoover et al. 2000), soit par la formation de pores (Lehrer et al. 1989). Les β -défensines ont pu être isolées à des concentrations identiques, de l'ordre de quelques ng/mL dans des LBA réalisés chez des volontaires sains ou chez

des patients atteints soit de mucoviscidose soit de maladies inflammatoires pulmonaires. La β -défensine 1 a été retrouvée dans les trois groupes analysés alors que la β -défensine 2 n'était présente que chez les patients atteints de mucoviscidose ou de maladies inflammatoires pulmonaires, suggérant une induction de l'expression des β -défensines 2 en réponse à l'inflammation alors que les β -défensines 1, d'expression constitutive, assureraient un mécanisme de défense permanent (Singh et al. 1998).

Cette capacité de l'épithélium à assurer une protection contre les agents pathogènes par la présence de mucus et la production de PAM est retrouvée dans tout le tractus respiratoire, excepté au niveau des alvéoles pulmonaires. Dans cette partie terminale, les pneumocytes de type I et II et les MA qui y patrouillent vont assurer la production de cytokines et chimiokines en réponse aux différents stress associés à l'environnement alvéolaire.

2-2-5 Les cellules recrutées en réponse à l'inflammation pulmonaire en période néonatale

2.2.5.1 Les polynucléaires neutrophiles, entre défense et pathogénicité

Les PNN sont des cellules immunitaires qui réagissent rapidement aux agents pathogènes, en particulier dans les poumons, par leur activité de phagocytose, par la production de substances antimicrobiennes (espèces réactives de l'oxygène ou ROS), par l'activité enzymatique de leurs granules intracytoplasmiques et par des pièges extracellulaires (NETs) capables de capturer et de neutraliser les agents pathogènes, mais pouvant également endommager les cellules hôtes. Les PNN ne font pas partie à proprement parler des cellules immunitaires de la muqueuse pulmonaire mais se tiennent en grande proximité. Il s'agit de cellules circulantes, retenues dans la microvascularisation pulmonaire, formant un réservoir défini comme le "pool de neutrophiles marginés du poumon". La première observation de la séquestration des cellules immunitaires dans la microvascularisation pulmonaire a été rapportée en 1910 par F.W. Andrewes lors d'une série de conférences organisées pour le Royal College of Physicians à Londres (Andrewes 1910) puis l'utilisation de techniques de radiomarquage et de transfert adoptif a permis d'identifier un pool de PNN marginés dans le lit capillaire des poumons, qui s'est avéré être en équilibre dynamique avec le pool circulant (Hogg et al. 1992; Doerschuk et al. 1987; Martin et al. 1982; Schwab et al. 2003).

Les PNN se développent à partir de précurseurs dans la moelle osseuse avant de migrer vers la périphérie. Leur courte durée de vie dans les organes périphériques nécessite un renouvellement constant (Evrard et al. 2018) et l'homéostasie des PNN est maintenue par un équilibre précis entre la granulopoïèse, le stockage et la libération dans la moelle osseuse, ainsi que la migration vers les compartiments vasculaires et les tissus périphériques. Les PNN apparaissent pour la première fois dans la moelle osseuse claviculaire humaine entre dix et onze semaines post-conception (Slayton et al. 1998). À la fin du premier trimestre, des précurseurs de PNN peuvent être détectés dans le sang périphérique, tandis que les cellules matures apparaissent entre quatorze et seize semaines de gestation (Laver et al. 1990; *Remington and Klein's Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant* 2024). Les PNN se répartissent en trois groupes ou réservoirs distincts, connus sous les noms de réservoirs prolifératif, circulant et marginal (Erdman et al. 1982). Le nombre de PNN dans chaque réservoir est influencé par l'état de santé de l'individu et par l'état de différenciation de la cellule. L'homéostasie entre ces réservoirs est étroitement régulée par les cellules dendritiques

conventionnelles, via la production contrôlée de G-CSF, CXCL1, CCL2 et CXCL10, qui influenceraient leur migration depuis la moelle osseuse vers leur site de recrutement et leur survie locale dans les organes périphériques (Jiao et al. 2014).

Le nombre de PNN dans le sang périphérique chez les nouveau-nés à terme est très similaire à celui des enfants plus âgés et des adultes (Mouzinho et al. 1994) ainsi que leur expression membranaire des récepteurs à la fraction constante des immunoglobulines (FcγRII et FcγRIII) (Carr et Davies 1990) et leur contenu en protéines enzymatiques dans les granules cytoplasmiques, comme la myéloperoxydase (MPO) (Levy et al. 1999). Chez les adultes, une infection pulmonaire entraîne un recrutement rapide des PNN via une migration des cellules, dépendante de la L-sélectine (Rebuck et al. 1995). De nombreuses études ont observé que les PNN néonataux ont une capacité de chimiotactisme inférieure à celle des PNN adultes, caractérisée par une vitesse de migration (test *in vitro*) réduite de moitié (Wolach et al. 1998; Boner et al. 1982; Pahwa et al. 1977). Le chimiotactisme implique la capacité des cellules à détecter un signal inflammatoire et à adhérer à l'endothélium via des récepteurs d'adhésion pour rejoindre le site d'inflammation. L'explication de cette différence fonctionnelle réside dans l'expression et la dynamique réduites de deux familles de molécules d'adhésion de la membrane cellulaire, les intégrines β2 et les sélectines, ainsi que dans des différences du cytosquelette des PNN des nouveau-nés. Plusieurs études ont montré que les PNN des nouveau-nés à terme expriment moins de la moitié du nombre de récepteurs à la L-sélectine à leur surface par rapport aux PNN adultes (Mariscalco et al. 1998; Török et al. 1993; Rebuck et al. 1995). Des études plus récentes suggèrent que cette réduction du recrutement des PNN pourrait être influencée par la production d'IL-10 par les Lc B et les CD. Il est important de noter qu'en l'absence de TLR2 et d'IL-10, les PNN néonataux sont capables de migrer vers les poumons infectés et de contrôler l'infection (Andrade et al. 2013). Cela suggère que les PNN néonataux possèdent intrinsèquement la capacité de migrer vers les tissus infectés et de stimuler des réponses immunitaires appropriées, mais que la régulation anti-inflammatoire du système immunitaire néonatal module cette capacité.

Bien que l'activité des PNN soit généralement associée à une réponse protectrice, elle peut également causer des dommages aux tissus, mettant en danger la santé des nouveau-nés. Les activités antimicrobiennes des PNN peuvent causer de graves dommages dans les poumons néonataux et aggraver les infections. Cela s'explique par la capacité des NETs à induire une inflammation non spécifique, permettant aux agents pathogènes d'échapper à la réponse immunitaire et de provoquer des pathologies pulmonaires et systémiques sévères (Colón et al. 2019; de Araujo et al. 2022; Denorme et al. 2023). Il a également été observé que la NETose peut être régulée par les cytokines. Par exemple, la présence d'IFN-delta limite la NETose et conduit à de meilleures survies chez les souris nouveau-nés exposés au Pneumovirus murin (causant une forme murine de bronchiolite) (Sebina et al. 2022). La production de ROS par les PNN a également été impliquée dans les lésions pulmonaires aiguës chez les rats nouveau-nés (Auten et al. 2001; 2002). Ainsi, si les PNN néonataux possèdent un potentiel fonctionnel comparable à celui des PNN adultes, leur activité doit être finement ajustée dans le contexte particulier du nouveau-né afin de limiter les lésions tissulaires. Cette nécessité de modulation pourrait offrir un avantage à certains pathogènes et soulève encore la question du caractère protecteur ou délétère des PNN dans la réponse inflammatoire pulmonaire du nouveau-né.

2-2-5-2 Les MDSC, une population transitoire caractéristique de la période néonatale

Les cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde (MDSC) forment une population hétérogène de cellules d'origine granulocytaire (G-MDC) ou monocyttaire (M-MDSC), capables d'inhiber les réponses immunitaires innées et adaptatives (Gervassi et al. 2014). Les MDSC de type granulocytaire sont particulièrement abondantes chez les femmes enceintes et dans le sang de cordon, mais leur fréquence diminue rapidement après la naissance. En effet, elles s'accumulent durant la grossesse, dans l'organisme maternel et fœtal, et contribuent à la tolérance materno-fœtale (Dietz et al. 2021; Köstlin et al. 2016; 2014; Köstlin-Gille et al. 2019; Rieber et al. 2013). Les MDSC du sang de cordon inhibent les réponses des Lc T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que des Lc NK, ce qui suggère un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie immunitaire au début de la vie (Gervassi et al. 2014; Köstlin et al. 2014; Rieber et al. 2013). Elles exercent leur action immunosuppressive par la production de molécules telles que l'arginase-1, les ROS et la synthase inductible de l'oxyde nitrique (iNOS). Ces molécules inhibent la prolifération et l'activité cytotoxique des Lc T, favorisent la prolifération des Lc T reg et empêchent l'activation des Lc NK (pour revue Gantt et al. 2014). Chez les nouveau-nés, les MDSC influencent les fonctions des Lc T et des monocytes (Dietz et al. 2019; Köstlin et al. 2017) et semblent jouer un rôle dans le contrôle de l'inflammation en cas d'entérocolite nécrosante chez les nouveau-nés (He et al. 2018). Actuellement, il n'existe pas de preuve de leur présence dans le compartiment pulmonaire à l'homéostasie mais elles seraient recrutées lors d'une inflammation en contexte infectieux (Zhang et al. 2012; Bline et al. 2023; Bedoya et al. 2019).

Récemment, une étude réalisée chez la souris montre une augmentation des MDSC dans la rate des souriceaux à un jour de vie suivie d'une diminution rapide au septième jour de vie. De plus, une diminution de la quantité de MDSC, après mutation d'un facteur de transcription impliqué dans leur prolifération et leur activation, s'accompagne d'une altération de la composition du microbiote intestinal ainsi que de l'homéostasie des Lc T (Schwarz et al. 2023). Ces résultats suggèrent un rôle des MDSC dans la régulation de l'inflammation, influençant la mise en place du microbiote intestinal durant la période néonatale. Il est également envisageable qu'elles exercent un rôle similaire sur d'autres microbiotes, notamment le microbiote pulmonaire, bien qu'aucune étude n'ait à ce jour démontré ce lien.

Conclusion :

Les cellules constituant le système immunitaire pulmonaire apparaissent précocement au cours du développement, selon des processus migratoires complexes et dynamiques, entraînant des variations dans la quantité, la nature et la réactivité des différentes populations cellulaires. Initialement, la muqueuse pulmonaire est dominée par des cellules de la lignée myéloïde, avant que les populations lymphoïdes ne deviennent progressivement plus représentées. Le développement complet des cellules présentatrices d'antigènes n'est atteint que plusieurs semaines après la naissance.

Ainsi, l'ensemble des types cellulaires présents dans la muqueuse pulmonaire adulte est déjà détectable à la naissance, mais dans des proportions différentes comme par exemple pour les CDc1 et les ILC2. Certains types cellulaires sont toutefois spécifiques de la période néonatale, tels que les CD migratrices, les Lc B reg et les MDSC. Par ailleurs, la capacité de réponse des cellules immunitaires (MA, CD, PNN) diffère selon l'âge, avec une orientation néonatale privilégiant la tolérance, essentielle à la protection de la muqueuse pulmonaire au cours des premières étapes de la vie.

2-3 Apports du modèle néonatal murin à l'étude des défenses immunitaires antivirales

L'étude de la réponse immunitaire suite à l'infection par le VRS est possible grâce à l'utilisation du modèle murin néonatal. Dans ce modèle, les souris infectées en période néonatale (≤ 7 jours de vie) et ré-exposées à l'âge adulte développent une forme « d'asthme » caractérisée par une hypersensibilité accrue des voies respiratoires, une hyperproduction de mucus, des réponses cytokiniques et cellulaires de type Th2, ainsi qu'un remodelage des voies respiratoires (**Figure 17**) (Culley et al. 2002; Becnel et al. 2005; You et al. 2006).

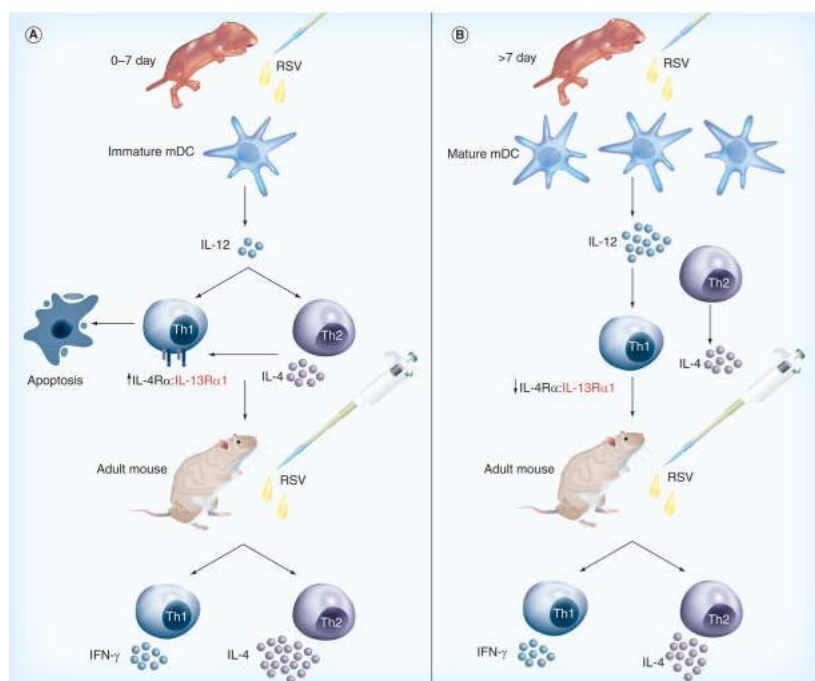


Figure 17 : Influence de l'âge lors de la primo-infection par le VRS sur le type de réponse immunitaire.

Représentation schématique illustrant l'influence de l'âge lors de la primo-infection par le VRS sur l'orientation de la réponse immunitaire. Chez les souriceaux infectés avant l'âge de sept jours, les cellules dendritiques produisent peu d'IL-12, cytokine clé dans l'induction des réponses Th1. Ce déficit favorise le développement de réponses immunitaires de type 2. Lors d'une réinfection à l'âge adulte, ce déséquilibre persiste et se traduit par une exacerbation des symptômes après exposition au virus ou à des allergènes, accompagnée d'une réponse cytokinique et cellulaire de type 2 amplifiée. Chez les souriceaux primo-infectés après sept jours de vie, la réponse immunitaire déclenchée suite à une réinfection à l'âge adulte présente un profil équilibré, associant des médiateurs et des cellules effectrices de type 1 et de type 2 (Cormier et al. 2010).

Les données issues de ces modèles néonataux murins ressemblent étroitement à celles des études épidémiologiques humaines, qui montrent que l'âge de l'infection initiale est un facteur déterminant majeur de la persistance des dysfonctionnements pulmonaires jusqu'au début de l'âge adulte (Pala et al. 2002). Chez les souris, lorsque l'infection primaire par le VRS survient au cours de la première semaine de vie, une réinfection par le VRS ou une exposition ultérieure à des allergènes entraîne une immuno-pathophysiologie pulmonaire sévère, similaire à l'asthme (Culley et al. 2002; You et al. 2006).

Cependant, lorsque l'infection primaire par le VRS survient chez des souriceaux sevrés ou des adultes, la pathophysiologie pulmonaire marquée ne persiste pas et est significativement moins grave après une réinfection par le VRS (Dakhama et al. 2005; Culley et al. 2002) ou une exposition à des allergènes (Becnel et al. 2005). Les données émergentes suggèrent que l'issue de la maladie liée

au VRS, même chez la souris, est dictée par l'âge de l'infection initiale. Cela indique que la réponse immunologique anti-virale chez le nouveau-né pourrait être responsable de l'évolution de la maladie et souligne ainsi l'importance du modèle murin néonatal pour étudier la pathophysiologie retrouvée chez les nourrissons humains.

3- Le microbiote : un élément clé dans la modulation des défenses immunitaires pulmonaires

Les êtres vivants dans leur ensemble peuvent être considéré comme des « hybrides organisme-microbe » appelés holobiontes. Pour l'homme, le microbiote dépasse de dix fois le nombre de cellules somatiques et germinales du corps humain et contient cent cinquante fois plus de gènes que ceux présents dans notre génome (Qin et al. 2010). Cette symbiose microbienne a résulté au fil de l'évolution d'une relation complexe entre eucaryotes et procaryotes, influencée par des pressions sélectives réciproques. En effet, le bénéfice est mutuel : l'hôte fournit une niche écologique sous forme d'environnement contrôlé et le microbiote, de par son métabolisme, apporte des éléments importants pour l'hôte. Parmi les différents microbiotes constitutifs d'un individu, le microbiote intestinal est le plus étudié et le mieux décrit. Les premières contributions connues du microbiote intestinal à la physiologie humaine sont la synthèse des vitamines B et K, et la capacité des bactéries intestinales à fermenter les fibres alimentaires, qui sont des glucides complexes non digestibles, pour produire des acides gras à chaînes courtes (AGCC) (pour revue LeBlanc et al. 2017). Cette interaction homme-microbe repose sur plusieurs niveaux d'intégration, incluant la symbiose, le commensalisme et le mutualisme. Ces interactions sont fragiles et nécessitent d'être finement régulées. Notre système immunitaire s'est alors développé avec la nécessité de tolérer ce microbiote tout en étant capable de reconnaître et d'éliminer les micro-organismes pathogènes (pour revue Round et Mazmanian 2009).

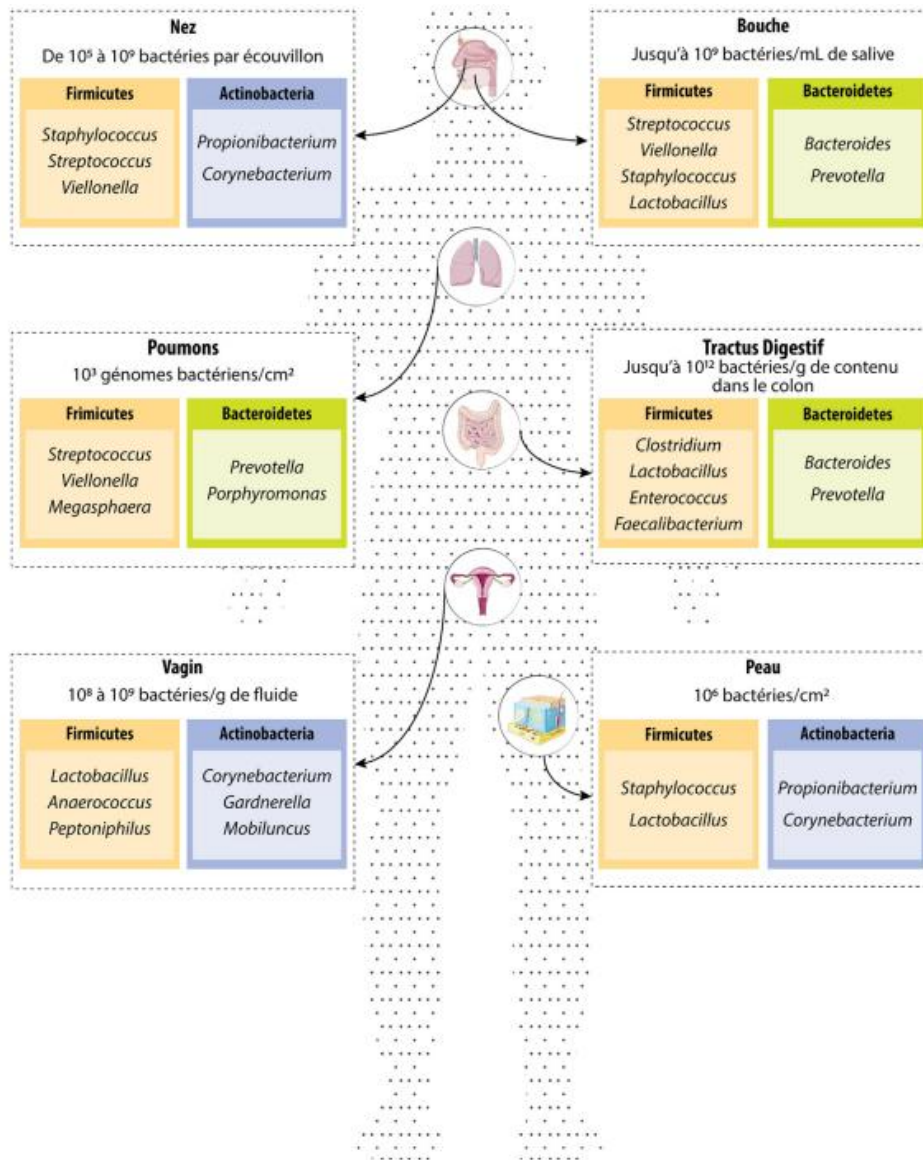


Figure 18 : Composition des différents microbiotes chez l'Homme à l'homéostasie. La charge bactérienne varie considérablement d'un microbiote à l'autre ; le poumon contient la plus faible densité bactérienne, tandis que l'intestin représente le principal réservoir de microorganismes. La quantité de bactéries varie en fonction de facteurs intrinsèques aux tissus (disponibilité en nutriment, présence d'oxygène) mais également de caractéristiques propres à l'hôte (alimentation, environnement) (Mathieu et al. 2021).

3-1 Le microbiote associé aux voies respiratoires

Le microbiote s'installe dans l'organisme dès la naissance en colonisant toutes les surfaces externes (peau) mais aussi toutes les muqueuses (intestinales, uro-génitales et respiratoires) (**Figure 18**), qui sont les zones d'entrée privilégiées des agents pathogènes pour infecter l'organisme. Ainsi, la présence de ces micro-organismes à la surface des muqueuses va contribuer à leur protection par divers mécanismes.

Historiquement, les poumons étaient considérés comme stériles, répondant au dogme médical « un poumon sain est un poumon stérile ». Ce dogme était fondé sur l'absence de détection de micro-organismes dans des prélèvements provenant des voies respiratoires profondes, analysés à l'aide de techniques microbiologiques classiques basées sur l'examen direct et la culture. L'arrivée

de technologies plus performantes a permis de démontrer que le signal microbien détecté dans les voies respiratoires inférieures relève de la présence d'un microbiote et pas d'une contamination. En 2010, grâce à une étude de métagénomique, Hilty et al. ont pu montrer la présence de différentes communautés bactériennes dans les lavages broncho-alvéolaire de patients asthmatiques ou sains (Hilty et al. 2010). Depuis, la connaissance du microbiote pulmonaire a évolué mais reste limitée par la difficulté d'accès à l'organe. Ainsi, de nombreuses interrogations subsistent, notamment sur le rôle de ce microbiote, ses interactions avec l'hôte et les agents pathogènes environnementaux.

Contrairement au microbiote pulmonaire, celui des voies respiratoires supérieures a fait l'objet d'études depuis de nombreuses années. En 1984 une étude s'est intéressée à la composition bactérienne de la cavité nasale de quatre-vingt-dix-sept jeunes hommes, candidats à la formation de pilote dans l'armée de l'air finlandaise. Le résultat des cultures aérobies a montré la présence d'une ou plusieurs espèces bactériennes dans les cent quatre-vingt-quatorze cavités nasales et la présence de bactéries anaérobies dans 76,5% des prélèvements. Les bactéries aérobies les plus fréquemment retrouvées étaient *Staphylococcus epidermidis* (79%), les *diphthéroïdes* (41%) et *Staphylococcus aureus* (34%). *Haemophilus influenzae* a été identifié dans 5% des cas et *Streptococcus pneumoniae* dans 0,5%. La culture anaérobie a permis d'isoler *Propionibacterium acnes* dans 74,5% des échantillons et *Peptococcus magnus* dans 3,5%.

Bien que des recherches aient longtemps été menées sur les bactéries pathogènes colonisant la cavité nasale, notamment *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pneumoniae*, ce n'est qu'avec l'essor des approches de biologie moléculaire, dans les années 2000, que le concept de microbiote nasal a réellement émergé. Les techniques de culture classiques ne permettaient pas d'explorer la diversité des espèces microbiennes présentes, en particulier celles qui sont difficiles voire impossibles à cultiver. Le développement du séquençage de l'ARN ribosomal 16S a marqué un tournant décisif, en rendant possible l'analyse complète et non biaisée des communautés bactériennes colonisant les muqueuses nasales. L'une des premières études majeures utilisant cette approche, publiée par Frank et al. en 2010, a mis en évidence la complexité et la stabilité du microbiote nasal chez l'adulte sain, soulignant l'importance de certaines espèces commensales dans la régulation de pathogènes opportunistes (Frank et al. 2010). Par la suite, le microbiote nasal est devenu un champ d'étude à part entière, intégré dans de grands projets tels que le Human Microbiome Project, et associé à de nombreuses fonctions biologiques et pathologiques, notamment respiratoires, allergiques, et neurodégénératives. Ce champ de recherche en plein essor continue d'élargir notre compréhension des liens entre écosystèmes microbiens et santé humaine.

3-2 Composition du microbiote des voies aériennes

La composition du microbiote pulmonaire est influencée par un ensemble de facteurs propres à l'environnement pulmonaire et à sa physiologie (**Figure 19**). Contrairement aux intestins qui sont recouverts d'une épaisse couche de mucus protecteur, les voies respiratoires produisent relativement peu de mucus à l'homéostasie (Policard J, Galy P 1945). Une fine couche de surfactant riche en lipides et faiblement bactériostatique (Wu et al. 2003) tapisse les alvéoles, empêchant leur collapsus local. Le tractus respiratoire représente généralement un environnement pauvre en nutriments pour les microbes, comparé à l'environnement riche du tractus gastro-intestinal. Ainsi chez un sujet sain à l'âge adulte, le microbiote pulmonaire contient environ 10^5 bactéries par cm^3 de LBA avec une prédominance du phylum des *Bacteroidetes* devant celui des *Firmicutes* (Morris et al. 2013). Cette

quantité de bactérie est considérée comme faible comparée au 10^{12} bactéries/g de contenu au niveau du colon, avec une répartition inversée des phyla prédominants (*Firmicutes* devant les *Bacteroidetes*) (Morris et al. 2013). Cependant, la mesure de l'indice de Shannon montre que le microbiote pulmonaire est associé à une plus forte diversité alpha égale à 3,3 versus 2,5 pour l'intestin, la diversité alpha correspondant à la richesse spécifique et représentant le nombre d'espèce que compte une communauté sans tenir compte de l'abondance relative de chacune des espèces (Kim et al. 2017).

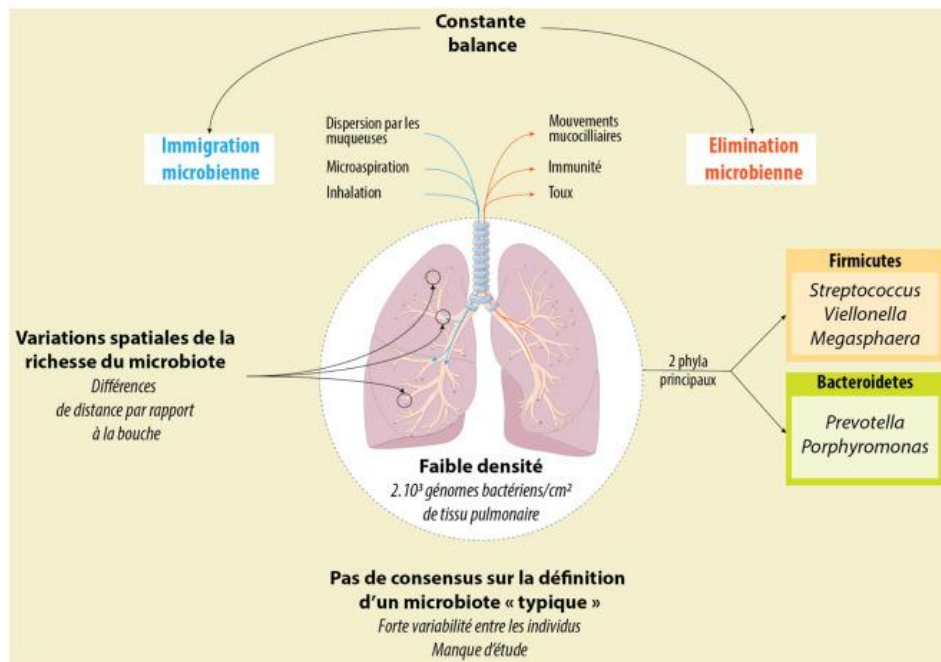


Figure 19 : Principales caractéristiques du microbiote pulmonaire sain. Le microbiote pulmonaire présente une faible densité bactérienne et une composition dominée par les *Firmicutes*, suivis des *Bacteroidetes*. Sa richesse varie selon les compartiments respiratoires, en lien avec un équilibre dynamique entre les processus d'immigration (micro-aspiration oropharyngée, inhalation, dispersion depuis les voies supérieures) et d'élimination (clairance mucociliaire, toux, phagocytose, réponses immunitaires locales). Il n'existe pas de microbiote pulmonaire "type", mais des communautés transitoires influencées par les conditions locales et l'état de l'hôte (Mathieu et al. 2021).

Au niveau du microbiote pulmonaire, les bactéries dominantes appartiennent aux genres *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Fusobacterium* et *Haemophilus*. La majeure partie de ces bactéries sont de types anaérobies (genre *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella* et *Veillonella*). Bien que les bactéries soient majoritaires, le microbiote pulmonaire est également composé d'un mycobiote, essentiellement composé des genres *Aspergillus*, *Cladosporium*, ou *Saccharomyces*, d'un virome, majoritairement représenté par les bactériophages (**Figure 21**) mais aussi des *Picornaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Anelloviridae*, *Polyomaviridae*, *Influenzavirus*, *Coronavirus*, *Bocavirus* et *Papillomavirus* (pour revue Wylie 2017). Enfin, cinq phyla d'archées ont été identifiés : *Euryarcheota*, *Thaumarchaeota*, *Diapherotrites*, *Woesarchaeota* et *Aenigmarchaeota* (Koskinen et al. 2017). Ces partenaires ont été décrits depuis une petite dizaine d'années et peu de données sont disponibles. Le développement des techniques de métagénomiques globales dont le séquençage shotgun, permettant l'analyse de tous les fragments d'ADN présents dans un échantillon plutôt que l'amplification d'un seul fragment, comme le 16S

bactérien classiquement utilisé, devraient permettre d'étendre les connaissances sur ces microorganismes du microbiote.

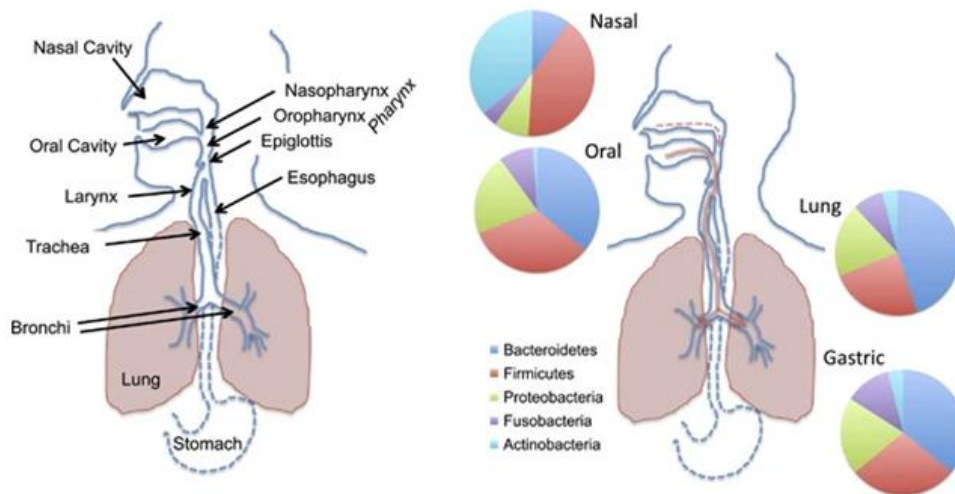


Figure 20 : Composition des microbiotes bactériens des voies aéro-digestives chez l'Homme sain. La composition du microbiote pulmonaire se rapproche davantage de celle du microbiote buccal que de celle du microbiote nasal, traduisant une influence prédominante des microorganismes de la bouche dans l'établissement du microbiote pulmonaire (Huffnagle et al. 2017).

La charge microbienne totale et la composition relative de la communauté bactérienne pulmonaire sont déterminées par l'équilibre de trois facteurs : l'immigration microbienne, l'élimination microbienne et les taux de reproduction relatifs des membres de la communauté (Dickson et al. 2014). A l'état sain, la composition du microbiote pulmonaire est principalement déterminée par l'équilibre entre immigration et élimination (**Figure 19**), avec une contribution relativement faible des taux de reproduction de ses membres (Venkataraman et al. 2015; Dickson et al. 2015). Les principales voies d'immigration microbienne vers les poumons sont la micro-aspiration, l'inhalation de l'air et la dispersion directe le long des surfaces muqueuses. Parmi celles-ci, la micro-aspiration est probablement la voie d'immigration dominante, comme l'indique la similarité de composition entre les microbiotes buccal et pulmonaire (**Figure 20**) (Bassis et al. 2015; Venkataraman et al. 2015).

L'élimination des microbes des poumons est un processus actif et continu qui implique la toux associée à l'escalator mucociliaire propulsant constamment et régulièrement les microbes vers le haut, le long de la fine couche de mucus sécrétée à la base (Policard J, Galy P 1945). Les poumons et les voies respiratoires possèdent un arsenal diversifié de défenses immunitaires innées et adaptatives qui éliminent sélectivement le microbiote.

Dans un poumon sain, on observe une grande variation régionale de nombreux facteurs environnementaux impactant la croissance bactérienne : la tension en oxygène, le pH, la perfusion sanguine relative, la ventilation alvéolaire relative, la température, la structure des cellules épithéliales, le dépôt de particules inhalées, ainsi que la concentration et le comportement des cellules immunitaires.

Malgré ces importantes variations spatiales au niveau du poumon sain, la pression sélective locale sur la croissance bactérienne semble moins déterminante que l'équilibre entre immigration et

élimination pour la composition de la communauté microbienne (Dickson et al. 2015). Par contre, en situation pathologique, les facteurs locaux deviennent déterminants (Dickson et al. 2015) (**Figure 21**).

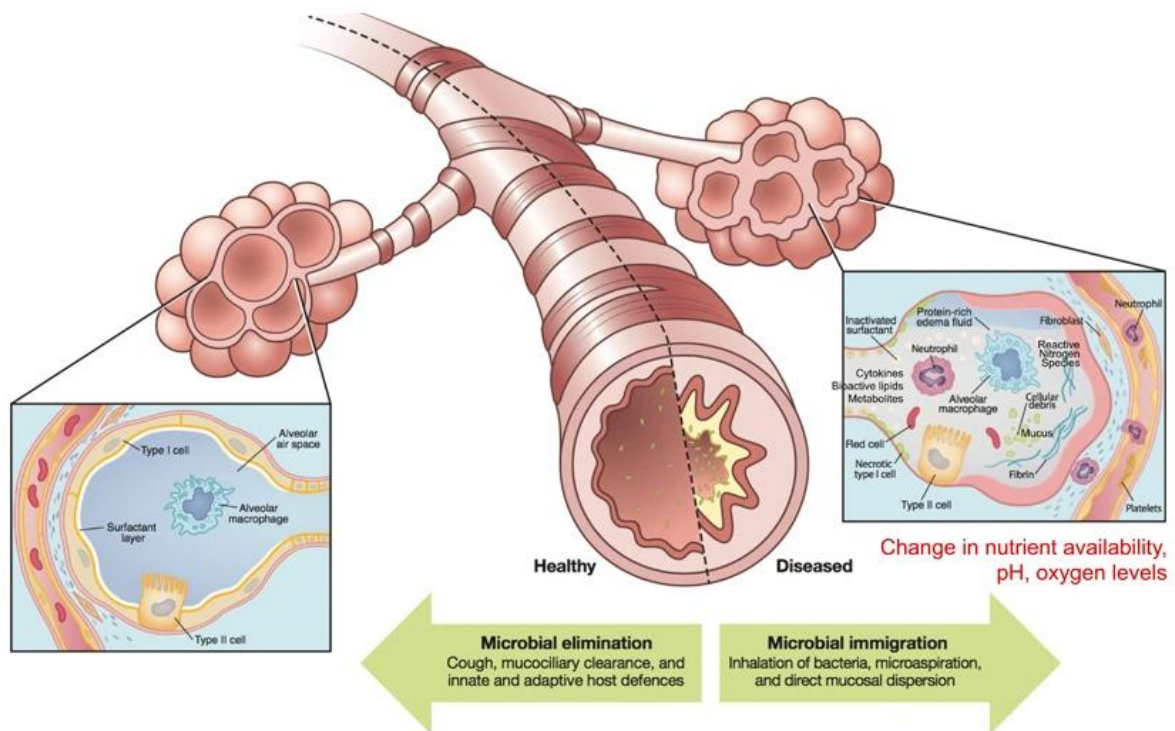


Figure 21 : Mécanismes influençant la composition du microbiote pulmonaire sain et pathologique.

L'immigration, l'élimination et le taux de reproduction sont les trois facteurs qui influencent la composition du microbiote pulmonaire. Toutes modifications de l'un de ses facteurs entraînent une variation du microbiome. En condition saine les paramètres de croissance locale ne favorisent généralement pas une prolifération bactérienne importante. L'inflammation modifie les conditions locales de croissance en fournissant nutriments et niches favorables aux bactéries, stimule les cytokines et l'activation des ILC2, favorise l'hyperplasie des cellules caliciformes et la production de mucus, créant des environnements anaérobies propices à la colonisation bactérienne (Huffnagle et al. 2017).

3-3 Cinétique de colonisation des voies respiratoires

Des communautés microbiennes sont détectées dans la cavité buccale et le nasopharynx des nouveau-nés dans les cinq minutes suivant la naissance, et dans les poumons dès les premières vingt-quatre heures de vie (Dominguez-Bello et al. 2010; Pattaroni et al. 2018). Le développement du microbiote pulmonaire est rapide comparé à celui du microbiote intestinal. On considère qu'il faut deux à trois ans pour l'installation du microbiote intestinal alors que la maturité du microbiote pulmonaire est atteinte en à peine deux mois. Une étude récente de l'analyse d'échantillons d'aspirations trachéales d'une cohorte de quarante-huit nourrissons, réalisée par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S des procaryotes, a permis d'identifier trois profils distincts de microbiote (PM) au cours des trois premiers jours de vie (Pattaroni et al. 2018) (**Figure 22**). Ces profils se différencient par leur composition bactérienne : le profil de microbiote 1 (PM1) présente une répartition équilibrée entre *Streptococcus*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Veillonella* et *Fusobacterium*, le PM2 est dominé par *Ureaplasma*, tandis que le PM3 est marqué par une prédominance de *Staphylococcus* (Pattaroni et al. 2018). Après sept semaines de vie, tous les nourrissons ont convergé vers le pulmotype diversifié (PM1), ce qui suggère une rapide

diversification des bactéries primo-colonisatrices. Pour comprendre les facteurs influençant la prédominance de ces différents profils, les auteurs ont analysé des paramètres tels que l'âge gestationnel, le mode de naissance et l'exposition aux antibiotiques. Ils ont observé que l'âge gestationnel joue un rôle clé: les nourrissons prématurés présentent principalement les profils PM2 ou PM3, tandis que les nouveau-nés à terme montrent directement un pulmotype diversifié (PM1) (**Figure 22**) (Pattaroni et al. 2018). Le mode de naissance influence également la composition du microbiote chez les prématurés. Ainsi, les nourrissons nés par césarienne présentent systématiquement le PM3, alors que ceux nés par voie basse peuvent présenter soit le PM2, soit le PM3 (Pattaroni et al. 2018).

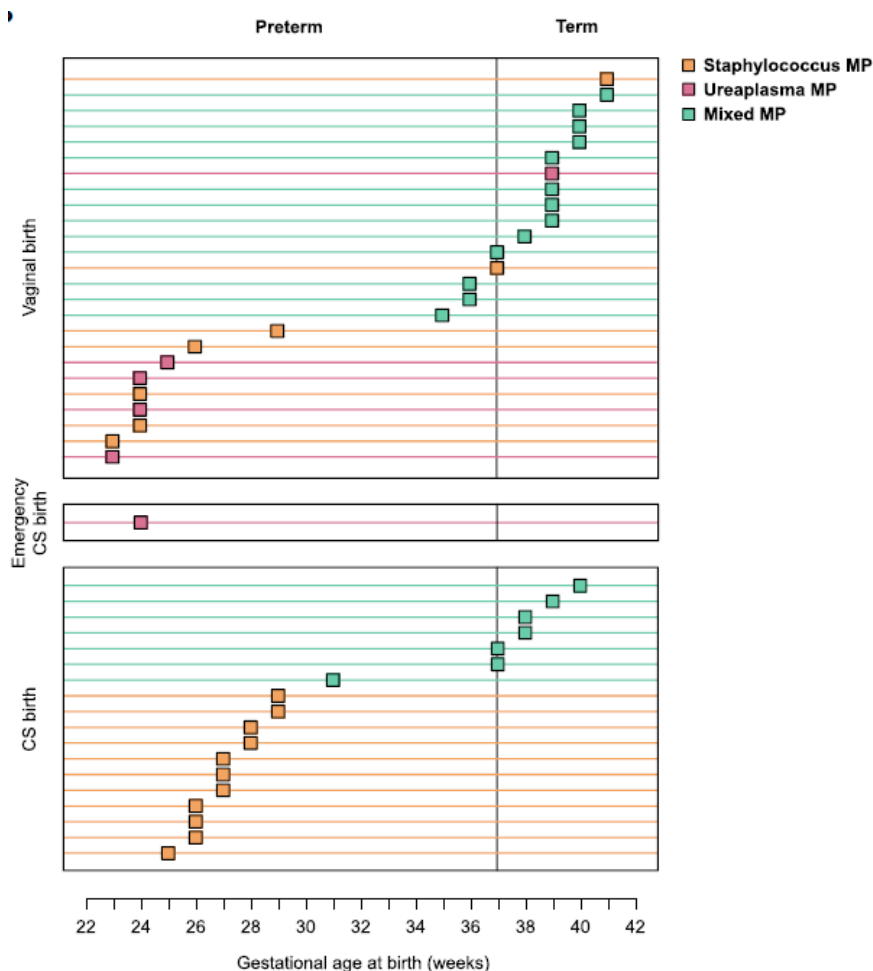


Figure 22 : Distribution des microbiotes des voies aériennes en fonction de l'âge gestationnel et du mode de naissance. Trois profils de microbiote ont été identifiés à la naissance sur la base de leur composition. Chaque ligne correspond à un individu. Les enfants nés à terme (à droite) présentent un microbiote mixte (carrés verts), tandis que les enfants prématurés montrent un microbiote dominé par *Staphylococcus* lorsqu'ils sont nés par césarienne (carrés jaunes), et un microbiote dominé soit par *Staphylococcus*, soit par *Ureaplasma* lorsqu'ils sont nés par voie basse (carrés jaunes et roses). (Pattaroni et al. 2018).

Cette cinétique de colonisation est cohérente avec celle observée au niveau du nasopharynx : une détection bactérienne dès le premier jour de vie, une rapide augmentation et diversification dans les premières semaines de vie et un impact du mode de naissance sur la cinétique de colonisation (Bosch et al. 2016). Les mêmes observations ont pu être réalisées chez des souriceaux BALB/c ou C57BL6 (Gollwitzer et al. 2014; Remot et al. 2016) permettant ainsi d'approfondir le rôle des interactions entre les bactéries primo-colonisatrices et leur hôte dans la maturation de la muqueuse

pulmonaire. En effet, l'étude réalisée dans le modèle BALB/c montre que pendant les deux premières semaines après la naissance, la charge bactérienne dans les poumons augmente, et la composition en phyla bactériens évolue : la prédominance initiale des *Gammaprotéobactéries* et des *Firmicutes* cède progressivement la place aux *Bacteroidetes*. Ces modifications du microbiote sont associées à une diminution de la réactivité aux allergènes domestiques et à l'apparition d'un sous-type de Lc T reg Helios⁻ (Gollwitzer et al. 2014). Dans le fond génétique C57BL/6, l'étude de Remot *et al.* a également mis en évidence une augmentation du nombre de bactéries dans le tissu pulmonaire entre trois et vingt et un jours de vie, par dénombrement des unités formant colonie (CFU) après mise en culture. Les souches primo-colonisatrices ainsi isolées ont ensuite été caractérisées en fonction de leurs propriétés immunostimulantes, révélant que certaines d'entre elles étaient capables d'aggraver ou, au contraire, d'atténuer l'inflammation pulmonaire dans un modèle murin d'exposition aux allergènes domestiques. (Remot et al. 2017).

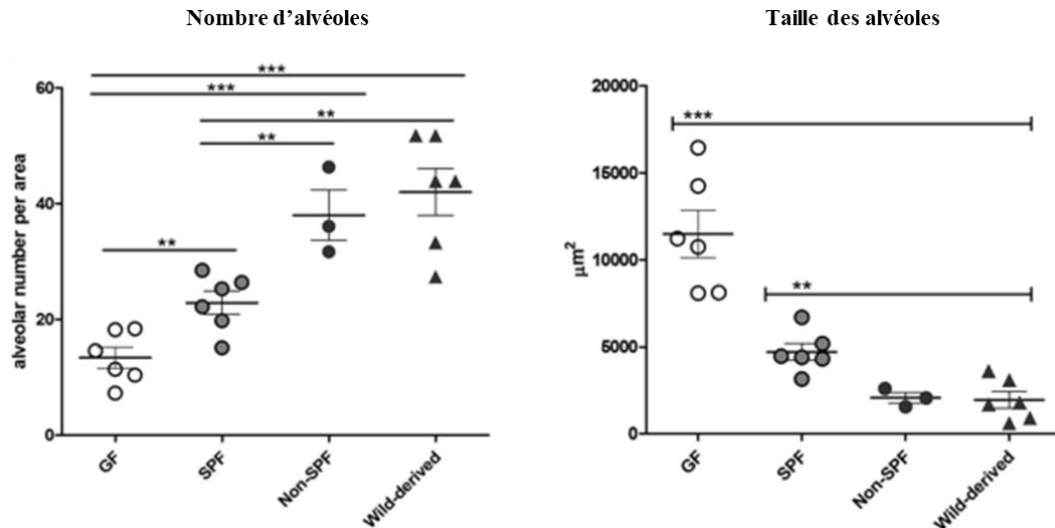
3-4 Le microbiote pulmonaire, 4 grandes fonctions

3-4-1 Architecture du tissu

Une étude réalisée chez la souris adulte a permis de mettre en évidence l'impact du microbiote sur le développement du tissu pulmonaire, grâce à des coupes histologiques de poumon, réalisées chez des animaux axéniques¹¹ (sans microbiote) et conventionnels (Yun et al. 2014). Les poumons des souris axéniques présentent une architecture alvéolo-capillaire différente de celle des souris conventionnelles (**Figure 23A**). En effet, chez les souris axéniques les alvéoles sont moins nombreuses et de grande surface, avec des parois plus fines. Après une exposition intranasale de seize semaines avec deux souches de *Lactobacillus*, l'architecture des alvéoles pulmonaires des souris axéniques est modifiée pour ressembler davantage à celle des alvéoles pulmonaires des souris conventionnelles (**Figure 23B**). En effet, il a été observé une augmentation du nombre d'alvéoles avec une réduction de leur surface et un épaississement des parois alvéolaires. Cette étude fait donc un lien entre le microbiote pulmonaire et le développement de l'architecture du tissu et montre une possible réversibilité de ces effets par l'exposition à des bactéries (Yun et al. 2014).

¹¹ Axénisation : consiste en l'obtention d'animaux exempts de tout microorganisme détectable par les méthodes de détection mises en œuvre dans le laboratoire (<https://www.taam.cnrs.fr/index.php/gestion-de-colonies-axeniques-et-gnotoxeniques/>)

A



B

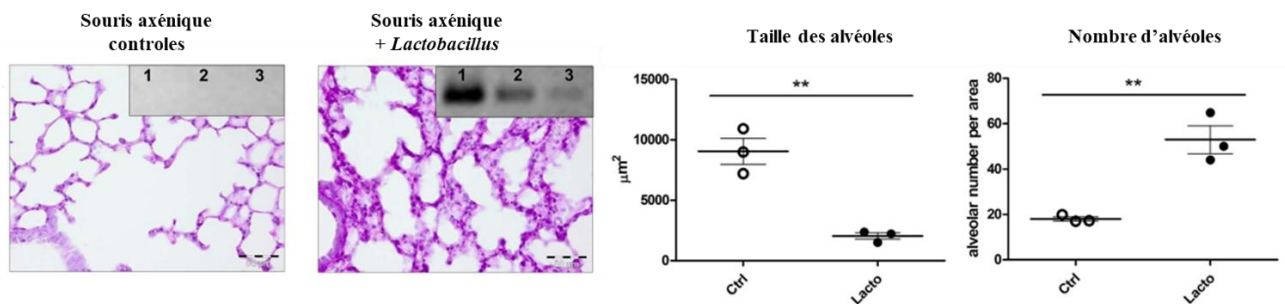


Figure 23 : Représentation graphique du nombre et de la taille des alvéoles pulmonaires en fonction de l'origine environnementale des souris. (A) Le nombre et la taille des alvéoles pulmonaires ont été évalués sur des coupes histologiques de poumons de souris axéniques, EOPS, conventionnelles ou issues de l'environnement extérieur. Les souris axéniques présentent des alvéoles beaucoup plus grandes et moins nombreuses que les autres groupes, suggérant que l'absence de microbiote influence l'architecture pulmonaire. **(B)** Ces deux paramètres sont réversibles après exposition intranasale pendant 16 semaines de deux souches de *Lactobacillus* aux souris axéniques (Yun et al. 2014).

3-4-2 Rôle de barrière

Le microbiote, par sa présence, empêche la colonisation par des microorganismes pathogènes. Cette fonction est bien décrite pour le microbiote intestinal (Travier et Lecuit 2022; Van der Leur et al. 1993). En effet, le traitement avec des antibiotiques s'accompagne d'une expansion importante d'*Enterobacteriaceae* commensaux ou exogènes dans le système digestif chez la souris ou chez l'Homme (Van der Leur et al. 1993). Ces travaux ont fait émerger la notion de résistance à la colonisation par le microbiote, représenté dans cet exemple par la capacité intrinsèque du microbiote à inhiber la prolifération des *Enterobacteriaceae* dans la lumière intestinale.

Il existe différents mécanismes mis en jeu par le microbiote pour aboutir à cette résistance, regroupés en deux catégories : les mécanismes à mode d'action direct et ceux à mode d'action indirecte. Parmi les mécanismes directs on peut citer l'occupation de la niche écologique par le microbiote avec consommation des facteurs biotiques et abiotiques, la sécrétion de bactériocines par les bactéries du microbiote, la production d'AGCC capables de perturber l'équilibre acido-basique intracellulaire des bactéries ou encore la libération de toxines par les souches équipées de

système de sécrétion. Tous ces mécanismes ont pour but d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes opportunistes (Buffie et Pamer 2013). Les mécanismes indirects correspondent aux interactions entre le microbiote et le système immunitaire, avec dans un premier temps une implication du microbiote dans le développement et la maturation du système immunitaire puis un rôle dans la stimulation des défenses mais aussi dans la régulation de la réponse et le maintien de la tolérance (Buffie et Pamer 2013).

Peu de données sont disponibles sur les mécanismes de résistance à la colonisation au niveau du microbiote pulmonaire. Quelques études se sont intéressées à cette question concernant le microbiote de la cavité nasale et les auteurs ont pu montrer que les souches commensales de Staphylocoques du microbiote nasal produisent des anti-microbiens qui réguleraient la colonisation par des bactéries pathogènes (Janek et al. 2016). De plus, une autre équipe a montré qu'une souche commensale de Staphylocoques, *Staphylococcus lugdunensis*, produit un peptide cyclique, la lugdunine, inhibant la colonisation de la muqueuse nasale par *Staphylococcus aureus* (pathogène opportuniste) ainsi qu'une corrélation négative entre la présence de *Staphylococcus lugdunensis* et le portage de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) chez l'Homme (Zipperer et al. 2016).

3-4-3 Participation aux réponses anti-infectieuses

Associé à son action directe pour empêcher la colonisation par des microorganismes pathogènes, le microbiote a aussi un rôle dans le déclenchement des réponses immunitaires innées et adaptatives lors d'épisodes infectieux ou inflammatoires.

Une étude de 2013 a montré que les souris élevées dans un environnement contrôlé (dites EOPS pour Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique) sont plus sensibles à l'infection par le virus de la grippe que des souris élevées dans un environnement conventionnel (non EOPS) et naturellement porteuses de *S. aureus* dans leurs voies aériennes (Wang et al. 2013). La colonisation des voies aériennes des souris EOPS par *S. aureus* a permis de diminuer la létalité de l'infection par le virus de la grippe, en réduisant l'intensité de la pathologie inflammatoire associée à cette infection virale. Les auteurs ont montré que la colonisation par *S. aureus* avant l'infection grippale a permis le recrutement de monocytes périphériques CCR2⁺CD11b⁺ responsable de l'orientation des MA vers un profil M2, inhibant l'exacerbation de la réponse inflammatoire à l'origine de la létalité de cette infection. Ce modèle suggère l'implication directe de certaines bactéries constitutives du microbiote pulmonaire dans l'intensité de la réponse immunitaire générée lors d'une infection (Wang et al. 2013).

Dans un autre modèle murin, la déplétion du microbiote a altéré la réponse immunitaire innée précoce face à l'infection pulmonaire par *Klebsiella pneumoniae*, en réduisant son élimination par les MA. Cette déficience est corrigée par l'administration orale de ligands des récepteurs de type NLR (NOD1 et NOD2), mais non par des ligands des récepteurs TLR (Clarke, 2014). De plus, seuls les ligands NLR d'origine intestinale ont permis de restaurer les défenses pulmonaires de l'hôte. En utilisant des modèles de colonisation par des bactéries commensales chez des souris axéniques ou traitées par des antibiotiques, les auteurs ont identifié plusieurs espèces bactériennes fortement stimulatrices des récepteurs NLR, notamment *S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis* dans les voies respiratoires supérieures, ainsi que *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus crispatus* et *Clostridium orbiscindens* dans le microbiote intestinal. Ces souches favorisent la résistance aux

infections pulmonaires par l'activation de NOD2 et la production de GM-CSF. La production accrue de GM-CSF pulmonaire en réponse à l'infection est initiée par le microbiote *via* l'IL-17A (Brown et al., 2017).

Ces travaux démontrent que les signaux microbiens d'origine pulmonaire ou intestinale jouent un rôle déterminant dans l'induction des défenses antibactériennes à distance, en particulier dans le poumon. Les auteurs ont également identifié les espèces bactériennes impliquées, ainsi que les cytokines et les types cellulaires mobilisés au cours de la réponse immunitaire innée pulmonaire.

3-4-4 Education du système immunitaire inné et adaptatif

Le rôle protecteur du microbiote va au-delà de l'effet de barrière et de déclenchement des réponses immunitaires lors d'infection. En effet, les micro-organismes qui colonisent rapidement la muqueuse pulmonaire contribuent à l'éducation et à la maturation du système immunitaire (**Figure 24**).

L'étude de Marquant *et al.* montre que des souris axéniques exposées à du LPS ont une réaction inflammatoire pulmonaire plus importante que des souris EOPS (Marquant et al. 2021). Dans la même étude, les MA issus de souris axéniques exposés à différents ligands de récepteurs de type « Toll Like » (TLR) ou au VRS présentent une réponse inflammatoire plus importante que ceux issus de souris EOPS, suggérant que le microbiote pulmonaire présent chez les souris EOPS est associé à une tolérance du système immunitaire inné vis-à-vis des stimuli exogènes (Marquant et al. 2021).

L'étude de Gollwitzer *et al.*, publiée en 2014 a montré que des souriceaux nouveau-nés exposés dès la naissance à un mélange de poussières et acariens développent une réponse immunitaire de type allergique exacerbée par rapport à des souriceaux juvéniles ou des souris adultes (Gollwitzer et al. 2014). Les auteurs ont pu montrer qu'entre ces différents âges, la charge bactérienne pulmonaire augmente et que la répartition entre les différents phyla est aussi modifiée, avec l'apparition de nouvelles espèces. Ils se sont également intéressés aux différentes populations de cellules immunitaires présentes et ont pu relever l'apparition d'une population de Lc T reg, dans les poumons des individus ayant un microbiote diversifié et présentant des symptômes allergiques moindres. Ces résultats ont pu être confirmés à l'aide d'un modèle de souris sans microbiote, qui présente une réponse allergique exacerbée y compris à l'âge adulte. Les mêmes résultats ont été obtenus après blocage du récepteur PD-L1 permettant le développement des Lc T reg, faisant le lien entre la colonisation par le microbiote, l'apparition d'une population de cellules immunitaires régulatrices et la capacité des animaux à élaborer une réponse immunitaire adaptée de type tolérogène (Gollwitzer et al. 2014).

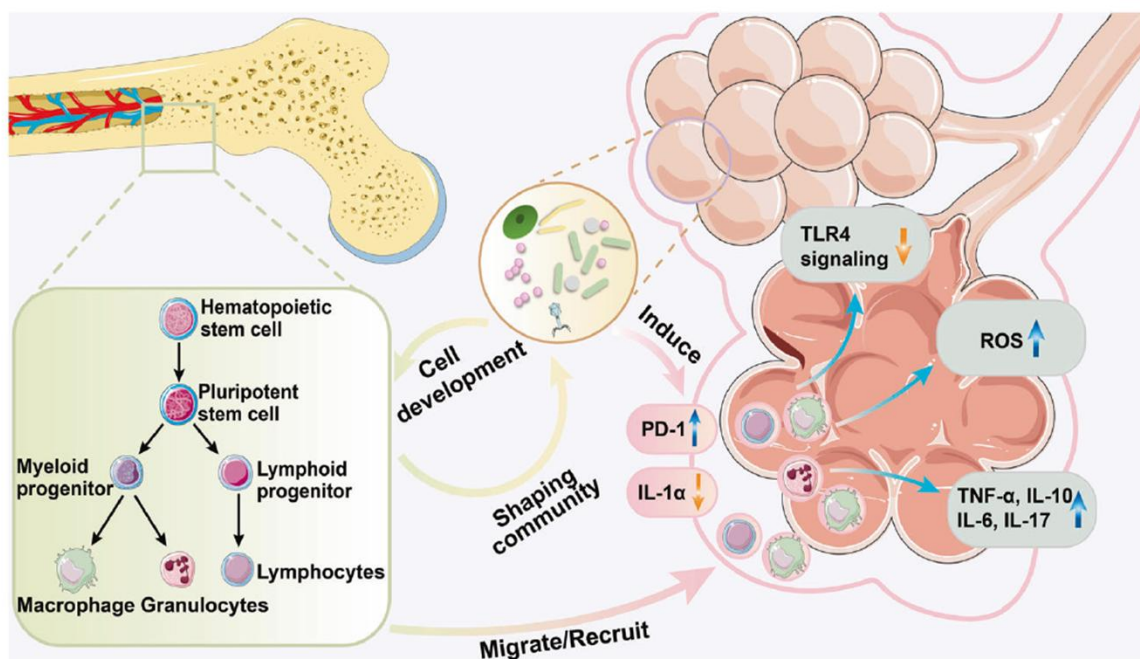


Figure 24 : Représentation schématique de l'impact du microbiote pulmonaire sur l'homéostasie de la muqueuse pulmonaire. Le microbiote peut être détecté dans le tractus respiratoire foetal dès les premiers stades de la vie. A mesure que l'hôte grandit, le microbiote et le système immunitaire inné évoluent et se perfectionnent. Le microbiote favorise la croissance des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse, lesquelles se différencient pour produire des cellules immunitaires compétentes, pouvant migrer ou être recrutées vers les poumons, pouvant à leur tour réguler la composition du microbiote ainsi que participer aux réponses immunitaires innées et adaptatives au sein de la muqueuse pulmonaire. Le microbiote pulmonaire peut participer à l'immunité innée et adaptative en augmentant l'expression de PD-L1 et en diminuant celle de l'IL-1 α . Le microbiote pulmonaire peut également promouvoir l'activité antimicrobienne des macrophages *via* les espèces réactives de l'oxygène, induire la production de cytokines (TNF- α , IL-6, IL-10 et IL-17) par les cellules immunitaires, ou inhiber la signalisation du TLR4. Ainsi, les altérations du microbiote pulmonaire peuvent contribuer soit à l'activation, soit à la suppression des réponses immunitaires (Li et al. 2024).

Conclusion :

Les différentes études menées sur le microbiote pulmonaire démontrent son importance dans le maintien de la santé de l'hôte. Ce microbiote participe à la structuration de l'architecture des alvéoles pulmonaires, protège la muqueuse en favorisant la tolérance immunitaire et module les capacités de réponse des cellules immunitaires. Les premières bactéries apparaissent précocement, dès l'exposition de l'individu à l'environnement extérieur. Bien que la charge microbienne initiale soit faible, la diversité bactérienne s'accroît rapidement, sous l'influence directe des expositions environnementales relayées par le microbiote buccal.

Contrairement au microbiote intestinal, connu pour sa grande stabilité, celui du poumon est soumis à une migration continue de micro-organismes, avec potentiellement de nouvelles espèces qui sont introduites ou éliminées, selon leur capacité à coloniser l'environnement pulmonaire. La pression de sélection est exercée par les facteurs abiotiques locaux, les mouvements muco-ciliaires ainsi que par le système immunitaire pulmonaire, lui-même sous influence de paramètres extérieurs au poumon tel que le microbiote intestinal. De plus en plus d'études s'intéressant à l'impact des pathologies respiratoires sur la composition du microbiote pulmonaire ont pu faire le lien entre dysbioses et maladie pulmonaire. Les résultats de ces études offrent de nouvelles perspectives

thérapeutiques en prévention ou en traitement, soit en ciblant directement le microbiote pulmonaire, soit indirectement *via* le microbiote intestinal.

4- Conséquences des infections respiratoires sur le microbiote : un déséquilibre aux multiples facettes

Le microbiote pulmonaire reflète étroitement l'état de santé des poumons. En effet, de nombreuses études montrent que la composition bactérienne et l'environnement pulmonaire subissent des modifications profondes lors de l'apparition de maladies respiratoires (**Figure 25**) (Chai et al. 2021; Alsayed et al. 2023; O'Dwyer et al. 2019; Wang et al. 2021; McCauley et al. 2019). Par ailleurs, il est désormais établi que les poumons et l'intestin sont en interaction permanente à travers un dialogue bidirectionnel, et qu'un déséquilibre du microbiote de l'un ou l'autre de ces compartiments (dysbiose) peut favoriser l'émergence et la progression de pathologies à distance (Sencio et al. 2021). Cette partie est consacrée aux données relatives aux perturbations des écosystèmes microbiens en contexte infectieux, dans les modèles animaux et chez l'Homme.

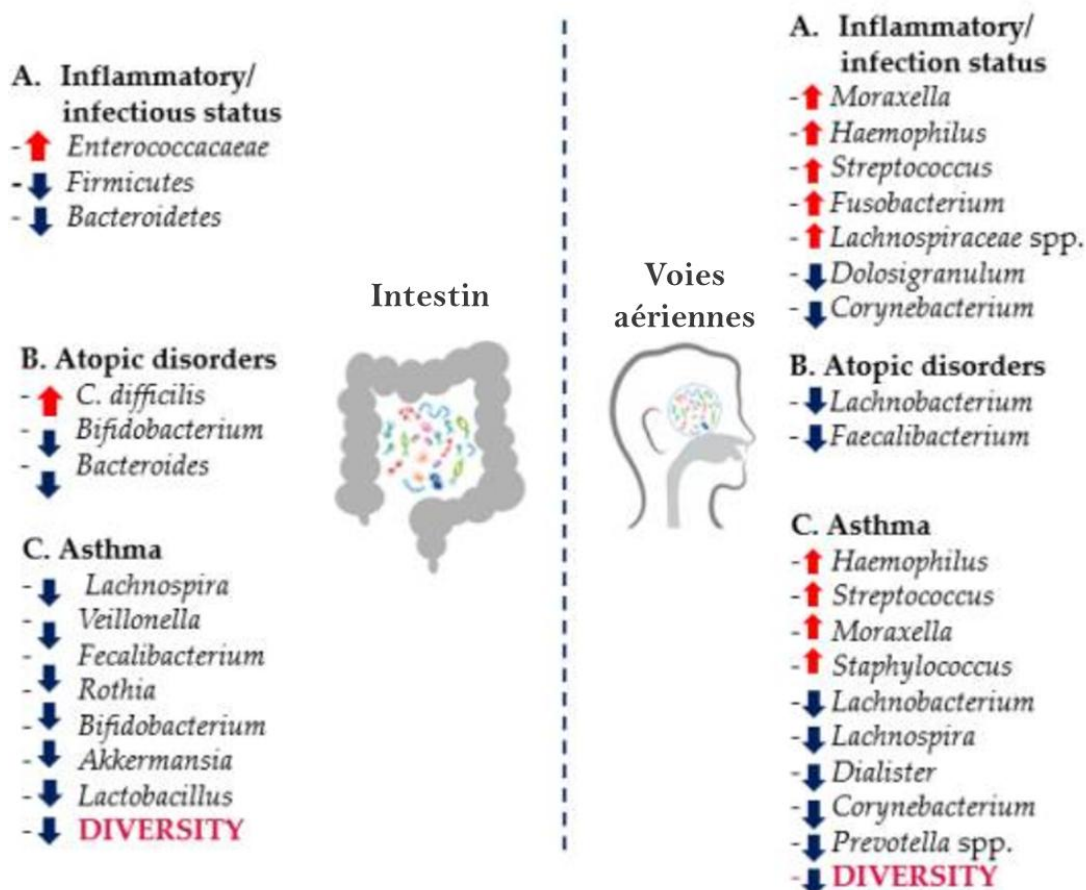


Figure 25 : Synthèse des principales corrélations entre les variations de l'abondance relative des micro-organismes des microbiotes intestinaux et respiratoires chez l'enfant lors d'infections respiratoires, d'allergies ou d'asthme. (flèches rouges : augmentation, flèches bleues : diminution) (Ballarini et al. 2021).

4-1 Dysbiose des voies aériennes et vulnérabilité pulmonaire

Dans les voies respiratoires, la dysbiose se manifeste principalement par une prédominance des familles bactériennes *Moraxellaceae*, *Pasteurellaceae* et *Streptococcaceae*, accompagnée d'une diminution notable des *Staphylococcaceae*. La composition du microbiote respiratoire est modulée par divers facteurs, parmi lesquels l'âge, les affections respiratoires et l'utilisation d'antimicrobiens sont les plus étudiés.

4-1-1 Réduction des commensaux protecteurs

Le microbiote des voies respiratoires est reconnu pour son rôle ambivalent dans les infections respiratoires virales, pouvant à la fois conférer une protection ou, au contraire, favoriser l'apparition des infections et de leurs complications. Les mécanismes sous-jacents sont activement étudiés. Un microbiote dominé par *Dolosigranulum* et *Corynebacterium* semble exercer un effet protecteur en début de vie, tandis qu'une forte abondance relative de *Moraxella*, *Haemophilus* et *Streptococcus* est associée à un risque accru d'infections respiratoires et de séquelles inflammatoires (Teo et al. 2015). Ce profil microbien pourrait être lié à des infections précoces plus sévères, à des maladies respiratoires avec sifflements et à un risque ultérieur de développement de l'asthme (Teo et al. 2015). L'étude de Bosch *et al.* a mis en évidence que les enfants ayant eu un nombre élevé d'infection respiratoire au cours de leur première année de vie présentent dès le premier mois une trajectoire de maturation microbienne anormale, comparativement aux enfants ayant eu moins de deux infections par an. Ces enfants ont une moindre stabilité de leur microbiote, une réduction prolongée de *Corynebacterium* et *Dolosigranulum*, ainsi qu'un enrichissement précoce en *Moraxella* (Bosch et al. 2017).

De manière similaire, les travaux de Robinson *et al.* ont observé que les bactéries les plus fréquemment isolées chez les enfants présentant des sifflements respiratoires étaient *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*. Par ailleurs, les auteurs ont identifié un cluster dysbiotique dominé par *Moraxella*, associé à une réponse inflammatoire neutrophilique au niveau des voies respiratoires, tandis qu'un cluster dit « mixte », enrichi en *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria* et *Porphyromonas*, est associé à un infiltrat cellulaire dominé par les macrophages et les lymphocytes (Robinson et al. 2019). Une autre étude a comparé le microbiote respiratoire de patients infectés par le virus de la grippe à celui de sujets non infectés, mais démographiquement comparables (Leung et al. 2013). Cette étude a mis en évidence des altérations microbiennes associées à une diminution de l'activité mucociliaire et à une réduction de la production de métabolites immunomodulateurs. Ces modifications contribuent à une réponse immunitaire affaiblie chez les patients infectés, corrélée à une évolution clinique défavorable (Leung et al. 2013).

4-1-2 Enrichissement en bactéries pathogènes ou inflammatoires

Les infections virales peuvent favoriser un portage élevé dans les voies respiratoires supérieures de *Streptococcus pneumoniae*, dont la présence a été associée à des complications respiratoires dues à sa possible dissémination vers l'oreille moyenne ou les voies respiratoires inférieures. Par conséquent, l'interaction entre les virus respiratoires (VRS, rhinovirus et grippe) et le microbiote respiratoire au moment de l'infection peut moduler la réponse immunitaire, affectant

potentiellement le cours de la maladie (gravité, récurrences et sur-infections bactériennes) et la santé respiratoire à long terme (Rosas-Salazar et al. 2016). La prédominance de certains genres ou espèces du microbiote des voies respiratoires est associée soit à une protection, soit à une morbidité plus élevée ou à un risque accru de complications respiratoires, (pour revue (Pichon et al. 2017)). Les espèces associées à une protection contre les infections virales sévères des voies respiratoires incluent principalement *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus rhamnosus*, *Veillonella*, *Escherichia coli* et *Prevotella spp.*, tandis que celles associées aux complications incluent *Haemophilus spp* (principalement *Haemophilus influenzae*), *Streptococcus*, *Moraxella*, *Fusobacterium* et *Lachnospiraceae spp.* *Haemophilus influenzae* est non seulement associé à des complications, mais aussi à un risque accru de nouvelles infections virales. Ce mécanisme semble lié à l'augmentation de l'expression d'ICAM-1, un récepteur membranaire des rhinovirus, par les cellules épithéliales bronchiques, favorisant l'adhérence virale et augmentant la virulence. Un microbiote nasopharyngé dominé par *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* chez des patients asymptomatiques est également associé à un risque accru d'infection par VRS et de maladies respiratoires sifflantes (Teo et al. 2015). La gravité et la morbidité de telles infections sont principalement dues à une réponse inflammatoire exagérée de l'hôte (augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans les voies respiratoires et systémiques). Cela a été observé dans une étude de cohorte d'enfants de moins de deux ans, où la prédominance de *Haemophilus* et *Streptococcus* dans le microbiote respiratoire est associée à une surexpression des gènes codant pour les TLR ainsi que des gènes impliqués dans les réponses des neutrophiles pendant les infections VRS (de Steenhuijsen Piters et al. 2016).

4-1-3 Conséquences cliniques et implications immunitaires

D'une part, la composition du microbiote respiratoire au cours de la période néonatale et infantile influence l'évolution des infections des voies respiratoires supérieures (IVRS) vers les voies respiratoires inférieures, la sévérité des épisodes infectieux ainsi que le risque ultérieur de développer des pathologies respiratoires chroniques telles que les sifflements récurrents ou l'asthme. D'autre part, la fréquence et la répétition des IVRS altèrent durablement l'équilibre d'un microbiote nasopharyngé sain, contribuant à l'instauration de cycles répétitifs de déséquilibres (Teo et al. 2015). Par ailleurs, des signatures microbiennes spécifiques à certains virus respiratoires ont été identifiées, révélant des profils taxonomiques distincts lors des infections par le VRS ou les rhinovirus, les deux agents viraux les plus fréquemment impliqués. Il reste toutefois difficile de déterminer si ces altérations du microbiote précèdent l'infection virale ou en sont la conséquence. Plusieurs données expérimentales soutiennent l'hypothèse selon laquelle les infections virales induiraient des modifications du microbiote nasopharyngé, en augmentant notamment l'adhérence bactérienne et la colonisation secondaire (pour revue (Tregoning et Schwarze 2010; Rossi et al. 2020)).

4-2 Infections respiratoires et dysbiose intestinale

4-2-1 Caractéristiques générales de la dysbiose intestinale

Bien que les mécanismes sous-jacents à la dysbiose intestinale ne sont que partiellement élucidés, il est établi que celle-ci perturbe la tolérance immunitaire muqueuse. Dans un microbiote intestinal équilibré, les *Firmicutes* prédominent sur les *Bacteroidetes*, alors que l'inversion de ce

rapport est fréquemment observée en cas de dysbiose selon les études épidémiologiques. Ce changement relatif se traduit par une diminution de la production d'AGCC et une élévation de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8 et le TNF α (Claassen et al. 2013). Plusieurs pathologies, incluant la maladie de Crohn, les affections inflammatoires de l'intestin, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, la sclérose en plaques, la dermatite atopique, le psoriasis, ainsi que les maladies pulmonaires chroniques (notamment l'asthme associé à un risque accru d'infections respiratoires) et divers troubles métaboliques (état prédiabétique, résistance à l'insuline et obésité), ont ainsi été associées à ces altérations de la tolérance immunitaire (pour revue (Sekirov et al. 2010).

Chez le jeune enfant, la dysbiose intestinale se manifeste par une réduction de la diversité microbienne individuelle, un retard dans la colonisation par les bactéries anaérobies strictes et une prolifération accrue de pathogènes opportunistes, notamment les entérobactéries et les entérocoques (Hill et al. 2017). Une étude conduite par Li *et al.* chez des enfants présentant des infections respiratoires récurrentes (IRR) a mis en évidence des altérations significatives dans la composition du microbiote intestinal, affectant six phylums (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* et *Tenericutes*) ainsi que quatre genres bactériens (*Enterococcus*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* et *Eubacterium*). Plus précisément, une abondance significativement plus élevée d'*Enterococcus* est observée chez les enfants atteints d'IRR, tandis que les genres *Eubacterium*, *Faecalibacterium* et *Bifidobacterium* sont significativement appauvris dans ce groupe (L. Li et al. 2019).

Il a été montré que les infections virales respiratoires modifient le microbiote intestinal en réduisant sa diversité microbienne (**Figure 25**) et en altérant la production d'AGCC, ce qui peut favoriser la prolifération secondaire de pathogènes et l'inflammation (Sencio et al. 2020; Groves et al. 2018). Les cellules immunitaires, les cytokines et les métabolites microbiens peuvent ainsi transiter par les systèmes sanguin et lymphatique depuis le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) vers le tissu lymphoïde associé aux bronches (BALT), modulant les défenses de l'hôte contre les infections respiratoires (Hu et al. 2024; L. Li et al. 2019). Ainsi, la dysbiose intestinale peut aggraver la sévérité des infections respiratoires, tandis que les infections pulmonaires peuvent altérer la santé intestinale, soulignant le caractère bidirectionnel et dynamique de l'axe intestin–poumon.

4-2-2 Effet à distance des dysbioses microbiennes : implication de l'axe intestin-poumon

L'axe intestin–poumon correspond à l'interaction entre le système gastro-intestinal et le système respiratoire (**Figure 26**). Cette interaction, principalement médiée par le microbiote intestinal, est réalisée par des voies directes et indirectes. Les voies directes incluent la déglutition de mucus et l'aspiration du contenu gastro-œsophagien, tandis que les voies indirectes impliquent la circulation de cellules immunitaires, de cytokines ou de métabolites et fragments bactériens par voie sanguine (pour revue El-Khoury et al. 2025; Bassis et al. 2015; Huang et al. 2018; Trompette et al. 2014). Parmi les métabolites bactériens, les AGCC, produits par le microbiote intestinal, occupent une place majeure. Ils favorisent l'hématopoïèse et influencent l'environnement immunitaire pulmonaire en stimulant la prolifération de précurseurs des macrophages et des CD (Trompette et al. 2014). En outre, les AGCC atténuent l'inflammation pulmonaire en réduisant les réponses Th2 et en stimulant l'activité des Lc T reg (Trompette et al. 2014). Le microbiote intestinal joue ainsi un rôle

critique dans l'équilibre entre la tolérance immunitaire vis-à-vis des micro-organismes commensaux et le maintien d'une réponse immunitaire efficace contre les agents pathogènes envahissants.

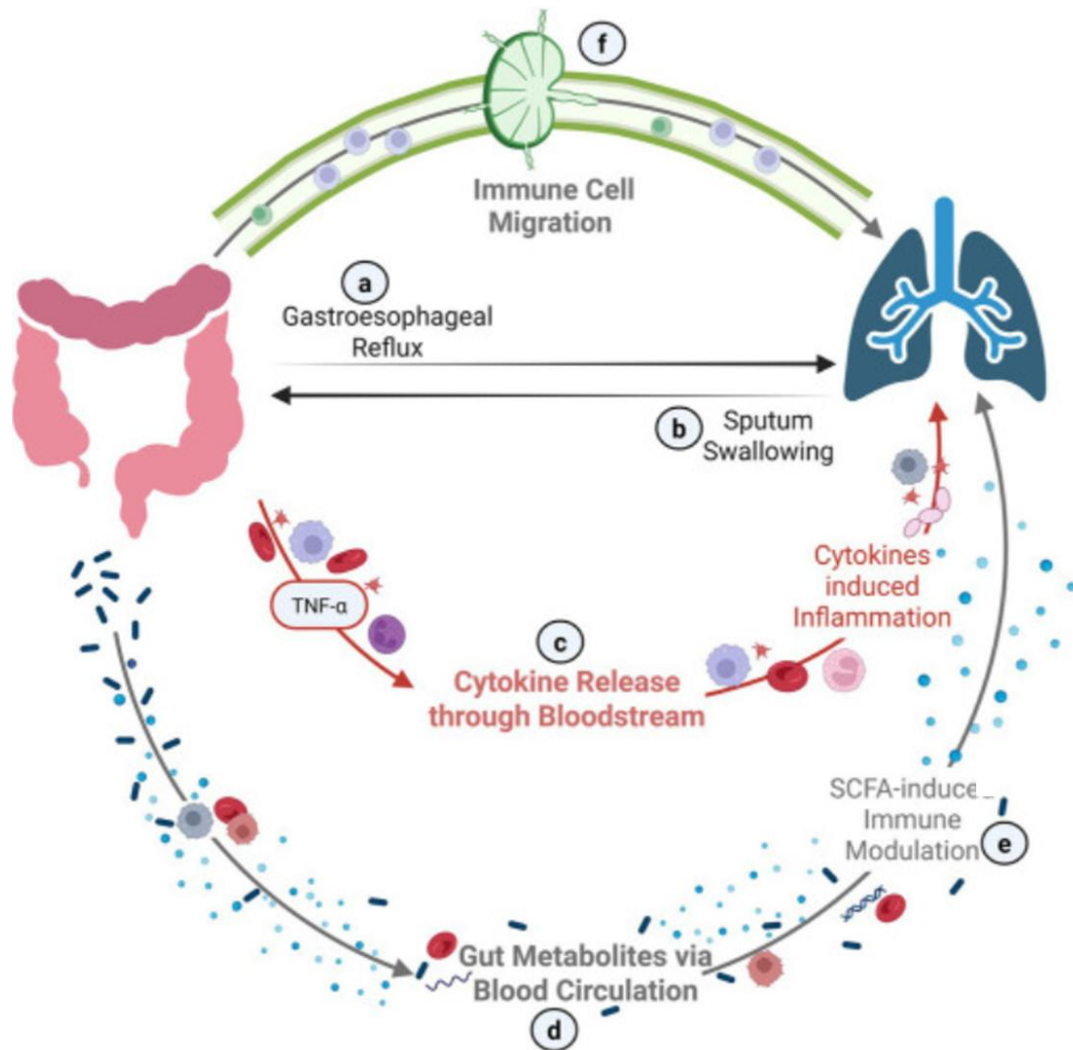


Figure 26 : Représentation schématique des principales interactions composant l'axe intestin-poumon.

La communication bidirectionnelle entre le tractus gastro-intestinal et les poumons fonctionne par des mécanismes directs tels que le reflux gastro-intestinal (a) et la déglutition de mucus (b) et par des voies indirectes impliquant la circulation systémique de cytokines (c), de métabolites (d) et des cellules immunitaires (f). Les signaux inflammatoires d'origine intestinale (TNF α , IL-6) peuvent aggraver l'inflammation pulmonaire (c), tandis que les métabolites dérivés de l'intestin, dont les AGCC, soutiennent le développement de Lc T reg et modulent l'activité des macrophages (e), participant à l'homéostasie pulmonaire. De plus, des bactéries commensales peuvent être phagocytées par les CD de la muqueuse intestinales. Après migration (f), les CD peuvent stimuler les Lc T pulmonaires et ainsi influencer l'environnement immunitaire. En modulant l'immunité, ce dialogue inter-organes participe autant à l'homéostasie qu'aux processus pathologiques comme les infections ou les maladies inflammatoires (AGCC : acides gras à chaîne courte ; TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha ; IL : interleukine ; Treg : lymphocyte T régulateur) (adapté à partir de Haldar et al. 2023).

Des études ont montré que les réponses antivirales des Lc T CD4⁺ et CD8⁺, ainsi que celles des Lc B, sont modulées par le microbiote intestinal. Un déséquilibre de ce dernier peut perturber la libération de cytokines et altérer la migration des CD chez des souris infectées par le virus de la grippe (Sencio et al. 2020). À l'aide d'un modèle murin d'infection par le virus de la grippe, Wang et al. ont montré que chez la souris, une infection par voie intranasale entraîne des lésions intestinales

suite à l'activation de Lc T CD4⁺ pulmonaire. Ces Lc T surexprimant CCR9 migrent vers l'intestin grêle, où ils sécrètent de l'IFN γ perturbant l'homéostasie du microbiote intestinal. Ces effets peuvent prédisposer à des infections entériques secondaires (Wang et al. 2014). Ainsi, la dysbiose intestinale peut aggraver la sévérité des infections respiratoires, tandis que les infections pulmonaires peuvent altérer la santé intestinale, soulignant le caractère bidirectionnel et dynamique de l'axe intestin-poumon. Bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore complètement élucidés, cet axe joue vraisemblablement un rôle central dans la présentation et l'évolution des maladies. Cela a suscité un intérêt croissant pour la compréhension des modifications du microbiote intestinal lors des infections virales respiratoires et leur potentiel en tant que cibles thérapeutiques (Groves et al. 2018; 2020; Gu et al. 2020; Tao et al. 2020; Wu et al. 2021; Khan et al. 2021; Li et al. 2021; Yeoh et al. 2021; Gaibani et al. 2021; Newsome et al. 2021; Cao et al. 2021; Hazan et al. 2022; Xu et al. 2022; Nagata et al. 2023; de Nies et al. 2023; Xu et al. 2021; Romani et al. 2022; Nashed et al. 2022; Suskun et al. 2022; Gutiérrez-Díaz et al. 2023; Qin et al. 2015; Gierse et al. 2021; Chen et al. 2023; Harding et al. 2020).

Bien que les bactéries commensales jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie au niveau intestinal, leur implication dans les réponses immunitaires des autres surfaces muqueuses est moins bien caractérisée. Une étude récente s'est intéressée à la contribution du microbiote intestinal dans l'initiation de l'immunité adaptative à la suite d'une infection respiratoire par le virus de la grippe. Les auteurs ont mis en évidence qu'un microbiote intestinal intact est indispensable à l'induction de la réponse Th1, à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et à la production d'IgA en réponse à l'infection. Ainsi, certaines espèces bactériennes intestinales spécifiques se révèlent essentielles au bon fonctionnement de l'immunité pulmonaire. Leur effet protecteur s'exerce notamment par leur capacité à induire, dès l'état basal, une activation efficace de l'expression des cytokines pro-IL-1 β et pro-IL-18 dans des modèles animaux (pour revue (Roquilly et al. 2019).

4-3 Infection VRS et dysbiose

Dans un modèle murin adulte infecté par le VRS, une modification de la diversité du microbiote intestinal a été observée, caractérisée par une augmentation des *Bacteroidetes* et une diminution des *Firmicutes*. L'élévation des *Bacteroidetes* était principalement liée aux *Bacteroidaceae*, tandis que la réduction des *Firmicutes* résultait d'une baisse des *Lachnospiraceae* et des *Lactobacillaceae* (Groves et al. 2018). Une étude plus récente a montré que la réponse immunitaire cellulaire induite par une infection pulmonaire avec le VRS ou le virus de la grippe entraîne une perte d'appétit, laquelle modifie secondairement le microbiote et le métabolome intestinaux. Les auteurs ont constaté que l'élimination des Lc T CD8⁺ prévient la diminution de la prise alimentaire et inverse les altérations du microbiote, probablement via la sécrétion de TNF α . En effet, la neutralisation de cette cytokine pendant l'infection avec le VRS limite la perte de poids et réduit la perturbation du microbiote (Groves et al. 2020).

Ngo *et al.* ont récemment montré que la colonisation intestinale par une seule espèce bactérienne commune, les bactéries filamenteuses segmentées, peut reprogrammer les MA en renforçant leur prolifération, leur production de complément et leur capacité phagocytaire. Cette modulation se traduit par une meilleure protection contre les infections virales respiratoires (Ngo et al. 2024).

4-4 Le microbiote comme stratégie d'intervention : immunomodulation

L'administration de microorganismes (probiotiques)¹², de substances favorisant leur croissance (prébiotiques)¹³ ou de métabolites microbiens (postbiotiques)¹⁴ peut renforcer la protection de l'hôte lors d'infections respiratoires. Cette action repose sur la compétition directe avec les agents pathogènes, l'amélioration des fonctions de la barrière épithéliale ou encore la modulation de la réponse immunitaire (Trompette et al. 2018; Alexandre et al. 2014).

De nombreuses études (**Tableau 3**) ont évalué les effets des probiotiques dans les infections virales respiratoires chez l'animal adulte ou juvénile. L'administration orale de souches, appartenant essentiellement aux genre *Lactobacillus spp* ou *Bifidobacterium spp*, avant une infection par le virus de la grippe ou le VRS permet d'améliorer la survie ou d'atténuer les symptômes de ces infections (Song et al. 2016; Nakayama et al. 2014; Arai et al. 2018; Kawahara et al. 2015; Mahooti et al. 2019). Sur le plan mécanistique, l'ingestion de probiotiques semble induire des réponses protectrices au niveau pulmonaire en activant les cellules immunitaires et en modulant le profil de production des cytokines et chimiokines, avec des effets fortement dépendants de la souche utilisée (Wang et al. 2022). Ainsi, plusieurs travaux ont rapporté (1) une augmentation de l'activité des Lc NK (Goto et al. 2013; Belkacem et al. 2017; Kawahara et al. 2015), (2) une diminution de l'infiltration par des cellules inflammatoires (Nakayama et al. 2014; Belkacem et al. 2017; Kawahara et al. 2015; Mahooti et al. 2019; Song et al. 2016), (3) une diminution de l'IL-6 (Eguchi et al. 2019; Mahooti et al. 2019; Kawahara et al. 2015; Nakayama et al. 2014), (4) une augmentation des IFN-I (Goto et al. 2013; Eguchi et al. 2019; Wang et al. 2022), de l'IL-1 β (Belkacem et al. 2017; Goto et al. 2013; Wang et al. 2022) ainsi (5) qu'une élévation des titres d'IgG spécifiques du virus dans le LBA (Mahooti et al. 2019). L'administration par voie intranasale de *Lactobacillus rhamnosus GG* (Harata et al. 2010) est associée à une élévation de l'IL-1 β , de MCP-1 et du TNF α alors que son administration par voie orale entraîne une augmentation de l'IL-12 et de l'IFN γ (Song et al. 2016). Toutefois, les mécanismes d'action des probiotiques chez l'Homme restent à clarifier. Bien que leur profil de sécurité soit globalement considéré comme satisfaisant, leur utilisation pourrait exposer les individus vulnérables à un risque accru d'infection ou de complications. L'une des principales préoccupations concernant l'utilisation de probiotiques vivants est le risque de translocation des bactéries de l'intestin vers les ganglions drainants puis dans la circulation sanguine, entraînant une bactériémie. Ce risque concerne surtout les patients en état critique et les populations pédiatriques (Besselink et al. 2008; Land et al. 2005). Cette incertitude contribue à l'intérêt croissant porté aux micro-organismes non viables. Des modèles animaux ont d'ailleurs confirmé les effets protecteurs de probiotiques inactivés par la chaleur, bien que globalement moins marqués que ceux des souches vivantes (Goto et al. 2013).

Le microbiote intestinal contribue également à la régulation des réponses immunitaires *via* la production d'AGCC. L'apport en fibres alimentaires fermentescibles (prébiotiques), qui stimule la diversité et l'activité de certaines bactéries symbiotiques, module la production de métabolites

¹² Probiotiques : « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte »

¹³ Prébiotiques : « substrats qui sont sélectivement utilisés par les micro-organismes de l'hôte, conférant un bénéfice pour la santé »

¹⁴ Postbiotiques : « Préparations de microorganismes inanimés (non-viables) et/ou de leurs composants qui confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte »

(Jung et Mosca, 2024, groupe francophone d'hépatologie-gastroentérologie et nutrition pédiatriques.)

microbiens et influence la réponse de l'hôte aux infections. Ainsi, un régime enrichi en inuline fermentescible confère une protection contre le virus de la grippe par deux voies complémentaires : une stimulation de la production médullaire de macrophages de type M2, moins aptes à recruter les PNN dans les voies respiratoires, limitant ainsi les lésions tissulaires et une activation des lymphocytes T CD8⁺ par le butyrate, *via* le récepteur FFAR3 (Trompette et al. 2018). De manière similaire, un régime riche en pectine fermentescible protège contre le VRS en stimulant la réponse IFN-I dans les cellules épithéliales pulmonaires, mécanisme médié par l'acétate *via* GPR43, le récepteur aux AGCC (Antunes et al. 2019). L'acétate administré par voie intranasale renforce également les réponses dépendantes des IFN et réduit la charge virale pulmonaire au cours d'une infection par le rhinovirus (Antunes et al. 2023).

Enfin, la désaminotyrosine, métabolite dérivé de la dégradation des flavonoïdes alimentaires par *Clostridium orbiscindens*, peut atteindre les poumons et renforcer l'immunité antivirale contre le virus de la grippe. Elle agit en activant la production des IFN-I par les MA (Steed et al. 2017). Un essai clinique a montré que l'administration de prébiotiques (galacto-oligosaccharides et polydextrose) chez le nouveau-né permet de prévenir les infections respiratoires virales plus efficacement que les probiotiques, probablement grâce à une stimulation directe de la croissance des bactéries bénéfiques déjà présentes (Luoto et al. 2014).

Tableau 3 : Effets des stratégies microbiennes thérapeutiques dans les infections virales respiratoires

Traitement	Voie d'administration	Modèle infectieux	Effets observés sur les animaux traités	Référence
Probiotiques				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M21	Orale	Adulte / Grippe	+ survie - charge virale - inflammation + IgA	(Song et al. 2016)
<i>Lactobacillus gasseri</i> SBT2055	Orale	Adulte / Grippe	- charge virale - inflammation + expression Mx1 Oas1 + IgA	(Nakayama et al. 2014)
<i>Bifidobacterium longum</i> MM-2	Orale	Adulte / Grippe	+ survie - charge virale - inflammation + activation Lc NK	(Kawahara et al. 2015)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Orale	Adulte / Grippe	+ survie - inflammation + équilibre Th1/Th2	(Mahooti et al. 2019)
<i>Lactobacillus mucosae</i> M104R01L3	Orale	Adulte / VRS	- charge virale - inflammation + IFN β TNF α	(Wang et al. 2022)
<i>Lactobacillus mucosae</i> DCC1HL5	Orale	Adulte / VRS	- charge virale - inflammation + IL-1 β IL-10	(Wang et al. 2022)
<i>Lactobacillus mucosae</i> 1,025	Orale	Adulte / VRS	- charge virale + AGCC	(Wang et al. 2022)

<i>Lactobacillus acidophilus</i> L-92	Orale	Adulte / Grippe	- charge virale + eotaxin, M-CSF, IL1 β RANTES, IFN α + activation Lc NK	(Goto et al. 2013)
<i>Lactobacillus paracasei</i> CNCM I-1518	Orale	Adulte / Grippe	+ survie - charge virale - inflammation + IL1 α IL1 β Lc NK	(Belkacem et al. 2017)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	Orale	Adulte / VRS	- charge virale + IFN-I et IFN γ	(Garcia-Castillo et al. 2020)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	Orale	Néonatal / poly(I :C)	- charge virale + Lc T CD3 ⁺ CD4 ⁺ IFN γ ⁺	(Chiba et al. 2013)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	Nasale	Néonatal / VRS	- charge virale + IFN γ	(Tomosada et al. 2013)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1506	Nasale	Néonatal / VRS	- charge virale + IFN α IFN β IL-6	(Tomosada et al. 2013)
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> 090104	Nasale	Néonatal / VRS puis <i>Streptococcus pneumoniae</i>	- charge virale + Lc T CD3 ⁺ CD4 ⁺ IFN γ ⁺ + Lc T CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL-10 ⁺ + MA CD11c ⁺ SiglecF ⁺ IFN- β ⁺	(Kanmani et al. 2017)
Postbiotiques				
OM-85	Nasale	Adulte / VRS	- charge virale - inflammation + équilibre Th1/Th2	(Antunes et al. 2022)
AGCC	Orale	Adulte / Grippe	+ MA de type M2 + activation Lc T CD8 ⁺	(Trompette et al. 2018)
AGCC (Acétate)	Orale	Adulte / VRS	- charge virale - inflammation + ISG + IFN β	(Antunes et al. 2019)
Prébiotiques				
Désaminotyrosine	Orale	Adulte / Grippe	- charge virale - inflammation + IFN-I et ISG	(Steed et al. 2017)
Galacto- oligosaccharides :polydextrose	Orale	Néonatal / IRV	- incidence infections respiratoires virales (surtout rhinovirus)	(Luoto et al. 2014)

B. OBJECTIFS DE LA THESE

Au cours de ma thèse nous avons cherché à démontrer que la mise en place du microbiote pulmonaire dès la naissance influence l'orientation de la réponse immunitaire de l'hôte et contribue ainsi à la susceptibilité du jeune aux infections virales. Cette problématique a été abordée selon deux axes principaux :

1) Évaluer l'impact de l'absence de microbiote sur la réponse à l'infection néonatale par le VRS.

Pour cela, nous avons comparé l'évolution de la réplication du VRS et de la réponse inflammatoire pulmonaire chez des souriceaux axéniques et EOPS. L'hypothèse sous-jacente reposait sur la capacité du microbiote à moduler l'intensité de la réponse inflammatoire, tel que suggéré par des travaux antérieurs menés au sein de l'équipe (Marquant et al., 2021). Notre étude a nécessité la production d'animaux EOPS à partir de lignées axéniques, permettant ainsi de disposer de souriceaux de même fond génétique, différant uniquement par la présence ou l'absence de microbiote. L'ensemble de ces travaux a mis en évidence des différences dans la cinétique de réplication du virus et dans la nature de la réponse immunitaire innée induite par l'infection.

2) Moduler expérimentalement l'immunité pulmonaire à l'aide de souches bactériennes isolées du microbiote respiratoire, dans le but d'induire une réponse protectrice vis-à-vis de l'infection par le VRS.

Nous formulons l'hypothèse que la colonisation précoce du poumon par des bactéries commensales spécifiques constitue un signal essentiel orientant la maturation des défenses immunitaires pulmonaires au cours de la période néonatale. En effet, Gollwitzer et al ont montré que la charge bactérienne pulmonaire augmente et se diversifie au cours des deux premières semaines de vie et que ces modifications étaient associées à une réponse immunitaire plus tolérante aux allergènes (Gollwitzer et al. 2014), soulignant l'impact du microbiote sur l'orientation des réponses immunitaires. Par ailleurs, l'équipe de Muriel Thomas a démontré que l'administration, en période néonatale, de souches bactériennes primo-colonisatrices isolées de poumons permet de moduler la réponse inflammatoire lors de l'induction d'une pathologie asthmatique à l'âge adulte (Remot et al., 2017). Dans la continuité de ces travaux, notre collaboration avec l'équipe de Muriel Thomas a permis d'étendre l'utilisation de ces souches primo-colonisatrices à un modèle d'infection néonatale murin, dans le but d'identifier des bactéries potentiellement bénéfiques capables de conférer une protection contre l'infection par le VRS.

C. RESULTATS EXPERIMENTAUX

1- Impact de l'absence de microbiote sur les cinétiques de réplication du VRS et des réponses immunitaires pulmonaires chez des souriceaux

1-1 Introduction

Après la naissance, la colonisation progressive de l'organisme va jouer un rôle clé dans la maturation et l'éducation du système immunitaire de l'individu. La composition du microbiote des différentes muqueuses va se diversifier plus ou moins rapidement en fonction des sites anatomiques concordant avec la présence de certains types cellulaires de l'immunité ou avec leurs capacités de réponses (Gollwitzer et al. 2014; Remot et al. 2017; Pattaroni et al. 2018).

L'infection par le VRS en période néonatale est caractérisée par une réponse immunitaire pulmonaire différente de celle observée chez les adultes, associée à une plus grande sensibilité de l'individu vis-à-vis de l'infection virale (Openshaw 2001; Remot et al. 2016; Ruckwardt et al. 2014; Drajac et al. 2021). Nous faisons l'hypothèse que le microbiote pulmonaire, en stimulant précocement les muqueuses, contribue à façonner le phénotype et la réactivité des cellules immunitaires résidentes du poumon. En effet, les signaux microbiens (PAMP) reconnus par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) tels que les TLR ou les NLR, constituent des stimuli essentiels pour la maturation fonctionnelle du système immunitaire.

L'utilisation d'animaux dépourvus de microbiote constitue un outil pertinent pour étudier le lien entre la présence du microbiote et la qualité de la réponse immunitaire face à une infection virale. Des travaux antérieurs réalisés au sein de l'équipe ont montré que, chez la souris adulte, l'absence de microbiote s'accompagne d'une exacerbation précoce de la réponse inflammatoire pulmonaire provoquée par l'exposition au LPS (Marquant et al. 2021), suggérant un rôle clé du microbiote dans la régulation de la réactivité tissulaire. À l'inverse, d'autres études menées dans un contexte d'infection bactérienne ou virale ont mis en évidence une sensibilité accrue des animaux axéniques à l'infection (Dolowy et Muldoon 1964), ainsi qu'une réduction de la concentration des cytokines dans le LBA (Fox et al. 2012). Plus récemment, une étude de co-infection combinant un parasite (*Heligmosomoides polygyrus*) et le VRS a révélé l'implication conjointe du microbiote et de la voie des IFN-I dans les mécanismes de protection antivirale (McFarlane et al. 2017). L'ensemble de ces travaux a été réalisé avec des animaux adultes. A notre connaissance, l'influence du microbiote sur l'infection par le VRS en période périnatale n'a pas été rapportée. Dans ce contexte, nous avons entrepris d'étudier dans quelle mesure l'absence de microbiote modifie la dynamique de l'infection par le VRS et la réponse inflammatoire pulmonaire chez le souriceau axénique.

Pour permettre une comparaison fiable, nous avons généré un groupe contrôle d'animaux EOPS du même fond génétique que les souris axéniques, en transférant ces dernières dans l'animalerie EOPS de l'IERP afin de permettre leur colonisation par le microbiote local. La réalisation de ce projet a reposé sur une étroite collaboration avec la plateforme Anaxem de Jouy-en-Josas, indispensable à la mise au point des infections expérimentales en isolateur sur des souriceaux âgés de six jours et au suivi rigoureux de la stérilité tout au long des expérimentations. Le développement de la lignée d'animaux contrôles a nécessité la participation de l'animalerie IERP de Jouy-en-Josas ainsi que la collaboration de Vinciane Saint-Criq (Équipe ProbiHôte, Institut MICALIS, INRAE).

1-2 Matériel et méthode

1-2-1 Vérification de la colonisation des animaux par quantification des bactéries

Les fèces ont été prélevés à 25 jours et à 2 ans après la colonisation passive d'animaux C57Bl/6 transférés de l'animalerie Anaxem à l'animalerie IERP. Les quantités totales de bactéries présentes dans les fèces ont été déterminées par qPCR TaqMan, à l'aide d'une gamme étalon établie à partir d'ADN extrait de quantités connues d'*E. coli*. À partir des ADN extraits, un fragment de 145 pb situé entre les régions V8 et V9 du gène codant l'ARNr 16S a été amplifié par qPCR, en utilisant des amorces et une sonde spécifiques marquée par un fluorophore FAM et un quencher MGB (Bact1369F : 5'-CGGTGAATACGTTCCCGG-3', Prok1492R:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3', Sonde MGB TM1389F:6-FAM-MGB-CTTGACACACCGCCCGTC). Les réactions ont été réalisées selon le protocole suivant : dénaturation initiale de l'ADN à 95 °C pendant 10 min, suivie de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95 °C pendant 15 s, puis une phase d'hybridation/élongation à 60 °C pendant 1 min. La gamme étalon a été construite en reliant les valeurs de cycle seuil (Ct) aux quantités connues de bactéries. La pente, l'ordonnée à l'origine et l'efficacité de la PCR ont ensuite été calculées, permettant d'estimer le nombre total de bactéries présentes dans chaque échantillon. Le nombre de bactérie total a été normalisé par le poids de fèces et exprimé en nombre de bactéries totales / g de fèces.

1-2-2 Infections *in vivo*

Les souriceaux C57BL/6 axéniques et EOPS ont été infectés à 6 jours de vie, en isolateur stérile (Anaxem, Jouy-en-Josas) et en animalerie A2 EOPS (IERP, Jouy-en-Josas) respectivement, par une souche de VRS recombinant exprimant la luciférase. L'infection a été réalisée par instillation intranasale de 10 µl de l'inoculum viral, représentant une charge virale entre $4,1 \cdot 10^4$ et $1,4 \cdot 10^5$ pfu (groupe VRS-Luc) ou de surnageant de culture Hep-2 non infecté (groupe Contrôle). A un, deux et quatre jours post-infection, les souriceaux ont été euthanasiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale d'anesthésiant pour réaliser des lavages broncho-alvéolaires et pour prélever les poumons et les fosses nasales. Les poumons ont été séparés en trois parties puis congelés dans l'azote liquide ainsi que les fosses nasales.

1-2-3 Analyse des lavages broncho-alvéolaires

Les échantillons, conservés sur glace, ont été centrifugés (2000 rpm, 10 min +4°C). Le volume de surnageant a été mesuré avant d'être congelé (-20°C) et les culots cellulaires ont été resuspendus dans 100 µl de PBS, une partie de l'échantillon a été introduite dans une cellule de Kovaslide (Dutscher) pour dénombrement au microscope et l'autre partie a été transférée dans une cytofunnel pour obtenir des spots de cellules sur lames de verre par cyto-centrifugation (1000 rpm, 5 min). Après séchage à l'air libre, les lames ont été colorées au May-Grünwald-Giemsa puis les cellules ont été identifiées au microscope selon des critères morphologiques. Le compte de chaque sous population a été établi à partir de l'observation de 200 cellules pour chaque échantillon.

1-2-4 Quantification de la réplication virale par mesure de la bioluminescence *in vitro*

Les cryotubes contenant les poumons et les fosses nasales ont été pesés individuellement avant et après l'échantillonnage des tissus. Les échantillons ont été transférés dans des tubes contenant 300 µl de tampon Passive Lysis Buffer avec DTT et des billes de céramique puis broyés au Precellys24 (6000 rpm, 15 sec d'agitation, 30 sec de pause, 15 sec d'agitation). Les lysats ont été clarifiés par centrifugation (11000 rpm, 10 min, +4°C) puis 50 µl ont été déposés dans une plaque 96 puits noire. L'ajout de 50 µl de luciférine, substrat de la luciférase produite lors de la réplication du VRS-Luc, déclenche la réaction enzymatique aboutissant à la production de bioluminescence, captée par l'IVIS200 (Xenogen Biosciences). L'utilisation du logiciel Living Image (version 4.0 Caliper Life Sciences) permet d'analyser le signal obtenu après capture des photons émis pendant un temps donné. La valeur obtenue est exprimée en radiance = photon/sec/cm²/sr et normalisée par quantité de protéines (photon/sec/cm²/sr/mg de protéines) dans l'échantillon ou au poids de l'échantillon (photon/sec/cm²/sr/g de tissus).

1-2-5 Mesure de la charge virale (gène N) et de l'expression des gènes par RT-qPCR

Les échantillons de poumons congelés ont été lysés dans le tampon RA1 du kit d'extraction des ARN totaux (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel) avec le Precellys24 (6000 rpm, 15 sec d'agitation). Après élution, les ARN totaux ont été dosés et rétrotranscrit en ADN complémentaire selon les instructions du kit « haute capacité de transcription inverse d'ADNc » (applied biosystems, Thermofisher scientific). Les PCR quantitatives ont été réalisées selon les recommandations du kit Master Mix SYBR Green (applied biosystems, Thermofisher scientific). Les amorces (Sigma-Aldrich), diluées au 1/10^{ème}, ont permis l'amplification des gènes d'intérêt (listés ci-dessous) grâce au thermocycleur RealPlex (Eppendorf). Le signal a été analysé avec le logiciel Realplex pour déterminer les valeurs seuils (Ct).

Nom du gène	Amorces sens 5'-3' (100 µM)	Amorces antisens (100 µM)
GAPDH	GGGGTCGTTGATGGCAACA	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
HPRT	CAGGCCAGACTTTGTTGGAT	TTGCGCTCATCTTAGGCTTT
N (VRS A2)	AGATCAACTTCTGTCATCCAGCAA	TTCTGCACATCATAATTAGGAGTATCAAT
IFN λ1 (IL-29)	CAGGTTCAAATCTCTGTCCAC	AACTCCAGTTTTTCAGCTTG
IFNβ	CCCTATGGAGATGACGGAGA	CTGTCTGCTGGTGGAGTTCA
ISG15	CCCCAGCATCTTACCTTTA	TGACTGTGAGAGCAAGCAGC
IRF7	CTGGATGAAGAAGATGCACAG	GAAGTTGGTCTTCCAGCCTC
OAS	CTTTGATGTCCTGGGTCATGT	GCTCCGTGAAGCAGGTAGAG

1-2-6 Cytométrie en flux

Après prélèvement, les poumons sont placés dans un tube contenant du milieu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) et six billes CK28 de 2,8 mm (Ozyme). Les tissus sont ensuite dissociés mécaniquement à l'aide du Precellys24 (5000 rpm, 10 sec), puis les suspensions cellulaires obtenues sont filtrées successivement sur des tamis de 100 µm et 40 µm. Les cellules sont ensuite incubées

pendant 1 min à température ambiante avec un tampon de lyse des hématies ACK (Gibco, Thermo Fisher). Les suspensions cellulaires sont distribuées en plaque 96 puits et après un rinçage au PBS afin d'éliminer le sérum, elles sont incubées avec le colorant vital Zombie Aqua (BioLegend, dilution 1/800) pendant 20 minutes à 4 °C dans l'obscurité. Les différentes sous-populations immunitaires ont ensuite été identifiées par marquage des récepteurs de surface des cellules à l'aide de 50 µl/puits de cocktails d'anticorps monoclonaux fluorescents (détaillés ci-dessous), en présence de Fc block (anti-CD16/32, SONY, dilution 1/100). Après 20 minutes d'incubation à 4 °C dans l'obscurité, les cellules ont été lavées et, si nécessaire, perméabilisées selon les instructions du kit fixation/perméabilisation Fcγ3 (invitrogen) afin de permettre le marquage intranucléaire avec 50 µl/puits d'anticorps, incubés 20 min, à 4 °C dans l'obscurité. Les échantillons ont été analysés à l'aide du cytomètre Fortessa LSR II (BD Biosciences) et du logiciel BD FACSDiva 8.0.

Panel "Lignée lymphoïde"

Bandpass filter	Fluorochromes	Marqueurs	dilution	Clones	Fournisseur	Isotype	espèce source	dilution
710/50	PerCP-Cy5.5	CD3	1/100	17A2	SONY Sirigen	IgG2b, k	Rat	1/100
530/30	FITC	CD23	1/800	B3B4	BD	IgG2a, k	Rat	1/800
780/60	APC-Cy7	CD45.2	1/100	104	Biolegend	IgG2a, k	Mouse	1/100
730/45								
670/14	APC	B220	1/100	1D3	BD biosciences	IgG2a, k	Rat	1/100
670/14		CD19	1/100	RA3-6B2	Biolegend	IgG2a, k	Rat	1/100
710/50								
610/20								
780/60	PE-Cy7	CD4	1/600	RM4-5	Biolegend	IgG2a, k	Rat	1/600
670/30								
586/15	PE	CD8	1/50	53-6.7	SONY Sirigen	IgG2a, k	Rat	1/50
710/50								
610/20								
450/20	BV421	CD5	1/25	53-7.3	SONY Sirigen	IgG2a, k	Rat	1/25
780/60	BV786	CD11c	1/100	M1/70	SONY Sirigen	IgG	Hamster	1/100
780/60		CD11b	1/200	N418	SONY Sirigen	IgG2b, k	Rat	1/200
660/20								
525/50	BV510	zombie aqua	1/800					

Panel "Lignée myéloïde"

Bandpass filter	Fluorochromes	Marqueurs	Dilution	Clones	Fournisseurs	Isotype	Espèce source	dilution
710/50	PerCP-Cy5.5	CD3	1/100	17A2	Biolegend	IgG2b, k	Rat	1/100
530/30	A488	CD45.2	1/100	104	SONY Sirigen	IgG2a, k	Mouse	1/100
780/60	APC-Cy7	IA-IE	1/600	M5/114.15.2	Biolegend	IgG2b, k	Rat	1/600
730/45	AF700							
670/14	APC	CD19	1/100	1D3	BD biosciences	IgG2a, k	Rat	1/100
710/50	PE-Cy5.5							
610/20	PE-TexasRed							
780/60	PE-Cy7	CD11c	1/600	N418	SONY Sirigen	IgG2	Hamster	1/600
670/30	Pe-Cy5							
586/15	PE	Ly6G	1/200	1A8	BD biosciences	IgG2a, k	Rat	1/200
710/50	BV711							
610/20	BV605	Ly6C	1/100	HK1.4	Biolegend	IgG2c, k	Rat	1/100
450/20	BV421	Siglec F	1/100	DIH9	Biolegend	IgG2a, k	Rat	1/100
780/60	BV786	CD11b	1/100	M1/70	SONY Sirigen	IgG2b, k	Rat	1/100
660/20	BV650							
525/50	BV510	zombie aqua	1/800					

Les combinaisons utilisées pour l'identification des populations cellulaires sont les suivantes :

Lc T: CD45⁺ CD11b⁻ CD11c⁻ CD3⁺

Lc T helper: CD45⁺ CD11b⁻ CD11c⁻ CD3⁺ CD4⁺

Lc T cytotoxique: CD45⁺ CD11b⁻ CD11c⁻ CD3⁺ CD8⁺

Lc B: CD45⁺ CD11b⁻ CD11c⁻ CD19⁺ B220⁺

Lc B reg: CD45⁺ CD11b⁻ CD11c⁻ CD19⁺ B220⁺ CD5⁺

Lc B matures: CD45⁺ CD11b⁻ CD11c⁻ CD19⁺ B220⁺ CD23⁺

MA: CD45⁺ CD19⁻ CD3⁻ CD11c⁺ SiglecF⁺

CD: CD45⁺ CD19⁻ CD3⁻ CD11c⁺ SiglecF⁻ CMH-II⁺

PNN: CD45⁺ CD19⁻ CD3⁻ CD11b⁺ CD11c⁻ Ly6G⁺

PNE: CD45⁺ CD19⁻ CD3⁻ CD11b⁺ CD11c⁻ Ly6G⁻ Ly6C⁻ SiglecF⁺

Mc: CD45⁺ CD19⁻ CD3⁻ CD11b⁺ CD11c⁻ Ly6G⁻ SiglecF⁻ Ly6C^{+/-}

1-3 Résultats

1-3-1 Colonisation passive de souris axéniques adultes

Les animaux axéniques utilisés pour l'étude de la réplication du VRS et de la réponse immunitaire associée appartiennent à la lignée C57BL/6N provenant à l'origine de chez Charles River. Le fond génétique des animaux étant un déterminant majeur de la sensibilité à l'infection et de la nature de la réponse immunitaire qui en découle, il était essentiel de contrôler ce paramètre afin d'assurer la comparabilité des données obtenues. Pour cette raison, nous avons choisi de travailler avec des souris C57BL/6 issues du même élevage que les animaux axéniques, mais colonisées par un microbiote.

Ainsi, pour constituer le groupe contrôle, quatre femelles et deux mâles axéniques adultes ont été transférés de l'animalerie Anaxem vers l'animalerie IERP, puis placés au contact de congénères EOPS afin de permettre leur colonisation passive par le microbiote local (**Figure 27**). Les groupes sont nommés selon leur statut bactérien : axéniques (Ax), colonisés (Col) ou EOPS et selon l'origine de production des animaux : River (R) ou Janvier (J). Ainsi les animaux hébergés sur la plateforme Anaxem sont appelés Ax_R, les animaux hébergés à l'IERP sont appelés EOPS_J, les animaux axéniques transférés à l'IERP et colonisés sont appelés Col_R et leurs descendants, après vérification de leur statut sanitaire, sont appelés EOPS_R.

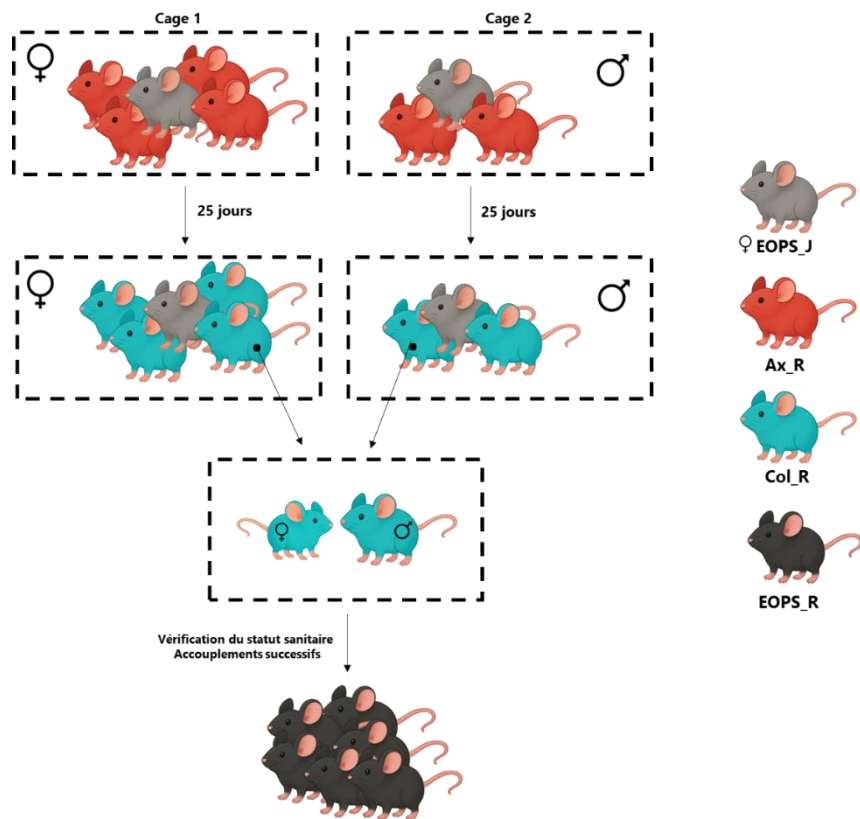


Figure 27 : Colonisation passive de souris axéniques adultes. Dans la cage 1, quatre femelles axéniques issues de la souche C57Bl/6 River ont été mises en cohabitation pendant 25 jours avec une femelle EOPS provenant de la souche C57Bl/6 Janvier. Dans la cage 2, deux mâles axéniques River ont été placés avec une femelle EOPS Janvier. Après confirmation de la colonisation et du statut sanitaire des animaux Col_R, des accouplements successifs ont permis d'établir la lignée C57Bl/6 EOPS_R.

Après 25 jours de cohabitation, les analyses fécales ont montré que la charge bactérienne des animaux Col_R était comparable à celle des souris EOPS_J (**Figure 28**). Après confirmation de leur statut sanitaire, ces animaux ont servi à établir la souche EOPS_R. Les infections *in vivo* ont ensuite été conduites sur des souriceaux issus de la deuxième génération afin de garantir la stabilité du statut microbiologique.

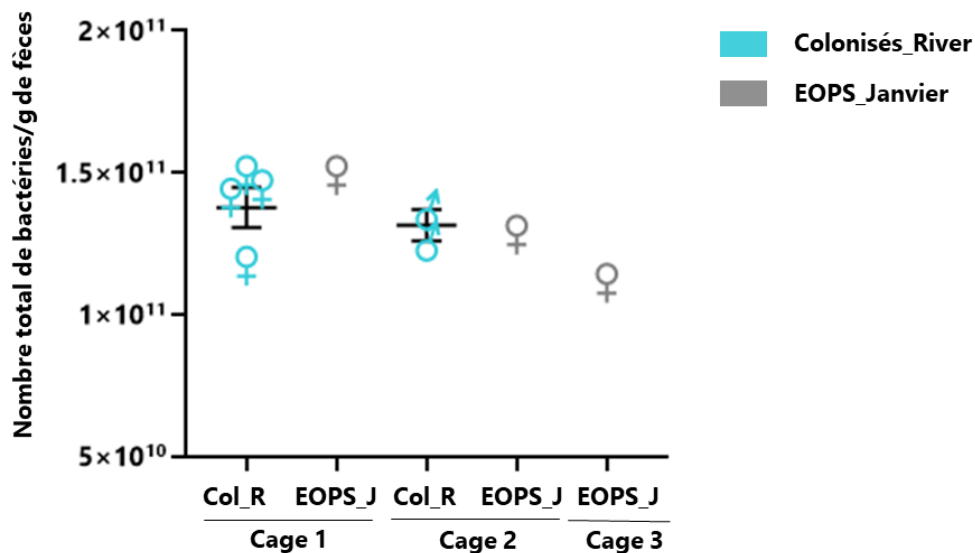


Figure 28 : Installation d'un microbiote intestinal par colonisation passive de souris axéniques mises en cohabitation avec de souris EOPS. Les fèces ont été récupérés chez les animaux colonisés et chez les animaux colonisateurs des cages 1 et 2, après 25 jours de cohabitation, ainsi que chez un individu hébergé indépendamment (cage 3) dans la zone EOPS de l'animalerie IERP. Les quantités totales de bactéries présentes dans les fèces ont été déterminées par qPCR TaqMan, à l'aide d'une gamme étalon établie à partir d'ADN extrait de quantités connues d'*E. coli*. La courbe étalon a été obtenue en reliant les valeurs de cycle seuil (Ct, threshold cycle) aux quantités connues d'*E. coli*, permettant ainsi d'estimer les charges bactériennes dans les échantillons de fèces à partir des valeurs de Ct mesurées. Les quantités totales de bactéries ont ensuite été normalisées à la masse de tissu d'origine et exprimées en nombre de bactéries par gramme de tissu.

1-3-2 Influence du microbiote sur la cinétique de réplication du VRS chez les souriceaux axéniques et EOPS

Afin d'évaluer l'impact de l'absence de microbiote sur la réplication du VRS-Luciférase *in vivo*, des souriceaux axéniques (Ax_R) et des souriceaux contrôles (EOPS_R) ont été infectés à l'âge de 6 jours. Les euthanasies ont été réalisées à 1, 2 et 4 jours post-infection. Les poumons et les fosses nasales ont alors été prélevés pour quantifier la réplication virale, à la fois par mesure de l'activité luciférase par bioluminescence dans les lysats tissulaires et par quantification du transcrite du gène N du VRS par RT-qPCR à partir des ARN extraits des poumons congelés. Chez les animaux EOPS_R, la détection de la bioluminescence et du transcrite N du VRS diminue significativement entre 1 et 4 jours post-infection, alors qu'aucune variation significative n'est observée chez les animaux axéniques. À noter que les deux groupes ont présenté, en moyenne, un niveau d'infection initial comparable (10^7 p/s/cm²/mg de protéines), bien que celui-ci soit nettement plus variable chez les animaux dépourvus de microbiote (**Figure 29**).

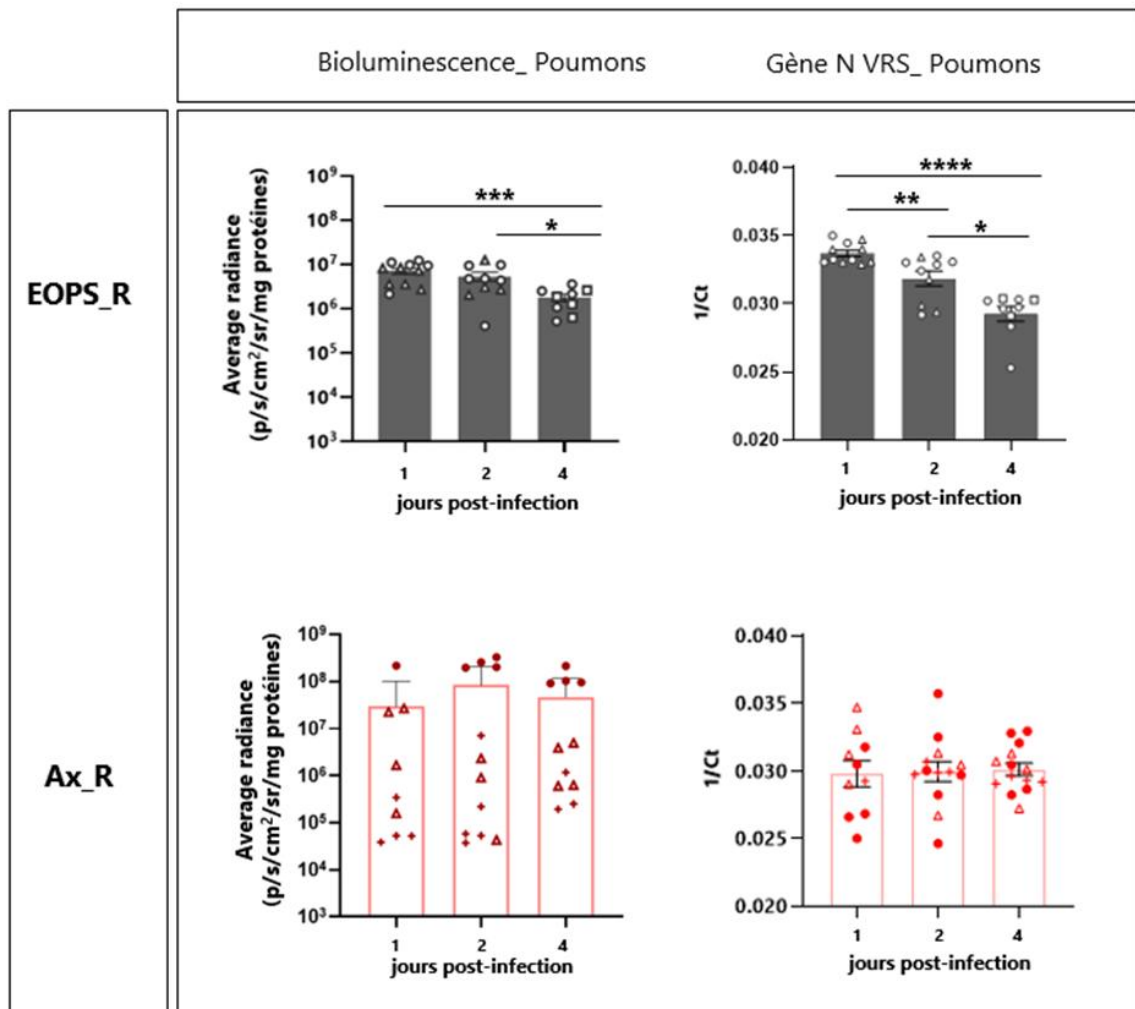


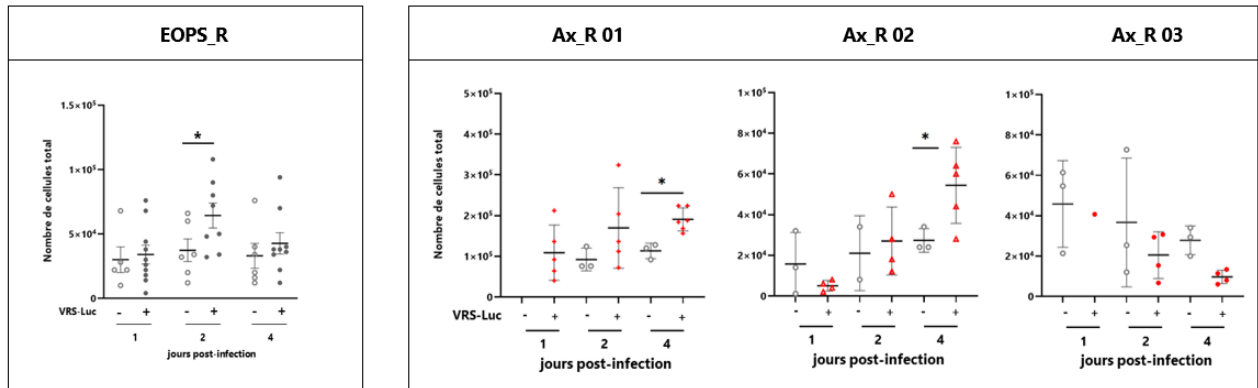
Figure 29 : Quantification de la réplication virale dans les poumons des souriceaux axéniques et contrôles. Les souriceaux EOPS_R (en noir) ou Ax_R (en rouge) ont été infectés avec 10 µl de VRS-Luc par voie intranasale à 6 jours de vie. La réplication virale a été mesurée par quantification de la bioluminescence émise par les lysats de poumon et par la détection du gène N du VRS par RT-qPCR. La bioluminescence a été rapportée à la quantité de protéines de l'échantillon et la moyenne du signal issu des tissus d'animaux non infectés a été soustraite au signal provenant des poumons d'animaux infectés. Pour l'expression du gène N, c'est l'inverse de la valeur du Ct qui est représenté pour permettre une visualisation optimale des données. Trois expérimentations indépendantes ont été réalisées pour chaque souche de souriceaux et chaque temps a été réalisé deux fois pour les souriceaux EOPS_R et trois fois pour les souriceaux Ax_R. Les symboles différents illustrent la variabilité entre les expérimentations. Test statistique réalisé avec le logiciel GraphPad Prism V8.1.1(GraphPad Software, Inc.) : en cas de normalité dans la distribution des échantillons, le t-test a été utilisé, dans le cas contraire, la version non paramétrique a été appliquée (Mann-Whitney). * p<0,05 **p<0,01, *** p<0,001 et ****p<0,0001).

1-3-3 Influence du microbiote sur la réponse inflammatoire pulmonaire au cours de l'infection par le VRS-Luc chez les souriceaux axéniques et EOPS

La réponse inflammatoire pulmonaire a été évaluée quantitativement par la numération des cellules immunitaires présentes dans le LBA et qualitativement par l'identification microscopique des types cellulaires selon leur morphologie après une coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG). Une augmentation significative du nombre total de cellules immunitaires a été observée au jour 2 post-infection chez les souriceaux EOPS_R (**Figure 30A**) et au jour 4 chez les souriceaux axéniques (**Figure**

30B) infectés par le VRS-Luc, dans deux des trois expérimentations indépendantes réalisées. Le pic de cellules observé à J2 post-infection chez les souriceaux EOPS_R correspond à un afflux de PNN alors que les PNE n'apparaissent qu'à partir du quatrième jour (**Figure 30A**). En revanche, il n'y a pas de recrutement de PNN chez les souriceaux axéniques mais plutôt un recrutement de PNE à partir du quatrième jour (résultats non significatifs) (**Figure 30B**).

A



B

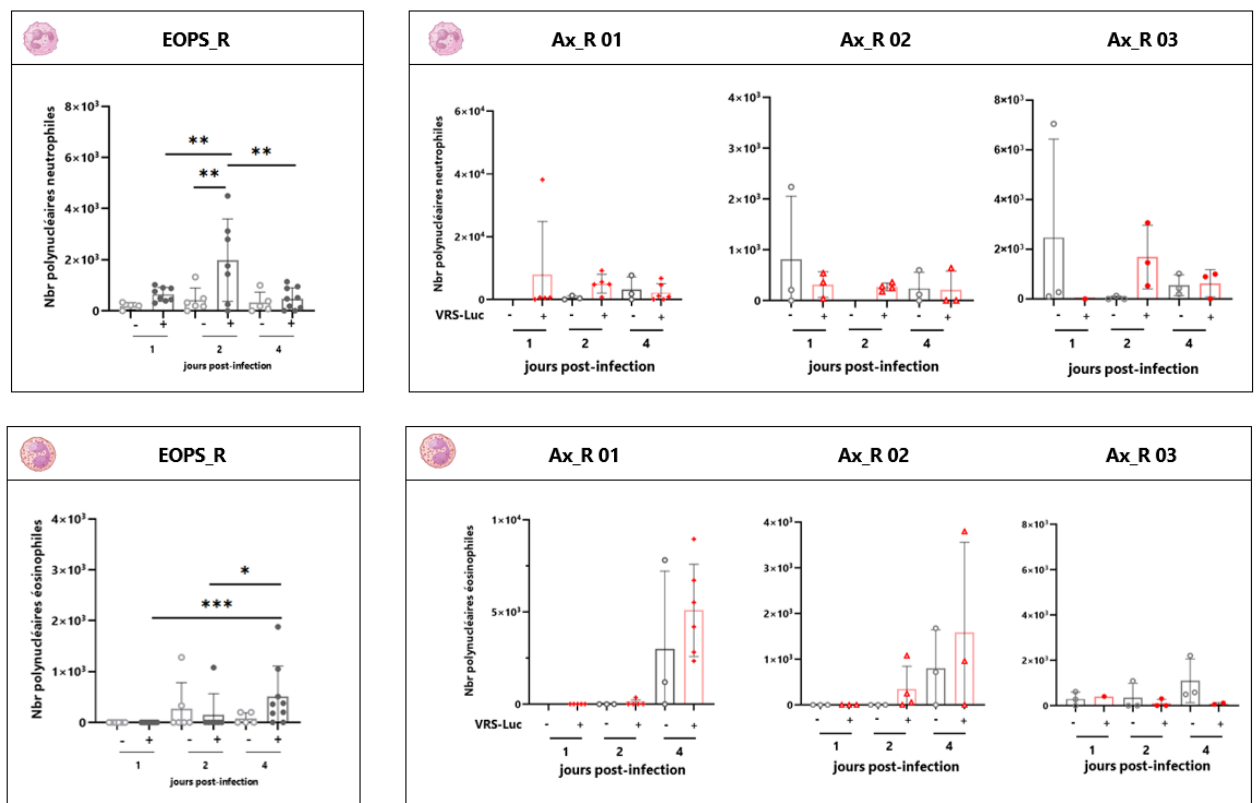


Figure 30 : Réponse inflammatoire pulmonaire des souriceaux axéniques et EOPS suite à l'infection par le VRS-Luc. Les souriceaux EOPS_R et Ax_R ont été infectés par voie intranasale à l'âge de 6 jours avec 10 μ l de VRS-Luc. Après euthanasie, des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été réalisés à différents temps post-infection. Les échantillons ont été analysés par dénombrement au microscope des cellules immunitaires totales (**A**) puis qualitativement par identification morphologique des principaux sous-types cellulaires après coloration de May-Grünwald-Giemsa, sur un total de 200 cellules observées par échantillon (**B**). Pour les souriceaux EOPS_R, chaque temps a été réalisé deux fois sur un total de trois expérimentations indépendantes et les données ont été associées. Pour les souriceaux axéniques, les trois expérimentations indépendantes réalisées sont représentées. Le test statistique utilisé est : Mann-Whitney * $p < 0,05$.

1-3-4 Influence du microbiote sur la réponse immunitaire innée pulmonaire au cours de l'infection par le VRS-Luc chez les souriceaux axéniques et EOPS

L'analyse du profil d'expression génique révèle que la réponse immunitaire pulmonaire induite par l'infection par le VRS dépend étroitement de la présence du microbiote. Chez les souriceaux EOPS, la stimulation précoce des voies de l'immunité innée se traduit par une induction significative dès le jour 1 post-infection des transcrits des interférons- β et de type III, ainsi que des gènes induits par les interférons (ISG15, IRF7 et OAS). En revanche, chez les souriceaux axéniques, dépourvus de microbiote, cette activation est absente ou retardée, n'apparaissant qu'au jour 4 post-infection (**Figure 31**).

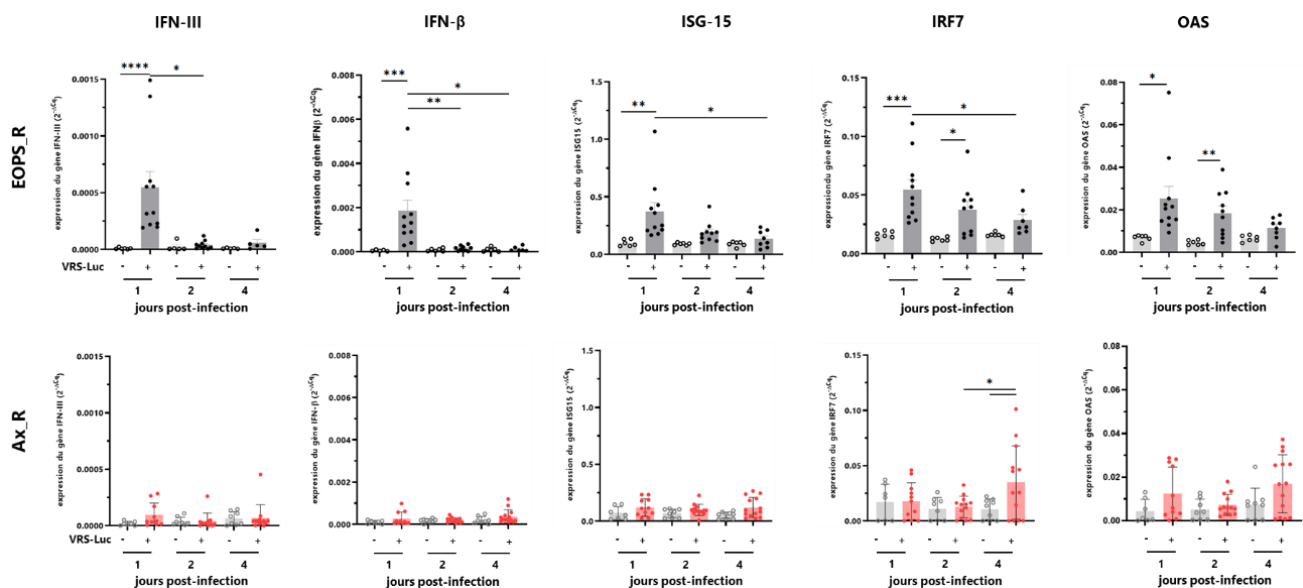


Figure 31 : Profil d'expression des gènes de l'immunité innée des souriceaux EOPS et axéniques en réponse à l'infection par le VRS-Luc. Les souriceaux EOPS_R (en noir) et Ax_R (en rouge) ont été infectés par voie intranasale à l'âge de 6 jours avec 10 μ l de VRS-Luc. Après euthanasie, les poumons ont été prélevés et congelés. L'expression des gènes des interférons (IFN) et des gènes stimulés par les interférons (ISG) a été quantifiée par RT-qPCR dans les poumons des souriceaux Ax_R et EOPS_R infectés. Les courbes de fluorescence ont été traitées à l'aide du logiciel Realplex (Eppendorf) afin de déterminer le cycle seuil (Ct, threshold cycle) pour chaque gène. Les valeurs obtenues ont été normalisées en fonction de l'expression moyenne de deux gènes de ménage : HPRT et GAPDH, selon la formule $\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ moyen des gènes de ménage}$. L'expression relative de chaque gène a ensuite été calculée à l'aide de la méthode $2^{(-\Delta Ct)}$. Les données obtenues sont homogènes entre les trois expérimentations indépendantes que ce soit pour les souriceaux EOPS_R ou Ax_R, permettant une représentation cumulée. Tests statistiques : test de comparaison multiple paramétrique (Anova) ou non paramétrique (Kruskal-Wallis) en fonction de la distribution des échantillons * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

1-3-5 Influence du microbiote sur la composition en cellules immunitaires de la muqueuse pulmonaire néonatale

Afin de mieux comprendre l'origine des différences observées dans l'induction de la réponse immunitaire innée, nous avons caractérisé les populations de cellules immunitaires présentes dans la muqueuse pulmonaire à l'état basal. Pour cela, les poumons de souriceaux axéniques et EOPS âgés de six jours, âge correspondant à celui utilisé pour les infections virales dans les expériences précédentes, ont été prélevés. Deux panels d'anticorps distincts ont été employés afin d'identifier le

plus grand nombre possible de sous-populations immunitaires : l'un ciblant la lignée myéloïde (**Figure 32A**), l'autre la lignée lymphoïde (**Figure 32B**). Parallèlement, le nombre total de cellules immunitaires a été déterminé pour chaque échantillon à l'aide de cellule de numération Kova Slide®. À l'état basal, les souriceaux EOPS_R présentent un nombre total de cellules immunitaires significativement plus élevé que les souriceaux Ax_R (**Figure 32C**). L'analyse par cytométrie en flux a révélé des différences de répartition cellulaire au sein des lignées myéloïde et lymphoïde entre les deux groupes. Chez les souriceaux Ax_R, la proportion de lymphocytes B parmi les cellules immunitaires est significativement plus élevée, avec en particulier une plus grande fréquence de lymphocytes B CD5⁺ (Lc B reg). Par ailleurs, une proportion accrue de monocytes Ly6C⁺ a été observée dans la lignée myéloïde. En revanche, chez les souriceaux EOPS_R, la muqueuse pulmonaire néonatale présente à l'état basal une proportion plus importante de PNN que celle des souriceaux Ax_R (**Figure 32C**).

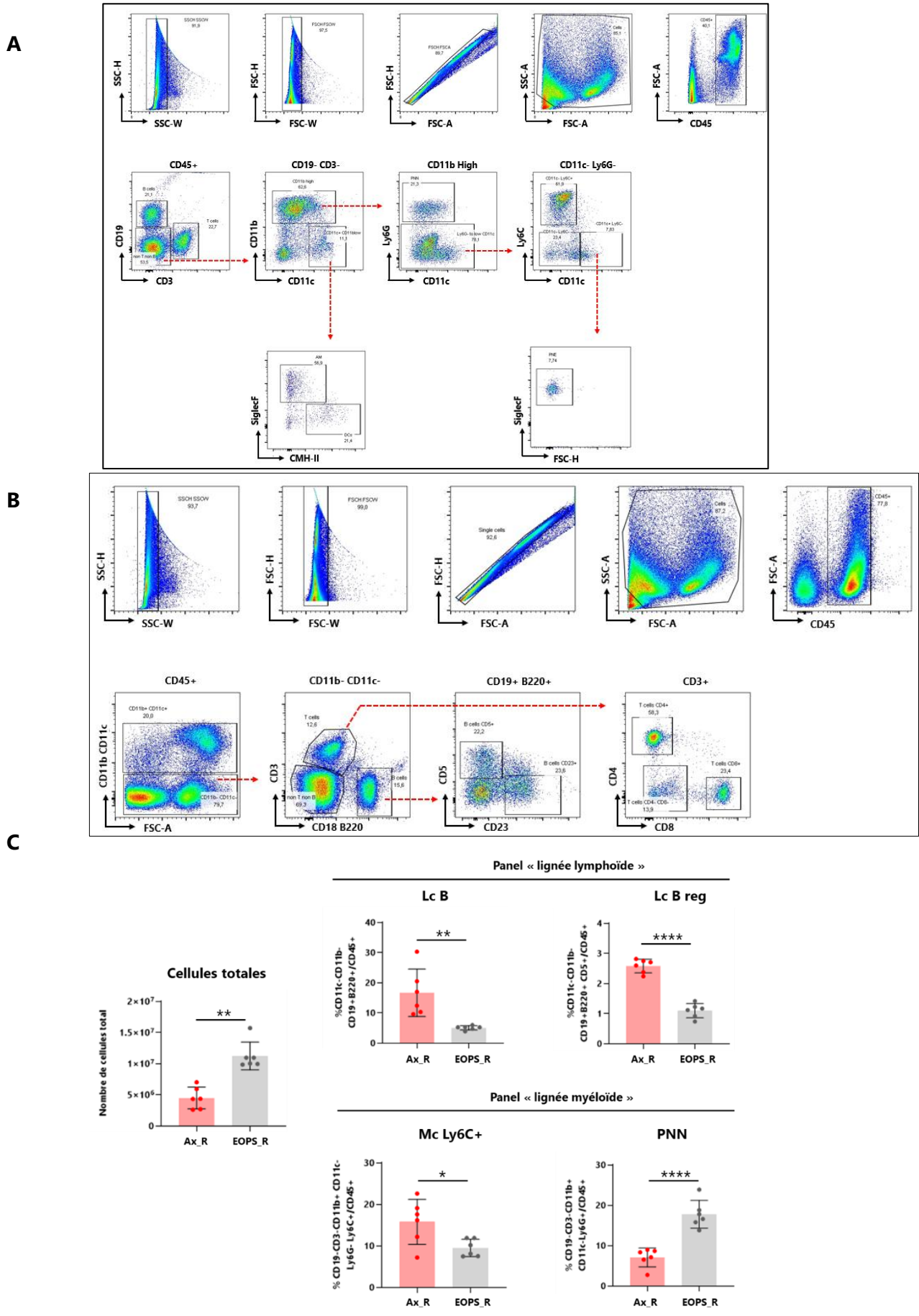


Figure 32 : Différence de composition en cellules immunitaires de la muqueuse pulmonaire néonatale entre des souriceaux axéniques et EOPS à l'état basal. (A) Stratégie d'identification des populations de la lignée myéloïde, réalisée avec le logiciel FlowJo V10.4 (Tree Star Inc.). A partir des cellules isolées, les cellules immunitaires sont sélectionnées sur l'expression du CD45+ puis la lignée myéloïde par exclusion des cellules

CD3⁺ et CD19⁺. Au sein de la lignée myéloïde, les cellules exprimant fortement le CD11b sont séparées de celles l'exprimant plus faiblement mais exprimant le CD11c. Parmi ces dernières, les MA sont identifiés par l'expression de SiglecF et les CD par l'expression du CMH-II (IA-IE). Parmi les cellules exprimant fortement le CD11b, les PNN sont identifiés par leur expression de Ly6G. Les cellules négatives restantes contiennent la population des Mc, Ly6C⁺ et Ly6C⁻. Les PNE sont identifiés sur l'expression de SiglecF parmi les cellules CD11c⁻ Ly6C⁻. **(B)** Stratégie d'identification des sous-populations de Lc, réalisée avec le logiciel FlowJo V10.4 (Tree Star Inc.). A partir des cellules isolées, les cellules immunitaires sont sélectionnées sur l'expression du CD45⁺ puis la lignée lymphoïde par exclusion des cellules CD11b⁺ et CD11c⁺. Au sein de la lignée lymphoïde, les cellules CD3⁺ sont séparées des cellules CD19⁺ B220⁺ ainsi que des cellules négatives, correspondant respectivement aux Lc T, aux Lc B et aux Lc non T et non B. Parmi les Lc T, deux sous-populations sont identifiées, les Lc CD4⁺ et les Lc CD8⁺ et parmi les Lc B, on peut distinguer les Lc B CD5⁺ (nB reg) des Lc B CD23⁺. **(C)** Les poumons ont été prélevés sur des souriceaux axéniques et EOPS à 6 jours de vie. Après dissociation mécanique des tissus avec le Precellys24, les cellules immunitaires ont été isolées, comptées et marquées avec de cocktails d'anticorps pour permettre l'identification des principales populations de la lignée myéloïde et lymphoïde à l'état basal. Test statistique utilisé : en cas de normalité dans la distribution des échantillons, le t-test a été utilisé, dans le cas contraire, la version non paramétrique a été appliquée (Mann-Whitney). * p<0,05, **p<0,01 ***p<0,0001. Les données sont issues de deux expérimentations indépendantes pour les échantillons issus de souriceaux axéniques et d'une seule expérimentation pour les souriceaux EOPS.

1-4 Conclusions

L'utilisation du modèle souriceau axénique a permis de démontrer que la présence du microbiote impacte la cinétique de la réplication du VRS et la nature de la réponse immunitaire néonatale. Chez les souriceaux EOPS, la réplication virale diminue précocement entre 1 et 4 jpi, en parallèle avec une induction rapide des voies des interférons dès 1 jpi et le recrutement de PNN à 2 jpi. À l'inverse, chez les souriceaux axéniques, la réplication virale persiste plus longtemps, l'activation des ISG est retardée ou absente, et la réponse cellulaire, marquée par la présence de PNE à 4 jpi, semble par conséquent moins adaptée à la clairance virale. Ces données indiquent que le microbiote est un acteur important pour la mise en place de la réponse antivirale pulmonaire néonatale. Néanmoins, le modèle axénique caractérisé par l'absence complète de microbiote ne permet pas de déterminer quel compartiment microbien (intestinal, pulmonaire ou autre) contribue à cet effet, ni d'identifier les signaux bactériens impliqués.

Partant du constat que la présence du microbiote favorise la maîtrise de l'infection virale, nous avons fait l'hypothèse que renforcer sa composition dès la naissance pourrait accroître l'efficacité de la réponse antivirale. Une approche d'immunomodulation expérimentale, basée sur l'administration contrôlée de souches bactériennes commensales isolées du microbiote pulmonaire néonatal, a été mise en place pour déterminer la capacité de ces microorganismes à orienter la nature des réponses immunitaires et à conférer une protection vis-à-vis de l'infection par le VRS. Cette seconde partie vise ainsi à explorer le lien entre certaines bactéries primo-colonisatrices et la régulation de l'immunité antivirale néonatale.

2- Immunomodulation de la réponse immunitaire pulmonaire par les bactéries primo-colonisatrices du poumon de souriceaux dans l'infection VRS

2-1 Introduction

Le microbiote pulmonaire et son influence sur la sévérité de l'infection par le VRS constituent des domaines de recherche importants dans la lutte contre la bronchiolite chez les jeunes enfants (de Steenhuijsen Piters et al. 2022). La sévérité des infections par le VRS (de Steenhuijsen Piters et al. 2022; Schippa et al. 2020) ainsi que la persistance des symptômes chez l'enfant pourraient être influencées par la composition de l'écosystème bactérien pulmonaire (Kristensen et al. 2024). Ainsi, la présence de *Lactobacillus* dans le nasopharynx durant l'infection par le VRS est associée à une diminution du risque de survenue d'épisodes sifflants pendant la petite enfance (Rosas-Salazar et al. 2016). Bien que la modulation du microbiote pulmonaire ou de ses métabolites apparaisse comme une stratégie prometteuse pour renforcer les défenses immunitaires chez la souris adulte (Fonseca et al. 2018) son impact au cours de la période critique du développement de la muqueuse pulmonaire, et notamment sur la susceptibilité à l'infection par le VRS, reste encore peu exploré (de Steenhuijsen Piters et al. 2020). Des travaux récents de notre collaboratrice, Muriel Thomas, ont montré que l'administration intranasale, au cours de la période néonatale, de certaines souches bactériennes primo-colonisatrices isolées de poumons de souriceaux de 3 jours de vie, influence la sévérité de la pathologie pulmonaire dans un modèle d'asthme allergique (Remot et al. 2017) Ces observations suggèrent que les bactéries commensales primo-colonisatrices du poumon jouent un rôle clé dans la modulation de l'immunité pulmonaire et dans la susceptibilité aux maladies respiratoires. Cependant, les mécanismes par lesquels cette colonisation bactérienne précoce oriente les réponses immunitaires et leurs conséquences sur la physiologie respiratoire, immédiates ou à long terme, en particulier lors d'infections précoces par le VRS, demeurent encore mal compris.

L'objectif de ce travail a été de démontrer que les réponses immunitaires des souriceaux nouveau-nées à l'infection par le VRS, ainsi que leurs conséquences à long terme, pouvaient être modulées favorablement par l'administration, peu après la naissance, de souches bactériennes primo-colonisatrices du poumon. En particulier, grâce à des approches cellulaires et *in vivo* complémentaires, nous avons identifié une souche commensale, la bactérie 17 (*E. coli*), capable de stimuler des réponses immunitaires protectrices de type 1 et de limiter la réplication du VRS, à la fois dans des modèles murins néonataux et dans des cellules épithéliales humaines. Les résultats de ce travail sont soumis pour publication dans le journal « *Mucosal Immunology* ».

Ce projet a nécessité de collaborer étroitement avec l'IERP de Jouy-en-Josas afin de suivre les naissances des souriceaux Balb/C. En effet, pour moduler le microbiote en période néonatale et compte tenu de la fenêtre de susceptibilité à l'infection par le VRS très réduite chez les souriceaux, il fallait intervenir très rapidement après la naissance des animaux. Enfin, l'utilisation et la préparation des souches primo-colonisatrices sont réalisées avec l'aide de l'équipe de Muriel Thomas à l'institut MICALIS sur le centre de recherche INRAE de Jouy-en-Josas. Enfin, grâce à une collaboration avec la société Epithelix et l'hôpital Foch, nous avons pu valider l'effet anti-VRS de notre souche d'intérêt, la bactérie 17, dans un modèle translationnel humain de cellules pulmonaires différenciées.

2-2 Article : Early-Life Commensal Lung Bacteria Shape Immune Responses and RSV Susceptibility in Neonatal Mice

Early-Life Commensal Lung Bacteria Shape Immune Responses and RSV Susceptibility in Neonatal Mice

Claire Chottin^{§1}, Quentin Marquant^{§1,2}, Cécile Ferret¹, Eloi Poucet¹, Vinciane Saint-Criq³, Daphnée Laubretton¹, Carole Drajac¹, Edwige Bouguyon¹, Aude Remot⁴, Samuel Constant⁵, Edouard Sage^{1,2}, Isabelle Schwartz-Cornil¹, Muriel Thomas³, Sabine Riffault¹, and Delphyne Descamps^{†1}

[§]Equal contribution

[†]Corresponding author

¹Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, 78350, Jouy-en-Josas, France

²Hôpital Foch, Suresnes, France

³Université Paris-Saclay, INRAE, Micalis, 78350, Jouy-en-Josas, France

⁴Université de Tours, INRAE, ISP, 37380, Nouzilly, France

⁵Epithelix, 18, Chemin des Aulx, CH-1228 Plan-les-Ouates, Geneva, Switzerland

Correspondence to: Delphyne Descamps, Tel: (33) 01 34 65 26 10, Email: delphyne.descamps@inrae.fr. Virologie et Immunologie Moléculaires, INRAE, UVSQ, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Abbreviations

RSV: respiratory syncytial virus; LTRI: lower respiratory tract infections; ILC2: type 2 innate lymphoid cells; AM: alveolar macrophages; IFN-I: type 1 interferons; ISG: interferon-stimulated genes; EL-Abx: early-life antibiotic treatment; BHI: Brain Heart Infusion; MRS: Man Rogosa Sharpe; PCLS: Precision-cut lung slices; CFU: colony forming unit; MOI: multiplicity of infection; BAL: Bronchoalveolar lavage; LDH: lactate dehydrogenase; i.n.: intranasal; MGG: May-Grunwald-Giemsa.

Acknowledgements

We greatly acknowledge M. Prost and A. Mialet for her assistances with experiments. We are grateful to M-A. Rameix-Welti (INSERM, U1173, UVSQ) and J-F Eléouët (INRAE, UVSQ, VIM) for providing recombinant RSV-Cherry. We are grateful to the IERP unit, INRAE (Infectiology of fishes and rodent facility, doi: 10.15454/1.5572427140471238E12). We thank the Emerg'in platform for access to IVIS-Spectrum that was financed by the Region Ile De France (DIM One Health). We thank E Helloin and C Darrigo (CIRM, INRAE, Nouzilly) for bacterial strains identification by mass spectrometry. C. Drajac. and Q. Marquant were the recipient of a Ph.D. and post-doctoral fellowships of Région Ile-de-France (DIM-Malinf or DIM-OneHealth, respectively). C. Chottin was the recipient of a Ph.D. fellowship of

the French research ministry. D. Laubreton and experiments were supported by a grant of the French national research agency "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-13-BSV3-0016 and ANR-24-NEOMIS). This project was supported by the Fondation Air Liquide, Vaincre la Mucoviscidose and by Association Grégory Lemarchal.

Conflict of Interest statement

The authors declare no competing financial interests. The authors declare that all the other data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary information files and from the corresponding author upon request.

Sample Credit author statement

Quentin Marquant: Methodology, Validation, Investigation, Data curation, Visualization, Writing – review & editing. **Claire Chottin:** Methodology, Validation, Investigation, Data curation, Visualization, Writing – review & editing. **Cécile Ferret:** Validation, Data curation, Resources. **Eloi Poucet:** Validation, Data curation. **Vinciane Saint-Criq:** Methodology, Writing – review & editing. **Edwige Bouguyon:** Validation, Data curation. **Daphnée Laubreton:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing. **Carole Drajac:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing. **Aude Remot:** Methodology, Conceptualization, Writing – review & editing. **Samuel Constant:** Resources, Writing – review & editing. **Edouard Sage:** Resources, Writing – review & editing. **Muriel Thomas:** Resources, Conceptualization, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Sabine Riffault:** Conceptualization, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Delphyne Descamps:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, , Writing – Original Draft, Writing – review & editing, Supervision, Visualization, Project administration, Funding acquisition.

Abstract

The lung mucosa at birth and shortly after is particularly vulnerable to respiratory syncytial virus (RSV) infection. Respiratory disease severity is strongly influenced by the age at first exposure, which may also affect the trajectory of airway function. Early-life represents a critical window for lung development and initial microbiota colonization, both of which shape mucosal immune responses to RSV. The impact of the initial establishment of the lung microbiota by its primo-colonizing strains on susceptibility to RSV infection remains largely unknown. In the present study, we show that early-life primo-colonizing bacterial strains in the mouse lung differentially induce innate immune responses and influence RSV susceptibility in *ex vivo* models using lung explants and alveolar macrophages. We identified a specific bacterial strain that enhances IFN-I antiviral pathways and reduces RSV replication both *in vitro* and *in vivo*. Intranasal administration of this strain to neonatal mice prevented the development of immunopathological responses upon RSV reinfection in adulthood. These findings highlight the potential of early-life microbiota modulation as a promising intervention for preventing RSV disease and its long-term respiratory consequences.

Keywords

Respiratory Syncytial Virus (RSV), Early-life, Lung microbiota, Primo-colonizing bacteria, Mucosal immunity, Immune imprinting, Interferon, Alveolar macrophages, lung explants

Research article

Introduction

The respiratory syncytial virus (RSV), known as the primary cause of bronchiolitis in infants, is a major contributor to lower respiratory tract infections (LRTI), remaining the leading cause of child mortality worldwide¹. Moreover, severe RSV infection in early-life has been associated with long-term respiratory problems, such as repeated LRTI, wheezing, asthma, and reduced lung function, which can continue into adulthood in the form of chronic respiratory disease². New passive immunisation strategies, such as maternal vaccination or administration of monoclonal antibodies, have been approved to reduce the burden of acute RSV infection in high-risk infants. However, some complications have been reported, including an increase in preterm births³. Direct vaccination in children remains a challenge, particularly after the FDA recently suspended all RSV vaccine trials in infants following reports of increased cases of severe illness in one trial⁴. The mechanisms underlying pulmonary hypersensitivity to RSV in early-life and its long-term health effects remain to be elucidated in order to develop effective prophylactic strategies. An increasing number of studies on RSV-infected neonatal mice (less than 7 days old at initial infection) have validated this model as relevant for understanding RSV infection in human infants⁵. It has been shown that the age at first infection plays a key role in shaping later immune responses, notably by inducing epigenetic modifications⁶. This may increase the severity of later RSV infections⁷, potentially by driving a type 2-biased immunity⁸, which promotes later allergic responses⁶. Moreover, the early-life in mice is characterized by an immediate permissiveness to RSV replication, which gradually delays with age as the ability to mount type I interferon (IFN-I) responses improves⁹. IFN-I are rarely detected in nasal washes from RSV-infected children¹⁰. However, IFN- α and IFN- β control viral pathogenesis by inducing interferon-stimulated genes that provide an early antiviral defense and shape inflammatory and adaptive immune responses¹¹. IFN-I appear to play a key role in the outcome of RSV infection¹¹, as treatments that enhance IFN-I levels in infected neonatal mice have been shown to reduce viral replication and long-term RSV-induced lung effects^{12,13}. Thus, modulation of pulmonary innate immune defenses during the perinatal period can affect susceptibility to RSV infection, and determine long-term respiratory outcomes.

Early-life is indeed a crucial period for lung mucosa development, during which environmental factors influence the maturation of three interconnected components, namely, the airway epithelium, the immune cells, and the resident microbiota. When the tuning between these three components is inadequate, it can ultimately affect susceptibility to infections¹⁴ or predispose to chronic respiratory diseases¹⁵. There is increasing evidence that postnatal lung mucosa is biased toward a type 2 immune response, as indicated by the spontaneous accumulation of type 2 innate lymphoid cells (ILC2), eosinophils, and basophils, along with the production of cytokines such as IL-33 and IL-13¹⁶, which are typically involved in anti-inflammatory responses and tissue repair. Such a tissue environment is prone to the early polarization of tissue-resident alveolar macrophages (AM) toward a tolerogenic, anti-inflammatory M2 phenotype¹⁷. Moreover, the lung microbiota establishes rapidly after birth¹⁸⁻²⁰, influencing the maturation of the epithelial barrier and the development of the immune effectors²¹. It is shaped by factors linked to the host and the environment¹⁹. The lung microbiota contributes to immune tolerance in early-life according to an asthma model¹⁸ and attenuates innate immune reactivity to PAMP²². Thus, it was demonstrated that prolonged exposition to low-dose

endotoxin or farm dust confers protection to mice against allergic asthma model²³. Recently, an antibiotic treatment when administered in early-life (EL-Abx), but not in adulthood, was shown to increase mice's susceptibility to allergic airway inflammation, suggesting that the dysbiosis induced by EL-Abx treatment predisposes the neonatal lungs to allergic responses²⁴.

The incidence of respiratory infections and the occurrence of dysbiosis in the lung microbiota are closely related²⁵. The severity of RSV infection^{26,27}, and the persistence of symptoms in children may be influenced by the bacterial ecosystem²⁸. Conversely, the presence of *Lactobacillus* in the nasopharynx is associated with a reduced risk of childhood wheezing illnesses at 2 years of age²⁹. In mice, viable commensal bacteria are detected in the lungs as early as 3 days of age, with their number and diversity increasing over time¹⁸ and reaching a plateau by weaning at around 21 days of age²⁰. A collection of primo-colonizing bacteria was established *via* their isolation from lung homogenates of neonatal mice using aerobic or anaerobic culture conditions²⁰. Intranasal administration of certain strains of this collection during early life influenced the outcome of an allergic asthma model²⁰, while instillation in adult mice attenuated pulmonary inflammation following *Mycobacterium tuberculosis* infection³⁰. These findings suggest that lung primo-colonizing commensal bacteria can modulate pulmonary immunity and influence susceptibility to respiratory diseases. However, the mechanisms through which early bacterial colonization of the lungs modulates immune responses and determines both immediate and long-term respiratory outcomes, including during early-life RSV infection, remain largely unexplored³¹. In the present study, we demonstrated that early-life commensal lung bacteria modulate immune responses and RSV susceptibility in neonatal mice. We established a proof of concept demonstrating that it is possible to select a single strain from a panel of lung primo-colonizing commensal bacteria based on its immunomodulatory and antiviral properties on the neonatal lungs. One bacterium in particular, hereafter referred to as bacterium 17, promoted IFN-I antiviral pathways and reduced RSV replication both *in vitro* and *in vivo*. Finally, intranasal administration of bacterium 17 to neonatal mice prevented early-life immunopathological priming revealed after a second exposure to RSV in adulthood.

Materials and methods

Mice

Pregnant BALB/cJrj mice were purchased from Janvier (Le Genest, France). All experiments were approved by the ethics committee COMETHEA (Ethical Committee for Animal Experimentation, INRAE, and AgroParisTech; authorization number: APAFIS#14654-2018032116445169).

Bacterial strains' identification and growth

Bacterial strains (Supplemental Table 1) previously isolated from 3-day-old mouse lungs were stored at -80°C^{20} . Strains were revived in 10 mL yhBHI or MRS medium and subcultured (100 $\mu\text{L}/10$ mL). Growth was monitored hourly for 8h by spectrophotometry to determine exponential and stationary phases. Bacterial counts were obtained using a BD Accuri™ C6 flow cytometer, and strain identity was confirmed by 16S PCR (J4/J7 primers) and MALDI-TOF mass spectrometry (CIRM, INRAE, Nouzilly, France).

Virus

Human RSV strain A2 and recombinant RSV-Long expressing mCherry (RSV-mCherry) or luciferase (RSV-Luc) were produced, titrated on HEp-2 cells, and stored at -80°C^{32} .

Ex vivo lung explants

Lungs from 6-day-old neonatal mice were filled *via* tracheotomy with RPMI containing 1.5% low-melting agarose (37°C). After solidification, lungs were placed in a Krumdieck tissue slicer (MD6000) chamber containing PBS with $1\times$ antibiotic-antimycotic and cut into 150 μm slices to obtain precision-cut lung slices (PCLS)^{20,22}.

Ex vivo lung explants stimulation and infection

PCLS were stimulated for 16h at 37°C , 5% CO_2 with bacterial strains (50 CFU/well in RPMI with 5% FBS and L-glutamine). Inoculations were verified by CFU counts on agar plates. Three hours later, PCLS were infected with RSV-Luc (7.19×10^4 PFU/well) or Mock control. Supernatants were collected. PCLS were lysated in lysis buffer (5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% Triton X100, pH 7,4) or Passive Lysis Buffer (30 mM Tris, 10 mM MgCl_2 , 1% Triton 100X, 2% Glycerol) using a Precellys 24-bead grinder homogenizer (Bertin Technologies) for $2 \times 15\text{s}$ at $6,000 \times \text{g}$. Protein levels were quantified with DC™ or RC-DC™ Protein Assays (Bio-Rad).

Stimulation and infection of differentiated human primary bronchial epithelial cells transwells

MucilAir® from healthy donors were purchased from Epithelix. Cells ($\approx 5 \times 10^5$ cells/transwell) were stimulated with bacterium 17 (10^3 CFU/transwell) in 20 μL in apical side. After 3h, cells were infected with RSV-mCherry (MOI = 0.1) or Mock control during 3h. The inoculum was removed, and cells were re-exposed to bacterium 17. RSV-mCherry replication was visualized using the ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad) and quantified with a fluorescence plate reader (Tecan Infinite 200 Pro). Supernatants and cell lysates were then collected.

Ex vivo AM culture and infection

BAL were performed on 6-days old mice to isolate AM, as previously described^{9,33,34}. Cells (1×10^5) were plated, 24h after seeding, incubated with bacterial strains (50 CFU/well) for 3h before exposure to RSV-Long (MOI = 5) or a mock control. Supernatants and cells were collected 24h post-infection.

Cell cytotoxicity

The cytotoxicity was measured by lactate dehydrogenase (LDH) activity, using the Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega).

Cytokine, IFN, and RSV-specific Ab assays

Cytokine production was measured using the 15-plex or L-6/TNF- α /IFN- α /IFN- β custom 4-Plex mouse ProcartaPlex™ immunoassay (ThermoFisher Scientific). Human IL-6, TNF- α or IP-10 were measured by luminex and human β -defensin-2 by ELISA (NB-50-1634-1000, NeoBiotech). Data were read on MagPix instrument (Luminex), and analyzed using Bio-Plex Manager software (Bio-Rad). HEK-Blue™ IFN- λ (InvivoGen) cells were used to the detection of bioactive human IFN- λ . Individual mouse sera were assayed for specific Ab (IgG1, IgG2a) against RSV lysates by ELISA as described¹³.

In vivo bacterial strains inoculation and RSV infection

Neonate mice received 10 μ L of bacterium 17 by the intranasal (i.n.) route. At 6-days old, mice were infected with RSV-Luc (7.187×10^6 PFU/mL, 10 μ L, i.n) or Mock control. In other experiments, neonate mice were first infected by RSV-A2 (2.3×10^6 PFU/mL, 10 μ L, i.n.), and were kept until 8 weeks of age when they were all infected with RSV-A2 (100 μ L, i.n.)¹³. BAL and lung tissues were collected.

Bioluminescence measurements

Photon emission was measured in lysates of the nasal cavity or lung tissues and PLCS using the IVIS system (Xenogen Biosciences) and Living Image software (version 4.0, Caliper Life Sciences), following a previously described method⁹, and was normalized to protein content.

Cellular infiltration

Cells were collected from BAL and centrifugated at 400 x g for 10min at 4°C. May-Grunwald-Giemsa (MGG) coloration was performed to assess the differential cell counts using light microscopy. Two hundred cells were counted to determine relative and absolute cell numbers.

RT-qPCR

Total RNA was extracted from lung lysates using a NucleoSpin® RNA midi column (Macherey Nagel) and reverse transcribed using random primers and SuperScript II (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The primers (Sigma–Aldrich) used are listed (**Supp. Table 2**). RT-qPCR was performed in duplicate for each gene using the CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-rad) and SYBRGreen PCR Master Mix (Eurogenetec). Data were analyzed using CFX Manager™ Software (Bio-rad) to determine the quantification cycle (Cq) values. Results were determined using the formula $2^{-\Delta Cq}$, with $\Delta Cq = Cq_{\text{gene}} - Cq_{(\text{mean } (bActine, Gapdh, Hprt))}$.

Data and statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was set at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$. Data normality was assessed using the D'Agostino–Pearson and Shapiro–Wilk tests. Depending on distribution, differences between groups were analyzed using a parametric t -test or a nonparametric Mann–Whitney test (two groups), or by one-way ANOVA/Kruskal–Wallis or two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Analyses were performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc.).

Results

Primo-colonizing commensal bacteria exert distinct immunostimulatory effects using an *ex vivo* model of neonatal lung mucosa.

The goal was to identify a safe strain capable of promoting a protective type 1 immunity in the lungs during early life. To evaluate the immunostimulatory effects of primo-colonizing bacterial strains (**Supp. Table 1**) on the neonatal lung, we established a PCLS-based screening assay using slices from 6-day-old mice, an *ex vivo* model that mimics pulmonary cytokine production³⁵. PCLS were exposed to each strain (**Fig. 1A**), and cytotoxicity and cytokine profiles were analyzed. Among 20 strains tested, two (bacteria 1 and 11) caused significant cytotoxicity after 16h and were excluded, while most showed cytotoxicity levels comparable to the control medium (mean = 21.3% ± 1.1%), indicating no harmful effects (**Fig. 1B**). Cytokine production in the supernatants was measured using a 15-plex assay based on Luminex xMAP technology. Cytokines were grouped by function into pro-inflammatory, type 1 immunity, type 2 immunity, Th17/Th22/Th9 associated responses, and lymphocyte proliferation (**Fig. S1C** and **Supp. Fig. S1**). Both the type and the quantity of cytokines produced by PCLS varied across the bacterial strain. Bacteria 2, 19 and 16 induced high levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 (**Supp. Fig. S1A**). These strains also triggered strong expression of type 2 cytokines, including IL-10 (**Supp. Fig. S1C**). A large proportion of the other bacterial strains induced low cytokine production by PCLS (**Supp. Fig. S1**). One bacterial strain, the strain 17, stood out from the others. Bacterium 17, identified as *Escherichia coli* by 16S sequencing and mass spectrometry (**Supp. Table 1**), although also inducing type 2 cytokine production (**Supp. Fig. S1C**), was the only lung bacterial strain eliciting a strong type 1 cytokine profile in PCLS characterized by a high expression ratio of IFN- γ and IL-12p70 (**Fig. 1C**), notably associated with increased production of IL-22 and IL-9 (**Supp. Fig. S1D**). To highlight strain-specific immune signatures of each strain, results are shown as a heat map representing the ratio of cytokine production in bacteria-exposed PCLS *versus* control PLCS (medium alone). Strains inducing similar immunostimulatory profiles were clustered based on their cytokine patterns, as illustrated by the hierarchical tree (**Supp. Fig. 1F**). Altogether, we observed that primo-colonizing commensal bacteria exert different immunostimulatory effects on PCLS from neonatal mice, and notably, bacterium 17 stood out with a profile strongly skewed toward type 1 immunity without any associated cytotoxicity.

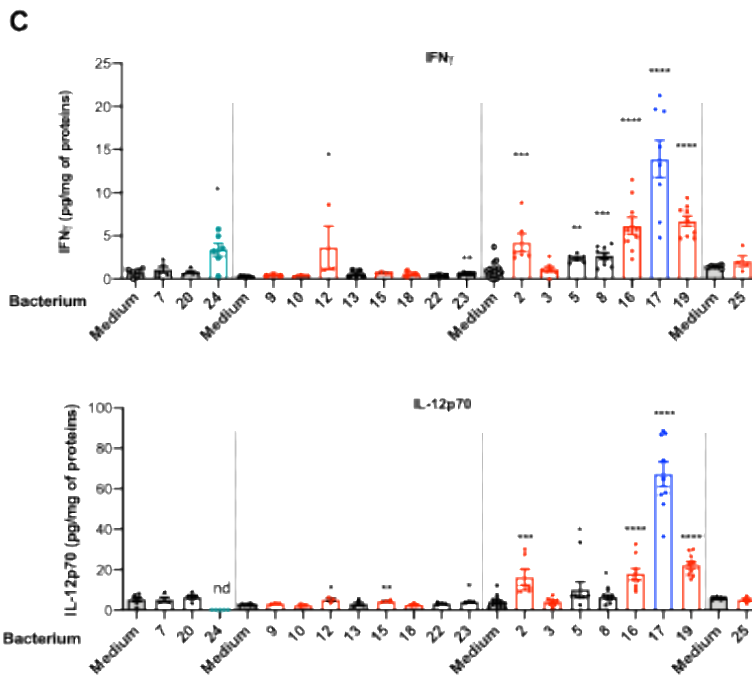
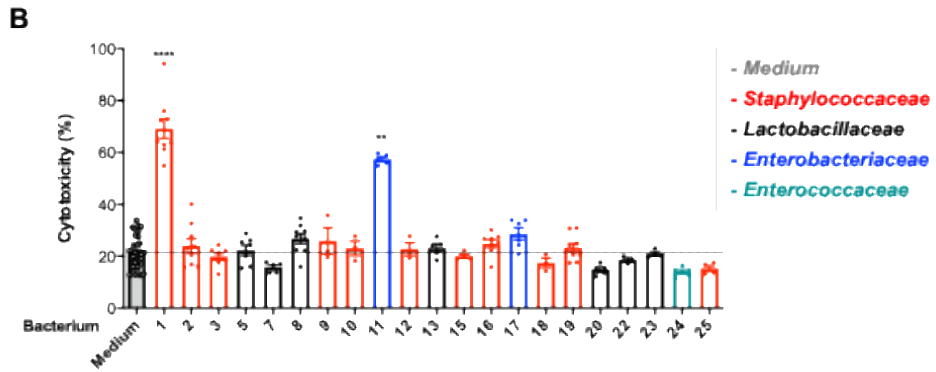
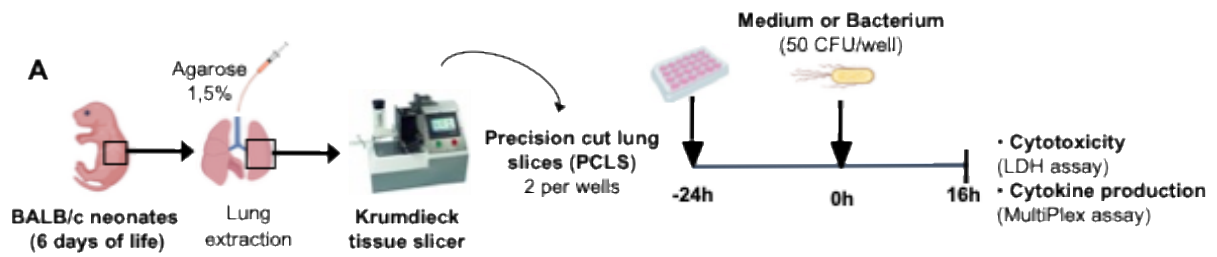


Fig. 1 : Cytokine production by precision-cut lung slices (PCLS) from neonatal mice varies in response to exposure to lung primo-colonizing bacteria. A. Experimental design. The lungs from 6-day-old mice were isolated and cut with a Krumdieck tissue slicer to obtain PCLS. They were next exposed to bacteria (50 CFU/well) or cultured in medium control. Supernatants were collected 16h after stimulation with bacterial strains and PCLS were lysed. **B.** Cytotoxicity observed in PCLS after bacteria exposure was measured by LDH activity assay. **C.** Secretion of cytokines associated with type 1 immune response (IFN- β , IL-12p70). Results are expressed as mean \pm SEM and represent a pool of five independent experiments (n = 2-5 biological replicate samples/condition). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ between the control medium and the bacteria-exposed condition (ANOVA, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test).

Bacterium 17 treatment of neonates attenuates the long-term pulmonary consequences of early-life RSV infection upon rechallenge in adulthood.

In vitro, bacterium 17 demonstrated a pronounced enhancement of type 1 immune responses. To assess the *in vivo* relevance of its effect, we first investigated whether intranasal (i.n.) administration of bacterium 17 (10^6 CFU; dose and method previously shown to deliver sufficient bacteria to the lungs²⁰) was pathogenic in neonatal mice. No mortality was observed in neonatal mice following administration of bacterium 17 (data not shown). A modest elevation in neutrophil counts was detected in the bronchoalveolar lavage (BAL), although total cell numbers remained unchanged (**Fig. S2**). Thus, we employed a previously described model of adult RSV re-exposure to investigate the ability of bacterium 17 to promote protective immunity and counter early-life immunopathological priming⁸. Three-day-old mice were treated intranasally with bacterium 17 or PBS vehicle at days 3, 5, 8, and 10 days of age. At 6-days old, mice were infected intranasally with RSV, followed by a second exposure in adulthood (**Fig. 2A**). Weight change was monitored (**Fig. 2B**), and antibody responses (**Fig. 2C-D**) and cellular infiltration in BAL were assessed (**Fig. S3B-E**). As expected, mice initially infected as pups and re-exposed to RSV in adulthood (PBS/RSV/RSV group) lost weight for over the 14 days post-infection (d.p.i), whereas mice treated with bacterium 17 and infected with RSV as neonates (bacterium 17/RSV/RSV group) lost little and regained their initial weight by 8 d.p.i., consistently showing better weight progression than controls (**Fig. 2B**). We next investigated whether neonatal bacterium 17 administration would impact the anti-RSV IgG1 response indicative of type 2 immunity and expected for adults upon RSV reexposure⁸. As expected, the re-exposure to RSV in adulthood induced a significant production of anti-RSV-IgG1 at 14 d.p.i. in the PBS/RSV/RSV group (**Fig. 2C**). In contrast, bacterium 17-treated neonates showed an early induction of anti-RSV-IgG2a antibody production as soon as 7 d.p.i (**Fig. 2D**) and no significant increase in IgG1 at 14 d.p.i. (**Fig. 2C**). Finally, we monitored cellular inflammation. At 7 d.p.i., total BAL cell numbers were significantly higher in mice first infected as neonates and re-exposed as adults (PBS/RSV/RSV, $2.51 \times 10^5 \pm 0.38 \times 10^5$) than in mice infected only as adults (PBS/Mock/RSV, $1.26 \times 10^5 \pm 0.33 \times 10^5$; **Fig. S3B**, $p < 0.05$). BAL cell counts in bacterium 17/RSV/RSV-treated mice did not differ significantly from the PBS/RSV/RSV group (**Fig. S3B**). Macrophage and neutrophil numbers were similar across groups at 7 and 9 d.p.i. (**Fig. S3C-D**), while the overall leukocyte increase was mainly due to lymphocyte recruitment ($0.98 \times 10^5 \pm 0.19 \times 10^5$ in PBS/RSV/RSV vs. $0.81 \times 10^5 \pm 0.24 \times 10^5$ in bacterium 17/RSV/RSV; **Fig. S3E**), which persisted until 9 d.p.i. despite declining over time. Significant eosinophil recruitment was observed in the BAL of PBS/RSV/RSV mice at 7 d.p.i. ($0.08 \times 10^5 \pm 0.012 \times 10^5$) and persisted at 9 d.p.i. ($0.065 \times 10^5 \pm 0.019 \times 10^5$), but was absent in PBS/Mock/RSV mice, reflecting type 2 immune priming from early-life RSV infection (**Fig. 2E-F**). Notably, eosinophil infiltration was nearly abolished in mice treated with bacterium 17 prior to the first RSV infection ($0.006 \times 10^5 \pm 0.004 \times 10^5$ at 7 d.p.i.). Accordingly, the bacterium 17/RSV/RSV group had 9.6- and 3.4-fold fewer eosinophils in the BAL compared to PBS/RSV/RSV animals at 7 and 9 d.p.i., respectively (**Fig. 2E-F**). Neonatal treatment with bacterium 17 did not affect overall leukocyte infiltration upon adult RSV re-exposure but prevented immunopathologic eosinophilia. All together, these data indicate that early-life *presence of* bacterium 17 during the first RSV infection promoted a shift in the RSV-specific antibody toward a type 1 profile (higher IgG2a, lower IgG1), associated with minimal eosinophil recruitment and improved disease outcomes (less weight loss).

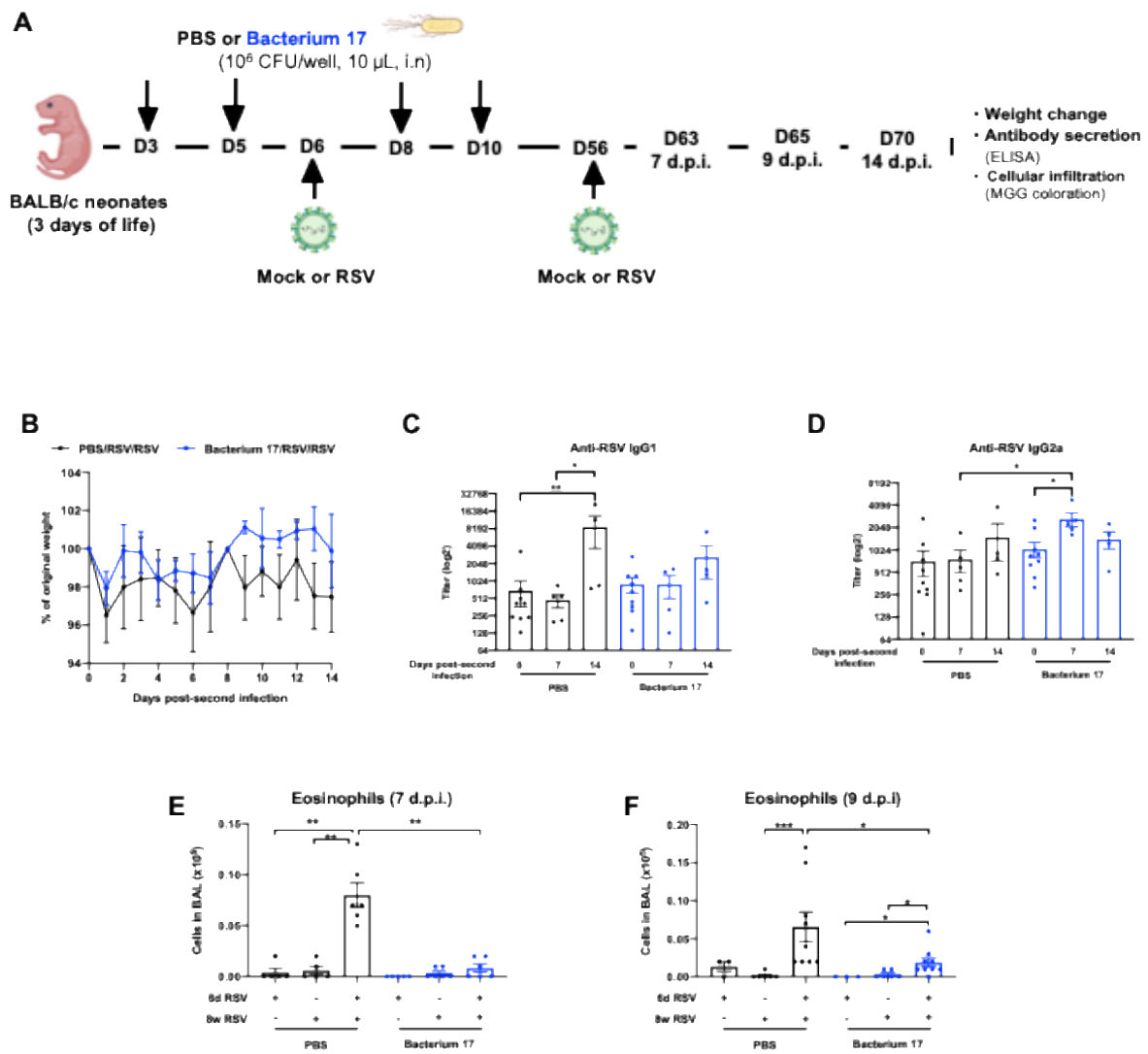


Fig. 2: Early life airway administration of bacterium 17 attenuates the long-term pulmonary consequences of neonatal RSV infection during reinfection in Adulthood. **A.** Experimental design. Three-day-old mice were treated intranasally with bacterium 17 (10^6 CFU, i.n., 10 μ L) or PBS vehicle at days 3, 5, 8, and 10 of age. At 6-days old, mice were infected intranasally with RSV-A2 (2.3×10^4 PFU in 10 μ L), followed by a second infection with RSV-A2 (2.3×10^5 PFU in 100 μ L, i.n.) at 8 weeks of age. Mice were euthanized at 7, 9 or 14 days post-reinfection (d.p.i.) to assess cellular infiltration in the bronchoalveolar lavage (BAL) and blood was collected. **B.** Weight evolution after second infection. Results are expressed as mean \pm SEM and presented a percentage of the starting weight ($n = 4$ per group). **C-D.** Anti-RSV antibody assays. Serum was used to quantify anti-RSV IgG1 (**C**) or IgG2a (**D**) antibodies by ELISA. Results are expressed as the mean \pm SEM ($n = 4$ -5 per group). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, Mann-Whitney test. **E-F.** The infiltration of eosinophils in BAL was assessed by May-Grünwald-Giemsa staining at 7 or 9 d.p.i.. Results are expressed as mean \pm SEM. Data are representative of two independent experiments ($n = 5$ -9 per group). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, Mann-Whitney test.

Exposure to bacterium 17 reduces RSV replication in PCLS.

We next focused on the early events following RSV infection to explore how bacterium 17 affects early innate antiviral response. To assess whether bacterium 17 influences early-life RSV susceptibility, we performed co-exposure experiments using PCLS from 6-day-old mice. PCLS were first exposed to bacterium 17 (50 CFU/well as previously used²⁰) to elicit its immunostimulatory effects, and then infected with luciferase-expressing RSV (RSV-Luc) or mock-treated for 16h to evaluate viral replication (**Fig. 3A**). Strains 16, 24, and 25, displaying distinct cytokine profiles (**see Fig. S1**), were included as comparators. Cytotoxicity induced by the bacteria, RSV-Luc, or their combination did not exceed 21% and was comparable to the control medium (**Fig. 3B**). No significant differences were observed, indicating that co-exposure does not affect PCLS viability and supporting the safe use of these bacteria during RSV infection. Viral replication was quantified in PCLS lysates using a luciferase activity assay (**Fig. 3C**). PCLS exposed to bacterium 25 showed a slight increase in luciferase activity compared to the control condition (not statistically different), suggesting a potential enhancement of RSV replication associated with the presence of bacterium 25. Pre-exposure to bacteria 16 or 24 resulted in only a slight reduction in RSV replication, with luciferase activity being slightly lower than that of the control (non statistically significant). In contrast, exposure to bacterium 17 resulted in a significant reduction in luciferase activity compared to both control and PCLS exposed to bacterium 16 or 24 conditions. Altogether, these results suggest that pre-exposure to lung primo-colonizing commensal bacteria can modulate RSV replication in PCLS from 6-day-old mice, with bacterium 17 emerging as the most effective strain in reducing RSV replication.

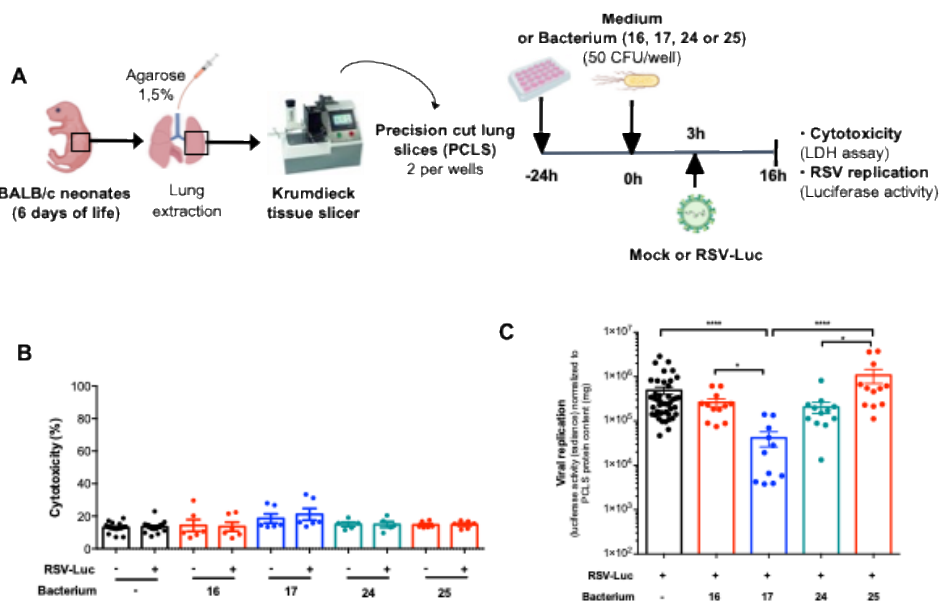


Fig. 3 : RSV replication in neonatal PCLS is differentially affected by primocolonizing commensal bacteria. **A.** Experimental design. The lungs from 6-day-old mice were isolated and cut with a Krumdieck tissue slicer to obtain PCLS. They were next exposed to bacteria 16, 17, 24 or 25 (50 CFU/well) or cultured in medium control. PCLS were infected with RSV expressing luciferase (RSV-Luc, 7.187×10^4 PFU/well) or mock control (-) 3h after bacterial stimulation. Supernatants were collected 16 h after bacterial strains stimulation and PCLS were lysed. **B.** Cytotoxicity observed in PCLS was measured by LDH activity assay. Results are expressed as the mean \pm SEM and represent a pool of four independent experiments (n = 5-18 per group in triplicate). **C.** RSV-Luc replication was assessed by measuring luciferase activity in lysates of PCLS exposed or unexposed to bacteria. Results are expressed as mean \pm SEM and represent a pool of four independent experiments (n = 6-21 per group in duplicate). * $P < 0.05$ and **** $P < 0.0001$ between the control medium or the bacteria-exposed condition (ANOVA, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test).

Exposure to bacterium 17 enhances innate immune response of neonatal AM to RSV infection.

We also investigated the effect of bacterium 17 on AM, the main pulmonary resident immune cells, involved in IFN-I production during RSV infection³⁶. Therefore, AM isolated from BAL of 6-day-old mice were first exposed to bacterium 17 (50 CFU/well as previously used²⁰) or control medium, followed by exposure to RSV (**Fig. 4A**). After 16h of incubation, exposure of AM to bacterium 17 alone did not induce a significant production of IL-6, TNF- α , and IFN-I in the supernatants compared to basal control conditions (no bacterium, no RSV, **Fig. 4B-C**). When AM exposed to bacterium 17 were subsequently infected with RSV, they produced markedly more inflammatory (IL-6 and TNF- α , **Fig. 4B**) and antiviral (IFN- α and IFN- β , **Fig. 4C**) cytokines than RSV-infected AM without bacterial pre-exposure. Notably, RSV-infected AM produced 3-fold higher levels of IFN-I when exposed to bacterium 17. Thus, neonatal AM exposure to bacterium 17 improved their ability to mount an innate antiviral immune response.

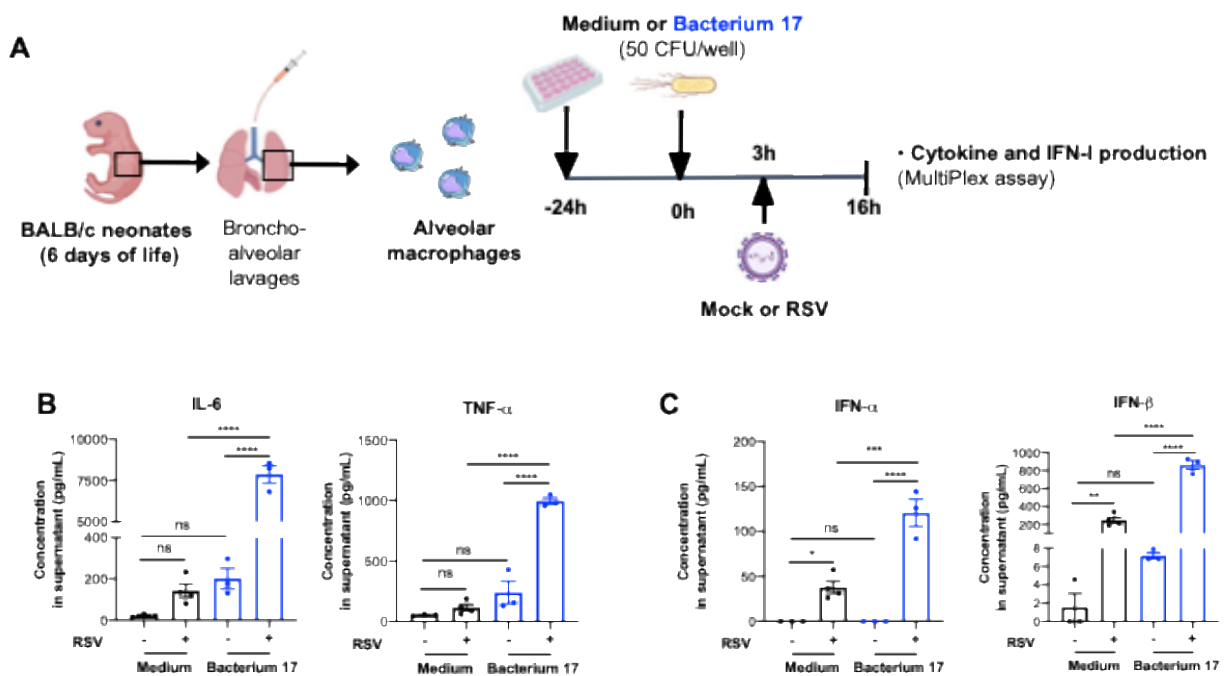


Fig. 4 : Cytokines and type I interferon (IFN-I) production by RSV-infected alveolar macrophages (AM) from neonatal mice is enhanced in response to exposure to bacterium 17. **A.** Experimental design. AM isolated from BAL of neonatal mice were exposed to bacterium 17 (50 CFU/well) or cultured in medium control. AM were infected with rRSV-long (MOI = 5) 3h after bacterial stimulation. Supernatants were collected 16h after bacterial strains stimulation and AM were lysed. The productions of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α , **B**) and IFN-I (IFN- α and IFN- β , **C**) were measured in supernatants using multiplex immunoassay. Data are representative of two independent experiments. Means \pm SEM are represented. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 and **** P < 0.0001 (2way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test).

Pulmonary exposure to bacterium 17 decreases the susceptibility of neonatal mice to RSV infection.

Collectively, these *in vitro* results identify bacterium 17 as a safe strain capable of enhancing IFN-I production and limiting RSV replication. We therefore evaluated whether pulmonary exposure to bacterium 17 confers protection against RSV infection in neonatal mice. Neonatal mice received bacterium 17 or PBS diluent intranasally at 3- and 5-days old to modulate the neonatal lung mucosa before infection with RSV-Luc at day 6 (**Fig. 5A**). Additionally, we performed a dose-response study to determine the minimal amount of bacterium 17 required to achieve its *in vivo* immunomodulatory effect. Mice were euthanized 1 or 2 d.p.i. to assess viral replication in the nasal cavities and lungs, as well as the associated immune response. As previously shown^{9,13}, i.n. RSV-Luc infection of neonatal mice led to rapid viral replication in the nasal cavity, reaching $1.42 \times 10^5 \pm 0.38 \times 10^5$ and $0.89 \times 10^5 \pm 0.28 \times 10^5$ photons/mg at 1 and 2 d.p.i., respectively (**Fig. 5B**). In PBS-treated neonates, lung replication was detectable at 1 d.p.i. ($1.02 \times 10^4 \pm 0.38 \times 10^4$ photons/mg) and increased by 2 d.p.i. ($2.09 \times 10^4 \pm 0.32 \times 10^4$ photons/mg), confirmed by RSV *N gene* expression (**Fig. 5C-D**). Bacterium 17 significantly reduced nasal viral replication at 1 d.p.i. at all doses (3-4-fold, **Fig. 5B**), whereas only the 10^6 CFU dose significantly lowered lung replication ($0.098 \times 10^4 \pm 0.047 \times 10^4$ photons/mg, **Fig. 5C**). The 10^5 CFU dose showed delayed lung protection at 2 d.p.i., while the 10^3 CFU dose had no effect, indicating that upper airway protection requires lower doses, whereas lung protection needs higher or delayed dosing (**Fig. 5B-D**). RSV infection in neonatal mouse lungs induced low *IFN-I* gene expression at 1 d.p.i. (**Fig. 6A**), and led to a slight, not significant, increase in BAL cellularity between 1 and 2 d.p.i. (**Fig. 6B**), primarily due to neutrophil recruitment (**Fig. 6D**), as previously shown^{9,12,13}. In neonates treated with high doses of bacterium 17, *IFN-I* gene expressions, and notably IFN- α , were increased at 1 d.p.i. (**Fig.6A**), while total BAL cells (**Fig. 6B**) and macrophages (**Fig. 6C**) remained unchanged. In contrast, neutrophil recruitment was significantly enhanced from 1 to 2 d.p.i., with an ~8-fold increase at 2 d.p.i. in RSV-infected mice pre-treated with the highest doses of bacterium 17 (**Fig. 6D**). Overall, these results demonstrate that neonatal exposure to bacterium 17 enhances early innate immune responses, leading to reduced RSV replication and dose-dependent protection of the lungs.

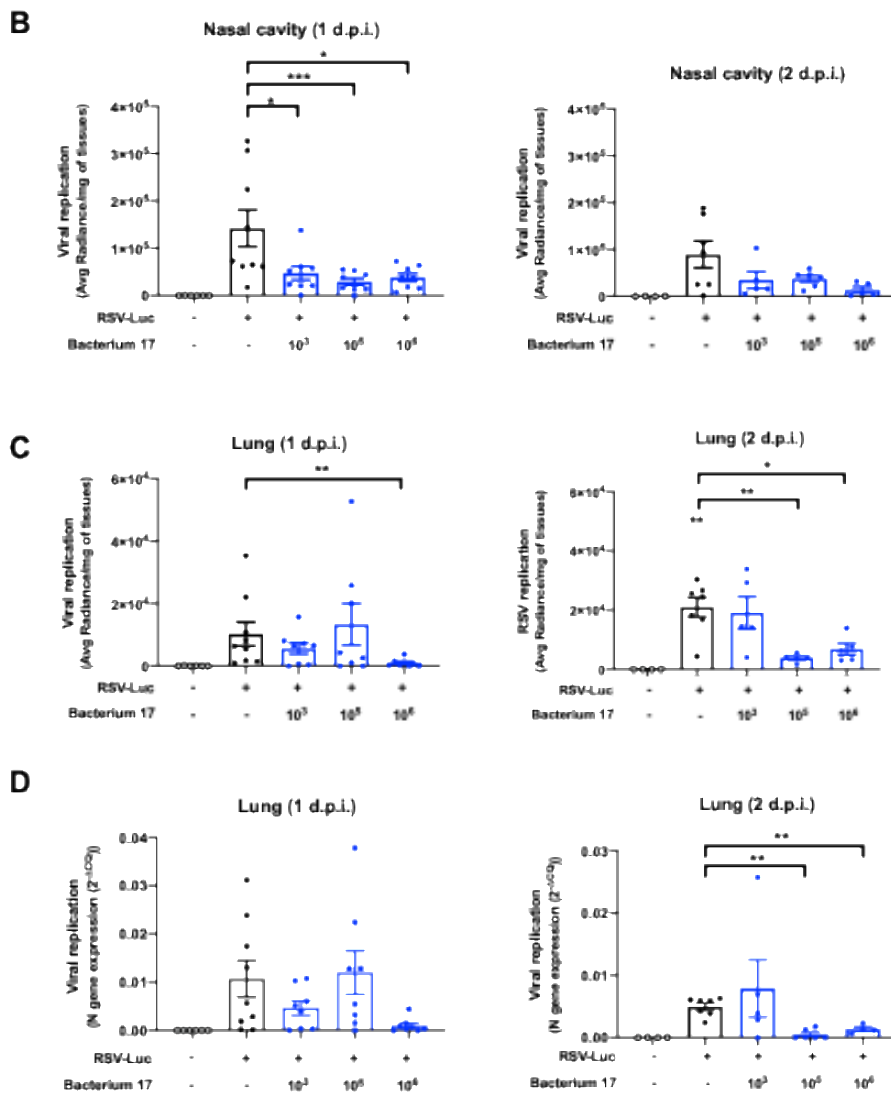
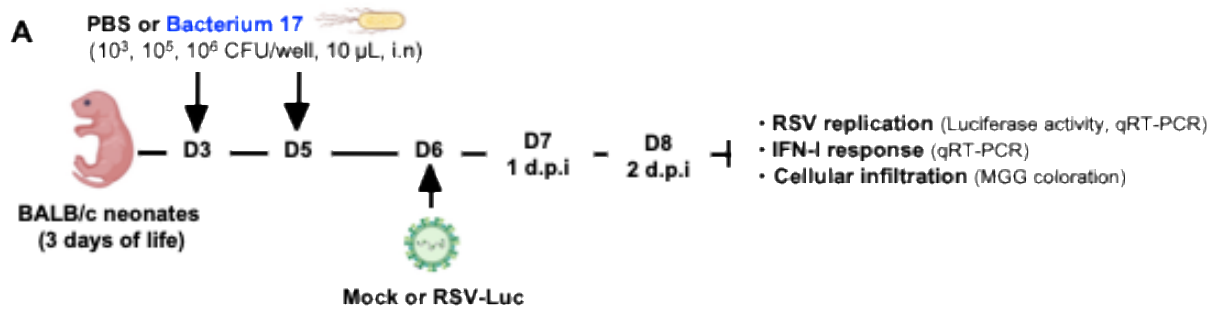


Fig. 5 : Early-life airway administration of bacterium 17 restricts RSV replication in neonatal mice. A. Experimental design. Three-days-old mice were treated with different quantities of bacterium 17 (10^3 , 10^5 or 10^6 CFU) or PBS vehicle at 3 and 5-days old by the intranasal (i.n., 10 μ L) route. At 6-days old, mice were infected with RSV-Luc (7.2×10^4 PFU, 10 μ L, i.n) and they were euthanized at 1 day after infection (d.p.i) or 2 d.p.i. to assess viral replication by luciferase activity assay in the lysats of nasal cavities (**B**) and lungs (**C**). **D.** The viral replication was evaluated by quantification of the RSV *N* gene expression. The level of expression was calculated by the formula $2^{-\Delta Cq}$ with $\Delta Cq = Cq_{N \text{ gene}} - Cq_{\text{reference genes}}$. Results are expressed as mean \pm SEM. Data are representative of two independent experiment (n = 5-8 per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Mann-Whitney test.

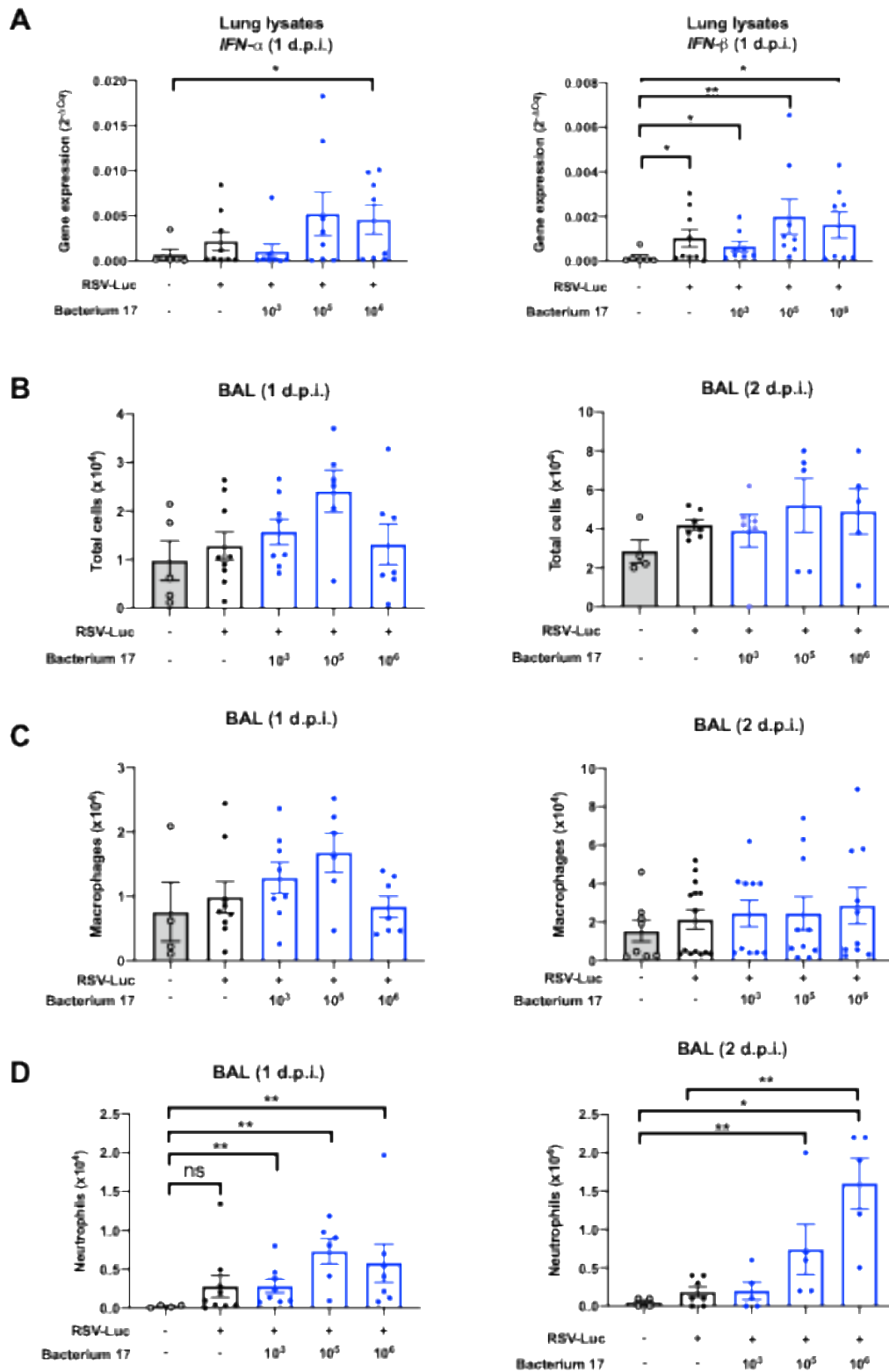


Fig. 6 : Early-life airway administration of bacterium 17 enhances neonatal pulmonary immunity against RSV. Three-days-old mice were treated with different quantities of bacterium 17 (10^3 , 10^5 or 10^6 CFU) or PBS vehicle at 3 and 5-days old (i.n., 10 μ L) route. At 6-days old, mice were infected with RSV-Luc (7.2×10^4 PFU, 10 μ L, i.n) and they were euthanized at 1 or 2 d.p.i. **A.** *IFN-1* gene expression was measured by qRT-PCR in lung lysates at 1 d.p.i.. Gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta Cq}$ method, with Cq values normalized to housekeeping gene. **B.** Cell counts were performed on BAL samples at 1 or 2 d.p.i.. Cellular infiltration in BAL was assessed by May-Grünwald-Giemsa staining to identify and differentiate macrophages (**C**) and polynuclear neutrophils (**D**) at 1 or 2 d.p.i.. Results are expressed as mean \pm SEM. Data are representative of two independent experiments (n = 5-8 per group). * P < 0.05, ** P < 0.01, Mann-Whitney test.

Bacterium 17 limits RSV spread in a translational airway model.

Finally, to validate the anti-RSV effect of bacterium 17 in a translational model, human primary airway epithelial cells cultured at the air-liquid interface were pre-exposed to bacterium 17 and subsequently infected with RSV expressing mCherry to visualize cellular RSV replication (**Fig. 7A**). Without bacterial pre-exposure, RSV replication was detectable at 48h post-infection, as shown by mCherry fluorescence. In contrast, bacterium 17 exposure markedly reduced mCherry activity compared to the control (**Fig. 7B-C**). No cytotoxicity was detected (**Fig. 7D**), and neither RSV exposure nor treatment with bacterium 17 induced the production of cytokines (IL-6, TNF- α or IP-10, **Fig. Sup S4**) in these experimental conditions. Type III interferons (IFN- λ) are produced by airway epithelial cells infected with influenza virus earlier than IFN-I, where they help limit viral spread without inducing inflammation³⁷. As expected, RSV infection induced IFN- λ production in epithelial cells (**Fig. 7E**). Bacterium 17 did not affect IFN- λ , which it did not induce, so IFN- λ likely does not explain the reduced RSV replication. We then measured another antiviral factor, the antimicrobial peptide human β -defensin 2, in epithelial cells (**Fig. 7F**). This cationic molecule, secreted by lung epithelial cells, blocks RSV entry by destabilizing its envelope³⁸. Bacterium 17 strongly induced β -defensin 2 (2040 ± 571 pg/mL vs 65 ± 19 pg/mL in controls), whereas RSV alone triggered low levels (120 ± 32 pg/mL). Thus, pre-exposure to bacterium 17 markedly reduced RSV propagation in a human airway epithelium model without cytotoxicity, likely *via* enhanced β -defensin 2 secretion.

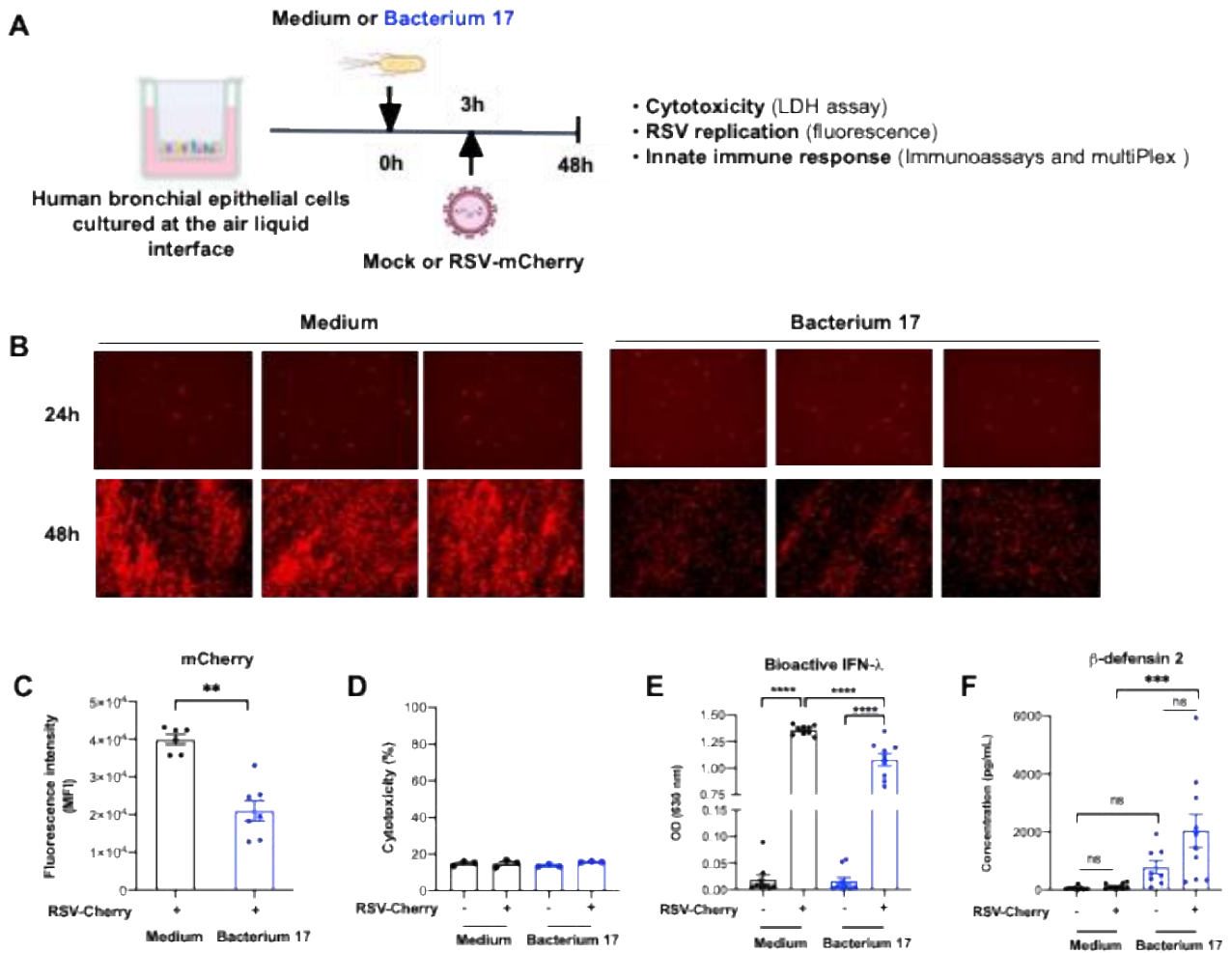


Fig. 7 : RSV replication in human primary airway epithelial cells is reduced by the pre-exposure to bacterium 17. **A.** Experimental design. Human primary bronchial epithelial cells cultured at the air liquid interface (MucilAir™) were first exposed to bacterium 17 (10^3 CFU/well) for 3h, followed by RSV expressing mCherry (RSV-mCherry, MOI = 0.1) infection or an incubation with mock. Supernatants and cell lysates were collected 48h after incubation. RSV replication was evaluated by detecting mCherry using microscopy (**B**, three images representative of six inserts) or a fluorescence plate reader (**C**). Results are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) observed in lysats of RSV-mCherry-infected cells, after subtraction of the background MFI from mock-infected controls (\pm SEM), and represent a pool of two independent experiments ($n = 3$ inserts per group per experiment, $**P < 0.01$, Mann-Whitney test). **D.** Cytotoxicity observed in MucilAir™ was measured by LDH activity assay. Results are expressed as mean \pm SEM. **E.** Bioactive IFN- λ was evaluated by measuring the response of HEK-Blue™ IFN- λ cells to the supernatants. SEAP activity was assessed using QUANTI-Blue™ Solution. The optical density (OD) at 630 nm is shown as mean \pm SEM. **F.** β -defensin 2 secretion in supernatants was evaluated by ELISA. **E-F.** Data represent a pool of two independent experiments ($n = 9$ inserts per group, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$, 2way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test).

Discussion

The lung microbiota and its influence on RSV infection severity have recently been identified as critical research areas in the fight against bronchiolitis in young children^{26,27}. While modulation of the lung microbiota or metabolites appears to be a promising strategy for strengthening immune defences in adults^{14,39}, the impact during the critical period of lung mucosal development and susceptibility to RSV infection is yet unknown³¹. In this study, we demonstrated that the immune responses of neonatal mice to RSV infection, as well as their long-term consequences, could be favorably modulated by lung primo-colonizing bacterial strains given shortly after birth. In particular, using complementary cellular and *in vivo* approaches, we identified a commensal strain, bacterium 17 (*E. coli*), that promoted protective type 1 immune responses and limited RSV replication in both mouse neonatal models and human epithelial cells.

We employed a PCLS-based screening platform from neonatal mice to systematically and unbiasedly assess cytokine responses to a collection of primo-colonizing bacterial strains isolated from mouse neonatal lungs. This strain collection encompasses major bacterial families, ranging from *Staphylococcus* to *Lactobacillus*. While most *Lactobacillus* strains exhibited low immunostimulatory activity on neonatal PCLS, the majority of *Staphylococcus* strains induced a pro-inflammatory cytokine profile. In contrast, bacterium 17, identified as *Escherichia coli*, uniquely induced a strong polarized type-1 cytokine response, particularly IFN- γ and IL-12p70, without causing cytotoxicity, suggesting its potential to prime antiviral immunity in the neonatal lung. However, bacterium 17 also induced the production of IL-9, a cytokine linked to asthma and detected in airway aspirates of severe bronchiolitis patients⁴⁰. Its role in early-life pulmonary mucosa and RSV pathology remains poorly understood⁴¹. Interestingly, bacterium 17 also induced the secretion of IL-22, which is known to promote epithelial barrier regeneration⁴², and whose beneficial inhibitory effect on RSV infection has been demonstrated in a neonatal mouse model⁴³. Although cytokine accumulation during 24-hour PCLS-based screening prevents the evaluation of secretion kinetics or autocrine effects, this approach nevertheless reveals the broad potential of early-life lung primo-colonizing bacteria to induce immune stimulation and polarization, highlighting their potential role in shaping pulmonary immunity and disease susceptibility during early-life. Bacterium 17 differed markedly from the other lung primo-colonizing strains tested due to its unique ability to limit RSV replication in both PCLS and a human airway epithelium model, underscoring its translational relevance. It is interesting to note that strains taken individually may display disease-specific immunobeneficial effects. Indeed, bacterium 24, previously shown to be protective in a juvenile asthma model²⁰, had neither a protective nor a detrimental effect on RSV replication in this study. These findings underscore the diverse immunomodulatory potential of bacteria within the pulmonary microbiota. Functionally, the antiviral activity of bacterium 17 in human epithelial cells appeared to be independent of IFN- λ and was associated with increased production of β -defensin 2, a known host defense peptide capable of destabilizing the viral envelope, thereby indirectly interfering with RSV entry and/or propagation³⁸. Our study also demonstrated that bacterium 17 can prime anti-RSV immunity in neonatal AM by enhancing their production of IFN-I. Thus, bacterium 17 confers innate protective immunity to the lung mucosa in early-life.

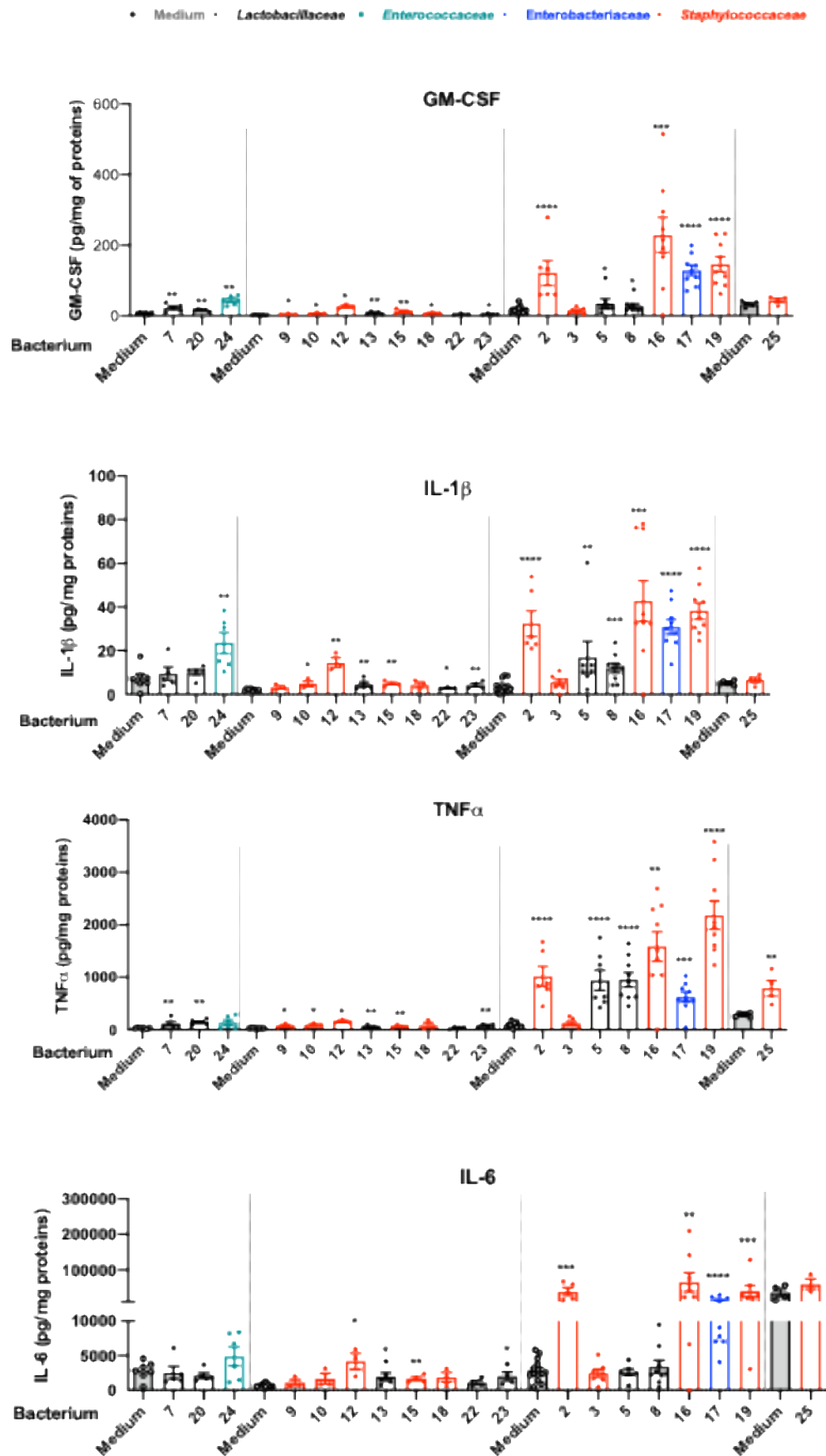
Our *in vivo* studies confirmed the ability of bacterium 17 to reduce RSV replication in the upper and lower respiratory tracts of neonatal mice. The degree of protection was dose-dependent and

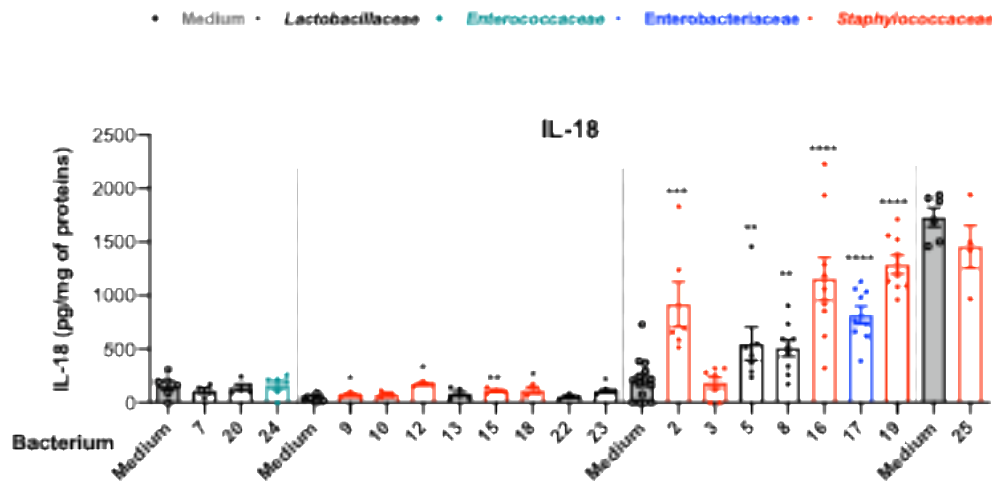
associated with an induction of IFN-I expression, as well as increased neutrophil recruitment. The role of the neutrophils recruited in bacterium 17-treated mice, with or without RSV infection, remains unclear, particularly regarding their protective *versus* pathological effects in neonates⁴⁴. Nevertheless, early-life exposure to bacterium 17 mitigated long-term immunopathology upon re-exposure to RSV in adulthood. Mice treated with bacterium 17 exhibited a relatively stable body weight curve with no major alterations following viral reinfection, a shift toward type 1 immunity (increased IgG2a, decreased IgG1), and reduced eosinophilic infiltration. These data indicate that early-life administration of bacterium 17 induces protective immunomodulation in the lung mucosa, mitigating the long-term consequences of type 2 immune imprinting established by neonatal RSV infection. Although colonization was not assessed, our study highlights the importance of dosing relative to the targeted respiratory region. For instance, the instillation of 10^6 CFU into the lungs of a neonatal mouse represents a substantial bacterial load compared to the naturally sparse neonatal lung microbiota²⁰. Higher doses were required to confer early protection in the lungs, whereas lower doses sufficed for the upper airways. This likely reflects the larger tissue surface of the lungs that must be exposed to the bacteria, rather than differences in microbiota density, which is already low in the pulmonary mucosa⁴⁵. However, before proposing this bacterial strain as a therapeutic candidate for early immunomodulation to prevent acute and chronic RSV-related diseases, it is essential to elucidate the molecular pathways underlying its immunostimulatory effects in both epithelial and immune cells. Future studies should determine whether the beneficial effects of bacterium 17 require live microorganisms, which colonize tissues and are likely more effective than inert components to produce metabolites. Testing conditioned supernatants could then clarify the contribution of bacterial metabolic activity, such as acetate production *in vitro* (data not shown), a metabolite known to enhance antiviral responses in AM during RSV infection^{46,47}. Indeed, in an adult context, airway administration of *Lactobacillus* or *Corynebacterium* strains^{48,49}, or a standardized bacterial lysate derived from human respiratory strains⁵⁰ are associated with a better resistance of mice to RSV challenge. Moreover, higher acetate levels boosts the IFN- β response of AM and epithelial ISG expression, reducing viral load and pulmonary inflammation in RSV-infected adult mice^{46,47}.

Overall, this study reveals that the immune responses of neonatal mice to RSV infection, as well as their long-term consequences, can be favorably modulated by early-life lung-colonizing bacterial strains. These results reinforce the notion that the neonatal lung microbiota plays a key role in shaping pulmonary immune responses, and that its disruption, for example by antibiotics, can have profound and lasting effects on host immunity and respiratory vulnerability²⁴. A recent study in pediatric RSV cohorts indicates that persistent respiratory symptoms during the convalescence phase are associated with disruptions of the respiratory microbiota²⁸. It would be interesting to explore the potential benefits of bacterium 17 during recovery.

Supplemental figure legends

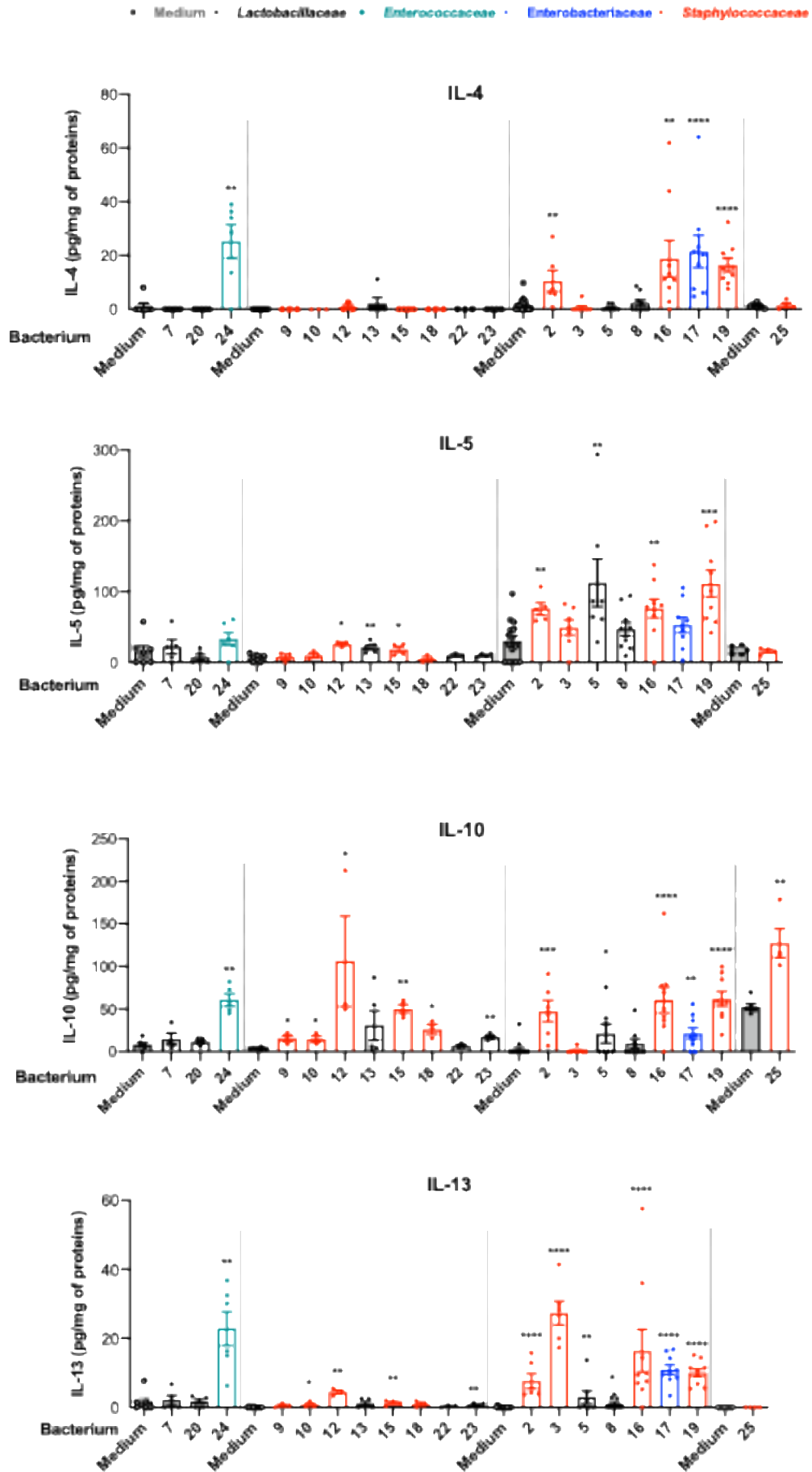
A



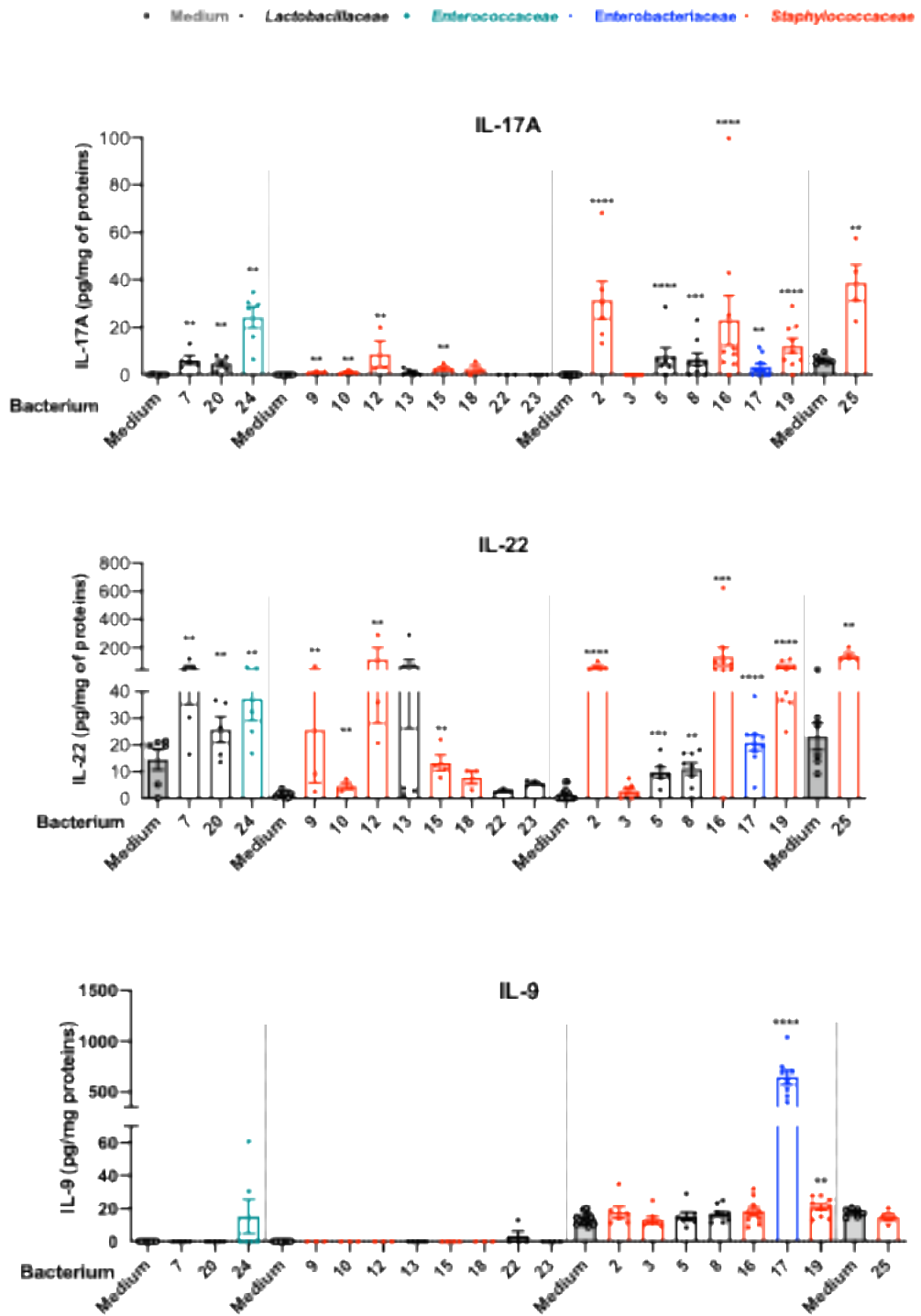
B

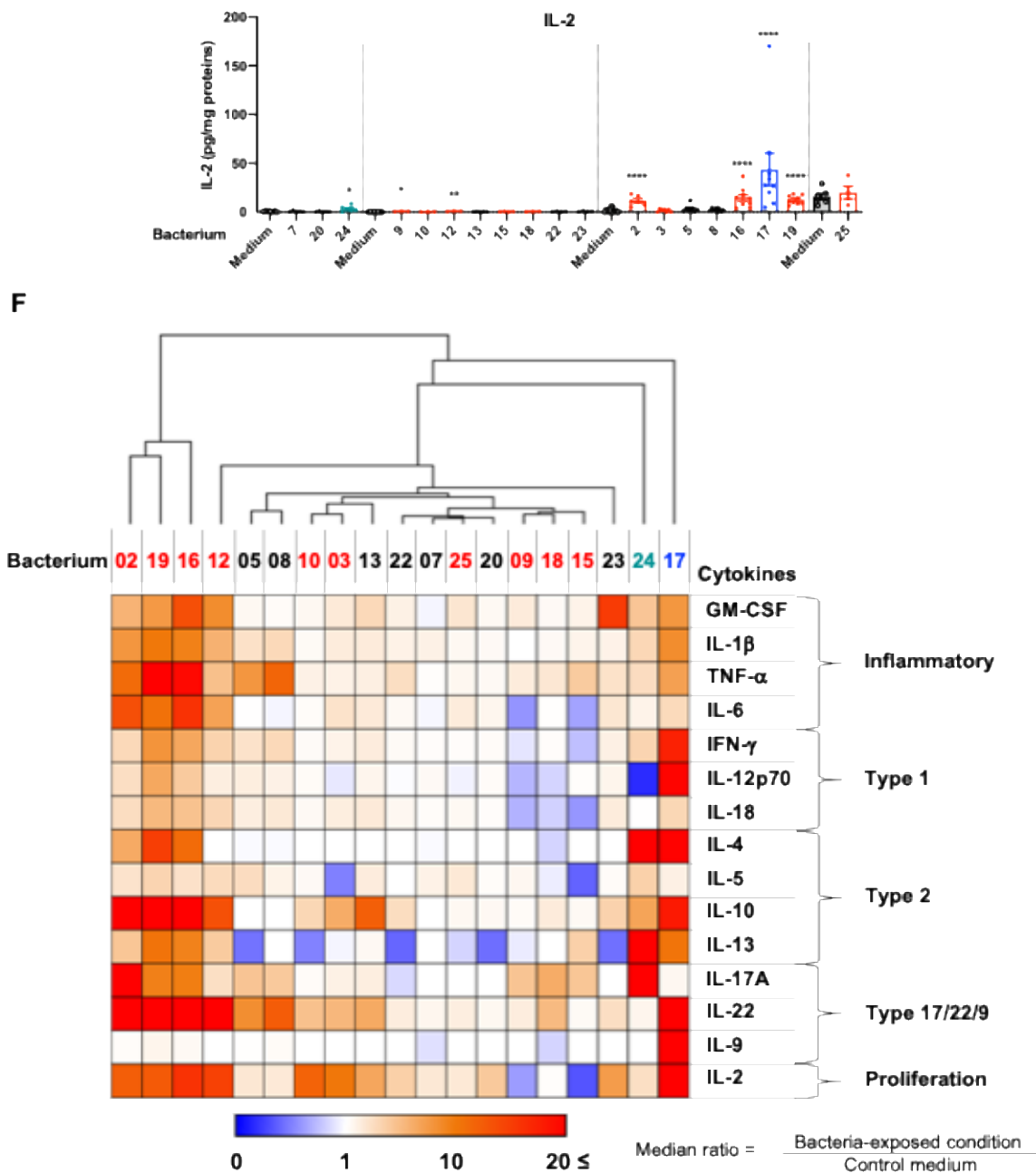
Supplemental Fig. 1 : Cytokines production of precision-cut lung slices (PCLS) from neonatal mice in response to exposure to lung primo-colonizing bacteria. The lungs from 6-day-old mice were isolated and cut with a Krumdieck tissue slicer to obtain PCLS. They were next exposed to bacteria (50 CFU/well) or cultured in medium control. Supernatants were collected 16h after stimulation with bacterial strains or , and cytokine production was assessed using the 15-plex Mouse ProcartaPlex™ immunoassay. **A.** Pro-inflammatory cytokine secretion (GM-CSF, IL-6, IL-1 β , TNF- α). **B.** Secretion of cytokine associated with type 1 immune response (IL-18). **C.** Secretion of cytokines associated with type 2 immune response (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13). **D.** Secretion of cytokines associated with type 17/22/9 immune response (IL-17A, IL-22, IL-9). **E.** Secretion of IL-2 associated with cellular proliferation response. Results are expressed as mean \pm SEM and represent a pool of five independent experiments (n = 2-5 biological replicate samples/condition). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, and **** P < 0.0001 between the control medium and the bacteria-exposed condition (ANOVA, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test). **D.** The heat map illustrates the median ratios of cytokine production (IFN- β , IL-12p70, IL-18, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-22, IL-6, IL-9, IL-2, IL-1 β , TNF- α) between the bacteria-exposed condition and the control medium for cytokine production after 16h of exposure, based on the histograms shown in Figure S1. For each condition and cytokine, the ratios shown in the heatmaps were calculated using the following formula: ratio = (average of the stimulated conditions)/(average of the control conditions). Ratios were entered into Morpheus online software (Broad Institute) to obtain the heatmaps.

C

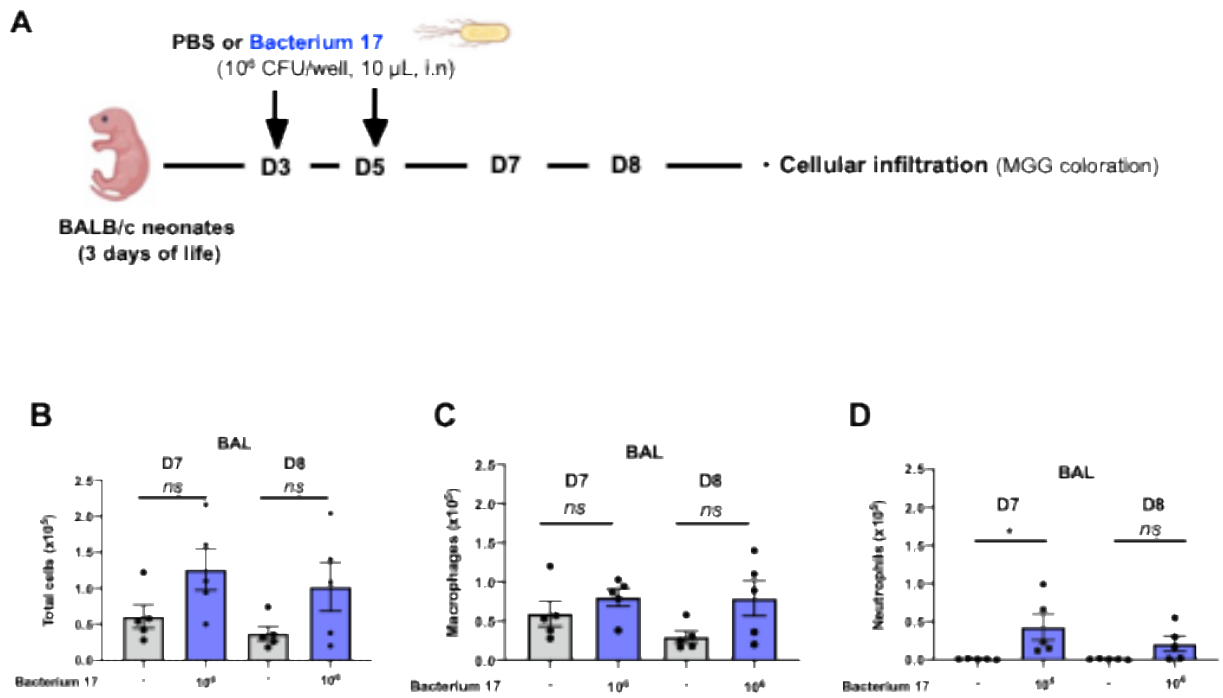


D

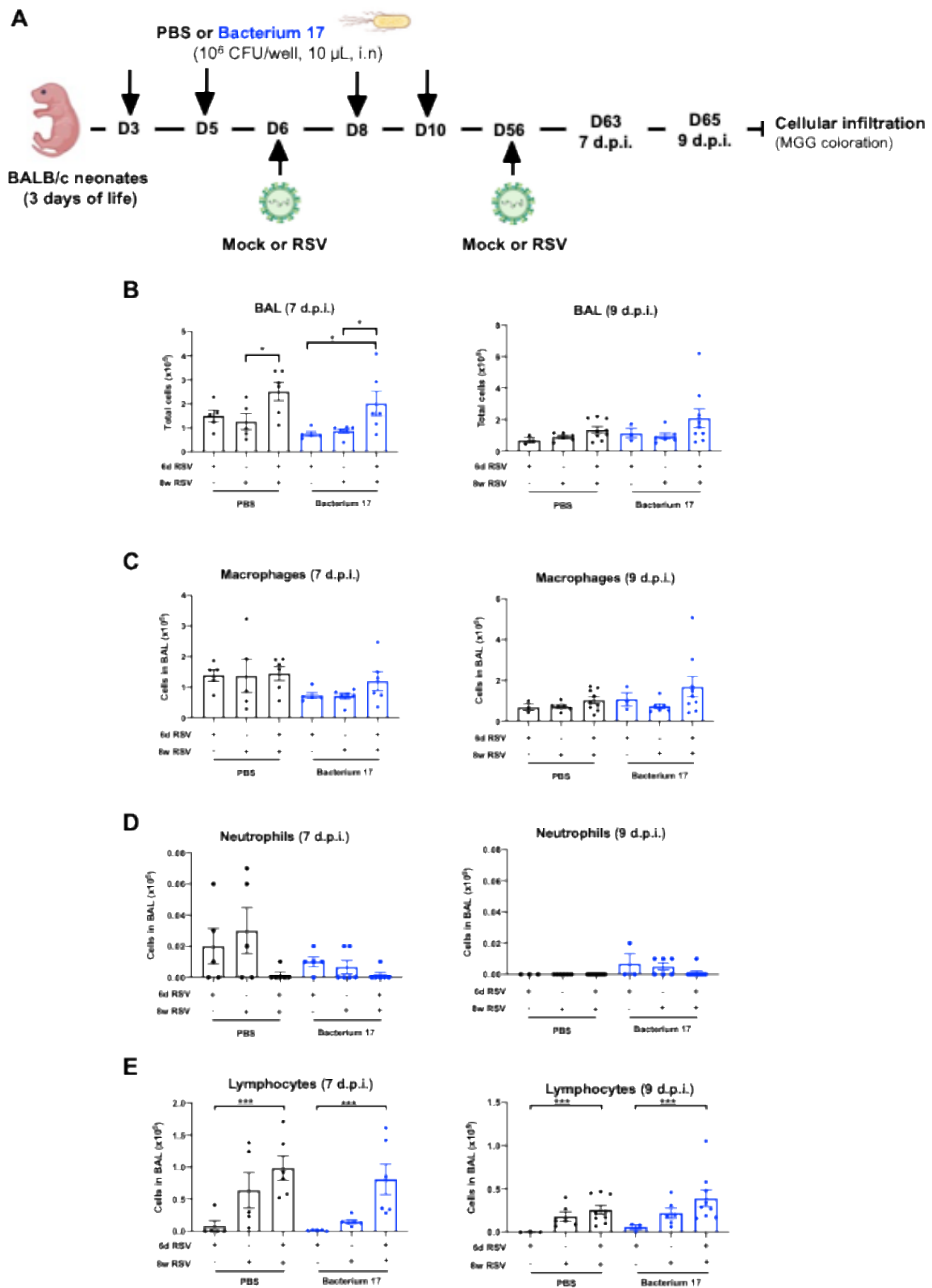




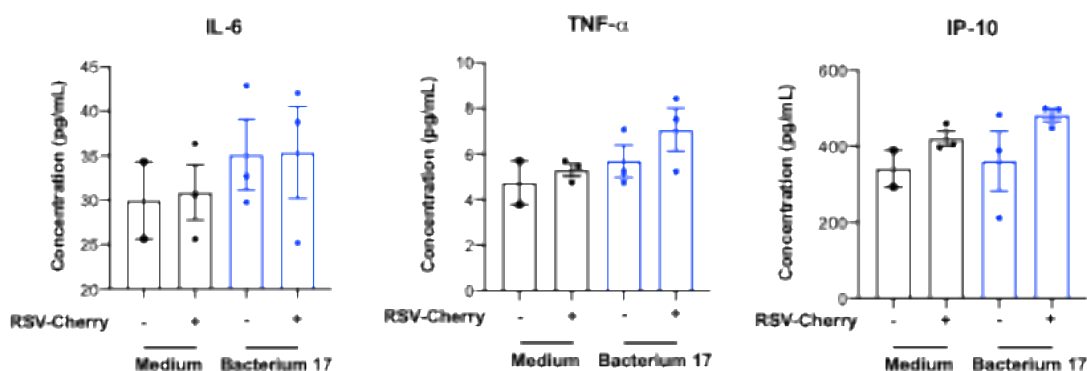
Supplemental Fig. 1 : Cytokines production of precision-cut lung slices (PCLS) from neonatal mice in response to exposure to lung primo-colonizing bacteria. The lungs from 6-day-old mice were isolated and cut with a Krumdieck tissue slicer to obtain PCLS. They were next exposed to bacteria (50 CFU/well) or cultured in medium control. Supernatants were collected 16h after stimulation with bacterial strains or , and cytokine production was assessed using the 15-plex Mouse ProcartaPlex™ immunoassay. **A.** Pro-inflammatory cytokine secretion (GM-CSF, IL-6, IL-1 β , TNF- α). **B.** Secretion of cytokine associated with type 1 immune response (IL-18). **C.** Secretion of cytokines associated with type 2 immune response (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13). **D.** Secretion of cytokines associated with type 17/22/9 immune response (IL-17A, IL-22, IL-9). **E.** Secretion of IL-2 associated with cellular proliferation response. Results are expressed as mean \pm SEM and represent a pool of five independent experiments (n = 2-5 biological replicate samples/condition). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, and **** P < 0.0001 between the control medium and the bacteria-exposed condition (ANOVA, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test). **D.** The heat map illustrates the median ratios of cytokine production (IFN- β , IL-12p70, IL-18, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-22, IL-6, IL-9, IL-2, IL-1 β , TNF- α) between the bacteria-exposed condition and the control medium for cytokine production after 16h of exposure, based on the histograms shown in Figure S1. For each condition and cytokine, the ratios shown in the heatmaps were calculated using the following formula: ratio = (average of the stimulated conditions)/(average of the control conditions). Ratios were entered into Morpheus online software (Broad Institute) to obtain the heatmaps.



Supplemental Fig. 2 : Bronchoalveolar cellular response to intranasal exposure to bacterium 17 in neonatal mice. **A.** Experimental design. Three-day-old mice were treated intranasally with bacterium 17 (10^6 CFU, i.n., $10 \mu\text{L}$) or PBS vehicle at days 3 and 5 of age. At day 7 and 8 of age, mice were euthanized and BAL were collected. **B.** Total cell counts in BAL samples. Cellular composition in BAL was assessed by May-Grünwald-Giemsa staining to identify and differentiate macrophages (**C**) and neutrophils (**D**). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 3$ per group). $*P < 0.05$ between the PBS- and the bacteria-exposed condition (ANOVA, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test).



Supplemental Fig. 3 : Early-life airway delivery of bacterium 17 prevents weight loss during RSV reinfection in adulthood and shapes the adaptive antibody response. **A.** Experimental design. Three-day-old mice were treated intranasally with bacterium 17 (10^6 CFU, i.n., $10\ \mu\text{L}$) or PBS vehicle at days 3, 5, 8, and 10 of age. On postnatal day 6, mice were infected intranasally with RSV-A2 (2.3×10^4 PFU in $10\ \mu\text{L}$), followed by a second infection with RSV-A2 (2.3×10^5 PFU in $100\ \mu\text{L}$, i.n.) at 8 weeks of age. **B-E.** Mice were euthanized at 7 or 9 d.p.i. to assess cellular infiltration in the bronchoalveolar lavage (BAL). **B.** Total cell counts in BAL. Cellular infiltration in BAL was assessed by May-Grünwald-Giemsa staining to identify and differentiate macrophages (**C**), neutrophils (**D**), and lymphocytes (**E**) at 7 or 9 d.p.i.. Results are expressed as mean \pm SEM. Data are representative of two independent experiments ($n = 5-9$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Mann-Whitney test.



Supplemental Fig. 4 : Cytokine response to RSV infection in primary human airway cells with or without Bacterium 17 pre-exposure. Human primary bronchial epithelial cells cultured at the air liquid interface (MucilAir™) were first exposed to bacterium 17 (10^3 CFU/well) for 3h, followed by RSV expressing mCherry (RSV-mCherry, MOI = 0.1) infection or an incubation with mock. Basal medium and cell lysates were collected 48h after incubation. IL-6, TNF- α or IP-10 concentrations in basal medium were assessed using Luminex immunoassay. Means \pm SEM are represented.

Supplemental table S1: Descriptive table of lung primo-colonizing commensal bacteria isolated from neonatal mice.

Paper identification number	Family	Species Identification by 16S sequencing and mass spectrometry (MALDI-TOF)	Phylum (P = Proteobacteria; F = Firmicutes)	Effect on RSV infection
1	Staphylococcaceae	<i>cohnii/cohnii</i>	F	Cytotoxic in vitro assay
2	Staphylococcaceae	<i>epidermidis</i>	F	Not evaluated
3	Staphylococcaceae	<i>nepalensis</i>	F	Not evaluated
4	Staphylococcaceae	<i>fleuretti/lentus</i>	F	Not used in this study
5	Lactobacillaceae	<i>lactis</i>	F	Not evaluated
6	Enterobacteriaceae	<i>Proteus mirabilis</i>	P	Not used in this study
7	Lactobacillaceae	<i>lactis</i>	F	Not evaluated
8	Lactobacillaceae	<i>lactis</i>	F	Not evaluated
9	Staphylococcaceae	<i>lentus</i>	F	Not evaluated
10	Staphylococcaceae	<i>epidermidis</i>	F	Not evaluated
11	Enterobacteriaceae	<i>Proteus mirabilis</i>	P	Cytotoxic in vitro assay
12	Staphylococcaceae	<i>sciuri</i>	F	Not evaluated
13	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillaceae murinus</i>	F	Not evaluated
14	Staphylococcaceae	<i>cohnii/epidermidis</i>	F	Not used in this study
15	Staphylococcaceae	<i>sciuri</i>	F	Not evaluated
16	Staphylococcaceae	<i>sciuri</i>	F	Not effect in vitro
17	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	P	Protective in vitro and in vivo
18	Staphylococcaceae	<i>epidermidis</i>	F	Not evaluated
19	Staphylococcaceae	<i>sciuri</i>	F	Not evaluated
20	Lactobacillaceae	<i>murinus</i> (CNCM 5314) <i>Ref Bernard-Raichan et al.</i>	F	Not evaluated
21	Staphylococcaceae	<i>cohnii/nepalensis</i>	F	Not used in this study
22	Lactobacillaceae	<i>murinus/Ligilactobacillus murinus</i> (CNCM 4967) <i>Ref Sécher et al.</i>	F	Not evaluated
23	Lactobacillaceae	<i>murinus/Ligilactobacillus murinus</i> (CNCM 4968) <i>Ref Sécher et al.</i>	F	Not evaluated
24	Enterococcaceae	<i>faecalis</i> (CNCM 4969) <i>Ref Remot et al.</i>	F	Not effect in vitro
25	Staphylococcaceae	<i>sciuri</i> (CNCM 4970) <i>Ref Remot et al.</i>	F	Potential detrimental effect in vitro

Supplemental table S2: List of primers used for RT-qPCR.

Name of gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
mbActine	TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA	GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA
mGapdh	GGGGTCGTTGATGGCAACA	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
mHprt	CAGGCCAGACTTTGTTGGAT	TTGCGCTCATCTTAGGCTTT
N (viral gene)	AGATCAACTTCTGTCATCCAGCAA	TTCTGCACATCATAATTAGGAGTATCAAT

References

1. 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).
2. Zar, H.J. et al. Early-life respiratory syncytial virus disease and long-term respiratory health. *Lancet Respir Med* 12, 810–821 (2024).
3. Dieussaert, I. et al. RSV Prefusion F Protein-Based Maternal Vaccine - Preterm Birth and Other Outcomes. *N Engl J Med* 390, 1009–1021 (2024).
4. Mahase, E. FDA pauses all infant RSV vaccine trials after rise in severe illnesses. *BMJ* 387, q2852 (2024).
5. Cormier, S.A., You, D. & Honnegowda, S. The use of a neonatal mouse model to study respiratory syncytial virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8, 1371–1380 (2010).
6. Morris, S.B. et al. Long-term alterations in lung epithelial cells after EL-RSV infection exacerbate allergic responses through IL-1beta-induced pathways. *Mucosal Immunol* 17, 1072–1088 (2024).
7. Malinczak, C.A. et al. Early-life pulmonary viral infection leads to long-term functional and lower airway structural changes in the lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 326, L280–L291 (2024).
8. 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).
9. 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).
10. Hall, C.B., Douglas, R.G., Jr., Simons, R.L. & Geiman, J.M. Interferon production in children with respiratory syncytial, influenza, and parainfluenza virus infections. *J Pediatr* 93, 28–32 (1978).
11. Hijano, D.R. et al. Role of Type I Interferon (IFN) in the Respiratory Syncytial Virus (RSV) Immune Response and Disease Severity. *Front Immunol* 10, 566 (2019).
12. 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).
13. 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).
14. 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).
15. Torow, N., Marsland, B.J., Hornef, M.W. & Gollwitzer, E.S. Neonatal mucosal immunology. *Mucosal Immunol* 10, 5–17 (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. Saluzzo, S. et al. First-Breath-Induced Type 2 Pathways Shape the Lung Immune Environment. *Cell Rep* 18, 1893–1905 (2017).
18. Gollwitzer, E.S. et al. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med* 20, 642–647 (2014).
19. Pattaroni, C., Marsland, B.J. & Harris, N.L. Early-Life Host-Microbial Interactions and Asthma Development: A Lifelong Impact? *Immunol Rev* 330, e70019 (2025).
20. Remot, A. et al. Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *ISME J* 11, 1061–1074 (2017).
21. Perdijk, O., Azzoni, R. & Marsland, B.J. The microbiome: an integral player in immune homeostasis and inflammation in the respiratory tract. *Physiol Rev* 104, 835–879 (2024).
22. 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).
23. Schuijs, M.J. et al. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science* 349, 1106–1110 (2015).
24. Perdijk, O. et al. Antibiotic-driven dysbiosis in early life disrupts indole-3-propionic acid production and exacerbates allergic airway inflammation in adulthood. *Immunity* 57, 1939–1954 e1937 (2024).
25. 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).
26. Schippa, S. et al. Nasal Microbiota in RSV Bronchiolitis. *Microorganisms* 8 (2020).
27. Yagi, K., Asai, N., Huffnagle, G.B., Lukacs, N.W. & Fonseca, W. Early-Life Lung and Gut Microbiota Development and Respiratory Syncytial Virus Infection. *Front Immunol* 13, 877771 (2022).
28. Kristensen, M. et al. The respiratory microbiome is linked to the severity of RSV infections and the persistence of symptoms in children. *Cell Rep Med* 5, 101836 (2024).
29. Rosas-Salazar, C. et al. Nasopharyngeal *Lactobacillus* is associated with a reduced risk of childhood wheezing illnesses following acute respiratory syncytial virus infection in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 142, 1447–1456 e1449 (2018).
30. Bernard-Raichon, L. et al. A Pulmonary *Lactobacillus murinus* Strain Induces Th17 and RORgammat(+) Regulatory T Cells and Reduces Lung Inflammation in Tuberculosis. *J Immunol* 207, 1857–1870 (2021).
31. de Steenhuijsen Piters, W.A.A., Binkowska, J. & Bogaert, D. Early Life Microbiota and Respiratory Tract Infections. *Cell Host Microbe* 28, 223–232 (2020).

32. Rameix-Welti, M.A. et al. Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nat Commun* 5, 5104 (2014).
33. 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).
34. Drjac, 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).
35. Liu, G. et al. Use of precision cut lung slices as a translational model for the study of lung biology. *Respir Res* 20, 162 (2019).
36. Makris, S., Bajorek, M., Culley, F.J., Goritzka, M. & Johansson, C. Alveolar Macrophages Can Control Respiratory Syncytial Virus Infection in the Absence of Type I Interferons. *J Innate Immun* 8, 452–463 (2016).
37. Galani, I.E. et al. Interferon-lambda Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness. *Immunity* 46, 875–890 e876 (2017).
38. Kota, S. et al. Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus. *J Biol Chem* 283, 22417–22429 (2008).
39. Fonseca, W., Lukacs, N.W. & Ptaschinski, C. Factors Affecting the Immunity to Respiratory Syncytial Virus: From Epigenetics to Microbiome. *Front Immunol* 9, 226 (2018).
40. McNamara, P.S. et al. Interleukin 9 production in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Lancet* 363, 1031–1037 (2004).
41. Dodd, J.S. et al. IL-9 regulates pathology during primary and memory responses to respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 183, 7006–7013 (2009).
42. Dean, L.S. et al. I don't know about you, but I'm feeling IL-22. *Cytokine Growth Factor Rev* 80, 1–11 (2024).
43. Das, S. et al. Interleukin-22 Inhibits Respiratory Syncytial Virus Production by Blocking Virus-Mediated Subversion of Cellular Autophagy. *iScience* 23, 101256 (2020).
44. Tahamtan, A. et al. Neutrophils in respiratory syncytial virus infection: From harmful effects to therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol* 178, 515–530 (2021).
45. Ozcam, M. & Lynch, S.V. The gut-airway microbiome axis in health and respiratory diseases. *Nat Rev Microbiol* 22, 492–506 (2024).
46. Antunes, K.H. et al. Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. *Nat Commun* 10, 3273 (2019).
47. Ji, J.J. et al. Probiotics protect against RSV infection by modulating the microbiota-alveolar-macrophage axis. *Acta Pharmacol Sin* 42, 1630–1641 (2021).
48. Villena, J. et al. Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C). *BMC Immunol* 13, 53 (2012).
49. Kanmani, P. et al. Respiratory Commensal Bacteria *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* Improves Resistance of Infant Mice to Respiratory Syncytial Virus and *Streptococcus pneumoniae* Superinfection. *Front Microbiol* 8, 1613 (2017).
50. Antunes, K.H. et al. Airway Administration of Bacterial Lysate OM-85 Protects Mice Against Respiratory Syncytial Virus Infection. *Front Immunol* 13, 867022 (2022).

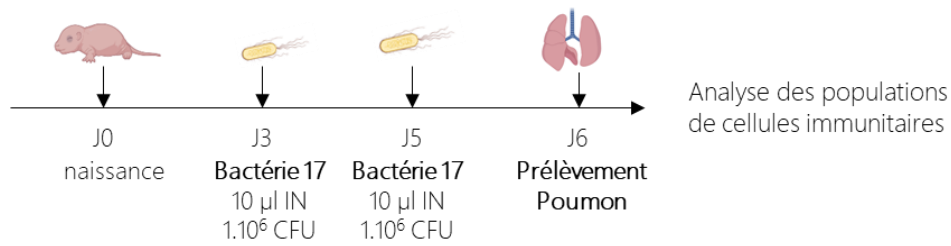
2-3 Résultats supplémentaires non publiés

2-3-1 Étude du paysage immunitaire pulmonaire néonatal en réponse à l'exposition à une bactérie primo-colonisatrice des poumons

L'ensemble des résultats présentés dans l'article précédent met en évidence le rôle immunomodulateur de la bactérie 17 dans le contexte de l'infection par le VRS. L'administration de cette souche *in vivo* a conduit à une diminution de la réplication virale dans les poumons, corrélée à un recrutement plus efficace de PNN au site d'infection. Ces observations suggèrent que la bactérie 17 favorise l'établissement d'un environnement immunitaire pulmonaire plus réactif et mieux adapté à la lutte contre l'infection par le VRS. Dans la continuité de ces travaux, nous avons cherché à mieux caractériser l'impact de cette bactérie sur la composition et la distribution des principales populations cellulaires de la muqueuse pulmonaire néonatale après exposition à la bactérie 17, afin d'évaluer son influence sur l'état basal du compartiment immunitaire pulmonaire.

L'effet de la bactérie 17 sur les cellules immunitaires de la muqueuse pulmonaire a été évalué par cytométrie en flux. Dans ce protocole, des souris Balb/c ont reçu par voie intranasale la bactérie 17 ou du PBS, aux jours trois et cinq de vie. Les poumons, prélevés à six jours de vie, ont été soumis à une lyse mécanique pour obtenir une suspension cellulaire, qui a ensuite été marquée à l'aide de cocktails d'anticorps pour permettre l'identification des principales populations de cellules immunitaires (**Figure 33A**). Parmi les cellules vivantes, nous avons observé que l'exposition à la bactérie 17 fait augmenter la présence des leucocytes (CD45⁺) dans le tissu pulmonaire. De plus, au sein de la lignée myéloïde, nous observons une augmentation significative du pourcentage de PNN et de lymphocytes (Lc) ne présentant pas les marqueurs des Lc T (CD3⁺) ni B (CD19⁺) chez les animaux exposés à la bactérie 17 (**Figure 33B**). Cette observation nous a orienté vers l'étude des Lc appartenant à l'immunité innée que sont les ILC. Cette nouvelle analyse a mis en évidence l'augmentation de la proportion de Lc NK au sein des cellules exprimant le marqueur NKp46 chez les animaux exposés à la bactérie 17, mais cette augmentation n'est pas significative (**Figure 33B**). Ces résultats montrent que l'exposition à la bactérie 17 induit une augmentation du nombre de cellules immunitaires, dont les PNN et les Lc NK, cellules d'intérêt contre l'infection par le VRS (Openshaw 2001), suggérant un remodelage du paysage immunitaire pulmonaire néonatal.

A



B

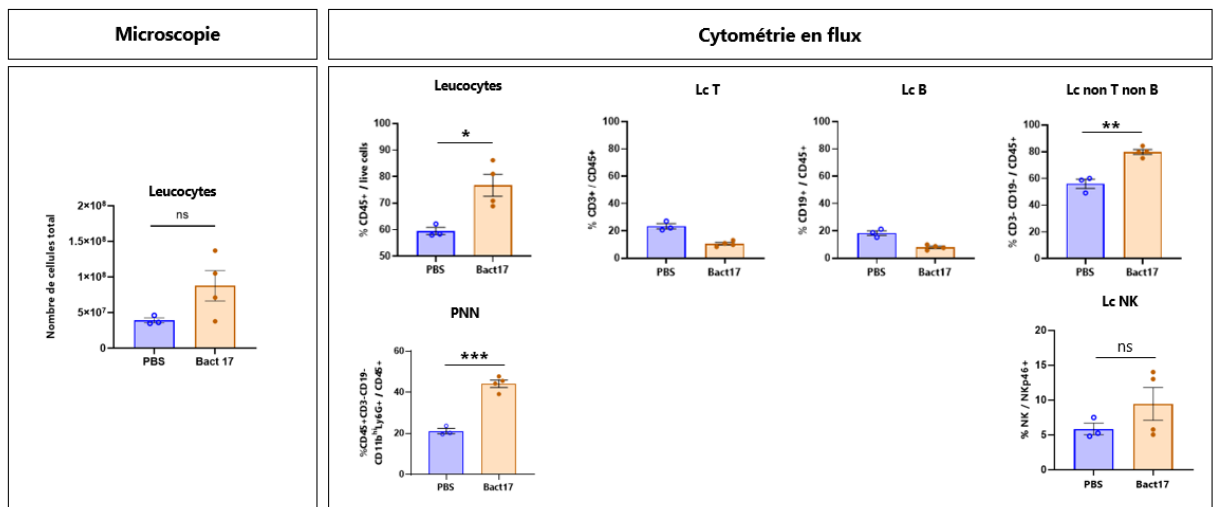


Figure 33 : Identification des cellules immunitaires de la muqueuse pulmonaire suite à l'exposition à la bactérie 17 chez des souris Balb/c de 6 jours de vie. (A) Schéma expérimental. Les souris ont été exposées à la bactérie 17 à 3 et 5 jours de vie par voie intranasale. Après euthanasie à 6 jours de vie, les poumons ont été prélevés afin de réaliser une suspension cellulaire après broyage mécanique des tissus. (B) Les cellules totales des suspensions cellulaires ont été dénombrées au microscope sur cellules de Kovalside puis marquées grâce à trois panels d'anticorps permettant l'identification des populations de cellules immunitaires pulmonaires. Les panels et stratégies d'identification des cellules sont communes à la figure 32. La fréquence des cellules immunitaires est exprimée en pourcentage parmi les cellules vivantes. La fréquence des différentes lignées et des PNN est exprimée en pourcentage parmi les leucocytes (CD45⁺) et la fréquence des Lc NK est exprimée en pourcentage au sein de leur population d'origine, les cellules NKp46⁺ (voir stratégie d'identification en annexe 1). Test statistique utilisé : en cas de normalité dans la distribution des échantillons, le t-test a été utilisé, dans le cas contraire, la version non paramétrique a été appliquée (Mann-Whitney). * p<0,05, **p<0,01 ***p<0,001 et ns : non significatif. Les données sont issues d'une expérimentation unique.

2-3-2 Effets de l'administration d'une souche de bactérie primo-colonisatrice des poumons sur la réplication du VRS-Luc et la réponse immunitaire chez la souris adulte

La période néonatale influence à la fois la composition et la réactivité des cellules immunitaires de la muqueuse pulmonaire, ce qui explique les différences de réponse face à l'infection par le VRS entre souriceaux et adultes. Chez les nouveau-nés, la muqueuse pulmonaire se caractérise par un environnement immunitaire tolérogène, qui la rend plus vulnérable aux infections. Nous avons formulé l'hypothèse que l'administration de la bactérie 17 pourrait remodeler ce paysage immunitaire néonatal et ainsi rapprocher la réponse des souriceaux, de celle des adultes. Grâce au modèle d'infection en période néonatale, nous avons pu montrer que l'administration de la bactérie 17 avant l'infection par le VRS réduit la réplication virale chez les souriceaux. Cet effet s'accompagne d'un meilleur recrutement des PNN *in vivo* et d'une augmentation de la production d'IFN-I par les macrophages alvéolaires *in vitro*. Pour compléter ces données, nous avons comparé la réponse immunitaire des souriceaux à celle des souris adultes dans le modèle expérimental d'exposition à la bactérie 17 avant l'infection par le VRS.

Pour cela, des souris Balb/c adultes ont reçu par voie nasale la bactérie 17 ou une solution saline (PBS) trois jours et un jour avant l'infection par une souche recombinante de VRS exprimant la luciférase (VRS-Luc) ou par du surnageant de culture cellulaire utilisé pour la production virale (Mock) (**Figure 34A**). Tous les animaux ont été euthanasiés à quatre jours post-infection, correspondant au pic de réplication du VRS dans les souris adultes BALB/c (Rameix-Welti et al. 2014). Les souris infectées par le VRS-Luc ont présenté une légère perte de poids à 2 et 3 jpi, perte de poids qui est corrigée par le prétraitement avec la bactérie 17 (**Figure 34B**). Le prétraitement avec la bactérie 17 réduit significativement la réplication virale quantifiée par la mesure de la bioluminescence au niveau des fosses nasales (**Figure 34C**) et des lysats pulmonaires (**Figure 34D**) par rapport aux témoins non traités.

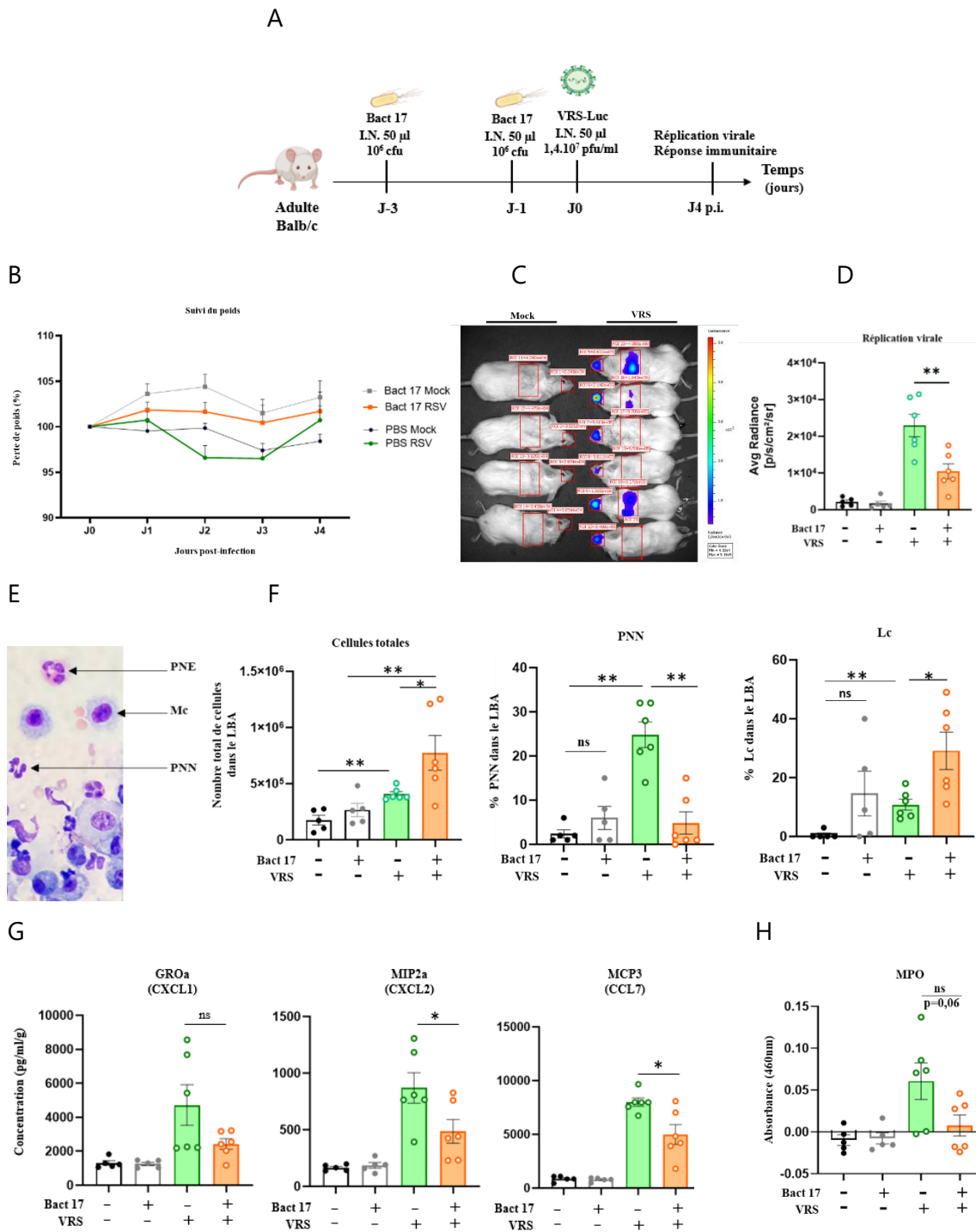


Figure 34 : L'administration préventive de la bactérie 17 chez les souris adultes interfère avec la réplication du VRS-Luc et modifie le recrutement des cellules inflammatoires pulmonaires. (A) Schéma expérimental. La bactérie 17 ou une solution saline contrôlée (PBS) ont été administrées par voie intranasale à des souris BALB/c à J-3 et J-1 avant une infection par le VRS-Luc. Les animaux ont tous été euthanasiés à 4 jours post-infection. (B) L'état de santé des animaux a été évalué pendant toute la durée de l'expérimentation par mesure du poids (g). La perte de poids (%) est calculée en rapportant les poids des animaux après l'infection à leur poids avant l'infection. (C) Image illustrant l'émission de bioluminescence *in vivo* détecté à l'IVIS spectrum. (D) La réplication du VRS-Luc a été mesurée par la détection de la bioluminescence (photon/sec/cm²/sr) émise par les broyats de poumons en présence du substrat de la luciférase, la luciférine, puis rapportée aux poids des poumons. (E) Coloration de MGG du LBA permettant l'identification morphologique des cellules immunitaires. (F) Les cellules totales des LBA ont été dénombrées au microscope sur cellules de Kovalside. Après cytocentrifugation et coloration de MGG des LBA la formule cellulaire est établie d'après le compte de 200 cellules. (G) Les concentrations en chémokines ont été dosées dans les

broyats de poumons en multiplex et analysées avec le logiciel BioPlex puis rapportées aux poids de poumons. **(H)** La myéloperoxydase (MPO) a été dosée dans les LBA par mesure de son activité enzymatique, évaluée par une technique basée sur l'oxydation d'un substrat chromogène en présence de peroxyde d'hydrogène. La mesure de l'absorbance à 460 nm permet de quantifier l'activité de la MPO. Test statistique réalisé avec le logiciel GraphPad Prism V8.1.1(GraphPad Software, Inc.), en cas de normalité dans la distribution des échantillons, le t-test a été utilisé, dans le cas contraire, la version non paramétrique a été appliquée (Mann-Whitney). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et ns : non significatif. Les données sont issues d'une expérimentation.

Afin d'explorer le lien entre la diminution de la réplication virale et le recrutement cellulaire, nous avons analysé par cytométrie en flux les populations présentes dans les fosses nasales et caractérisé la composition cellulaire du lavage broncho-alvéolaire (LBA) après coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) (**Figure 34E**). L'administration de la bactérie 17 n'a pas modifié la composition cellulaire au niveau nasal (données non présentées). En revanche, le LBA des souris infectées présentait une augmentation significative du nombre total de cellules, effet encore plus marqué chez les animaux prétraités avec la bactérie 17. L'analyse morphologique au microscope a montré que cette augmentation cellulaire correspondait essentiellement à des PNN chez les animaux infectés, alors que chez ceux ayant reçu la bactérie 17, elle concernait majoritairement des Lc (**Figure 34F**). Le dosage dans les LBA de la myéloperoxydase (MPO), enzyme présente dans les membranes des phagosomes des PNN pour produire des ions superoxydes, a permis de révéler une activité importante des PNN dans le groupe des animaux infectés par le VRS-Luc par rapport aux animaux témoins (**Figure 34H**). Le traitement par la bactérie 17 des animaux infectés prévient cette activation des PNN (**Figure 34H**). Enfin, le dosage multiplex des chimiokines dans les lysats pulmonaires a révélé une quantité plus importante des chimiokines CXCL1, CXCL2 et CCL7 impliquées dans le recrutement des PNN chez les animaux infectés par rapport aux animaux non infectés. Le pré-traitement des animaux infectés par la bactérie 17 réduit significativement la production de CXCL1, CXCL2 et CCL7 (**Figure 34G**). Cet effet du traitement par la bactérie 17 chez les souris infectées est cohérent avec le plus faible recrutement de PNN et leur plus faible niveau d'activation.

2-3-3 Conclusion

Pris dans leur globalité, nos résultats mettent en évidence la capacité de la bactérie 17 à limiter l'infection par le VRS en modulant la réponse immunitaire, selon des mécanismes distincts chez les souriceaux et chez les adultes. Chez les souriceaux, la diminution de la réplication virale s'accompagne d'un recrutement de PNN, tandis que chez les adultes, si l'infection par le VRS induit également un afflux de PNN, le contrôle de la propagation virale semble plutôt associé à la présence de Lc. Ainsi, la bactérie 17 exerce un effet conservé sur la réplication virale entre les deux groupes d'âge, mais dans un environnement cellulaire propre à chaque âge, suggérant que le contexte néonatal et l'infection par le VRS influencent différemment le paysage immunitaire pulmonaire. Ces observations soulèvent par ailleurs la question de la nature des mécanismes impliqués : la présence d'une bactérie vivante est-elle nécessaire pour induire cet effet, ou des éléments bactériens inertes pourraient-ils suffire ? Ce point pourrait être mis en perspective avec la troisième partie du travail, qui explore précisément l'impact d'éléments bactériens inertes.

3-Effets de l'administration d'un postbiotique en période néonatale sur l'évolution de l'infection par le VRS

3-1 Introduction

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet collaboratif avec le laboratoire PiLeJe, visant à étudier l'impact d'une supplémentation en postbiotique sur l'infection par le VRS au cours de la période néonatale. Les postbiotiques ont été définis par l'OMS en 2021 comme des « préparations de microorganismes inanimés et/ou de leurs composants qui confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte ». Contrairement aux probiotiques, les postbiotiques ne contiennent pas de microorganismes vivants, mais peuvent inclure des fragments cellulaires et des métabolites issus du métabolisme des microorganismes. L'ensemble de ces composants peut exercer diverses activités biologiques, notamment antibactériennes, antioxydantes ou immunomodulatrices (pour revue Mosca *et al.*, 2022). L'utilisation de postbiotiques présente plusieurs avantages par rapport aux probiotiques : 1) sur le plan de la sécurité : aucun risque de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques ni de bactériémie, ce qui leur confère un profil d'innocuité favorable, notamment chez les populations vulnérables (nouveau-nés, individus immunodéprimés), 2) sur le plan de l'efficacité : les composés actifs sont directement disponibles dans l'intestin, sans nécessiter l'implantation préalable d'une souche vivante au sein du microbiote, et ces composés ne sont pas inactivés par un traitement antibiotique, et 3) sur le plan pratique : les postbiotiques sont plus stables que les probiotiques, avec des conditions de conservation simplifiées.

Si les postbiotiques font actuellement l'objet d'un intérêt croissant, un nombre limité d'entre eux a prouvé leur sécurité et leurs effets bénéfiques. Ainsi, en France, le seul postbiotique disposant de l'AMM est une association de *Lactobacillus LB* (*Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus delbrueckii*) et d'un milieu de culture fermenté, commercialisée sous le nom de Lactéol®. Aucune étude ne décrit à ce jour les effets de l'administration de postbiotique en période néonatale. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à leur effet bénéfique potentiel face à l'infection par le VRS, en collaboration avec le laboratoire Pileje, spécialisé dans les solutions de santé autour de la nutrition et des microbiotes.

Bien que l'approche conceptuelle reste proche de celle décrite précédemment, le modèle animal mis en place dans ce projet présente plusieurs différences majeures, notamment concernant la voie d'administration (orale *versus* intranasale), la nature de la souche utilisée (préparation tyndallisée *versus* souche vivante) et l'âge des animaux lors de l'infection par le VRS (vingt et un jours *versus* six jours). Cette durée de 21 jours a été choisie pour refléter le protocole de traitement utilisé dans les essais cliniques pédiatriques (Szajewska *et al.* 2013; Savino *et al.* 2010).

Dans ce protocole, les animaux ont reçu quotidiennement, par gavage, soit le postbiotique (*Bifidobacterium breve* LA708, *B. breve* LA708) soit une solution saline, à partir de cinq jours de vie et jusqu'au jour de l'euthanasie.

La réplication du virus recombinant VRS-Luc a été suivie par mesure de la bioluminescence *in vivo*. La réponse immunitaire a été évaluée par l'analyse de l'infiltrat cellulaire dans les LBA, le dosage des cytokines et la caractérisation des populations immunitaires pulmonaires.

A postbiotic supplementation in early life impacted Respiratory Syncytial Virus infection in mice

C. Chottin, S. Holowacz, C. Ferret, S. Riffault, E. Jacouton, D. Descamps

Revue des Maladies Respiratoires Volume 42, Issue 4, April 2025, Pages 212-213

doi.org/10.1016/j.rmr.2025.02.062

Introduction

The Respiratory Syncytial Virus (RSV) causes severe bronchiolitis in children with 30% of them affected each year. Infection in neonates is characterised by a Th2 immune response and a low Th1 increasing the risk to develop asthma later. Oral probiotics supplementation reduced RSV infection by modulating the lung immune response [1]. However, no study describes nor the effect of postbiotics or inanimate bacteria in very early life.

Methods

Five-days-old BALBC mice were randomly divided into two groups, one receiving tyndallized *Bifidobacterium breve* LA708 (equivalent to 5×10^8 CFU before tyndallization) or the other PBS as negative control every day during 2 weeks. Luciferase recombinant RSV (205×10^3 pfu per animal) was intranasally inoculated at day 21 to half the mice in both groups (**Fig 35A**). Infection was recorded in vivo by bioluminescence in lung and snout at 1.4 and 10 days post infection (dpi). Animals were necropsied and tissues and bronchoalveolar fluid (BALF) were collected for analysis of viral replication (bioluminescence activity) and lung inflammation (luminex assay and cytometry).

Results

All infected animals showed a mean radiance of around 1×10^4 in lungs and 1×10^5 in snouts at 1 and 4 dpi confirming the infection. *B. breve* LA708 showed no effect on infection at 1dpi in either the snouts or lungs. However, animals supplemented with *B. breve* LA708 exhibited lower infection in snouts at 4 dpi compared with animals supplemented with PBS. Similarly, although all mice were free of infection at 10 dpi in the LA708 group, a few mice still exhibited lung infection in the PBS one. An analysis of the immune response was then performed to decipher the effect of the strain. At 1 dpi, infected animals supplemented with *B. breve* LA708 showed a higher but non-significant number of polynuclear neutrophils and lymphocytes in BALF compared with infected control mice ($P = 0.13$) without affecting the total number of cells. Similarly, it seemed that IFN- β , TNF- α and IL-6 were increased in the lungs of animals supplemented with *B. breve* LA708 compared with infected control mice at 4 dpi (**Fig 35B**). At 4 and 10 dpi, lungs of infected neonates supplemented with *B. breve* LA708 expressed an increased level of CD45⁺ leucocytes compared to those supplemented with PBS with an enhance on the proportion of CD8⁺ lymphocytes, NK cells and type 1 innate lymphoid cells (ILC1) among lymphocytes (**Fig 35C**).

Conclusion

These data indicated that early supplementations with the postbiotic *B. breve* LA708 reduced infection in neonates, probably through a faster recruitment of innate immune cells and an activation of Th1 response in the lungs.

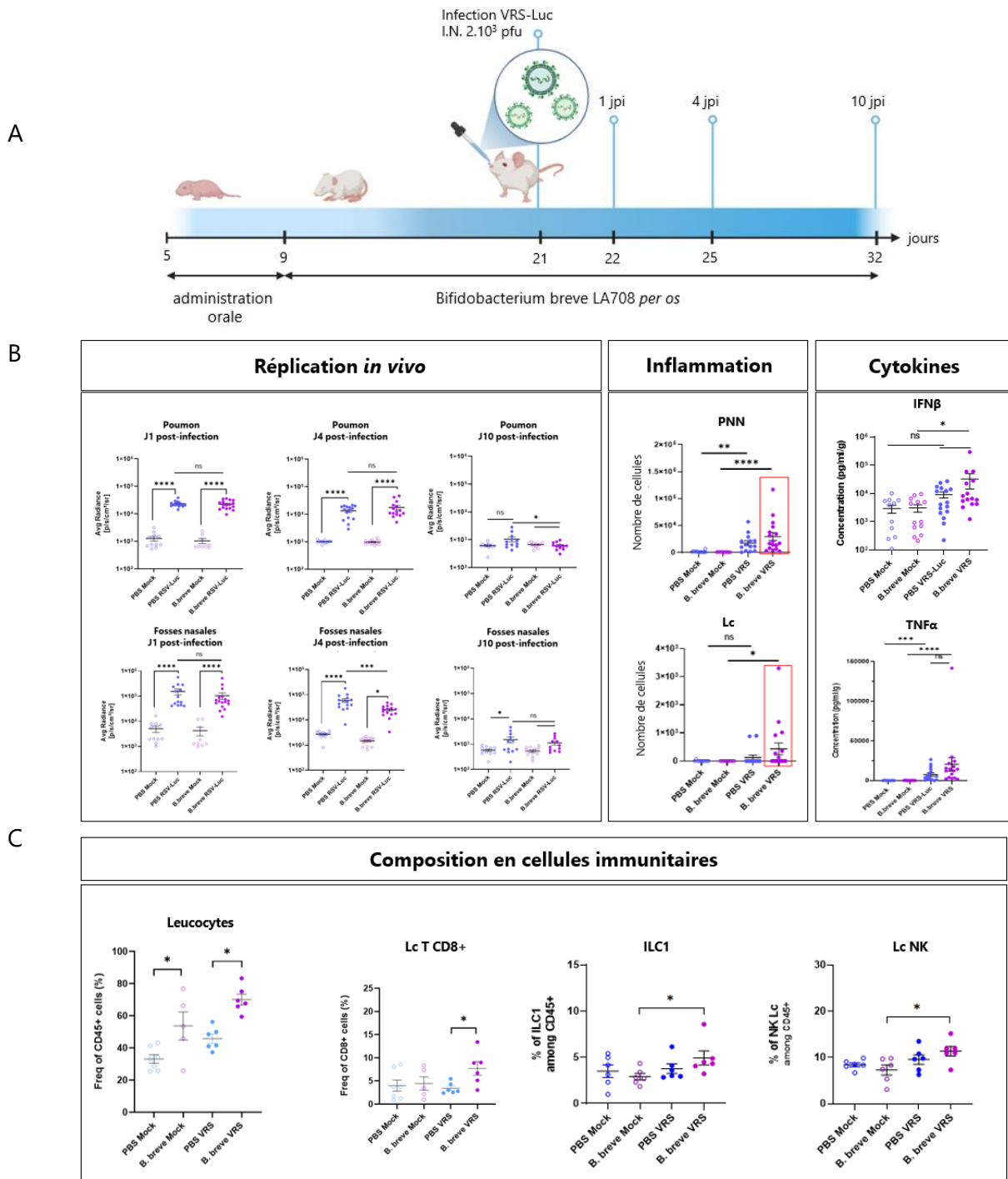


Figure 35 : L'administration préventive de *Bifidobacterium breve* LA708 chez les souris permet une élimination plus rapide du VRS-Luc et oriente la réponse immunitaire pulmonaire vers un profil Th1.

(A) Schéma expérimental. *B. breve* ou une solution saline contrôlée (PBS) ont été administrés par voie orale à des souris BALB/c à partir de 5 jours de vie et jusqu'à l'euthanasie. À 21 jours, les animaux ont été infectés par le VRS-Luc. **(B)** La réplication du VRS-Luc a été mesurée par la détection de la bioluminescence (photon/sec/cm²/sr) *in vivo* après anesthésie des animaux et injection intramusculaire de la Luciférase. Les cellules totales des LBA ont été dénombrées au microscope sur cellules de Kovalscode. Après cytocentrifugation et coloration de MGG des LBA la formule cellulaire est établie d'après le compte de 200 cellules. Les concentrations en cytokines ont été dosées dans les broyats de poumons en multiplex et analysées avec le logiciel BioPlex puis rapportées aux poids de poumons. **(C)** Les poumons ont été prélevés afin de réaliser une suspension cellulaire après broyage mécanique des tissus. La suspension cellulaire a été marquée grâce à un panel d'anticorps permettant l'identification des populations de cellules immunitaires pulmonaires. La fréquence des leucocytes est exprimée en pourcentage parmi les cellules vivantes. La fréquence des différentes populations de lymphocytes est exprimée en pourcentage parmi les leucocytes (CD45⁺) (voir stratégie d'identification en annexe 1). Test statistique réalisé avec le logiciel GraphPad Prism V8.1.1 (GraphPad Software, Inc.) : en cas de normalité dans la distribution des échantillons, le test ANOVA a été utilisé, dans le cas contraire, la version non paramétrique a été appliquée (Kruskal-Wallis). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et ns : non significatif. Les données en B sont issues de trois expérimentations et les données en C sont issues d'une expérimentation.

3-3 Conclusion

L'administration orale de *B. breve* LA708 n'a pas modifié la réplication virale à 1 jpi dans les poumons ou les fosses nasales, mais a permis de réduire significativement l'infection nasale à 4 jpi (au contraire des poumons) et finalement d'accélérer la clairance virale. En effet, aucune réplication virale n'est détectée à 10 jpi dans les poumons des individus traités par le postbiotique. Sur le plan immunitaire, les animaux ayant reçu *B. breve* ont présenté une tendance à l'augmentation précoce des PNN et des Lc dans le LBA (1 jpi), ainsi qu'une production plus importante d'IFN- β , de TNF- α et d'IL-6 dans les lysats pulmonaires à 4 jpi. Cette modulation s'est accompagnée d'une infiltration pulmonaire accrue de cellules immunitaires (CD45⁺) et d'une proportion plus importante de Lc T CD8⁺, de Lc NK et d'ILC1, suggérant que *B. breve* LA708 favorise une activation plus efficace des réponses antivirales innées et adaptatives.

D. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1- Modification de la réplication virale et la réponse immunitaire à l'infection par le VRS chez des souriceaux en absence de microbiote

Le VRS constitue la principale cause d'infection respiratoire aiguë chez le nourrisson, pouvant évoluer vers une bronchiolite sévère. Cette susceptibilité accrue reflète les particularités du système immunitaire à cet âge. Par ailleurs, une infection précoce par le VRS est associée à des séquelles respiratoires à long terme, telles que des épisodes d'infections récurrentes ou un risque accru de développer de l'asthme. Ces éléments soulignent l'importance des premières interactions (**Figure 36**) entre le virus et le système immunitaire néonatal. Parallèlement, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle essentiel du microbiote, tant intestinal que respiratoire, dans la maturation des réponses immunitaires postnatales. C'est dans ce contexte que nous avons exploré, à l'aide d'un modèle murin néonatal axénique, l'impact de l'absence de microbiote sur la réplication du VRS et sur la réponse immunitaire pulmonaire.

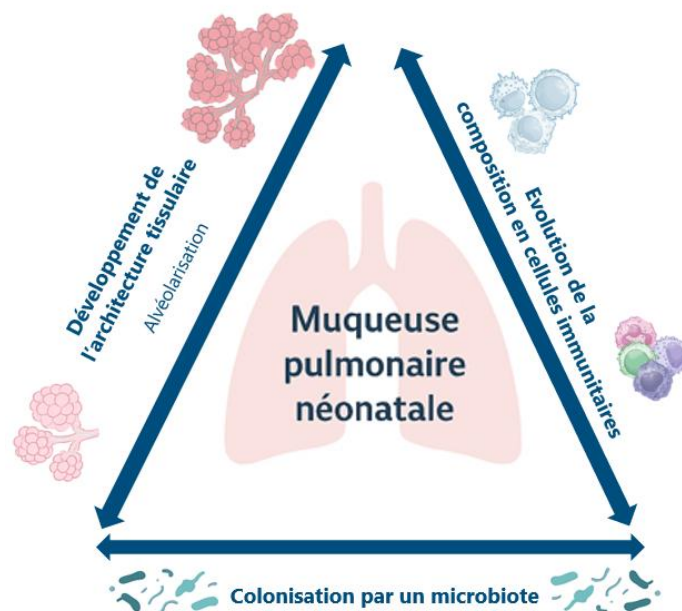


Figure 36: Caractéristiques de la muqueuse pulmonaire en période néonatale. Le processus d'alvéolarisation, initié *in utero* va se poursuivre pendant plusieurs années après la naissance. Des cellules immunitaires s'installent progressivement dans la muqueuse pulmonaire et acquièrent une réactivité en fonction de l'environnement local. De plus, des microorganismes colonisent le tractus respiratoire.

1-1 Impact du statut axénique sur la cinétique de réplication virale

Nos résultats mettent en évidence une cinétique de réplication virale distincte témoignant d'une clairance virale efficace chez les souriceaux EOPS contrairement aux souriceaux axéniques. Chez ces derniers les mesures de charge virale ont montré une persistance de la détection du VRS avec une forte variabilité d'intensité entre les expérimentations. Cette hétérogénéité pourrait en partie résulter de contraintes techniques liées à l'instillation intranasale chez le souriceau axénique, manipulé en isolateur, où la petite taille des animaux rend le dépôt de l'inoculum moins précis. Néanmoins, malgré ces limites expérimentales, ces données constituent une première démonstration

de l'impact potentiel de l'absence de microbiote sur la réplication du VRS en période néonatale. A ce jour, une seule étude rapporte l'impact de l'infection de souriceaux axéniques avec le VRS sur l'installation du microbiote intestinal, sans montrer les conséquences pulmonaires de la réplication virale (Ethridge et al. 2025). L'observation d'une cinétique virale atypique chez les animaux axéniques suggère que la présence du microbiote pourrait participer, directement ou indirectement, à la maîtrise de la réplication virale, possiblement via la modulation du signal basal des réponses immunitaires innées.

1-2 Rôle du microbiote dans l'activation précoce de la réponse antivirale

Afin d'évaluer la réponse inflammatoire locale induite par l'infection, nous avons analysé les cellules présentes dans les LBA, qui reflètent le recrutement effectif des cellules immunitaires dans la lumière pulmonaire. La réponse inflammatoire, plus rapide chez les souriceaux EOPS est composée de PNN. Chez les souriceaux axéniques, nos résultats sont moins précis sur la nature de l'infiltration, en raison d'une grande disparité entre les échantillons, mais dans deux des trois expérimentations réalisées, ce sont les PNE qui ont été majoritairement identifiés. À ce jour, la littérature ne rapporte pas d'analyse du LBA dans un modèle néonatal axénique, rendant impossible une comparaison directe avec des données publiées. Le faible afflux cellulaire que nous observons reste néanmoins compatible avec la physiopathologie de l'infection néonatale au VRS, caractérisée par une réponse inflammatoire limitée (Cormier et al. 2010).

La production rapide d'interférons de type I et III constitue un pilier de la défense antivirale innée. Produites en réponse à la détection du virus par les cellules épithéliales et myéloïdes, ces cytokines induisent l'expression de gènes stimulés par les interférons (ISG) aux fonctions antivirales et immunomodulatrices, permettant de limiter la réplication virale et d'orchestrer les réponses immunitaires précoces. Cette induction rapide et marquée des transcrits d'IFN-III et d'IFN- β , ainsi que des ISG, observée chez les souriceaux EOPS mais retardée ou absente chez les souriceaux axéniques, s'aligne avec des travaux antérieurs soulignant le rôle du microbiote dans la préparation du système immunitaire aux infections virales. En effet, plusieurs études, réalisées chez l'adulte, ont montré que l'absence de microbiote ou sa déplétion par antibiotiques réduit la signalisation des IFN-I et l'induction des ISG (Ganal et al. 2012; Schaupp et al. 2020). Dans le modèle d'infection VRS, l'administration de métabolites microbiens (par exemple l'acétate) permet d'augmenter l'IFN- β et les gènes ISG pulmonaires et de réduire la charge virale. (Antunes et al. 2019). Toutefois, certains travaux réalisés chez le souriceau nouveau-né montrent que la réponse IFN- λ basale peut être indépendante du microbiote, suggérant une maturation intrinsèque du tissu épithélial en période néonatale (Reyes et al. 2025). Nos données indiquent que, dans le contexte néonatal, l'absence de microbiote retarde ou inhibe l'activation antivirale précoce, ce qui se traduit par une absence de clairance virale. Ces éléments renforcent l'hypothèse selon laquelle la colonisation microbienne intervenant tôt dans la vie est un facteur clé pour la mise en place de la voie IFN et de la réponse antivirale pulmonaire.

1-3 Le microbiote contribue-t-il à façonner le paysage immunitaire pulmonaire néonatal ?

Ces observations nous ont conduits à nous interroger sur l'existence de différences intrinsèques dans la composition du compartiment immunitaire pulmonaire des souriceaux avec ou sans flore et susceptibles d'expliquer la modulation de la réponse antivirale observée. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons analysé les populations cellulaires présentes dans la muqueuse

pulmonaire des souriceaux axéniques et EOPS âgés de six jours de vie à l'état basal par cytométrie en flux.

Cette analyse a révélé des différences de composition entre les deux groupes. Les souriceaux axéniques présentent une proportion plus élevée de Lc B régulateurs CD5⁺ et de Monocytes Ly6C⁺, tandis que la proportion de PNN est plus faible que chez les souriceaux EOPS. L'augmentation de la proportion de Lc B régulateurs CD5⁺ observée dans les poumons des souriceaux axéniques est paradoxale au regard de la littérature, qui rapporte que la colonisation microbienne favorise généralement la prolifération de ces cellules (Yang et al. 2024). Ces Lc ne constituent pas une lignée distincte, mais représentent un état fonctionnel acquis par différentes sous-populations en réponse à des signaux cytokiniques (IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-35, BAFF, APRIL) (Fehres et al. 2019; Rosser et al. 2014; Yeramilli et Knight 2010), ou passant par l'activation des TLR ou encore par les métabolites microbiens (AGCC) (Kim et al. 2016). Dans notre modèle, bien que la proportion de Lc CD5⁺ soit augmentée chez les animaux axéniques, cette différence n'est pas retrouvée en valeur absolue. Cela suggère que l'augmentation relative observée est probablement due à une diminution d'autres sous-populations (cellules effectrices, mémoires,...) plutôt qu'à une expansion spécifique des cellules CD5⁺. Le marqueur CD5 est un marqueur impliqué dans la régulation du récepteur à l'antigène des Lc B et T (Berland et al. 2010), dans la tolérance des Lc B aux antigènes du soi (Henderson et al. 2015), ainsi qu'une fonction régulatrice (H. Li et al. 2019). Ainsi, l'augmentation relative des Lc B CD5⁺ pourrait être liée à un aspect physiologique du modèle axénique et pourrait contribuer à la réponse antivirale retardée et moins efficace observée chez ces animaux. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer leur capacité à produire de l'IL-10 après activation *ex vivo* en comparaison aux mêmes cellules issues des animaux EOPS et ainsi établir leur fonction régulatrice.

Les différences observées au niveau des populations myéloïdes sont également notables. En effet, chez les souriceaux EOPS, la muqueuse pulmonaire présente à l'état basal une proportion plus importante de PNN. Or, cette population est augmentée dans les LBA des animaux infectés à 2 jpi, suggérant leur implication directe dans la réponse immunitaire précoce contre le VRS. À l'inverse, chez les souriceaux axéniques, nous avons observé une proportion plus élevée de Monocytes Ly6C⁺ à l'état basal, population qui ne semble toutefois pas être recrutée au site d'infection lors de la réponse antivirale. Cette observation soulève la question de la nature exacte des Monocytes Ly6C⁺ présents dans le poumon axénique. En effet, ce phénotype peut correspondre à des Monocytes inflammatoires classiques, ou à des cellules myéloïdes suppressives de type monocytaires (M-MDSC). Ces dernières partagent les mêmes marqueurs de surface que les Monocytes Ly6C⁺, rendant leur identification phénotypique seule insuffisante. Leur distinction repose sur des analyses fonctionnelles démontrant leur capacité à inhiber les réponses immunitaires adaptatives ou innées, notamment via la production d'arginase-1, d'oxyde nitrique ou de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10. La présence accrue de cellules Ly6C⁺ dans les poumons axéniques pourrait refléter un enrichissement en cellules à activité immunosuppressive, favorisant un microenvironnement régulateur défavorable à l'établissement d'une réponse antivirale efficace contre le VRS. Ce biais immunitaire pourrait expliquer la faible induction des gènes de la voie IFN-I et la cinétique retardée de la réponse cellulaire observées chez les souriceaux axéniques après infection par le VRS. Des analyses fonctionnelles complémentaires seront nécessaires pour déterminer la nature exacte de ces cellules Ly6C⁺ et leur impact sur la réponse antivirale pulmonaire dans le contexte axénique.

1-4 Limites et spécificités des modèles animaux utilisés

L'utilisation de souris axéniques permet d'étudier l'impact global de l'absence de microbiote sur la réponse immunitaire néonatale. Cependant, ce modèle ne permet pas d'identifier la contribution de chaque microbiote aux effets observés. De plus, les animaux axéniques présentent des adaptations physiologiques et immunitaires propres à leur état, telles qu'une architecture pulmonaire modifiée (Yun et al. 2014) ainsi qu'une taille réduite des organes lymphoïdes (Zhang et al. 2016; Chung et al. 2012). Ces caractéristiques peuvent influencer la distribution et la fonction des cellules immunitaires, et compliquer l'interprétation directe des résultats en termes de rôle d'un microbiote normal. Ainsi, bien que le modèle axénique permette de démontrer l'importance du microbiote dans la maturation et l'activation des réponses antivirales, il reste nécessaire d'utiliser des modèles complémentaires, tels que la colonisation sélective avec des consortiums bactériens ou des mono-colonisations, pour identifier les espèces ou groupes bactériens spécifiques responsables de la modulation observée.

L'un des points essentiels de cette étude réside dans la définition d'un groupe contrôle, de même fond génétique que les souris axéniques et présentant un microbiote représentatif. Pour cela, nous avons développé une souche EOPS, issue du transfert d'animaux axéniques dans l'animalerie EOPS, suivie d'une colonisation passive par cohabitation avec des congénères EOPS (**Figure 37A**). Cette approche permet d'obtenir un microbiote stable, dérivé de l'environnement animalier local, tout en conservant des conditions sanitaires contrôlées. La quantification des bactéries dans les fèces, réalisée vingt cinq jours après la cohabitation, a confirmé une colonisation efficace sur le plan quantitatif. Afin d'évaluer la stabilité du microbiote au cours du temps, un séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S a été réalisé à partir des échantillons de fèces collectés vingt-cinq jours après la cohabitation et après deux ans d'élevage. L'analyse de la diversité α (richesse spécifique) et de la diversité β (différences de composition entre groupes) permet de caractériser la structure du microbiote selon des unités taxonomiques opérationnelles (OTU, Operational Taxonomic Units), définies par un seuil de similarité de 97 % entre les séquences.

La diversité α , qui reflète la richesse en espèces d'un écosystème, a été évaluée à l'aide des différents indicateurs (**Figure 37B**) (indices de Chao1, de Shannon,...), dont les valeurs ont été représentées graphiquement (**Figure 37C**). Les animaux EOPS_J présentent un indice de diversité α stable aux deux temps d'analyse, témoignant d'une stabilité du microbiote intestinal dans l'élevage EOPS. Après vingt-cinq jours de cohabitation, les souris Col_R affichent une diversité de microbiote significativement inférieure à celle des EOPS_J. En revanche, après deux ans d'élevage, la diversité bactérienne des EOPS_R est devenue comparable à celle des EOPS_J. La diversité β , qui mesure les différences de composition microbienne entre échantillons, montre que le microbiote des Col_R est différent de celui des EOPS. Après deux ans d'élevage, les EOPS_R ont un microbiote intestinal comparable à celui des EOPS_J (**Figure 37D**).

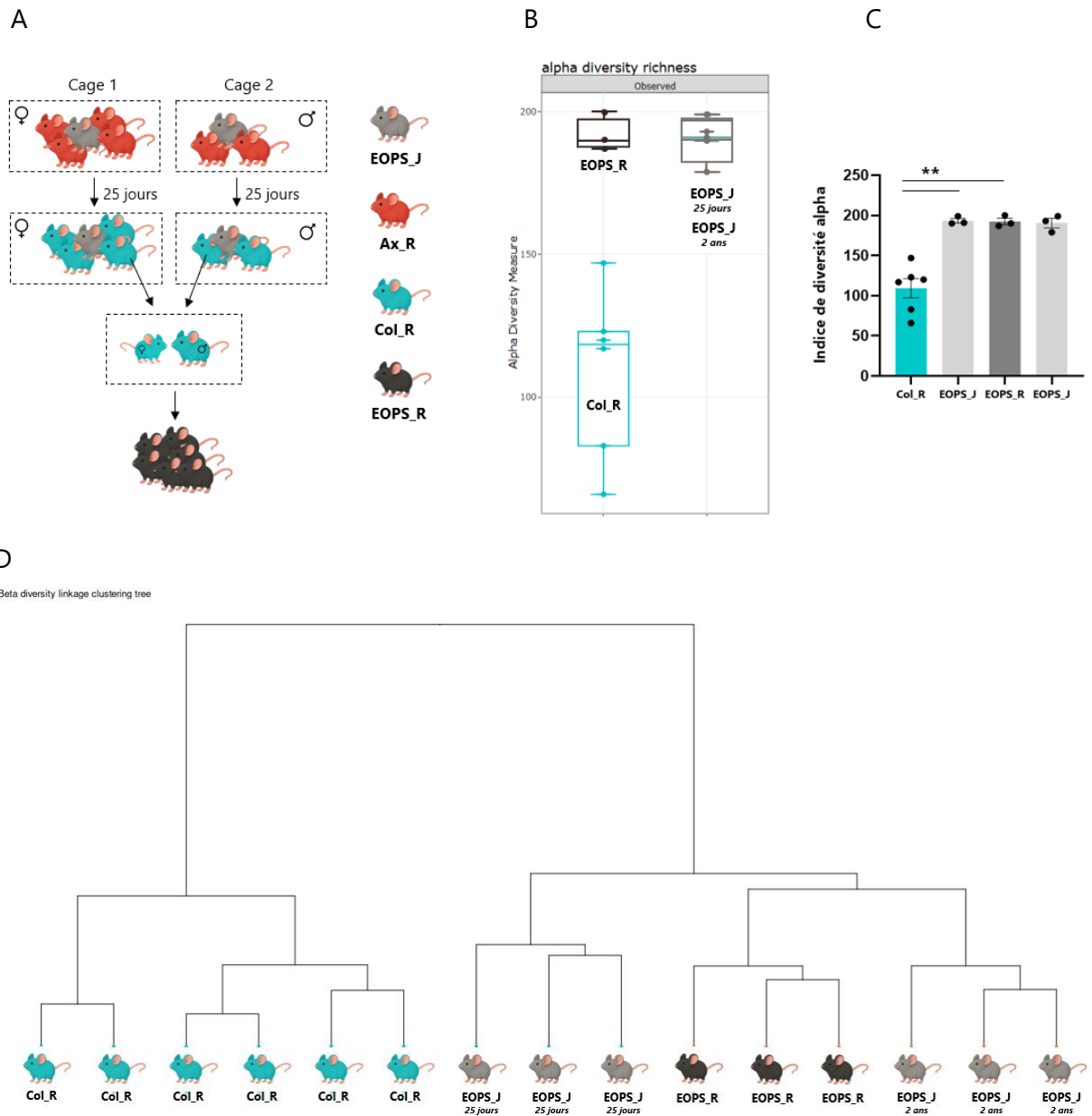


Figure 37. Analyse de la composition du microbiote intestinal des élevages des lignées C57BL/6. A. Stratégie de la recolonisation. L'ADN total a été extrait des échantillons de fèces des animaux Col_R, EOPS_R et EOPS_J à l'aide du kits DNeasy PowerSoil (Qiagen) après une étape de lyse mécanique avec billes (FastPrep Tissue Homogenizers). Les régions variables du gène 16S sont amplifiées à l'aide d'amorces spécifiques (ici régions V3-V4). Les amplicons sont purifiés puis séquencés sur une plateforme Illumina (MiSeq) en lecture paire (2x250 pb). On obtient ainsi des millions de séquences brutes représentant la diversité bactérienne de l'échantillon. Le traitement bioinformatique comprend une étape de suppression des séquences de faible qualité, des amorces et des chimères puis les lectures sont fusionnées et regroupées en unités taxonomiques (OTU). Chaque séquence représentative est comparée à une base de données de référence pour identifier la bactérie au niveau du genre et de l'espèce. Les indices de diversité alpha (**B**, **C**) et beta (**D**) ont été obtenu après analyse des OTU avec le logiciel Easy 16S. Les données sont issues d'une seule expérimentation. Test statistique : t-test, ** p < 0,01.

1-5 Approches méthodologiques et perspectives d'analyse à résolution cellulaire

L'ensemble des résultats présentés dans cette étude repose sur une approche de cytométrie en flux multiparamétrique, qui permet une identification des principales populations immunitaires du poumon néonatal. Cependant, elle reste limitée par la nécessité de panels d'anticorps prédéfinis et ne permet pas d'appréhender la diversité transcriptionnelle des cellules analysées.

Dans cette perspective, le séquençage d'ARN sur cellule unique (scRNA-seq) représente une approche complémentaire particulièrement pertinente. Il permettrait d'accéder à une résolution moléculaire fine des cellules pulmonaires, de détecter des sous-populations rares ou transitoires et de mieux caractériser les états d'activation associés à la présence ou à l'absence de microbiote. De plus, cette approche non biaisée offrirait la possibilité d'identifier de nouveaux marqueurs ou voies de signalisation impliqués dans la régulation immunitaire néonatale. Combinée à des approches spatiales, elle permettrait également de reconstituer la cartographie fonctionnelle du tissu pulmonaire, en précisant les interactions entre les populations immunitaires et l'environnement local. Ainsi, l'intégration du scRNA-seq dans l'étude du modèle axénique en comparaison avec des souriceaux EOPS ou en cours de recolonisation contrôlée par une souche bactérienne spécifique ouvrirait la voie à une compréhension plus globale et dynamique des réseaux cellulaires et moléculaires qui gouvernent la mise en place de l'immunité pulmonaire précoce.

2- Modulation de l'immunité de la muqueuse pulmonaire périnatale par le microbiote pour prévenir de la bronchiolite du nourrisson

Nos travaux mettent en lumière le rôle important du microbiote pulmonaire précoce dans la modulation des réponses immunitaires néonatales face à l'infection par le VRS. En particulier, la caractérisation de la bactérie 17 (*E. coli*) comme souche primo-colonisatrice capable d'induire une immunité antivirale protectrice et durable ouvre des perspectives prometteuses pour le développement de nouvelles stratégies de prévention des infections respiratoires sévères du nourrisson. Cette approche centrée sur la fenêtre d'âge néonatale est originale. A notre connaissance, les études ayant rapporté une meilleure résistance des souris à l'infection par le VRS après administration respiratoire de souches de *Lactobacillus* ou de *Corynebacterium* (Tomosada et al. 2013; Kanmani et al. 2017; Chiba et al. 2013) ont été réalisées uniquement chez des animaux juvéniles (3 semaines de vie) ou adultes, et dans certains cas, un impact bénéfique sur l'activité anti-virale des MA a été décrit (Clua et al. 2020; Garcia-Castillo et al. 2020).

Un autre aspect original de notre étude a été d'évaluer l'impact à long terme d'une exposition précoce à la bactérie 17 sur la maturation du système immunitaire respiratoire et la susceptibilité à une seconde infection par le VRS. Les données obtenues indiquent que cette exposition pourrait influencer durablement la polarisation des réponses immunitaires, en favorisant un profil de type 1 protecteur et en limitant les réactions inflammatoires excessives. Cette reprogrammation précoce pourrait avoir des conséquences positives sur la tolérance pulmonaire et réduire la susceptibilité à d'autres infections virales ou à des pathologies inflammatoires chroniques telles que l'asthme. Comprendre comment cette modulation initiale s'inscrit dans le développement global de l'immunité pulmonaire pourrait contribuer à la prévention des déséquilibres immunitaires à long terme.

2-1 Compréhension des mécanismes d'action et de l'origine de l'effet protecteur de la bactérie 17

Les prochains travaux devront viser à élucider les mécanismes moléculaires précis responsables des effets immunomodulateurs observés avec la bactérie 17. Il sera notamment crucial d'identifier les voies de signalisation activées au sein des cellules épithéliales pulmonaires et des MA par la bactérie 17. La bactérie 17 étant une souche d'*E. coli*, elle possède plusieurs PAMP qui peuvent être reconnus par différents TLR, comme par exemple le LPS ou la flagelline reconnus par les TLR4 et TLR5 respectivement, induisant une réponse immune de la muqueuse (Mahajan et Gally 2011). Aussi, il serait intéressant d'utiliser des cellules, ou d'infecter directement des souris génétiquement modifiées n'exprimant plus ces récepteurs, afin de tester si l'effet bénéfique de la bactérie 17 est conservé lors de l'infection par le VRS. L'étude approfondie des interactions entre la bactérie 17 et les cellules pulmonaires constitue un enjeu essentiel, compte tenu de l'induction du recrutement des polynucléaires neutrophiles au sein de la muqueuse pulmonaire du jeune. Si ces derniers participent activement à la défense antivirale, ils peuvent également contribuer à l'immunopathologie lorsqu'ils sont recrutés de manière excessive ou prolongée. Leur rôle dans l'infection par le VRS chez le jeune n'est toujours clairement pas défini (Johansson et Kirsebom 2021). La détermination de l'impact des PNN sur cet effet protecteur pourrait être définie par de nouvelles expériences où la neutropénie serait préalablement induite après l'administration de l'anticorps anti-Ly6G. Une compréhension fine de ces interactions permettra de distinguer les composantes protectrices des réponses délétères et d'envisager des interventions plus ciblées visant à renforcer l'immunité antivirale tout en limitant l'inflammation tissulaire.

Un autre axe majeur de recherche consistera à déterminer la nature exacte de l'effet protecteur conféré par la bactérie 17, s'il dépend de la composition et/ou des caractéristiques métaboliques de la souche. Il reste à établir si cet effet repose sur la capacité de la souche vivante à coloniser la muqueuse et à produire des métabolites actifs, ou si des structures bactériennes inertes, telles que les composants de la paroi ou des dérivés métaboliques, peuvent, à eux seuls, déclencher une réponse immunitaire protectrice. L'étude de surnageants conditionnés constituera une approche clé pour dissocier ces deux dimensions. Une attention particulière sera portée à l'acétate, métabolite bactérien déjà reconnu pour potentialiser l'immunité innée antivirale des MA lors de l'infection par le VRS (Ji et al. 2021; Antunes et al. 2019). Ces investigations permettront de déterminer si les effets bénéfiques observés contre le VRS peuvent être reproduits par des fractions purifiées, ou de lysats bactériens de souches respiratoires humaines, (Antunes et al. 2022) ouvrant la voie à des interventions plus sûres et mieux contrôlées.

2-2 Diversité et spécificité de souche.

La spécificité des effets immunomodulateurs constitue également une question majeure. Les premières données suggèrent que l'activité antivirale observée n'est pas une propriété commune à toutes les bactéries primo-colonisatrices, mais qu'elle dépend étroitement des caractéristiques propres à chaque souche. Il sera donc essentiel de tester d'autres souches d'*E. coli* afin de déterminer si l'effet protecteur mis en évidence est spécifique à la bactérie 17 ou partagé par d'autres représentants de cette espèce.

Parallèlement, l'exploration de combinaisons de souches primo-colonisatrices du poumon présentant des profils immunomodulateurs distincts pourrait permettre de révéler d'éventuelles synergies fonctionnelles entre bactéries commensales. La constitution et l'évaluation de cocktails microbiens ciblés offriraient ainsi une approche intégrative visant à reproduire la complexité du microbiote pulmonaire naturel tout en optimisant les interactions bénéfiques pour la mise en place d'un équilibre immunitaire protecteur dès les premiers jours de vie. Ces travaux contribueraient à mieux comprendre comment la colonisation microbienne précoce influence la maturation du système immunitaire respiratoire.

2-3 Sécurité et conditions d'administration de la bactérie 17

Notre étude sur la bactérie 17 est ici une preuve de concept qu'il est possible de moduler la réponse mucoale pulmonaire contre l'infection par le VRS par des souches primo-colonisantes. Avant toute application clinique, une étape cruciale consistera à évaluer de manière rigoureuse la sécurité de la bactérie 17 ainsi que les modalités optimales de son administration. La faible densité microbienne naturelle du poumon néonatal (Morris et al. 2013), la sensibilité accrue de la muqueuse et les effets contrastés observés pour certaines souches bactériennes imposent une approche prudente et méthodique. La définition des doses efficaces, de la voie d'administration la plus adaptée et du moment optimal d'exposition sera déterminante pour garantir l'efficacité et la sécurité d'une telle intervention.

Dans leur ensemble, nos résultats constituent aussi une première étape vers la compréhension des interactions complexes entre les micro-organismes commensaux précoces et le système immunitaire immature du poumon. Des études toxicologiques et microbiologiques détaillées devront précéder toute transposition à l'humain et l'élaboration d'une stratégie probiotique respiratoire ciblée, capable de renforcer les défenses immunitaires dès les premiers jours de la vie et de prévenir durablement les infections virales sévères du nourrisson.

3- Vers des stratégies postbiotiques de modulation immunitaire néonatale contre l'infection par le VRS

Notre étude sur la bactérie 17 a confirmé le potentiel immunomodulateur de certaines bactéries primo-colonisatrices du poumon, tout en soulevant plusieurs interrogations. En effet, cette souche a été administrée vivante, alors que l'utilisation de micro-organismes viables chez le nouveau-né pose d'importantes questions de sécurité. Les postbiotiques, préparations issues de bactéries inactivées ou de leurs métabolites, offrent une alternative intéressante en combinant innocuité et effet immunomodulateur. Dans ce contexte, le projet collaboratif avec le laboratoire Pileje a permis d'évaluer l'impact d'un postbiotique dérivé de *Bifidobacterium breve* LA708 sur l'évolution de l'infection avec le VRS et sur la réponse immunitaire pulmonaire néonatale. Nos résultats montrent une parfaite innocuité de la souche tyndalisée ainsi qu'un effet bénéfique sur l'élimination du VRS dix jours après l'infection chez les animaux ayant reçu le postbiotique. Cet effet est associé à une réponse immunitaire de type Th1 caractérisée par un meilleur recrutement de Lc T CD8⁺, de Lc NK et d'ILC1 dans le poumon.

La modulation immunitaire observée après administration de notre postbiotique s'inscrit dans un contexte où certaines souches de *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) ont déjà montré des effets immunomodulateurs pertinents. Chez l'enfant, un essai clinique randomisé récent portant sur un mélange probiotique incluant *B. breve* M-16V a montré une réduction de la durée de la fièvre lors d'épisodes d'infections des voies respiratoires supérieures, sans signal de tolérance défavorable, ce qui suggère un bénéfice clinique possible mais non spécifique à un agent viral particulier (Bettocchi et al. 2025). Sur le plan préclinique, des études menées chez des rongeurs montrent que l'administration néonatale de *B. breve* modifie l'expression de gènes inflammatoires et stimule des marqueurs associés au recrutement et à l'homéostasie des lymphocytes de la muqueuse intestinale. Dans un modèle de rat nouveau-né, une supplémentation précoce (de jours 6 à 18) augmente l'expression du TLR4 dans les compartiments lymphoïdes intestinaux et accroît l'expression d'intégrines et d'autres marqueurs liés à la circulation des lymphocytes, suggérant une potentialisation du recrutement et du maintien des lymphocytes au niveau muqueux. Ces changements sont cohérents avec une maturation renforcée de l'immunité muqueuse (Rigo-Adrover et al. 2016). D'un point de vue mécanistique, des travaux *in vitro* et *ex vivo* indiquent que des composants de *B. breve* (ou de ses produits de sécrétion) peuvent activer et moduler les cellules dendritiques *via* des voies dépendantes des TLR, en particulier le TLR2, et ainsi favoriser une orientation de la réponse adaptative. Cependant, il n'est pas fait mention d'une induction de l'immunité Th1, comme celle que nous avons observée, mais plutôt d'un meilleur contrôle de la réponse Th1, rendu possible par son association à une réponse Th2, limitant ainsi une inflammation excessive (Ohtsuka et al. 2012; Hoarau et al. 2006).

Chez l'adulte, la bactérie 17 vivante, administrée par voie intranasale, induisait un recrutement de lymphocytes dans le LBA. Dans le modèle *B. breve* tyndallisé, malgré l'absence de viabilité de la souche et l'administration par voie orale, une augmentation comparable des lymphocytes est observée. Ces résultats suggèrent qu'un signal immunomodulateur commun, lié à la bactérie elle-même et non à sa capacité à se multiplier, pourrait favoriser le recrutement lymphocytaire au niveau pulmonaire, soutenant l'hypothèse d'un mécanisme conservé. Il resterait à déterminer si cet effet est médié par des signaux systémiques dérivés de l'intestin, tels que des cytokines ou des métabolites,

ou par une stimulation directe des récepteurs de l'immunité innée. Le dosage des AGCC et des cytokines dans la circulation sanguine serait un moyen rapide de mettre en évidence l'implication de l'axe intestin-poumon dans le protocole d'administration de *B. breve*. Peu d'études sont disponibles sur les effets de l'administration de *B. breve* en période néonatale mais globalement la littérature soutient l'idée qu'une modulation précoce par des bifidobactéries (ou leurs dérivés) peut favoriser l'activation de l'immunité innée des muqueuses et améliorer certains paramètres cliniques ou immunitaires. Toutefois, les comparaisons directes sont limitées, car les essais cliniques disponibles utilisent souvent des mélanges de souches et des critères différents des nôtres, tandis que les modèles animaux varient selon l'espèce, la souche, la dose et le moment d'administration. En raison de ces limites, l'extrapolation directe de ces données à notre modèle d'infection néonatale par le VRS doit être envisagée avec prudence.

L'un des points forts de notre étude réside dans la démonstration qu'une administration orale d'une bactérie inactivée peut induire un effet bénéfique à distance, au niveau pulmonaire, dans un contexte d'infection virale périnatale. Cette approche présente l'avantage majeur d'un protocole d'exposition parfaitement maîtrisable, stable et dépourvu de risques liés à l'utilisation d'un microorganisme vivant. Cette sécurité ouvre des perspectives nouvelles. Elle pourrait notamment permettre d'envisager des stratégies d'administration encore plus précoces, comme pendant la gestation (Terada-Ikeda et al. 2020), qui correspond à une période critique du développement du système immunitaire. Une telle stratégie pourrait favoriser le transfert de signaux immunomodulateurs vers le nouveau-né et ainsi renforcer son immunité dès la naissance, avant même l'exposition aux premiers pathogènes respiratoires. Ainsi, l'utilisation de postbiotiques apparaît comme une voie prometteuse pour le développement d'interventions sûres, standardisées et potentiellement transposables en clinique pédiatrique, afin de limiter la sévérité des infections respiratoires virales du nourrisson.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le VRS constitue la première cause d'infections respiratoires sévères chez le nourrisson et la tolérance du système immunitaire néonatal contribue largement à la sévérité de la maladie. Dans ce contexte, l'hypothèse selon laquelle le microbiote pulmonaire, encore largement méconnu, en particulier chez le nouveau-né, pourrait contribuer au développement d'une immunité antivirale efficace reste peu explorée. Ce travail de thèse avait pour objectif de mieux comprendre le rôle du microbiote dans la sensibilité néonatale au VRS et d'évaluer le potentiel immunomodulateur de bactéries primo-colonisatrices du poumon pour restaurer une protection antivirale précoce.

L'accès à un modèle murin axénique néonatal, encore très peu utilisé dans le domaine des infections respiratoires virales, a constitué un atout majeur de ce travail. Il nous a permis, pour la première fois, de caractériser de manière dynamique la cinétique de réplication du VRS en absence totale de microbiote, et d'établir une comparaison directe avec des souriceaux EOPS. Cette approche expérimentale a mis en évidence des différences précoces mais déterminantes dans l'activation des voies de l'immunité innée, notamment celles dépendantes de l'interféron, et dans la nature du recrutement cellulaire au sein du parenchyme pulmonaire. L'originalité de ces données ouvre aujourd'hui la voie à plusieurs études. Elles offrent une base solide pour des projets visant à identifier précisément quels signaux microbiens conditionnent la maturation de l'immunité néonatale et la clairance antivirale. À ce titre, l'approche par transcriptomique sur cellule unique (scRNAseq), qui n'a à ce jour jamais été appliquée dans le contexte de l'infection néonatale par le VRS, représente une perspective particulièrement innovante. Elle permettrait d'obtenir une résolution cellulaire et fonctionnelle pour cartographier de manière exhaustive les trajectoires immunitaires du poumon en absence de microbiote. Il convient également de souligner que cette étude s'est focalisée sur une exposition unique, à savoir l'infection par le VRS. Or, dans la réalité, les nouveau-nés sont exposés simultanément ou successivement à de multiples facteurs, qu'il s'agisse d'agents infectieux variés ou de polluants environnementaux. L'intégration de ces expositions multiples dans des modèles expérimentaux pourrait permettre de générer des données plus réalistes et d'approfondir notre compréhension des interactions complexes entre l'hôte et les pathogènes, ainsi que des déterminants environnementaux qui modulent la susceptibilité néonatale aux infections respiratoires.

Il a été démontré que les souches bactériennes naturellement présentes dans le microbiote peuvent exercer des effets favorables ou défavorables dans le contexte d'infections respiratoires. Dans cette étude, nous avons montré l'intérêt de considérer spécifiquement les souches primo-colonisatrices de la muqueuse respiratoire. La cartographie de leur profil cytokinique a permis de sélectionner une souche d'intérêt, mais des analyses plus larges pourraient intégrer d'autres paramètres et suggérer de nouvelles souches candidates ou même des associations de souches capables de potentialiser l'effet protecteur. Par ailleurs, la compréhension des mécanismes immunomodulateurs induits par ces bactéries reste encore à approfondir. Nos travaux *in vitro* ont permis d'identifier deux axes d'action principaux : l'interaction avec les cellules épithéliales a mis en évidence une inhibition de la propagation virale, médiée par la production de peptides antimicrobiens, notamment les défensines bêta, tandis que l'interaction avec les macrophages alvéolaires révèle une capacité à stimuler la production d'interférons de type I.

Enfin, l'intégration de données provenant d'autres microbiotes, tels que l'intestinal ou le nasal, serait également pertinente. Ces analyses pourraient aider à mieux comprendre les effets des dysbioses sur l'immunité pulmonaire et, à terme, permettre de proposer des interventions ciblées pour restaurer ou renforcer la protection antivirale chez le nouveau-né.

BIBLIOGRAPHIE

- Adkins, B., et R. Q. Du. 1998. « Newborn Mice Develop Balanced Th1/Th2 Primary Effector Responses in Vivo but Are Biased to Th2 Secondary Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160 (9): 4217-24.
- Alexandre, Youenn, Rozenn Le Berre, Georges Barbier, et Gwenaelle Le Blay. 2014. « Screening of Lactobacillus Spp. for the Prevention of Pseudomonas Aeruginosa Pulmonary Infections ». *BMC Microbiology* 14 (avril): 107. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-107>.
- Alsayed, Ahmad R., Anas Abed, Yazun Bashir Jarrar, et al. 2023. « Alteration of the Respiratory Microbiome in Hospitalized Patients with Asthma-COPD Overlap during and after an Exacerbation ». *Journal of Clinical Medicine* 12 (6): 2118. <https://doi.org/10.3390/jcm12062118>.
- Altamirano-Lagos, María José, Fabián E. Díaz, Miguel Andrés Mansilla, et al. 2019. « Current Animal Models for Understanding the Pathology Caused by the Respiratory Syncytial Virus ». *Frontiers in Microbiology* 10: 873. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00873>.
- Amarasinghe, Gaya K., María A. Ayllón, Yímíng Bào, et al. 2019. « Taxonomy of the Order Mononegavirales: Update 2019 ». *Archives of Virology* 164 (7): 1967-80. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04247-4>.
- Anderson, Christopher S., Chin-Yi Chu, Qian Wang, et al. 2020. « CX3CR1 as a Respiratory Syncytial Virus Receptor in Pediatric Human Lung ». *Pediatric Research* 87 (5): 862-67. <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0677-0>.
- Andrade, Elva B., Joana Alves, Pedro Madureira, et al. 2013. « TLR2-Induced IL-10 Production Impairs Neutrophil Recruitment to Infected Tissues during Neonatal Bacterial Sepsis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (9): 4759-68. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301752>.
- Andrewes, F. W. 1910. « The Croonian Lectures ON THE BEHAVIOUR OF THE LEUCOCYTES IN INFECTION AND IMMUNITY. » *The Lancet* 175 (4530): 1737-43. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)55765-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)55765-7).
- Antonis, Adriaan F. G., Remco S. Schrijver, Franz Daus, et al. 2003. « Vaccine-Induced Immunopathology during Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection: Exploring the Parameters of Pathogenesis ». *Journal of Virology* 77 (22): 12067-73. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.22.12067-12073.2003>.
- Antunes, Krist Helen, Gisele Cassão, Leonardo Duarte Santos, et al. 2022. « Airway Administration of Bacterial Lysate OM-85 Protects Mice Against Respiratory Syncytial Virus Infection ». *Frontiers in Immunology* 13: 867022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867022>.
- Antunes, Krist Helen, José Luís Fachi, Rosemeire de Paula, et al. 2019. « Microbiota-Derived Acetate Protects against Respiratory Syncytial Virus Infection through a GPR43-Type 1 Interferon Response ». *Nature Communications* 10 (1): 3273. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11152-6>.
- Antunes, Krist Helen, Aran Singanayagam, Lily Williams, et al. 2023. « Airway-Delivered Short-Chain Fatty Acid Acetate Boosts Antiviral Immunity during Rhinovirus Infection ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 151 (2): 447-457.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.09.026>.
- Arai, Satoshi, Noriyuki Iwabuchi, Sachiko Takahashi, Jin-Zhong Xiao, Fumiaki Abe, et Satoshi Hachimura. 2018. « Orally Administered Heat-Killed Lactobacillus Paracasei MCC1849 Enhances Antigen-Specific IgA Secretion and Induces Follicular Helper T Cells in Mice ». *PLoS One* 13 (6): e0199018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199018>.
- Araujo, Claudia V. de, Frederik Denorme, W. Zac Stephens, et al. 2022. « Neonatal NET-Inhibitory Factor Improves Survival in the Cecal Ligation and Puncture Model of Polymicrobial Sepsis by Inhibiting Neutrophil Extracellular Traps ». *Frontiers in Immunology* 13: 1046574. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1046574>.
- Arnold, R., B. König, H. Galatti, H. Werchau, et W. König. 1995. « Cytokine (IL-8, IL-6, TNF-Alpha) and Soluble TNF Receptor-I Release from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells after Respiratory Syncytial Virus Infection ». *Immunology* 85 (3): 364-72.
- Arnold, R., et W. König. 1996. « ICAM-1 Expression and Low-Molecular-Weight G-Protein Activation of Human Bronchial Epithelial Cells (A549) Infected with RSV ». *Journal of Leukocyte Biology* 60 (6): 766-71. <https://doi.org/10.1002/jlb.60.6.766>.
- Auten, R. L., S. N. Mason, D. T. Tanaka, K. Welty-Wolf, et M. H. Whorton. 2001. « Anti-Neutrophil Chemokine Preserves Alveolar Development in Hyperoxia-Exposed Newborn Rats ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 281 (2): L336-344. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.2.L336>.
- Auten, Richard L., Mary H. Whorton, et S. Nicholas Mason. 2002. « Blocking Neutrophil Influx Reduces DNA Damage in Hyperoxia-Exposed Newborn Rat Lung ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 26 (4): 391-97. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.26.4.4708>.
- Ballarini, Stefania, Giovanni A. Rossi, Nicola Principi, et Susanna Esposito. 2021. « Dysbiosis in Pediatrics Is Associated with Respiratory Infections: Is There a Place for Bacterial-Derived Products? » *Microorganisms* 9 (2): 448. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020448>.
- Bals, R., et P. S. Hiemstra. 2004. « Innate Immunity in the Lung: How Epithelial Cells Fight against Respiratory Pathogens ». *The European Respiratory Journal* 23 (2): 327-33. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00098803>.

- Bassis, Christine M., John R. Erb-Downward, Robert P. Dickson, et al. 2015. « Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals ». *mBio* 6 (2): e00037. <https://doi.org/10.1128/mBio.00037-15>.
- Bautista, Maria V., Yajun Chen, Vessela S. Ivanova, Michael K. Rahimi, Alan M. Watson, et Mary C. Rose. 2009. « IL-8 Regulates Mucin Gene Expression at the Posttranscriptional Level in Lung Epithelial Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (3): 2159-66. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803022>.
- Becker, S., J. Soukup, et J. R. Yankaskas. 1992. « Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Primary Nasal and Bronchial Epithelial Cell Cultures and Bronchoalveolar Macrophages ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 6 (4): 369-74. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/6.4.369>.
- Becnel, David, Dahui You, Joshua Erskin, Dawn M. Dimina, et Stephania A. Cormier. 2005. « A Role for Airway Remodeling during Respiratory Syncytial Virus Infection ». *Respiratory Research* 6 (1): 122. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-122>.
- Bedoya, Santiago Acero, Fang Ye, Victoria Best, Octavio Ramilo, Octavio Ramilo, et Asuncion Mejias. 2019. « 2783. Expansion of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection ». *Open Forum Infectious Diseases* 6 (Suppl 2): S983. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz360.2460>.
- Behera, A. K., H. Matsuse, M. Kumar, X. Kong, R. F. Lockey, et S. S. Mohapatra. 2001. « Blocking Intercellular Adhesion Molecule-1 on Human Epithelial Cells Decreases Respiratory Syncytial Virus Infection ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280 (1): 188-95. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4093>.
- Belkacem, Nouria, Nicolas Serafini, Richard Wheeler, et al. 2017. « Lactobacillus Paracasei Feeding Improves Immune Control of Influenza Infection in Mice ». *PLoS One* 12 (9): e0184976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184976>.
- Belshe, R. B., L. S. Richardson, W. T. London, et al. 1977. « Experimental Respiratory Syncytial Virus Infection of Four Species of Primates ». *Journal of Medical Virology* 1 (3): 157-62. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890010302>.
- Berland, Robert, Steven Fiering, et Henry H. Wortis. 2010. « A Conserved Enhancer Element Differentially Regulates Developmental Expression of CD5 in B and T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (12): 7537-43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002173>.
- Besselink, Marc Gh, Hjalmar C. van Santvoort, Erik Buskens, et al. 2008. « Probiotic Prophylaxis in Predicted Severe Acute Pancreatitis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ». *Lancet (London, England)* 371 (9613): 651-59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60207-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60207-X).
- Bettocchi, Silvia, Anna Comotti, Marina Elli, et al. 2025. « Probiotics and Fever Duration in Children With Upper Respiratory Tract Infections: A Randomized Clinical Trial ». *JAMA Network Open* 8 (3): e250669. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2025.0669>.
- Bline, Katherine, Anna Kuehn-Everson, Calla Edmonds, et al. 2023. « Comparison of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in children with RSV vs. COVID-19 ». *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* 12 (Supplement_1): S1-2. <https://doi.org/10.1093/jpids/piad070.003>.
- Boner, A., B. J. Zeligs, et J. A. Bellanti. 1982. « Chemotactic Responses of Various Differentiation Stages of Neutrophils from Human Cord and Adult Blood ». *Infection and Immunity* 35 (3): 921-28. <https://doi.org/10.1128/iai.35.3.921-928.1982>.
- Bosch, Astrid A. T. M., Evgeni Levin, Marlies A. van Houten, et al. 2016. « Development of Upper Respiratory Tract Microbiota in Infancy Is Affected by Mode of Delivery ». *EBioMedicine* 9 (juillet): 336-45. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.031>.
- Bosch, Astrid A. T. M., Wouter A. A. de Steenhuijsen Piters, Marlies A. van Houten, et al. 2017. « Maturation of the Infant Respiratory Microbiota, Environmental Drivers, and Health Consequences. A Prospective Cohort Study ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 196 (12): 1582-90. <https://doi.org/10.1164/rccm.201703-0554OC>.
- Bourgeois, C., J. B. Bour, K. Lidholt, C. Gauthray, et P. Pothier. 1998. « Heparin-like Structures on Respiratory Syncytial Virus Are Involved in Its Infectivity in Vitro ». *Journal of Virology* 72 (9): 7221-27. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7221-7227.1998>.
- Brault, Antoine, Isabelle Pontais, Vincent Enouf, et al. 2024. « Effect of Nirsevimab on Hospitalisations for Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in France, 2023-24: A Modelling Study ». *The Lancet. Child & Adolescent Health* 8 (10): 721-29. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(24\)00143-3](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(24)00143-3).
- Brouard, J., C. Vallet, J. Marie, et C. Faucon. 2020. « Les séquelles de virose en pneumopédiatrie ». *Perfectionnement en Pédiatrie* 3 (2): 176-81. <https://doi.org/10.1016/j.perped.2020.03.007>.
- Buchholz, Ursula J., Kunio Nagashima, Brian R. Murphy, et Peter L. Collins. 2006. « Live Vaccines for Human Metapneumovirus Designed by Reverse Genetics ». *Expert Review of Vaccines* 5 (5): 695-706. <https://doi.org/10.1586/14760584.5.5.695>.
- Buffie, Charlie G., et Eric G. Pamer. 2013. « Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens ». *Nature reviews. Immunology* 13 (11): 790-801. <https://doi.org/10.1038/nri3535>.
- Caballero, Mauricio T., M. Elina Serra, Patricio L. Acosta, et al. 2015. « TLR4 Genotype and Environmental LPS Mediate RSV Bronchiolitis through Th2 Polarization ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (2): 571-82. <https://doi.org/10.1172/JCI75183>.

- Cadena-Cruz, C., J. L. Villarreal Camacho, Marcio De Ávila-Arias, Leidy Hurtado-Gomez, Alexander Rodriguez, et Homero San-Juan-Vergara. 2023. « Respiratory Syncytial Virus Entry Mechanism in Host Cells: A General Overview ». *Molecular Microbiology* 120 (3): 341-50. <https://doi.org/10.1111/mmi.15133>.
- Cao, Jiabao, Cheng Wang, Yuqing Zhang, et al. 2021. « Integrated Gut Virome and Bacteriome Dynamics in COVID-19 Patients ». *Gut Microbes* 13 (1): 1-21. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1887722>.
- Carr, R., et J. M. Davies. 1990. « Abnormal FcRIII Expression by Neutrophils from Very Preterm Neonates ». *Blood* 76 (3): 607-11.
- Chai, Lan, Qi Wang, Caijuan Si, Wenyan Gao, et Lun Zhang. 2021. « Potential Association Between Changes in Microbiota Level and Lung Diseases: A Meta-Analysis ». *Frontiers in Medicine* 8: 723635. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.723635>.
- Chen, Qichao, Manjiao Liu, Yanfeng Lin, et al. 2023. « Topography of Respiratory Tract and Gut Microbiota in Mice with Influenza A Virus Infection ». *Frontiers in Microbiology* 14: 1129690. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1129690>.
- Chiba, Eriko, Yohsuke Tomosada, Maria Guadalupe Vizoso-Pinto, et al. 2013. « Immunobiotic Lactobacillus Rhamnosus Improves Resistance of Infant Mice against Respiratory Syncytial Virus Infection ». *International Immunopharmacology* 17 (2): 373-82. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.024>.
- Chini, B. A., M. A. Fiedler, L. Milligan, T. Hopkins, et J. M. Stark. 1998. « Essential Roles of NF-kappaB and C/EBP in the Regulation of Intercellular Adhesion Molecule-1 after Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Respiratory Epithelial Cell Cultures ». *Journal of Virology* 72 (2): 1623-26. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.2.1623-1626.1998>.
- Chirkova, Tatiana, Seyhan Boyoglu-Barnum, Kelsey A. Gaston, et al. 2013. « Respiratory Syncytial Virus G Protein CX3C Motif Impairs Human Airway Epithelial and Immune Cell Responses ». *Journal of Virology* 87 (24): 13466-79. <https://doi.org/10.1128/JVI.01741-13>.
- Chirkova, Tatiana, Songbai Lin, Antonius G. P. Oomens, et al. 2015. « CX3CR1 Is an Important Surface Molecule for Respiratory Syncytial Virus Infection in Human Airway Epithelial Cells ». *The Journal of General Virology* 96 (9): 2543-56. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000218>.
- Chung, Hachung, Sünje J. Pamp, Jonathan A. Hill, et al. 2012. « Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota ». *Cell* 149 (7): 1578-93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.037>.
- Claassen, Shantelle, Elloise du Toit, Mamadou Kaba, Clinton Moodley, Heather J. Zar, et Mark P. Nicol. 2013. « A Comparison of the Efficiency of Five Different Commercial DNA Extraction Kits for Extraction of DNA from Faecal Samples ». *Journal of Microbiological Methods* 94 (2): 103-10. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.05.008>.
- Clua, Patricia, Mikado Tomokiyo, Fernanda Raya Tonetti, et al. 2020. « The Role of Alveolar Macrophages in the Improved Protection against Respiratory Syncytial Virus and Pneumococcal Superinfection Induced by the Peptidoglycan of Lactobacillus Rhamnosus CRL1505 ». *Cells* 9 (7): 1653. <https://doi.org/10.3390/cells9071653>.
- Colón, David F., Carlos W. Wanderley, Marcelo Franchin, et al. 2019. « Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Exacerbate Severity of Infant Sepsis ». *Critical Care (London, England)* 23 (1): 113. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2407-8>.
- Colonna, Marco. 2018. « Innate Lymphoid Cells: Diversity, Plasticity, and Unique Functions in Immunity ». *Immunity* 48 (6): 1104-17. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.013>.
- Cormier, Stephania A., Bishwas Shrestha, Jordy Saravia, et al. 2014. « Limited Type I Interferons and Plasmacytoid Dendritic Cells during Neonatal Respiratory Syncytial Virus Infection Permit Immunopathogenesis upon Reinfection ». *Journal of Virology* 88 (16): 9350-60. <https://doi.org/10.1128/JVI.00818-14>.
- Cormier, Stephania A., Dahui You, et Srinivasa Honnegowda. 2010. « The Use of a Neonatal Mouse Model to Study Respiratory Syncytial Virus Infections ». *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 8 (12): 1371-80. <https://doi.org/10.1586/eri.10.125>.
- Crowe, J. E., P. L. Collins, W. T. London, R. M. Chanock, et B. R. Murphy. 1993. « A Comparison in Chimpanzees of the Immunogenicity and Efficacy of Live Attenuated Respiratory Syncytial Virus (RSV) Temperature-Sensitive Mutant Vaccines and Vaccinia Virus Recombinants That Express the Surface Glycoproteins of RSV ». *Vaccine* 11 (14): 1395-404. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(93\)90168-w](https://doi.org/10.1016/0264-410x(93)90168-w).
- Culley, Fiona J., Joanne Pollott, et Peter J. M. Openshaw. 2002. « Age at First Viral Infection Determines the Pattern of T Cell-Mediated Disease during Reinfection in Adulthood ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (10): 1381-86. <https://doi.org/10.1084/jem.20020943>.
- Cunningham, Coleen K., Ruth A. Karron, Petronella Muresan, et al. 2022. « Evaluation of Recombinant Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccines RSV/ΔNS2/Δ1313/11314L and RSV/276 in RSV-Seronegative Children ». *The Journal of Infectious Diseases* 226 (12): 2069-78. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac253>.
- Currier, Michael G., Sujin Lee, Christopher C. Stobart, et al. 2016. « EGFR Interacts with the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Strain 2-20 and Mediates Infection and Mucin Expression ». *PLoS Pathogens* 12 (5): e1005622. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005622>.

- Dakhama, Azzeddine, Jung-Won Park, Christian Taube, et al. 2005. « The Enhancement or Prevention of Airway Hyperresponsiveness during Reinfection with Respiratory Syncytial Virus Is Critically Dependent on the Age at First Infection and IL-13 Production ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (3): 1876-83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1876>.
- Dakic, Aleksandar, Qi-xiang Shao, Angela D'Amico, et al. 2004. « Development of the Dendritic Cell System during Mouse Ontogeny ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (2): 1018-27. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1018>.
- Dayananda, Pete, Christopher Chiu, et Peter Openshaw. 2024. « Controlled Human Infection Challenge Studies with RSV ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 445: 41-68. https://doi.org/10.1007/82_2022_257.
- De Swart, Rik L., Thijs Kuiken, Helga H. Timmerman, et al. 2002. « Immunization of Macaques with Formalin-Inactivated Respiratory Syncytial Virus (RSV) Induces Interleukin-13-Associated Hypersensitivity to Subsequent RSV Infection ». *Journal of Virology* 76 (22): 11561-69. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.22.11561-11569.2002>.
- Decool, Hortense, Lorène Gonnin, Irina Gutsche, Christina Sizun, Jean-François Eléouët, et Marie Galloux. 2021. « Interactions between the Nucleoprotein and the Phosphoprotein of Pneumoviruses: Structural Insight for Rational Design of Antivirals ». *Viruses* 13 (12): 2449. <https://doi.org/10.3390/v13122449>.
- Denorme, Frederik, John L. Rustad, Irina Portier, et al. 2023. « Neutrophil Extracellular Trap Inhibition Improves Survival in Neonatal Mouse Infectious Peritonitis ». *Pediatric Research* 93 (4): 862-69. <https://doi.org/10.1038/s41390-022-02219-0>.
- Derscheid, Rachel J., Albert van Geelen, Jack M. Gallup, et al. 2014. « Human Respiratory Syncytial Virus Memphis 37 Causes Acute Respiratory Disease in Perinatal Lamb Lung ». *BioResearch Open Access* 3 (2): 60-69. <https://doi.org/10.1089/biores.2013.0044>.
- Derscheid, Rachel J., Albert van Geelen, Jodi L. McGill, et al. 2013. « Human Respiratory Syncytial Virus Memphis 37 Grown in HEp-2 Cells Causes More Severe Disease in Lambs than Virus Grown in Vero Cells ». *Viruses* 5 (11): 2881-97. <https://doi.org/10.3390/v5112881>.
- DeVincenzo, John P., Tom Wilkinson, Akshay Vaishnav, et al. 2010. « Viral Load Drives Disease in Humans Experimentally Infected with Respiratory Syncytial Virus ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182 (10): 1305-14. <https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0221OC>.
- Dickson, Robert P., John R. Erb-Downward, Christine M. Freeman, et al. 2015. « Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography ». *Annals of the American Thoracic Society* 12 (6): 821-30. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201501-029OC>.
- Dickson, Robert P., John R. Erb-Downward, et Gary B. Huffnagle. 2014. « Towards an Ecology of the Lung: New Conceptual Models of Pulmonary Microbiology and Pneumonia Pathogenesis ». *The Lancet. Respiratory medicine* 2 (3): 238-46. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70028-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70028-1).
- Dietz, Stefanie, Julian Schwarz, Ana Velic, et al. 2021. « Human Leucocyte Antigen G and Murine Qa-2 Are Critical for Myeloid Derived Suppressor Cell Expansion and Activation and for Successful Pregnancy Outcome ». *Frontiers in Immunology* 12: 787468. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.787468>.
- Doerschuk, C. M., M. F. Allard, B. A. Martin, A. MacKenzie, A. P. Autor, et J. C. Hogg. 1987. « Marginated Pool of Neutrophils in Rabbit Lungs ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 63 (5): 1806-15. <https://doi.org/10.1152/jappl.1987.63.5.1806>.
- Dolowy, W. C., et R. L. Muldoon. 1964. « STUDIES OF GERM-FREE ANIMALS. I. RESPONSE OF MICE TO INFECTION WITH INFLUENZA A VIRUS ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 116 (juin): 365-71. <https://doi.org/10.3181/00379727-116-29249>.
- Domingo-Gonzalez, Racquel, Fabio Zanini, Xibing Che, et al. 2020. « Diverse Homeostatic and Immunomodulatory Roles of Immune Cells in the Developing Mouse Lung at Single Cell Resolution ». *eLife* 9 (juin): e56890. <https://doi.org/10.7554/eLife.56890>.
- Dominguez-Bello, Maria G., Elizabeth K. Costello, Monica Contreras, et al. 2010. « Delivery Mode Shapes the Acquisition and Structure of the Initial Microbiota across Multiple Body Habitats in Newborns ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (26): 11971-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>.
- Donovan, Chantal, Malcolm R. Starkey, Richard Y. Kim, et al. 2019. « Roles for T/B Lymphocytes and ILC2s in Experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease ». *Journal of Leukocyte Biology* 105 (1): 143-50. <https://doi.org/10.1002/JLB.3AB0518-178R>.
- Drajac, Carole, Daphné Laubret, Quentin Marquant, et al. 2021. « Control of IFN- γ Responses by the Aminopeptidase IRAP in Neonatal C57BL/6 Alveolar Macrophages during RSV Infection ». *Mucosal Immunology* 14 (4): 949-62. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00402-w>.
- Duits, Louise A., Peter H. Nibbering, Elisabeth van Strijen, et al. 2003. « Rhinovirus Increases Human Beta-Defensin-2 and -3 mRNA Expression in Cultured Bronchial Epithelial Cells ». *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 38 (1): 59-64. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00106-8](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00106-8).

- Eguchi, Kei, Naoki Fujitani, Hisako Nakagawa, et Tadaaki Miyazaki. 2019. « Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection with Probiotic Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus Gasseri* SBT2055 ». *Scientific Reports* 9 (1): 4812. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39602-7>.
- Eléouët, Jean-François. 2020. « [Molecular mechanisms of respiratory syncytial virus replication: a guide for the development of antivirals] ». *Virologie (Montrouge, France)* 24 (2): 99-112. <https://doi.org/10.1684/vir.2020.0834>.
- El-Khoury, Gaele, Crystel Hajjar, Regina Geitani, et al. 2025. « Gut Microbiota and Viral Respiratory Infections: Microbial Alterations, Immune Modulation, and Impact on Disease Severity: A Narrative Review ». *Frontiers in Microbiology* 16: 1605143. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1605143>.
- Erdman, S. H., R. D. Christensen, P. P. Bradley, et G. Rothstein. 1982. « Supply and Release of Storage Neutrophils. A Developmental Study ». *Biology of the Neonate* 41 (3-4): 132-37. <https://doi.org/10.1159/000241541>.
- Ethridge, Alexander D., Kazuma Yagi, Lillian Arzola Martínez, et al. 2025. « RSV Infection in Neonatal Mice and Gastrointestinal Microbiome Alteration Contribute to Allergic Predisposition ». *Mucosal Immunology* 18 (4): 874-86. <https://doi.org/10.1016/j.mucimm.2025.04.007>.
- Evrard, Maximilien, Immanuel W. H. Kwok, Shu Zhen Chong, et al. 2018. « Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions ». *Immunity* 48 (2): 364-379.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.002>.
- Fehres, Cynthia M., Nathalie O. van Uden, Nataliya G. Yeremenko, et al. 2019. « APRIL Induces a Novel Subset of IgA+ Regulatory B Cells That Suppress Inflammation via Expression of IL-10 and PD-L1 ». *Frontiers in Immunology* 10 (juin): 1368. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01368>.
- Feldman, S. A., S. Audet, et J. A. Beeler. 2000. « The Fusion Glycoprotein of Human Respiratory Syncytial Virus Facilitates Virus Attachment and Infectivity via an Interaction with Cellular Heparan Sulfate ». *Journal of Virology* 74 (14): 6442-47. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.14.6442-6447.2000>.
- Feldman, S. A., R. M. Hendry, et J. A. Beeler. 1999. « Identification of a Linear Heparin Binding Domain for Human Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein G ». *Journal of Virology* 73 (8): 6610-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6610-6617.1999>.
- Feng, Ziheng, Lili Xu, et Zhengde Xie. 2022. « Receptors for Respiratory Syncytial Virus Infection and Host Factors Regulating the Life Cycle of Respiratory Syncytial Virus ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12: 858629. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.858629>.
- Foncela, Angela M., Jeff Lauzon-Joset, Naomi Scott, Philip A. Stumbles, Deborah Strickland, et Mark L. Everard. 2023. « In Vivo Evidence of Respiratory Syncytial Virus Persistence in a Subset of Pulmonary Dendritic Cells Following a Primary Infection ». *Viral Immunology* 36 (7): 466-74. <https://doi.org/10.1089/vim.2023.0007>.
- Fonseca, Wendy, Nicholas W. Lukacs, et Catherine Ptaschinski. 2018. « Factors Affecting the Immunity to Respiratory Syncytial Virus: From Epigenetics to Microbiome ». *Frontiers in Immunology* 9: 226. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00226>.
- Forsthuber, T., H. C. Yip, et P. V. Lehmann. 1996. « Induction of TH1 and TH2 Immunity in Neonatal Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 271 (5256): 1728-30. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1728>.
- Fox, Amy C., Kevin W. McConnell, Benyam P. Yoseph, et al. 2012. « The Endogenous Bacteria Alter Gut Epithelial Apoptosis and Decrease Mortality Following *Pseudomonas Aeruginosa* Pneumonia ». *Shock (Augusta, Ga.)* 38 (5): 508-14. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31826e47e8>.
- Frank, Daniel N., Leah M. Feazel, Mary T. Bessesen, Connie S. Price, Edward N. Janoff, et Norman R. Pace. 2010. « The Human Nasal Microbiota and *Staphylococcus Aureus* Carriage ». *PloS One* 5 (5): e10598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010598>.
- Franke-Ullmann, G., C. Pfortner, P. Walter, et al. 1995. « Alteration of Pulmonary Macrophage Function by Respiratory Syncytial Virus Infection in Vitro ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 154 (1): 268-80.
- Gaibani, Paolo, Federica D'Amico, Michele Bartoletti, et al. 2021. « The Gut Microbiota of Critically Ill Patients With COVID-19 ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11: 670424. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.670424>.
- Ganal, Stephanie C., Stephanie L. Sanos, Carsten Kalfass, et al. 2012. « Priming of Natural Killer Cells by Nonmucosal Mononuclear Phagocytes Requires Instructive Signals from Commensal Microbiota ». *Immunity* 37 (1): 171-86. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.020>.
- Gantt, Soren, Ana Gervassi, Heather Jaspan, et Helen Horton. 2014. « The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Immune Ontogeny ». *Frontiers in Immunology* 5: 387. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00387>.
- Garcia-Castillo, Valeria, Mikado Tomokiyo, Fernanda Raya Tonetti, et al. 2020. « Alveolar Macrophages Are Key Players in the Modulation of the Respiratory Antiviral Immunity Induced by Orally Administered *Lactobacillus Rhamnosus* CRL1505 ». *Frontiers in Immunology* 11: 568636. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.568636>.

- Gervassi, Ana, Nicholas Lejarcegui, Sandra Dross, et al. 2014. « Myeloid Derived Suppressor Cells Are Present at High Frequency in Neonates and Suppress in Vitro T Cell Responses ». *PLoS One* 9 (9): e107816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107816>.
- Gierse, Laurin Christopher, Alexander Meene, Daniel Schultz, et al. 2021. « Influenza A H1N1 Induced Disturbance of the Respiratory and Fecal Microbiome of German Landrace Pigs - a Multi-Omics Characterization ». *Microbiology Spectrum* 9 (2): e0018221. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00182-21>.
- Gollwitzer, Eva S., Sejal Saglani, Aurélien Trompette, et al. 2014. « Lung Microbiota Promotes Tolerance to Allergens in Neonates via PD-L1 ». *Nature Medicine* 20 (6): 642-47. <https://doi.org/10.1038/nm.3568>.
- Goto, Hiroaki, Atsuhiko Sagitani, Nobuhisa Ashida, et al. 2013. « Anti-Influenza Virus Effects of Both Live and Non-Live Lactobacillus Acidophilus L-92 Accompanied by the Activation of Innate Immunity ». *The British Journal of Nutrition* 110 (10): 1810-18. <https://doi.org/10.1017/S0007114513001104>.
- Graaff, Patricia M. A. de, Esther C. de Jong, Toni M. van Capel, et al. 2005. « Respiratory Syncytial Virus Infection of Monocyte-Derived Dendritic Cells Decreases Their Capacity to Activate CD4 T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (9): 5904-11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.5904>.
- Graham, B. S., M. D. Perkins, P. F. Wright, et D. T. Karzon. 1988. « Primary Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice ». *Journal of Medical Virology* 26 (2): 153-62. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890260207>.
- Green, Gia, Sara M. Johnson, Heather Costello, et al. 2021. « CX3CR1 Is a Receptor for Human Respiratory Syncytial Virus in Cotton Rats ». *Journal of Virology* 95 (16): e0001021. <https://doi.org/10.1128/JVI.00010-21>.
- Griffiths, Cameron D., Leanne M. Bilawchuk, John E. McDonough, et al. 2020. « IGF1R Is an Entry Receptor for Respiratory Syncytial Virus ». *Nature* 583 (7817): 615-19. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2369-7>.
- Groves, Helen T., Leah Cuthbertson, Phillip James, Miriam F. Moffatt, Michael J. Cox, et John S. Tregoning. 2018. « Respiratory Disease Following Viral Lung Infection Alters the Murine Gut Microbiota ». *Frontiers in Immunology* 9: 182. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00182>.
- Groves, Helen T., Sophie L. Higham, Miriam F. Moffatt, Michael J. Cox, et John S. Tregoning. 2020. « Respiratory Viral Infection Alters the Gut Microbiota by Inducing Inappetence ». *mBio* 11 (1): e03236-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03236-19>.
- Gu, Qisheng, Marion Draheim, Cyril Planchais, et al. 2024. « Intestinal Newborn Regulatory B Cell Antibodies Modulate Microbiota Communities ». *Cell Host & Microbe* 32 (10): 1787-1804.e9. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.08.010>.
- Gu, Silan, Yanfei Chen, Zhengjie Wu, et al. 2020. « Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or H1N1 Influenza ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 71 (10): 2669-78. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa709>.
- Gutiérrez-Díaz, Isabel, Miriam Sanz-Martinez, Ana M^a Castro, et al. 2023. « Microbial and Immune Faecal Determinants in Infants Hospitalized with COVID-19 Reflect Bifidobacterial Dysbiosis and Immature Intestinal Immunity ». *European Journal of Pediatrics* 182 (10): 4633-45. <https://doi.org/10.1007/s00431-023-05140-8>.
- Haldar, Swati, Snehal R Jadhav, Vandana Gulati, et al. 2023. « Unravelling the gut-lung axis: insights into microbiome interactions and Traditional Indian Medicine's perspective on optimal health ». *FEMS Microbiology Ecology* 99 (10): fiad103. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad103>.
- Hall, C. B., R. G. Douglas, R. L. Simons, et J. M. Geiman. 1978. « Interferon Production in Children with Respiratory Syncytial, Influenza, and Parainfluenza Virus Infections ». *The Journal of Pediatrics* 93 (1): 28-32. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(78\)80594-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(78)80594-0).
- Hallak, L. K., D. Spillmann, P. L. Collins, et M. E. Peeples. 2000. « Glycosaminoglycan Sulfation Requirements for Respiratory Syncytial Virus Infection ». *Journal of Virology* 74 (22): 10508-13. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.22.10508-10513.2000>.
- Harata, G., F. He, N. Hiruta, et al. 2010. « Intranasal Administration of Lactobacillus Rhamnosus GG Protects Mice from H1N1 Influenza Virus Infection by Regulating Respiratory Immune Responses ». *Letters in Applied Microbiology* 50 (6): 597-602. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02844.x>.
- Harcourt, Jennifer, Rene Alvarez, Les P. Jones, Christine Henderson, Larry J. Anderson, et Ralph A. Tripp. 2006. « Respiratory Syncytial Virus G Protein and G Protein CX3C Motif Adversely Affect CX3CR1+ T Cell Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (3): 1600-1608. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1600>.
- Harding, Jeffrey N., David Siefker, Luan Vu, et al. 2020. « Altered Gut Microbiota in Infants Is Associated with Respiratory Syncytial Virus Disease Severity ». *BMC Microbiology* 20 (1): 140. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01816-5>.
- Hazan, Sabine, Neil Stollman, Huseyin S. Bozkurt, et al. 2022. « Lost Microbes of COVID-19: Bifidobacterium, Faecalibacterium Depletion and Decreased Microbiome Diversity Associated with SARS-CoV-2 Infection Severity ». *BMJ Open Gastroenterology* 9 (1): e000871. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2022-000871>.
- Hegele, Richard G. 2012. « Making Sense of Cell Surface Nucleolin: Implications for Respiratory Syncytial Virus Prophylaxis and Therapy ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 11 (1): 1-2. <https://doi.org/10.4161/cc.11.1.18466>.

- Henderson, Jacob G., Adeleye Opejin, Andrew Jones, Cindy Gross, et Daniel Hawiger. 2015. « CD5 Instructs Extrathymic Regulatory T Cell Development in Response to Self and Tolerizing Antigens ». *Immunity* 42 (3): 471-83. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.010>.
- Henneke, Philipp, Katrin Kierdorf, Lindsay J Hall, Markus Sperandio, et Mathias Hornef. s. d. « Perinatal development of innate immune topology ». *eLife* 10: e67793. <https://doi.org/10.7554/eLife.67793>.
- Hijano, Diego R., Luan D. Vu, Lawrence M. Kauvar, Ralph A. Tripp, Fernando P. Polack, et Stephania A. Cormier. 2019. « Role of Type I Interferon (IFN) in the Respiratory Syncytial Virus (RSV) Immune Response and Disease Severity ». *Frontiers in Immunology* 10: 566. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00566>.
- Hill, Cian J., Denise B. Lynch, Kiera Murphy, et al. 2017. « Evolution of Gut Microbiota Composition from Birth to 24 Weeks in the INFANTMET Cohort ». *Microbiome* 5 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0213-y>.
- Hilty, Markus, Conor Burke, Helder Pedro, et al. 2010. « Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways ». *PLoS One* 5 (1): e8578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008578>.
- Hoarau, Cyrille, Christine Lagaraine, Laurence Martin, Florence Velge-Roussel, et Yvon Lebranchu. 2006. « Supernatant of Bifidobacterium Breve Induces Dendritic Cell Maturation, Activation, and Survival through a Toll-like Receptor 2 Pathway ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117 (3): 696-702. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.10.043>.
- Hogg, J. C., C. M. Doerschuk, B. Wiggs, et D. Minshall. 1992. « Neutrophil Retention during a Single Transit through the Pulmonary Circulation ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 73 (4): 1683-85. <https://doi.org/10.1152/jappl.1992.73.4.1683>.
- Hoover, D. M., K. R. Rajashankar, R. Blumenthal, et al. 2000. « The Structure of Human Beta-Defensin-2 Shows Evidence of Higher Order Oligomerization ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (42): 32911-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006098200>.
- Hu, Lei, Li Sun, Chun Yang, et al. 2024. « Gut Microbiota-Derived Acetate Attenuates Lung Injury Induced by Influenza Infection via Protecting Airway Tight Junctions ». *Journal of Translational Medicine* 22 (1): 570. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05376-4>.
- Huang, Yuefeng, Kairui Mao, Xi Chen, et al. 2018. « S1P-Dependent Interorgan Trafficking of Group 2 Innate Lymphoid Cells Supports Host Defense ». *Science (New York, N.Y.)* 359 (6371): 114-19. <https://doi.org/10.1126/science.aam5809>.
- Huffnagle, G. B., R. P. Dickson, et N. W. Lukacs. 2017. « The Respiratory Tract Microbiome and Lung Inflammation: A Two-Way Street ». *Mucosal Immunology* 10 (2): 299-306. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.108>.
- Imai, T., K. Hieshima, C. Haskell, et al. 1997. « Identification and Molecular Characterization of Fractalkine Receptor CX3CR1, Which Mediates Both Leukocyte Migration and Adhesion ». *Cell* 91 (4): 521-30. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80438-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80438-9).
- Isaacs, D. 1989. « Production of Interferon in Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis ». *Archives of Disease in Childhood* 64 (1): 92-95. <https://doi.org/10.1136/adc.64.1.92>.
- Janek, Daniela, Alexander Zipperer, Andreas Kulik, Bernhard Krismer, et Andreas Peschel. 2016. « High Frequency and Diversity of Antimicrobial Activities Produced by Nasal Staphylococcus Strains against Bacterial Competitors ». *PLoS Pathogens* 12 (8): e1005812. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005812>.
- Jeffree, Chris E., Helen W. McL Rixon, Gaie Brown, James Aitken, et Richard J. Sugrue. 2003. « Distribution of the Attachment (G) Glycoprotein and GM1 within the Envelope of Mature Respiratory Syncytial Virus Filaments Revealed Using Field Emission Scanning Electron Microscopy ». *Virology* 306 (2): 254-67. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00016-8](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00016-8).
- Jeong, Kwang-Il, Peter A. Piepenhagen, Michael Kishko, et al. 2015. « CX3CR1 Is Expressed in Differentiated Human Ciliated Airway Cells and Co-Localizes with Respiratory Syncytial Virus on Cilia in a G Protein-Dependent Manner ». *PLoS One* 10 (6): e0130517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130517>.
- Ji, Jian-Jian, Qin-Mei Sun, Deng-Yun Nie, et al. 2021. « Probiotics Protect against RSV Infection by Modulating the Microbiota-Alveolar-Macrophage Axis ». *Acta Pharmacologica Sinica* 42 (10): 1630-41. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00573-5>.
- Jiao, Jingjing, Ana-Cristina Dragomir, Peri Kocabayoglu, et al. 2014. « Central Role of Conventional Dendritic Cells in Regulation of Bone Marrow Release and Survival of Neutrophils ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (7): 3374-82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300237>.
- Johansson, Cecilia, et Freja C. M. Kirsebom. 2021. « Neutrophils in Respiratory Viral Infections ». *Mucosal Immunology* 14 (4): 815-27. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00397-4>.
- Johnson, Joyce E., Ricardo A. Gonzales, Sandy J. Olson, Peter F. Wright, et Barney S. Graham. 2007. « The Histopathology of Fatal Untreated Human Respiratory Syncytial Virus Infection ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 20 (1): 108-19. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800725>.

- Johnson, Sara M., Beth A. McNally, Ioannis Ioannidis, et al. 2015. « Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures ». *PLoS Pathogens* 11 (12): e1005318. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005318>.
- Jung, Camille, et Alexis Mosca. s. d. *Fiches de Recommandations ou d'Informations*.
- Kanmani, Paulraj, Patricia Clua, Maria G. Vizoso-Pinto, et al. 2017. « Respiratory Commensal Bacteria *Corynebacterium Pseudodiphtheriticum* Improves Resistance of Infant Mice to Respiratory Syncytial Virus and *Streptococcus Pneumoniae* Superinfection ». *Frontiers in Microbiology* 8: 1613. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01613>.
- Kawahara, Tomohiro, Tadanobu Takahashi, Kenta Oishi, et al. 2015. « Consecutive Oral Administration of *Bifidobacterium Longum* MM-2 Improves the Defense System against Influenza Virus Infection by Enhancing Natural Killer Cell Activity in a Murine Model ». *Microbiology and Immunology* 59 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12210>.
- Khan, Mahejbin, Bijina J. Mathew, Priyal Gupta, et al. 2021. « Gut Dysbiosis and IL-21 Response in Patients with Severe COVID-19 ». *Microorganisms* 9 (6): 1292. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061292>.
- Kim, Hyun Jung, You-Sun Kim, Kang-Hyun Kim, et al. 2017. « The Microbiome of the Lung and Its Extracellular Vesicles in Nonsmokers, Healthy Smokers and COPD Patients ». *Experimental & Molecular Medicine* 49 (4): e316. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.7>.
- Kim, Myunghoo, Yaqing Qie, Jeongho Park, et Chang H. Kim. 2016. « Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses ». *Cell Host & Microbe* 20 (2): 202-14. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.001>.
- Kleer, Ismé M. de, Mirjam Kool, Marjolein J. W. de Bruijn, et al. 2016. « Perinatal Activation of the Interleukin-33 Pathway Promotes Type 2 Immunity in the Developing Lung ». *Immunity* 45 (6): 1285-98. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.031>.
- Kollmann, Tobias R., Beate Kampmann, Sarkis K. Mazmanian, Arnaud Marchant, et Ofer Levy. 2017. « Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny ». *Immunity* 46 (3): 350-63. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.009>.
- Koskinen, Kaisa, Manuela R. Pausan, Alexandra K. Perras, et al. 2017. « First Insights into the Diverse Human Archaeome: Specific Detection of Archaea in the Gastrointestinal Tract, Lung, and Nose and on Skin ». *mBio* 8 (6): e00824-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00824-17>.
- Köstlin, Natascha, Kathrin Hofstädter, Anna-Lena Ostermeir, et al. 2016. « Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 196 (3): 1132-45. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500340>.
- Köstlin, Natascha, Hellen Kugel, Bärbel Spring, et al. 2014. « Granulocytic Myeloid Derived Suppressor Cells Expand in Human Pregnancy and Modulate T-Cell Responses ». *European Journal of Immunology* 44 (9): 2582-91. <https://doi.org/10.1002/eji.201344200>.
- Köstlin-Gille, Natascha, Stefanie Dietz, Julian Schwarz, et al. 2019. « HIF-1 α -Deficiency in Myeloid Cells Leads to a Disturbed Accumulation of Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) During Pregnancy and to an Increased Abortion Rate in Mice ». *Frontiers in Immunology* 10: 161. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00161>.
- Kristensen, Maartje, Wouter A. A. de Steenhuijsen Piters, Joanne Wildenbeest, et al. 2024. « The Respiratory Microbiome Is Linked to the Severity of RSV Infections and the Persistence of Symptoms in Children ». *Cell Reports. Medicine* 5 (12): 101836. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101836>.
- Krusat, T., et H. J. Streckert. 1997. « Heparin-Dependent Attachment of Respiratory Syncytial Virus (RSV) to Host Cells ». *Archives of Virology* 142 (6): 1247-54. <https://doi.org/10.1007/s007050050156>.
- Land, Michael H., Kelly Rouster-Stevens, Charles R. Woods, Michael L. Cannon, James Cnota, et Avinash K. Shetty. 2005. « *Lactobacillus* Sepsis Associated with Probiotic Therapy ». *Pediatrics* 115 (1): 178-81. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2137>.
- Larios Mora, Alejandro, Laurent Detalle, Albert Van Geelen, et al. 2015. « Kinetics of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Memphis Strain 37 (M37) Infection in the Respiratory Tract of Newborn Lambs as an RSV Infection Model for Human Infants ». *PLoS One* 10 (12): e0143580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143580>.
- Laubretton, Daphné, Carole Drajac, Jean-François Eléouët, et al. 2020. « 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* 12 (8): 822. <https://doi.org/10.3390/v12080822>.
- Laver, J., E. Duncan, M. Abboud, et al. 1990. « High Levels of Granulocyte and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors in Cord Blood of Normal Full-Term Neonates ». *The Journal of Pediatrics* 116 (4): 627-32. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(05\)81617-8](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(05)81617-8).
- LeBlanc, Jean Guy, Florian Chain, Rebeca Martín, Luis G. Bermúdez-Humarán, Stéphanie Courau, et Philippe Langella. 2017. « Beneficial Effects on Host Energy Metabolism of Short-Chain Fatty Acids and Vitamins Produced by Commensal and Probiotic Bacteria ». *Microbial Cell Factories* 16 (1): 79. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0691-z>.

- Lee, F. Eun-Hyung, Edward E. Walsh, Ann R. Falsey, Robert F. Betts, et John J. Treanor. 2004. « Experimental Infection of Humans with A2 Respiratory Syncytial Virus ». *Antiviral Research* 63 (3): 191-96. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.04.005>.
- Lee, Hyun-Hee, Christine M. Hoeman, John C. Hardaway, et al. 2008. « Delayed Maturation of an IL-12-Producing Dendritic Cell Subset Explains the Early Th2 Bias in Neonatal Immunity ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (10): 2269-80. <https://doi.org/10.1084/jem.20071371>.
- Lehmkuhl, H. D., et R. C. Cutlip. 1979. « Experimental Respiratory Syncytial Virus Infection in Feeder-Age Lambs ». *American Journal of Veterinary Research* 40 (12): 1729-30.
- Lehrer, R. I., A. Barton, K. A. Daher, S. S. Harwig, T. Ganz, et M. E. Selsted. 1989. « Interaction of Human Defensins with Escherichia Coli. Mechanism of Bactericidal Activity ». *The Journal of Clinical Investigation* 84 (2): 553-61. <https://doi.org/10.1172/JCI114198>.
- Leung, R. K.-K., J.-W. Zhou, W. Guan, S.-K. Li, Z.-F. Yang, et S. K.-W. Tsui. 2013. « Modulation of Potential Respiratory Pathogens by pH1N1 Viral Infection ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19 (10): 930-35. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12054>.
- Levy, O., S. Martin, E. Eichenwald, et al. 1999. « Impaired Innate Immunity in the Newborn: Newborn Neutrophils Are Deficient in Bactericidal/Permeability-Increasing Protein ». *Pediatrics* 104 (6): 1327-33. <https://doi.org/10.1542/peds.104.6.1327>.
- Li, Hui, Erica Burgueño-Bucio, Shin Xu, et al. 2019. « CD5 on Dendritic Cells Regulates CD4+ and CD8+ T Cell Activation and Induction of Immune Responses ». *PLoS One* 14 (9): e0222301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222301>.
- Li, Lei, Fang Wang, Yann Li, et Feng Gu. 2019. « Intestinal Microbiota Dysbiosis in Children with Recurrent Respiratory Tract Infections ». *Microbial Pathogenesis* 136 (novembre): 103709. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103709>.
- Li, Ruomeng, Jing Li, et Xikun Zhou. 2024. « Lung Microbiome: New Insights into the Pathogenesis of Respiratory Diseases ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9 (1): 19. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01722-y>.
- Li, Sijia, Siyuan Yang, Yuzheng Zhou, et al. 2021. « Microbiome Profiling Using Shotgun Metagenomic Sequencing Identified Unique Microorganisms in COVID-19 Patients With Altered Gut Microbiota ». *Frontiers in Microbiology* 12: 712081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.712081>.
- Lifland, Aaron W., Jeenah Jung, Eric Alonas, Chiara Zurla, James E. Crowe, et Philip J. Santangelo. 2012. « Human Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein and Inclusion Bodies Antagonize the Innate Immune Response Mediated by MDA5 and MAVS ». *Journal of Virology* 86 (15): 8245-58. <https://doi.org/10.1128/JVI.00215-12>.
- Lingemann, Matthias, Thomas McCarty, Xueqiao Liu, et al. 2019. « The Alpha-1 Subunit of the Na⁺,K⁺-ATPase (ATP1A1) Is Required for Macropinocytic Entry of Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Human Respiratory Epithelial Cells ». *PLoS Pathogens* 15 (8): e1007963. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007963>.
- Loering, Svenja, Guy J. M. Cameron, Nirmal P. Bhatt, et al. 2021. « Differences in Pulmonary Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Dependent on Mouse Age, Sex and Strain ». *Immunology and Cell Biology* 99 (5): 542-51. <https://doi.org/10.1111/imcb.12430>.
- Luoto, Raakel, Olli Ruuskanen, Matti Waris, Marko Kalliomäki, Seppo Salminen, et Erika Isolauri. 2014. « Prebiotic and Probiotic Supplementation Prevents Rhinovirus Infections in Preterm Infants: A Randomized, Placebo-Controlled Trial ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (2): 405-13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.08.020>.
- Mahajan, Arvind, et David Gally. 2011. « Escherichia Coli and the Mucosal Immune System ». *Expert Review of Clinical Immunology* 7 (6): 743-45. <https://doi.org/10.1586/eci.11.68>.
- Mahooti, Mehran, Elahe Abdolalipour, Ali Salehzadeh, Seyed Reza Mohebbi, Ali Gorji, et Amir Ghaemi. 2019. « Immunomodulatory and Prophylactic Effects of Bifidobacterium Bifidum Probiotic Strain on Influenza Infection in Mice ». *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 35 (6): 91. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2667-0>.
- Mariscalco, M. M., M. H. Tcharmthi, et C. W. Smith. 1998. « P-Selectin Support of Neonatal Neutrophil Adherence under Flow: Contribution of L-Selectin, LFA-1, and Ligand(s) for P-Selectin ». *Blood* 91 (12): 4776-85.
- Marquant, Quentin, Daphné Laubret, Carole Drjac, et al. 2021. « The Microbiota Plays a Critical Role in the Reactivity of Lung Immune Components to Innate Ligands ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (4): e21348. <https://doi.org/10.1096/fj.202002338R>.
- Martin, B. A., J. L. Wright, H. Thommasen, et J. C. Hogg. 1982. « Effect of Pulmonary Blood Flow on the Exchange between the Circulating and Marginating Pool of Polymorphonuclear Leukocytes in Dog Lungs ». *The Journal of Clinical Investigation* 69 (6): 1277-85. <https://doi.org/10.1172/jci110567>.
- Mastrangelo, Peter, Allysia A. Chin, Stephanie Tan, et al. 2021. « Identification of RSV Fusion Protein Interaction Domains on the Virus Receptor, Nucleolin ». *Viruses* 13 (2): 261. <https://doi.org/10.3390/v13020261>.

- Mathieu, Elliot, Quentin Marquant, Delphyne Descamps, Sabine Riffault, Vinciane Saint-Criq, et Muriel Thomas. 2021. « Le poumon est sensible aux effets locaux et à distance des microbiotes ». *Nutrition Clinique et Métabolisme* 35 (4): 242-52. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2021.04.002>.
- McCauley, Kathryn, Juliana Durack, Ricardo Valladares, et al. 2019. « Distinct Nasal Airway Bacterial Microbiotas Differentially Relate to Exacerbation in Pediatric Patients with Asthma ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 144 (5): 1187-97. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.05.035>.
- McFarlane, Amanda J., Henry J. McSorley, Donald J. Davidson, et al. 2017. « Enteric Helminth-Induced Type I Interferon Signaling Protects against Pulmonary Virus Infection through Interaction with the Microbiota ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140 (4): 1068-1078.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.016>.
- Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, et A. M. Hill. 2000. « M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (12): 6166-73. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>.
- Monticelli, Laurel A., Gregory F. Sonnenberg, Michael C. Abt, et al. 2011. « Innate Lymphoid Cells Promote Lung-Tissue Homeostasis after Infection with Influenza Virus ». *Nature Immunology* 12 (11): 1045-54. <https://doi.org/10.1031/ni.2131>.
- Morris, Alison, James M. Beck, Patrick D. Schloss, et al. 2013. « Comparison of the Respiratory Microbiome in Healthy Nonsmokers and Smokers ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 187 (10): 1067-75. <https://doi.org/10.1164/rccm.201210-1913OC>.
- Mouzinho, A., C. R. Rosenfeld, P. J. Sánchez, et R. Risser. 1994. « Revised Reference Ranges for Circulating Neutrophils in Very-Low-Birth-Weight Neonates ». *Pediatrics* 94 (1): 76-82.
- Munday, Diane C., Weining Wu, Nikki Smith, et al. 2015. « Interactome Analysis of the Human Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase Complex Identifies Protein Chaperones as Important Cofactors That Promote L-Protein Stability and RNA Synthesis ». *Journal of Virology* 89 (2): 917-30. <https://doi.org/10.1128/JVI.01783-14>.
- Nagata, Naoyoshi, Tadashi Takeuchi, Hiroaki Masuoka, et al. 2023. « Human Gut Microbiota and Its Metabolites Impact Immune Responses in COVID-19 and Its Complications ». *Gastroenterology* 164 (2): 272-88. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.09.024>.
- Nair, Harish, D. James Nokes, Bradford D. Gessner, et al. 2010. « Global Burden of Acute Lower Respiratory Infections Due to Respiratory Syncytial Virus in Young Children: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Lancet (London, England)* 375 (9725): 1545-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60206-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60206-1).
- Nakayama, Yosuke, Tomohiro Moriya, Fumihiko Sakai, et al. 2014. « Oral Administration of Lactobacillus Gasseri SBT2055 Is Effective for Preventing Influenza in Mice ». *Scientific Reports* 4 (avril): 4638. <https://doi.org/10.1038/srep04638>.
- Nang, Sue C., Yu-Wei Lin, Aleksandra Petrovic Fabijan, et al. 2023. « Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Phage Therapy: A Major Hurdle to Clinical Translation ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 29 (6): 702-9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.01.021>.
- Nashed, Lydia, Jyoti Mani, Sahel Hazrati, et al. 2022. « Gut Microbiota Changes Are Detected in Asymptomatic Very Young Children with SARS-CoV-2 Infection ». *Gut* 71 (11): 2371-73. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326599>.
- Newsome, Rachel C., Josee Gauthier, Maria C. Hernandez, et al. 2021. « The Gut Microbiome of COVID-19 Recovered Patients Returns to Uninfected Status in a Minority-Dominated United States Cohort ». *Gut Microbes* 13 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1926840>.
- Ngo, Vu L., Carolin M. Lieber, Hae-Ji Kang, et al. 2024. « Intestinal Microbiota Programming of Alveolar Macrophages Influences Severity of Respiratory Viral Infection ». *Cell Host & Microbe* 32 (3): 335-348.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.01.002>.
- Nies, Laura de, Valentina Galata, Camille Martin-Gallausiaux, et al. 2023. « Altered Infective Competence of the Human Gut Microbiome in COVID-19 ». *Microbiome* 11 (1): 46. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01472-7>.
- O'Dwyer, David N., Shanna L. Ashley, Stephen J. Gurczynski, et al. 2019. « Lung Microbiota Contribute to Pulmonary Inflammation and Disease Progression in Pulmonary Fibrosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 199 (9): 1127-38. <https://doi.org/10.1164/rccm.201809-1650OC>.
- Ohtsuka, Yoshikazu, Takako Ikegami, Hirohisa Izumi, et al. 2012. « Effects of Bifidobacterium Breve on Inflammatory Gene Expression in Neonatal and Weaning Rat Intestine ». *Pediatric Research* 71 (1): 46-53. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.11>.
- Olivier, Alicia, Jack Gallup, Marcia M. M. A. de Macedo, Steven M. Varga, et Mark Ackermann. 2009. « Human Respiratory Syncytial Virus A2 Strain Replicates and Induces Innate Immune Responses by Respiratory Epithelia of Neonatal Lambs ». *International Journal of Experimental Pathology* 90 (4): 431-38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00643.x>.
- Openshaw, P. J. 2001. « Potential Mechanisms Causing Delayed Effects of Respiratory Syncytial Virus Infection ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163 (3 Pt 2): S10-13. https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.supplement_1.2011111.
- Osiowy, C., et R. Anderson. 1995. « Neutralization of Respiratory Syncytial Virus after Cell Attachment ». *Journal of Virology* 69 (2): 1271-74. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.2.1271-1274.1995>.

- Pahwa, S. G., R. Pahwa, E. Grimes, et E. Smithwick. 1977. « Cellular and Humoral Components of Monocyte and Neutrophil Chemotaxis in Cord Blood ». *Pediatric Research* 11 (5): 677-80. <https://doi.org/10.1203/00006450-197705000-00010>.
- Paireau, Juliette, Cécile Durand, Sylvain Rimbault, et al. 2024. « Nirsevimab Effectiveness Against Cases of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis Hospitalised in Paediatric Intensive Care Units in France, September 2023-January 2024 ». *Influenza and Other Respiratory Viruses* 18 (6): e13311. <https://doi.org/10.1111/irv.13311>.
- Pala, P., R. Bjarnason, F. Sigurbergsson, C. Metcalfe, N. Sigurs, et P. J. M. Openshaw. 2002. « Enhanced IL-4 Responses in Children with a History of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Infancy ». *The European Respiratory Journal* 20 (2): 376-82. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00249902>.
- « Palivizumab, a Humanized Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, Reduces Hospitalization From Respiratory Syncytial Virus Infection in High-Risk Infants ». 1998. *Pediatrics* 102 (3): 531-37.
- Patel, J. A., M. Kunitomo, T. C. Sim, et al. 1995. « Interleukin-1 Alpha Mediates the Enhanced Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 in Pulmonary Epithelial Cells Infected with Respiratory Syncytial Virus ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 13 (5): 602-9. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.13.5.7576697>.
- Pattaroni, Céline, Martin L. Watzenboeck, Sabrina Schneidegger, et al. 2018. « Early-Life Formation of the Microbial and Immunological Environment of the Human Airways ». *Cell Host & Microbe* 24 (6): 857-865.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.019>.
- Patton, Kathryn, Shahin Aslam, Cindy Shambaugh, et al. 2015. « Enhanced Immunogenicity of a Respiratory Syncytial Virus (RSV) F Subunit Vaccine Formulated with the Adjuvant GLA-SE in Cynomolgus Macaques ». *Vaccine* 33 (36): 4472-78. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.025>.
- Percopo, Caroline M., Zhijun Qiu, Simon Phipps, Paul S. Foster, Joseph B. Domachowske, et Helene F. Rosenberg. 2009. « Pulmonary Eosinophils and Their Role in Immunopathologic Responses to Formalin-Inactivated Pneumonia Virus of Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (1): 604-12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802270>.
- Pichon, Maxime, Bruno Lina, et Laurence Josset. 2017. « Impact of the Respiratory Microbiome on Host Responses to Respiratory Viral Infection ». *Vaccines* 5 (4): 40. <https://doi.org/10.3390/vaccines5040040>.
- Pinto, Ricardo A., Sonia M. Arredondo, Maria R. Bono, Aldo A. Gaggero, et Patricia V. Díaz. 2006. « T Helper 1/T Helper 2 Cytokine Imbalance in Respiratory Syncytial Virus Infection Is Associated with Increased Endogenous Plasma Cortisol ». *Pediatrics* 117 (5): e878-886. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-2119>.
- Policard J, Galy P. 1945. *Les bronches: structures et mécanismes à l'état normal et pathologique*. Masson&Cie.
- Prince, G. A., S. C. Suffin, D. A. Prevar, et al. 1979. « Respiratory Syncytial Virus Infection in Owl Monkeys: Viral Shedding, Immunological Response, and Associated Illness Caused by Wild-Type Virus and Two Temperature-Sensitive Mutants ». *Infection and Immunity* 26 (3): 1009-13. <https://doi.org/10.1128/iai.26.3.1009-1013.1979>.
- Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, et al. 2010. « A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing ». *Nature* 464 (7285): 59-65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>.
- Qin, Nan, Beiwen Zheng, Jian Yao, et al. 2015. « Influence of H7N9 Virus Infection and Associated Treatment on Human Gut Microbiota ». *Scientific Reports* 5 (octobre): 14771. <https://doi.org/10.1038/srep14771>.
- Rameix-Welti, Marie-Anne, Ronan Le Goffic, Pierre-Louis Hervé, et al. 2014. « Visualizing the Replication of Respiratory Syncytial Virus in Cells and in Living Mice ». *Nature Communications* 5 (octobre): 5104. <https://doi.org/10.1038/ncomms6104>.
- Ratjen, F., M. Bredendiek, L. Zheng, M. Brendel, et U. Costabel. 1995. « Lymphocyte Subsets in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Children without Bronchopulmonary Disease ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152 (1): 174-78. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.152.1.7599820>.
- Rebuck, N, A Gibson, et A Finn. 1995. « Neutrophil adhesion molecules in term and premature infants: normal or enhanced leucocyte integrins but defective L-selectin expression and shedding. » *Clinical and Experimental Immunology* 101 (1): 183-89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb02296.x>.
- Remington and Klein's Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 2024. <https://shop.elsevier.com/books/remington-and-kleins-infectious-diseases-of-the-fetus-and-newborn-infant/maldonado/978-0-323-79525-8>.
- Remot, Aude, Delphyne Descamps, Luc Jouneau, et al. 2016. « Flt3 Ligand Improves the Innate Response to Respiratory Syncytial Virus and Limits Lung Disease upon RSV Reexposure in Neonate Mice ». *European Journal of Immunology* 46 (4): 874-84. <https://doi.org/10.1002/eji.201545929>.
- Remot, Aude, Delphyne Descamps, Marie-Louise Noordine, et al. 2017. « Bacteria Isolated from Lung Modulate Asthma Susceptibility in Mice ». *The ISME Journal* 11 (5): 1061-74. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.181>.
- Renz, Harald, Per Brandtzaeg, et Mathias Hornef. 2011. « The Impact of Perinatal Immune Development on Mucosal Homeostasis and Chronic Inflammation ». *Nature Reviews. Immunology* 12 (1): 9-23. <https://doi.org/10.1038/nri3112>.

- Reyes, Bryan Ramirez, Shelby Madden, Kimberly A. Meyer, et al. 2025. « Homeostatic antiviral protection of the neonatal gut epithelium by interferon lambda ». *Cell reports* 44 (2): 115243. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.115243>.
- Rieber, N., C. Gille, N. Köstlin, et al. 2013. « Neutrophilic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cord Blood Modulate Innate and Adaptive Immune Responses ». *Clinical and Experimental Immunology* 174 (1): 45-52. <https://doi.org/10.1111/cei.12143>.
- Rigo-Adrover, Maria del Mar, Àngels Franch, Margarida Castell, et Francisco José Pérez-Cano. 2016. « Preclinical Immunomodulation by the Probiotic Bifidobacterium Breve M-16V in Early Life ». *PLOS ONE* 11 (11): e0166082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166082>.
- Robinson, Polly F. M., Céline Pattaroni, James Cook, et al. 2019. « Lower Airway Microbiota Associates with Inflammatory Phenotype in Severe Preschool Wheeze ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143 (4): 1607-1610.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.12.985>.
- Romani, Lorenza, Federica Del Chierico, Gabriele Macari, et al. 2022. « The Relationship Between Pediatric Gut Microbiota and SARS-CoV-2 Infection ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12: 908492. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.908492>.
- Roquilly, A., A. Torres, J. A. Villadangos, et al. 2019. « Pathophysiological Role of Respiratory Dysbiosis in Hospital-Acquired Pneumonia ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 7 (8): 710-20. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30140-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30140-7).
- Rosas-Salazar, Christian, Meghan H. Shilts, Andrey Tovchigrechko, et al. 2016. « Differences in the Nasopharyngeal Microbiome During Acute Respiratory Tract Infection With Human Rhinovirus and Respiratory Syncytial Virus in Infancy ». *The Journal of Infectious Diseases* 214 (12): 1924-28. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw456>.
- Rosser, Elizabeth C., Kristine Oleinika, Silvia Tonon, et al. 2014. « Regulatory B Cells Are Induced by Gut Microbiota-Driven Interleukin-1 β and Interleukin-6 Production ». *Nature Medicine* 20 (11): 1334-39. <https://doi.org/10.1038/nm.3680>.
- Rossi, Giovanni A., Hani Fanous, et Andrew A. Colin. 2020. « Viral Strategies Predisposing to Respiratory Bacterial Superinfections ». *Pediatric Pulmonology* 55 (4): 1061-73. <https://doi.org/10.1002/ppul.24699>.
- Round, June L., et Sarkis K. Mazmanian. 2009. « The Gut Microbiota Shapes Intestinal Immune Responses during Health and Disease ». *Nature Reviews. Immunology* 9 (5): 313-23. <https://doi.org/10.1038/nri2515>.
- Ruckwardt, T. J., K. M. Morabito, E. Bar-Haim, D. Nair, et B. S. Graham. 2018. « Neonatal Mice Possess Two Phenotypically and Functionally Distinct Lung-Migratory CD103+ Dendritic Cell Populations Following Respiratory Infection ». *Mucosal Immunology* 11 (1): 186-98. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.28>.
- Ruckwardt, Tracy J., Allison M. W. Malloy, Kaitlyn M. Morabito, et Barney S. Graham. 2014. « Quantitative and Qualitative Deficits in Neonatal Lung-Migratory Dendritic Cells Impact the Generation of the CD8+ T Cell Response ». *PLoS Pathogens* 10 (2): e1003934. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003934>.
- Ryu, Ji-Hwan, Jung-Yeon Yoo, Min-Ji Kim, et al. 2013. « Distinct TLR-Mediated Pathways Regulate House Dust Mite-Induced Allergic Disease in the Upper and Lower Airways ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (2): 549-61. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.050>.
- Saluzzo, Simona, Anna-Dorothea Gorki, Batika M. J. Rana, et al. 2017. « First-Breath-Induced Type 2 Pathways Shape the Lung Immune Environment ». *Cell Reports* 18 (8): 1893-905. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.071>.
- Santos, Angela Batista Gomes dos, Daniella Binoki, Luis Fernando F. Silva, et al. 2013. « Immune Cell Profile in Infants' Lung Tissue ». *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft* 195 (6): 596-604. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2013.05.003>.
- Savino, Francesco, Lisa Cordisco, Valentina Tarasco, et al. 2010. « Lactobacillus Reuteri DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ». *Pediatrics* 126 (3): e526-533. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-0433>.
- Schaupp, Laura, Sabine Muth, Leif Rogell, et al. 2020. « Microbiota-Induced Type I Interferons Instruct a Poised Basal State of Dendritic Cells ». *Cell* 181 (5): 1080-1096.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.022>.
- Schippa, Serena, Antonella Frassanito, Massimiliano Marazzato, et al. 2020. « Nasal Microbiota in RSV Bronchiolitis ». *Microorganisms* 8 (5): 731. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050731>.
- Schittny, Johannes C. 2017. « Development of the Lung ». *Cell and Tissue Research* 367 (3): 427-44. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2545-0>.
- Schmoele-Thoma, Beate, Agnieszka M. Zareba, Qin Jiang, et al. 2022. « Vaccine Efficacy in Adults in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study ». *The New England Journal of Medicine* 386 (25): 2377-86. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2116154>.
- Schwab, Andreas J., Agnes Salamand, Yahye Merhi, Andre Simard, et Jocelyn Dupuis. 2003. « Kinetic Analysis of Pulmonary Neutrophil Retention in Vivo Using the Multiple-Indicator-Dilution Technique ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 95 (1): 279-91. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00783.2001>.

- Schwarz, Julian, Jessica Rühle, Kevin Stephan, et al. 2023. « HIF-1 α Targeted Deletion in Myeloid Cells Decreases MDSC Accumulation and Alters Microbiome in Neonatal Mice ». *European Journal of Immunology* 53 (7): e2250144. <https://doi.org/10.1002/eji.202250144>.
- Schwarze, Jurgen, Diarmund R. O'Donnell, Angela Rohwedder, et Peter J. M. Openshaw. 2004. « Latency and Persistence of Respiratory Syncytial Virus despite T Cell Immunity ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 169 (7): 801-5. <https://doi.org/10.1164/rccm.200308-1203OC>.
- Sebina, Ismail, Ridwan B. Rashid, Md Al Amin Sikder, et al. 2022. « IFN- λ Diminishes the Severity of Viral Bronchiolitis in Neonatal Mice by Limiting NADPH Oxidase-Induced PAD4-Independent NETosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 208 (12): 2806-16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100876>.
- Sedney, Colleen J., et Eric T. Harvill. 2023. « The Neonatal Immune System and Respiratory Pathogens ». *Microorganisms* 11 (6): 1597. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061597>.
- Sekirov, Inna, Shannon L. Russell, L. Caetano M. Antunes, et B. Brett Finlay. 2010. « Gut Microbiota in Health and Disease ». *Physiological Reviews* 90 (3): 859-904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.
- Sencio, Valentin, Adeline Barthelemy, Luciana P. Tavares, et al. 2020. « Gut Dysbiosis during Influenza Contributes to Pulmonary Pneumococcal Superinfection through Altered Short-Chain Fatty Acid Production ». *Cell Reports* 30 (9): 2934-2947.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.013>.
- Sencio, Valentin, Alexandre Gallerand, Marina Gomes Machado, et al. 2021. « Influenza Virus Infection Impairs the Gut's Barrier Properties and Favors Secondary Enteric Bacterial Infection through Reduced Production of Short-Chain Fatty Acids ». *Infection and Immunity* 89 (9): e0073420. <https://doi.org/10.1128/IAI.00734-20>.
- Shi, Ting, David A. McAllister, Katherine L. O'Brien, et al. 2017. « 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 (London, England)* 390 (10098): 946-58. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8).
- Simoes, E. A., A. R. Hayward, E. M. Ponnuraj, et al. 1999. « Respiratory Syncytial Virus Infects the Bonnet Monkey, *Macaca Radiata* ». *Pediatric and Developmental Pathology: The Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 2 (4): 316-26. <https://doi.org/10.1007/s100249900129>.
- Singh, Pradeep K., Hong Peng Jia, Kerry Wiles, et al. 1998. « Production of β -defensins by human airway epithelia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (25): 14961-66.
- Slayton, W. B., Y. Li, D. A. Calhoun, et al. 1998. « The First-Appearance of Neutrophils in the Human Fetal Bone Marrow Cavity ». *Early Human Development* 53 (2): 129-44. [https://doi.org/10.1016/s0378-3782\(98\)00049-8](https://doi.org/10.1016/s0378-3782(98)00049-8).
- Song, Jeong Ah, Hee Joo Kim, Seong Keun Hong, et al. 2016. « Oral Intake of *Lactobacillus Rhamnosus* M21 Enhances the Survival Rate of Mice Lethally Infected with Influenza Virus ». *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* 49 (1): 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.07.011>.
- Srinivasakumar, N., P. L. Ogra, et T. D. Flanagan. 1991. « Characteristics of Fusion of Respiratory Syncytial Virus with HEp-2 Cells as Measured by R18 Fluorescence Dequenching Assay ». *Journal of Virology* 65 (8): 4063-69. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.8.4063-4069.1991>.
- Steed, Ashley L., George P. Christophi, Gerard E. Kaiko, et al. 2017. « The Microbial Metabolite Desaminotyrosine Protects from Influenza through Type I Interferon ». *Science (New York, N.Y.)* 357 (6350): 498-502. <https://doi.org/10.1126/science.aam5336>.
- Steenhuijsen Piters, Wouter A. A. de, Justyna Binkowska, et Debby Bogaert. 2020. « Early Life Microbiota and Respiratory Tract Infections ». *Cell Host & Microbe* 28 (2): 223-32. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.004>.
- Steenhuijsen Piters, Wouter A. A. de, Santtu Heinonen, Raiza Hasrat, et al. 2016. « Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 194 (9): 1104-15. <https://doi.org/10.1164/rccm.201602-0220OC>.
- Steenhuijsen Piters, Wouter A. A. de, Rebecca L. Watson, Emma M. de Koff, et al. 2022. « Early-Life Viral Infections Are Associated with Disadvantageous Immune and Microbiota Profiles and Recurrent Respiratory Infections ». *Nature Microbiology* 7 (2): 224-37. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-01043-2>.
- Steer, Catherine A., Laura Mathä, Hanjoo Shim, et Fumio Takei. 2020. « Lung Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Trained by Endogenous IL-33 in the Neonatal Period ». *JCI Insight* 5 (14): e135961, 135961. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.135961>.
- Stockman, Lauren J., Aaron T. Curns, Larry J. Anderson, et Gayle Fischer-Langley. 2012. « Respiratory Syncytial Virus-Associated Hospitalizations among Infants and Young Children in the United States, 1997-2006 ». *The Pediatric Infectious Disease Journal* 31 (1): 5-9. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31822e68e6>.
- Sun, Cheng-Ming, Edith Deriaud, Claude Leclerc, et Richard Lo-Man. 2005. « Upon TLR9 Signaling, CD5+ B Cells Control the IL-12-Dependent Th1-Priming Capacity of Neonatal DCs ». *Immunity* 22 (4): 467-77. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.02.008>.

- Sun, Cheng-Ming, Laurence Fiette, Myriam Tanguy, Claude Leclerc, et Richard Lo-Man. 2003. « Ontogeny and Innate Properties of Neonatal Dendritic Cells ». *Blood* 102 (2): 585-91. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2966>.
- Suskun, Cansu, Omer Kilic, Dilek Yilmaz Ciftdogan, et al. 2022. « Intestinal Microbiota Composition of Children with Infection with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Multisystem Inflammatory Syndrome (MIS-C) ». *European Journal of Pediatrics* 181 (8): 3175-91. <https://doi.org/10.1007/s00431-022-04494-9>.
- Swieboda, Dawid, Thomas F. Rice, Yanping Guo, et al. 2024. « Natural Killer Cells and Innate Lymphoid Cells but Not NKT Cells Are Mature in Their Cytokine Production at Birth ». *Clinical and Experimental Immunology* 215 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1093/cei/uxad094>.
- Szajewska, Hania, Ewa Gyrczuk, et Andrea Horvath. 2013. « Lactobacillus Reuteri DSM 17938 for the Management of Infantile Colic in Breastfed Infants: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ». *The Journal of Pediatrics* 162 (2): 257-62. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.08.004>.
- Tao, Wanyin, Guorong Zhang, Xiaofang Wang, et al. 2020. « Analysis of the Intestinal Microbiota in COVID-19 Patients and Its Correlation with the Inflammatory Factor IL-18 ». *Medicine in Microecology* 5 (septembre): 100023. <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2020.100023>.
- Tayyari, Farnoosh, David Marchant, Theo J. Moraes, Wenming Duan, Peter Mastrangelo, et Richard G. Hegele. 2011. « Identification of Nucleolin as a Cellular Receptor for Human Respiratory Syncytial Virus ». *Nature Medicine* 17 (9): 1132-35. <https://doi.org/10.1038/nm.2444>.
- Teng, M. N., S. S. Whitehead, A. Bermingham, et al. 2000. « Recombinant Respiratory Syncytial Virus That Does Not Express the NS1 or M2-2 Protein Is Highly Attenuated and Immunogenic in Chimpanzees ». *Journal of Virology* 74 (19): 9317-21. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.19.9317-9321.2000>.
- Teo, Shu Mei, Danny Mok, Kym Pham, et al. 2015. « The Infant Nasopharyngeal Microbiome Impacts Severity of Lower Respiratory Infection and Risk of Asthma Development ». *Cell Host & Microbe* 17 (5): 704-15. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.008>.
- Terada-Ikeda, Chiyoko, Masahiro Kitabatake, Akari Hiraku, et al. 2020. « Maternal Supplementation with Bifidobacterium Breve M-16V Prevents Their Offspring from Allergic Airway Inflammation Accelerated by the Prenatal Exposure to an Air Pollutant Aerosol ». *PLOS ONE* 15 (9): e0238923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238923>.
- Thome, Joseph J. C., Kara L. Bickham, Yoshiaki Ohmura, et al. 2016. « Early-Life Compartmentalization of Human T Cell Differentiation and Regulatory Function in Mucosal and Lymphoid Tissues ». *Nature Medicine* 22 (1): 72-77. <https://doi.org/10.1038/nm.4008>.
- Tomosada, Yohsuke, Eriko Chiba, Hortensia Zelaya, et al. 2013. « Nasally Administered Lactobacillus Rhamnosus Strains Differentially Modulate Respiratory Antiviral Immune Responses and Induce Protection against Respiratory Syncytial Virus Infection ». *BMC Immunology* 14 (août): 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-40>.
- Török, C., J. Lundahl, J. Hed, et H. Lagercrantz. 1993. « Diversity in Regulation of Adhesion Molecules (Mac-1 and L-Selectin) in Monocytes and Neutrophils from Neonates and Adults ». *Archives of Disease in Childhood* 68 (5 Spec No): 561-65. https://doi.org/10.1136/adc.68.5_spec_no.561.
- Torres, David, Arnaud Köhler, Sandrine Delbauve, et al. 2016. « IL-12p40/IL-10 Producing preCD8 α /Clec9A⁺ Dendritic Cells Are Induced in Neonates upon *Listeria Monocytogenes* Infection ». *PLoS Pathogens* 12 (4): e1005561. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005561>.
- Travier, Laetitia, et Marc Lecuit. 2022. « [Neonatal susceptibility to meningitis results from the immaturity of epithelial barriers and gut microbiota] ». *Medicine Sciences: M/S* 38 (5): 416-18. <https://doi.org/10.1051/medsci/2022049>.
- Tregoning, John S., et Jürgen Schwarze. 2010. « Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology ». *Clinical Microbiology Reviews* 23 (1): 74-98. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-09>.
- Tripp, R. A., L. P. Jones, L. M. Haynes, H. Zheng, P. M. Murphy, et L. J. Anderson. 2001. « CX3C Chemokine Mimicry by Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein ». *Nature Immunology* 2 (8): 732-38. <https://doi.org/10.1038/90675>.
- Trompette, Aurélien, Eva S. Gollwitzer, Céline Pattaroni, et al. 2018. « Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c⁺ Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8⁺ T Cell Metabolism ». *Immunity* 48 (5): 992-1005.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.022>.
- Trompette, Aurélien, Eva S. Gollwitzer, Koshika Yadava, et al. 2014. « Gut Microbiota Metabolism of Dietary Fiber Influences Allergic Airway Disease and Hematopoiesis ». *Nature Medicine* 20 (2): 159-66. <https://doi.org/10.1038/nm.3444>.
- Van der Leur, J. J., P. L. Thunnissen, H. A. Clasener, N. F. Muller, et A. S. Dofferhoff. 1993. « Effects of Imipenem, Cefotaxime and Cotrimoxazole on Aerobic Microbial Colonization of the Digestive Tract ». *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 25 (4): 473-78. <https://doi.org/10.3109/00365549309008529>.
- Venkataraman, Arvind, Christine M. Bassis, James M. Beck, et al. 2015. « Application of a Neutral Community Model to Assess Structuring of the Human Lung Microbiome ». *mBio* 6 (1): e02284-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02284-14>.

- Verstraelen, Sandra, Dirk Roymans, An Jacobs, et al. 2024. « Proof of Stability of an RSV Controlled Human Infection Model Challenge Agent ». *Virology Journal* 21 (1): 112. <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02386-y>.
- Wang, Jian, Fengqi Li, Rui Sun, et al. 2013. « Bacterial Colonization Dampens Influenza-Mediated Acute Lung Injury via Induction of M2 Alveolar Macrophages ». *Nature Communications* 4: 2106. <https://doi.org/10.1038/ncomms3106>.
- Wang, Jian, Fengqi Li, Haiming Wei, Zhe-Xiong Lian, Rui Sun, et Zhigang Tian. 2014. « Respiratory Influenza Virus Infection Induces Intestinal Immune Injury via Microbiota-Mediated Th17 Cell-Dependent Inflammation ». *The Journal of Experimental Medicine* 211 (12): 2397-410. <https://doi.org/10.1084/jem.20140625>.
- Wang, Qianwen, Zhifeng Fang, Lingzhi Li, et al. 2022. « Lactobacillus Mucosae Exerted Different Antiviral Effects on Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice ». *Frontiers in Microbiology* 13: 1001313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1001313>.
- Wang, S. Z., P. G. Hallsworth, K. D. Dowling, J. H. Alpers, J. J. Bowden, et K. D. Forsyth. 2000. « Adhesion Molecule Expression on Epithelial Cells Infected with Respiratory Syncytial Virus ». *The European Respiratory Journal* 15 (2): 358-66. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.15b23.x>.
- Wang, Zhang, Nicholas Locantore, Koirobi Haldar, et al. 2021. « Inflammatory Endotype-Associated Airway Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Clinical Stability and Exacerbations: A Multicohort Longitudinal Analysis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 203 (12): 1488-502. <https://doi.org/10.1164/rccm.202009-3448OC>.
- Warning, J. C., S. A. McCracken, et J. M. Morris. 2011. « A Balancing Act: Mechanisms by Which the Fetus Avoids Rejection by the Maternal Immune System ». *Reproduction (Cambridge, England)* 141 (6): 715-24. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0360>.
- West, K., L. Petrie, D. M. Haines, et al. 1999. « The Effect of Formalin-Inactivated Vaccine on Respiratory Disease Associated with Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection in Calves ». *Vaccine* 17 (7-8): 809-20. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(98\)00265-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(98)00265-5).
- West, K., L. Petrie, C. Konoby, D. M. Haines, V. Cortese, et J. A. Ellis. 1999. « The Efficacy of Modified-Live Bovine Respiratory Syncytial Virus Vaccines in Experimentally Infected Calves ». *Vaccine* 18 (9-10): 907-19. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00324-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00324-2).
- Wolach, B., D. Sonnenschein, R. Gavrieli, O. Chomsky, A. Pomeranz, et I. Yuli. 1998. « Neonatal Neutrophil Inflammatory Responses: Parallel Studies of Light Scattering, Cell Polarization, Chemotaxis, Superoxide Release, and Bactericidal Activity ». *American Journal of Hematology* 58 (1): 8-15. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8652\(199805\)58:1%253C8::aid-ajh2%253E3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8652(199805)58:1%253C8::aid-ajh2%253E3.0.co;2-x).
- Wu, Chunyan, Qian Xu, Zhan Cao, et al. 2021. « The Volatile and Heterogeneous Gut Microbiota Shifts of COVID-19 Patients over the Course of a Probiotics-Assisted Therapy ». *Clinical and Translational Medicine* 11 (12): e643. <https://doi.org/10.1002/ctm2.643>.
- Wu, Huixing, Alexander Kuzmenko, Sijue Wan, et al. 2003. « Surfactant Proteins A and D Inhibit the Growth of Gram-Negative Bacteria by Increasing Membrane Permeability ». *The Journal of Clinical Investigation* 111 (10): 1589-602. <https://doi.org/10.1172/JCI16889>.
- Wylie, Kristine M. 2017. « The Virome of the Human Respiratory Tract ». *Clinics in Chest Medicine* 38 (1): 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.11.001>.
- Xu, Rong, Pengcheng Liu, Tao Zhang, et al. 2021. « Progressive Deterioration of the Upper Respiratory Tract and the Gut Microbiomes in Children during the Early Infection Stages of COVID-19 ». *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* 48 (9): 803-14. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.05.004>.
- Xu, Xiaoguang, Wei Zhang, Mingquan Guo, et al. 2022. « Integrated Analysis of Gut Microbiome and Host Immune Responses in COVID-19 ». *Frontiers of Medicine* 16 (2): 263-75. <https://doi.org/10.1007/s11684-022-0921-6>.
- Yang, Xin, Juan Huang, Jian Peng, et al. 2024. « Gut Microbiota from B-Cell-Specific TLR9-Deficient NOD Mice Promote IL-10+ Breg Cells and Protect against T1D ». *Frontiers in Immunology* 15: 1413177. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1413177>.
- Yeoh, Yun Kit, Tao Zuo, Grace Chung-Yan Lui, et al. 2021. « Gut Microbiota Composition Reflects Disease Severity and Dysfunctional Immune Responses in Patients with COVID-19 ». *Gut* 70 (4): 698-706. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323020>.
- Yeramilli, Venkata A., et Katherine L. Knight. 2010. « Requirement for BAFF and APRIL during B Cell Development in GALT ». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (10): 5527-36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000146>.
- You, Dahui, David Becnel, Kai Wang, Michael Ripple, Melissa Daly, et Stephania A. Cormier. 2006. « Exposure of Neonates to Respiratory Syncytial Virus Is Critical in Determining Subsequent Airway Response in Adults ». *Respiratory Research* 7 (1): 107. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-107>.

- Yun, Yeojun, Girish Srinivas, Sven Kuenzel, et al. 2014. « Environmentally Determined Differences in the Murine Lung Microbiota and Their Relation to Alveolar Architecture ». *PloS One* 9 (12): e113466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113466>.
- Zhang, Chen, Guang-Sheng Lei, Shoujin Shao, Hsin-Wei Jung, Pamela J. Durant, et Chao-Hung Lee. 2012. « Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Lungs during Pneumocystis Pneumonia ». *Infection and Immunity* 80 (10): 3634-41. <https://doi.org/10.1128/IAI.00668-12>.
- Zhang, Liqun, Mark E. Peeples, Richard C. Boucher, Peter L. Collins, et Raymond J. Pickles. 2002. « Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Airway Epithelial Cells Is Polarized, Specific to Ciliated Cells, and without Obvious Cytopathology ». *Journal of Virology* 76 (11): 5654-66. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5654-5666.2002>.
- Zhang, Wei, Xue Lin, Zhi-Yong Li, et al. 2024. « Novel Intercellular Spread Mode of Respiratory Syncytial Virus Contributes to Neutralization Escape ». *Antiviral Research* 231 (novembre): 106023. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.106023>.
- Zhang, Zongde, Jianjian Li, Wencheng Zheng, et al. 2016. « Peripheral lymphoid volume expansion and maintenance are controlled by gut microbiota via RALDH+ dendritic cells ». *Immunity* 44 (2): 330-42. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.004>.
- Zhivaki, Dania, Sébastien Lemoine, Annick Lim, et al. 2017. « Respiratory Syncytial Virus Infects Regulatory B Cells in Human Neonates via Chemokine Receptor CX3CR1 and Promotes Lung Disease Severity ». *Immunity* 46 (2): 301-14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.010>.
- Zipperer, Alexander, Martin C. Konnerth, Claudia Laux, et al. 2016. « Human Commensals Producing a Novel Antibiotic Impair Pathogen Colonization ». *Nature* 535 (7613): 511-16. <https://doi.org/10.1038/nature18634>.

ANNEXE

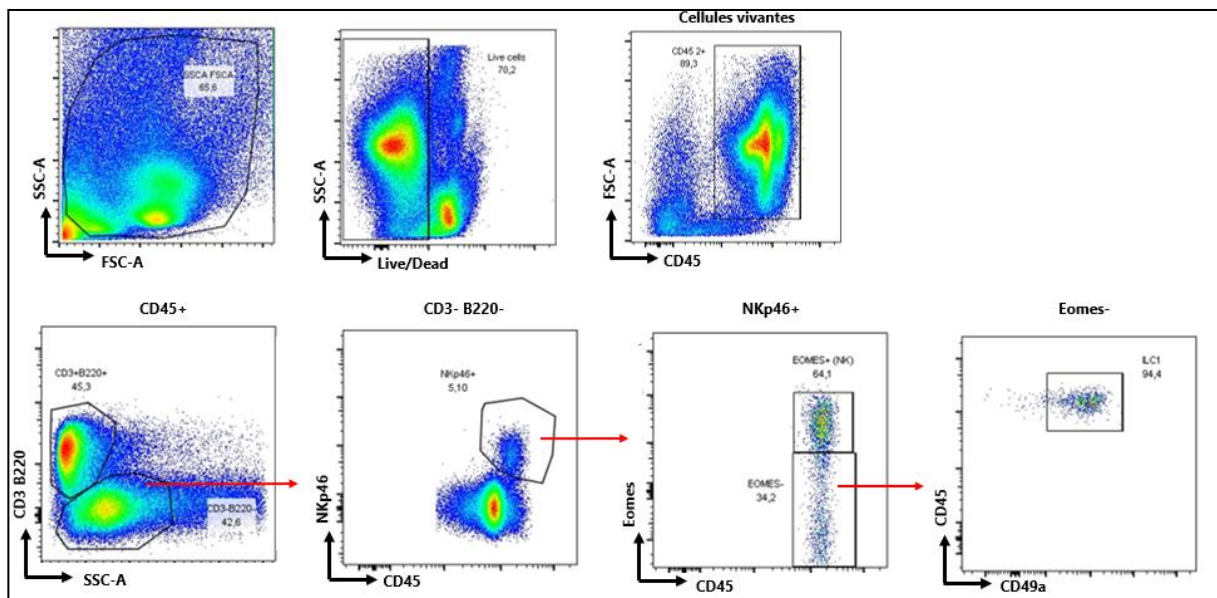
Annexe 1 : Stratégie d'identification des Lc NK

Panel "ILC1/NK"

Bandpass filter	Fluorochromes	Marqueurs	Dilution	Clones	Fournisseur	Isotype	Espèce source	Dilution
710/50	PerCP-Cy5.5	CD3	1/100	17A2	SONY Sirigen	IgG2b, k	Rat	1/100
		B220	1/100	RA3-6B2	BD	IgG2a, k	Rat	1/100
530/30	FITC	CD45.2	1/100	104	SONY Sirigen	IgG2a, k	Mouse	1/100
780/60	APC-Cy7	CD27	1/200	LG.3A10	Biolegend	IgG	Hamster	1/200
730/45	AF700	CD11b	1/800	M1/70	Biolegend	IgG2b, k	Rat	1/800
670/14	APC	TRAIL	1/50	N2B2	eBiosciences	IgG2a, k	Rat	1/50
710/50								
610/20								
780/60	PE-Cy7	CD49b	1/200	DX5	SONY Sirigen	IgM, k	Rat	1/200
670/30								
586/15	PE	EOMES	1/100	Dan11mag	eBiosciences	IgG2a, k	Rat	1/100
710/50	BV711	CD49a	1/25	Ha31/8	BD	IgG2, I1	Hamster	1/25
610/20	BV605	NKp46	1/25	29A1.4	SONY Sirigen	IgG2a, k	Rat	1/25
450/20								
780/60	BV786	CD90.2	1/1000	53-2.1	BD	IgG2a, k	Rat	1/1000
660/20								
525/50	BV510	zombie aqua	1/800					

Combinaison de marqueurs utilisés pour l'identification des Lc NK :

CD45+ CD19- CD3- NKp46+ EOMES+



Annexe 2 : Participation à des congrès

- Journées de Recherche Respiratoire (poster), 2024, Paris
- Journées de Recherche Respiratoire (poster), 2023, Tours
- 24^{ème} édition du colloque des jeunes chercheurs VLM (poster), 2023, Paris
- 23^{ème} édition du colloque des jeunes chercheurs VLM, 2022, Paris
- 12th International RSV Symposium (communication orale), 2022, Belfast
- Journées de Recherche Respiratoire (communication orale), 2021, Brest

Annexe 3 : Formations suivies pendant le doctorat

Catégorie : Communication et médiation scientifique

Modélisation statistique et analyse de données biologiques, AgroParisTech Palaiseau

Catégorie : Outils du doctorant-chercheur

Initiation à la gestion de projet : Conduire sa thèse comme un projet, AgroParisTech, Paris

Journée d'accueil des nouveaux doctorants, en ligne

Prévention et gestion des risques en laboratoire de confinement L2 et L3, AFPIC Formation

Catégorie : Préparer son projet professionnel

Organisation de la journée Doc'Avenir 2023, AgroParisTech

Catégorie : Préparer son devenir professionnel : Identifier ses compétences, découvrir le marché de l'emploi, se préparer aux entretiens

Ecole d'été Innovation thérapeutique, OI HEALTHI Université Paris Saclay

Catégorie : Se former à l'éthique de la recherche et l'intégrité scientifique

Suivi du MOOC Ethique de la recherche et intégrité scientifique

Catégorie : Conforter la culture scientifique

Journées des Doctorants ABIES 2024, AgroParisTech, Palaiseau

Catégorie : Rédaction de la thèse ou exposition écrite ou orale des travaux de recherche

12th International RSV Symposium, ICC Belfast, Northern Ireland, UK

Catégorie : Se former à la science ouverte et aux données de la recherche

Organoïdes et recherche agronomique, INRAE Maisons-Alfort

La muqueuse pulmonaire en période périnatale : un monde à comprendre pour lutter contre la sensibilité du jeune à la bronchiolite

Claire Chottin¹, Quentin Marquant^{1,2}, Vinciane Saint-Criq³, Muriel Thomas³, Sabine Riffault¹& Delphyne Descamps^{1,@}

¹Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, Jouy-en-Josas, France

²Hôpital Foch, Suresnes, France

³Université Paris-Saclay, INRAE, Micalis, Jouy-en-Josas, France

@Correspondance : delphyne.descamps@inrae.fr

Mots clés : période périnatale, virus respiratoire syncytial, poumons, microbiote

Résumé français (100 mots)

La bronchiolite est la principale maladie respiratoire du nourrisson contre laquelle il n'existe pas de traitements efficaces. C'est une infection due au virus respiratoire syncytial (VRS). La période périnatale est une phase importante dans la maturation de la muqueuse pulmonaire exerçant un déterminisme sur la réactivité des poumons de l'hôte exposés à des pathogènes. Comprendre les caractéristiques physiologiques, immunologiques et microbiologiques des poumons au début de la vie peut conduire à de nouvelles stratégies innovantes contre les agents infectieux. Nous faisons l'hypothèse que le microbiote pulmonaire est un acteur déterminant de la santé des jeunes.

Abstract

Bronchiolitis is the main respiratory disease in infants due to infection with the respiratory syncytial virus (RSV). The perinatal period is an important stage in the maturation of the lung mucosa, which influences the pulmonary reactivity of the host to pathogens. Understanding the physiological, immunological and microbiological characteristics of the lungs in early life may lead to new innovative strategies against infectious agents. We hypothesize that the lung microbiota is an important regulatory factor of the young people health.

Introduction

Les pathologies respiratoires des jeunes enfants sont un problème majeur de santé publique car elles constituent la première cause de mortalité dans le monde pour les enfants de moins de 5 ans. Chez le nourrisson, la principale pathologie respiratoire est la bronchiolite causée dans la grande majorité des cas par le virus respiratoire syncytial (VRS)¹. Une étude épidémiologique française à partir de données de réseaux hospitaliers d'Ile de France, conclut que le nombre d'enfants atteints de bronchiolite augmente régulièrement depuis 1992². De plus, les bronchiolites sévères du nourrisson sont également associées à un risque accru de développer de l'asthme en grandissant³. Actuellement, aucun vaccin contre le VRS n'est disponible. Obtenir un traitement efficace contre ces infections est une priorité de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'infection VRS a pour particularité de causer des atteintes sévères des voies respiratoires inférieures chez le nouveau-né. Cette infection affecte particulièrement les nourrissons car chez l'adulte elle est généralement asymptomatique et cantonnée aux voies respiratoires supérieures. Cette sensibilité du jeune à une infection VRS est intrinsèquement liée aux caractéristiques de la muqueuse pulmonaire en évolution pendant la période périnatale, caractéristiques qui dépendent de la maturation de l'épithélium, de l'établissement de l'immunité et de la colonisation des poumons par un microbiote respiratoire (Figure 1)^{4,5}. Malgré le développement d'un modèle murin pour étudier l'infection par le VRS, les éléments expliquant cette hypersensibilité du jeune enfant au virus sont encore mal connus. La période périnatale est caractérisée par une immaturité la réponse immune qui joue un rôle clé dans le développement des bronchiolites. En particulier la production d'IFN-gamma est diminuée avec un tropisme TH2. Les caractéristiques du microbiote joue un rôle déterminant dans la maturation du système immunitaire. Comprendre et améliorer les connaissances sur le tissu pulmonaire périnatal permettra de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Etat des connaissances

1- L'hyper-sensibilité du nouveau-né à l'infection pulmonaire par le VRS.

L'infection par le VRS en période périnatale tend à promouvoir une polarisation de type 2 de la réponse immunitaire avec une quantité prédominante d'IL-4, et d'IL-10 et moins d'IFN γ dans les sécrétions nasopharyngées des nourrissons infectés^{6,7}. A l'inverse chez l'adulte, l'infection virale provoque la sécrétion d'IFN γ , la production d'anticorps IgG2a et IgA ainsi que la présence de macrophages, de cellules Natural Killer (NK) et de lymphocytes T cytotoxiques, signatures immunologiques d'un profil de réponse de type 1⁸. Les études sur l'infection du souriceau par le VRS se sont d'abord focalisées sur l'immunité adaptative et ont démontré une prédisposition au développement d'une réponse de type 2 et un défaut d'activation des lymphocytes T CD8⁺ qui peut expliquer la déficience de production d'IFN γ ¹⁰. Il est bien établi que les souriceaux infectés par le VRS présentent des lacunes importantes dans la mobilisation pulmonaire des cellules dendritiques (DC), responsables de l'orientation de la réponse des lymphocytes T, ainsi que de la production des IFN de type I (IFN-I)¹¹⁻¹³. L'infection VRS en période périnatale provoque une libération d'IL-33 dans les poumons des souriceaux, ce qui n'est pas le cas chez les individus adultes. L'IL-33 exercerait une fonction majeure dans l'immuno-pathogénèse de l'infection au VRS chez les nouveau-nés en engendrant une plus grande présence dans les poumons de cellules lymphoïdes innées de type 2 (ou ILC2), cellules douées d'une capacité à orienter la réponse immunitaire vers une immunité de type 2¹⁴. Un modèle d'infection par le VRS développé chez le souriceau BALB/c a démontré

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, une réinfection à l'âge adulte entraîne une perte de poids plus sévère, un recrutement de cellules inflammatoires (éosinophiles et neutrophiles) et une production d'IL-4 augmentés⁹. Ces observations suggèrent que l'infection par le VRS pendant la période néonatale 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.

2- Le tissu pulmonaire en période périnatale : un environnement particulier en pleine évolution.

Le tissu pulmonaire périnatal est orienté vers une immunité de type 2. Rapidement après la naissance, pendant la phase d'alvéolarisation, des ILC2, des éosinophiles et des basophiles s'accumulent spontanément dans les poumons des souriceaux¹⁵. A l'homéostasie, le tissu pulmonaire de souriceaux BALB/c de 6 jours est pauvre en DC plasmacytoïdes et conventionnelles par rapport à un poumon adulte¹⁶. En revanche, le poumon du souriceau est riche en lymphocytes B régulateurs¹⁷ et en lymphocytes exprimant le facteur de transcription GATA3 qui pourraient contribuer à la prévalence des réponses de type 2 néonatales¹⁶. Il a très récemment 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 résidants dans les poumons, lesquels vont sécréter de l'IL-13 conduisant à la polarisation des macrophages alvéolaires (MA) nouvellement différenciés vers un phénotype M2 (plutôt pro réponses immune de type 2)^{15, 18}.

Parallèlement à cette maturation immunitaire post-natale, un microbiote se constitue et se diversifie progressivement en fonction de l'âge dans le tissu pulmonaire¹⁹⁻²¹. Récemment, les caractéristiques du microbiote pulmonaire sur sa composition, sa mise en place et ses fonctions ont été décrites dans la revue de Mathieu *et al.*⁵. Le processus de colonisation du poumon pose la question de son influence sur la maturation de la barrière épithéliale et sur le développement de l'immunité, ainsi que sa contribution à la sensibilité du nouveau-né à des pathologies respiratoires²². L'impact de la colonisation microbienne sur la maturation fonctionnelle de l'épithélium respiratoire n'a pas encore été décrit. Néanmoins, il a été rapporté que la présence d'une flore bactérienne pulmonaire chez les jeunes souris (21 jours) favorise une alvéolarisation plus riche qu'en absence de flore microbienne tandis que l'épaisseur de la muqueuse pulmonaire reste inchangée^{21, 23}. La présence du microbiote dans les poumons de souriceaux 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 DC¹⁹. Chez des souris adultes axéniques, élevées dans des conditions excluant toute colonisation de leurs organes par des microorganismes de l'environnement extérieur, le rôle du microbiote dans la modulation de la réponse immunitaire innée du poumon suite à une stimulation par le LPS et le VRS a été décrite²⁴. Beaucoup de travaux soulignent l'existence d'un lien étroit entre la survenue d'infections respiratoires et des dysbioses du microbiote²⁵. Toutefois, 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 VRS^{26, 27}. Ainsi, la

dominance de bactéries *Haemophilus* dans le microbiote nasopharyngé de jeunes enfants a été associée à un retard d'élimination du VRS²⁸.

Perspectives

De nombreuses données appuient le concept d'une « fenêtre de sensibilité » ou « fenêtre d'opportunité » néonatale²⁹. Le début de vie est une période cruciale dans le développement de l'immunité, et donc pour la sensibilité du nouveau-né à développer des pathologies pulmonaires. 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, de la sensibilité d'un individu à des pathogènes²⁹. Nous avons démontré qu'il est possible de moduler les défenses immunitaires pulmonaires pendant la période périnatale pour modifier la sensibilité au VRS. Le traitement des souriceaux avec le facteur de croissance des DC, le Flt3-ligand, restaure la sécrétion d'IFN-I *via* une augmentation de la présence des DC plasmacytoïdes dans les poumons et permet de réduire les conséquences pathologiques de l'infection par le VRS¹³. La colonisation bactérienne des poumons dès la naissance coïncide avec la « fenêtre d'opportunité » néonatale pendant laquelle les nourrissons sont particulièrement sensibles à l'infection par le VRS. Aussi, des modulations du microbiote pulmonaire dans cette période de la vie représenteraient une solution pour modifier les défenses immunitaires et par conséquent, la sensibilité d'un individu à l'infection par le VRS (Figure 2). Notre hypothèse est que les bactéries commensales primo-colonisatrices du poumon participent à la maturation de la réponse immunitaire pulmonaire. De ce fait, l'utilisation de ces souches en période périnatale permettrait d'orienter la réponse immunitaire vers une immunité protectrice contre l'infection VRS, et constituerait une nouvelle alternative prophylactique et thérapeutique contre la bronchiolite.

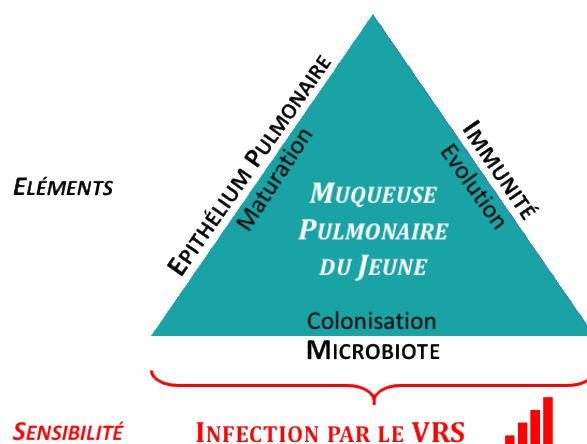


Figure 1 : Les éléments de la muqueuse pulmonaire associés dans la sensibilité du jeune à l'infection par le Virus Respiratoire Syncytial (VRS).

La sensibilité du jeune à l'infection par le VRS est multifactorielle. La maturation de l'épithélium pulmonaire, l'évolution des cellules immunitaires et la colonisation progressive par un microbiote sont les éléments majeurs composant la muqueuse pulmonaire. Leurs installations et leurs interactions sont des acteurs de prédisposition à une sensibilité accrue à l'infection pulmonaire par le Virus Respiratoire Syncytial chez le jeune.

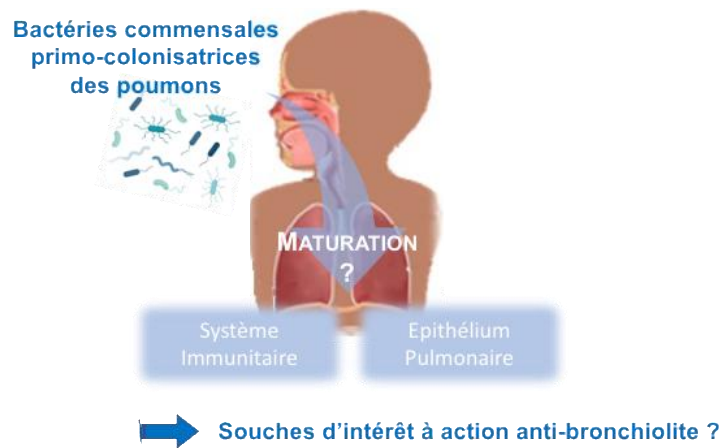


Figure 2 : Le microbiote pulmonaire : acteur déterminant dans la santé du jeune.

Le processus de colonisation du poumon pose la question de son influence sur la maturation de la barrière épithéliale et sur le développement de l'immunité, ainsi que sa contribution à la sensibilité du nouveau-né à des pathologies respiratoires. Aussi, l'identification de souches primocolonistriques des poumons à effet bénéfiques pour la santé respiratoire et leur utilisation préventive en période néonatale permettrait d'orienter la réponse immunitaire vers une immunité protectrice contre l'infection VRS, et constituerait une nouvelle alternative thérapeutique contre la bronchiolite.

Bibliographie

1. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA *et al.* The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 2009; **360**(6): 588-598.
2. Grimprel E. [Epidemiology of infant bronchiolitis in France]. *Arch Pediatr* 2001; **8 Suppl 1**: 83S-92S.
3. Esteban I, Stein RT, Polack FP. A Durable Relationship: Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis and Asthma past Their Golden Anniversary. *Vaccines (Basel)* 2020; **8**(2).
4. Drajac C, Laubretton D, Riffault S, Descamps D. Pulmonary Susceptibility of Neonates to Respiratory Syncytial Virus Infection: A Problem of Innate Immunity? *J Immunol Res* 2017; **2017**: 8734504.
5. Mathieu E, Marquant Q, Descamps D, Riffault S, Saint-Criq V, Thomas M. Le poumon est sensible aux effets locaux et à distance des microbiotes. *Nutrition clinique et métabolisme* 2021; **35**: 242-252.
6. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; **168**(6): 633-639.
7. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JM *et al.* Local interferon-gamma levels during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection are associated with disease severity. *J Infect Dis* 2001; **184**(3): 355-358.
8. Russell CD, Unger SA, Walton M, Schwarze J. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin Microbiol Rev* 2017; **30**(2): 481-502.
9. Culley FJ, Pollott J, Openshaw PJ. Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood. *J Exp Med* 2002; **196**(10): 1381-1386.
10. Tregoning JS, Yamaguchi Y, Harker J, Wang B, Openshaw PJ. The role of T cells in the enhancement of respiratory syncytial virus infection severity during adult reinfection of neonatally sensitized mice. *J Virol* 2008; **82**(8): 4115-4124.
11. Cormier SA, Shrestha B, Saravia J, Lee GI, Shen L, DeVincenzo JP *et al.* Limited type I interferons and plasmacytoid dendritic cells during neonatal respiratory syncytial virus infection permit immunopathogenesis upon reinfection. *J Virol* 2014; **88**(16): 9350-9360.
12. Drajac C, Laubretton D, Marquant Q, Chottin C, Ferret C, Bouguyon E *et al.* Control of IFN-I responses by the aminopeptidase IRAP in neonatal C57BL/6 alveolar macrophages during RSV infection. *Mucosal Immunol* 2021; **14**(4): 949-962.
13. Remot A, Descamps D, Jouneau L, Laubretton D, Dubuquoy C, Bouet S *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* 2016; **46**(4): 874-884.
14. Saravia J, You D, Shrestha B, Jaligama S, Siefker D, Lee GI *et al.* Respiratory Syncytial Virus Disease Is Mediated by Age-Variable IL-33. *PLoS Pathog* 2015; **11**(10): e1005217.
15. de Kleer IM, Kool M, de Bruijn MJ, Willart M, van Moorlegghem J, Schuijs MJ *et al.* Perinatal Activation of the Interleukin-33 Pathway Promotes Type 2 Immunity in the Developing Lung. *Immunity* 2016; **45**(6): 1285-1298.
16. Roux X, Remot A, Petit-Camurdan A, Nahori MA, Kiefer-Biasizzo H, Marchal G *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* 2011; **41**(10): 2852-2861.
17. Laubretton D, Drajac C, Eleouet JF, Rameix-Welti MA, Lo-Man R, Riffault S *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* 2020; **12**(822).
18. Saluzzo S, Gorki AD, Rana BM, Martins R, Scanlon S, Starkl P *et al.* First-Breath-Induced Type 2 Pathways Shape the Lung Immune Environment. *Cell Rep* 2017; **18**(8): 1893-1905.
19. Gollwitzer ES, Saglani S, Trompette A, Yadava K, Sherburn R, McCoy KD *et al.* Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med* 2014; **20**(6): 642-647.
20. Kostic M, Milger K, Krauss-Etschmann S, Engel M, Vestergaard G, Schloter M *et al.* Development of a Stable Lung Microbiome in Healthy Neonatal Mice. *Microb Ecol* 2018; **75**(2): 529-542.
21. Remot A, Descamps D, Noordine ML, Boukadiri A, Mathieu E, Robert V *et al.* Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *ISME J* 2017; **11**(5): 1061-1074.
22. Man WH, de Steenhuijsen Pijters WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* 2017; **15**(5): 259-270.
23. Yun Y, Srinivas G, Kuenzel S, Linnenbrink M, Alnahas S, Bruce KD *et al.* Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. *PLoS One* 2014; **9**(12): e113466.
24. Marquant Q, Laubretton D, Drajac C, Mathieu E, Bouguyon E, Noordine ML *et al.* The microbiota plays a critical role in the reactivity of lung immune components to innate ligands. *FASEB J* 2021; **35**(4): e21348.
25. de Steenhuijsen Pijters WAA, Binkowska J, Bogaert D. Early Life Microbiota and Respiratory Tract Infections. *Cell Host Microbe* 2020; **28**(2): 223-232.

26. de Steenhuijsen Piters WA, Heinonen S, Hasrat R, Bunsow E, Smith B, Suarez-Arrabal MC *et al.* Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; **194**(9): 1104-1115.
27. Teo SM, Mok D, Pham K, Kusel M, Serralha M, Troy N *et al.* The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe* 2015; **17**(5): 704-715.
28. Mansbach JM, Hasegawa K, Piedra PA, Avadhanula V, Petrosino JF, Sullivan AF *et al.* Haemophilus-Dominant Nasopharyngeal Microbiota Is Associated With Delayed Clearance of Respiratory Syncytial Virus in Infants Hospitalized for Bronchiolitis. *J Infect Dis* 2019; **219**(11): 1804-1808.
29. Gollwitzer ES, Marsland BJ. Impact of Early-Life Exposures on Immune Maturation and Susceptibility to Disease. *Trends Immunol* 2015; **36**(11): 684-696.

Titre : Microbiote pulmonaire et immunomodulation de la sensibilité néonatale au Virus Respiratoire Syncytial : vers le développement d'une approche thérapeutique basée sur des bactéries primo-colonisatrices du poumon.

Mots clés : Période néonatale, VRS, Immunomodulation, Microbiote, Immunité innée, Poumon

Résumé : La bronchiolite est la principale infection respiratoire chez le nourrisson causée par le virus respiratoire syncytial (VRS) et les formes sévères augmentent le risque de développer de l'asthme chez l'enfant. Cette sensibilité du nourrisson est intrinsèquement liée aux caractéristiques 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.

Notre hypothèse est que les bactéries commensales primo-colonisatrices, qui sont les premiers micro-organismes à « conquérir » le tractus respiratoire, participeraient à la maturation des défenses immunitaires de la muqueuse pulmonaire, et donc à la sensibilité du nouveau-né à des pathologies pulmonaires.

La manipulation de ces souches (isolées par notre partenaire à MICALIS) en période néonatale permettrait d'orienter la réponse immunitaire vers une immunité protectrice contre l'infection VRS.

Les résultats obtenus ont montré qu'il est possible de limiter l'invasion virale et de réduire la sévérité de la pathologie grâce à l'utilisation de bactéries primo-colonisatrices de la flore commensale pulmonaire, capables d'interférer avec les mécanismes d'infection du virus.

Ce projet apporte ainsi les premiers éléments de la preuve de concept vers une nouvelle alternative thérapeutique contre la bronchiolite par la modulation du microbiote pulmonaire.

Title : Pulmonary microbiota and immunomodulation of the neonatal susceptibility to Respiratory Syncytial Virus infection: towards the development of a therapeutic approach based on commensal lung bacteria.

Keywords : Neonate, RSV, Immunomodulation, Microbiota, Innate immunity, Lung

Abstract : Respiratory syncytial virus (RSV) is the commonest viral agent causing acute lower respiratory infection in infants, a disease usually named bronchiolitis. Severe forms of the disease increase the risk of developing asthma later in childhood. This susceptibility in infants is intrinsically linked to the characteristics of the pulmonary mucosa during the neonatal period, which depend on both the establishment of immunity and the colonization of the lungs by a bacterial microbiota.

Our hypothesis is that the primo-colonizing commensal lung bacteria, which are the first microorganisms to colonize the respiratory tract, contribute to the maturation of immune defenses in the pulmonary mucosa, and consequently, to individual's susceptibility to respiratory diseases.

Manipulating these bacterial strains (isolated by our partner of MICALIS Unit) during the neonatal period could help shape the immune responses toward protective immunity against RSV infection.

The results obtained showed that it is possible to limit viral invasion and reduce disease severity through the use of pioneer commensal bacteria of the pulmonary microbiota, capable of interfering with viral infection mechanisms.

This project ultimately provides the first evidence of concept for a new therapeutic alternative against bronchiolitis through modulation of the pulmonary microbiota.