

**INVESTIGATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES
NON-INVASIVES CHEZ LA SOURIS
LES INTÉRÊTS DE LA MÉTHODE ILLUSTRÉS PAR TROIS APPROCHES
DIFFÉRENTES**

**NON-INVASIVE FUNCTIONAL RESPIRATORY
INVESTIGATIONS IN THE MOUSE
THE INTERESTS OF THE METHOD ILLUSTRATED BY THREE DIFFERENT
APPROACHES**

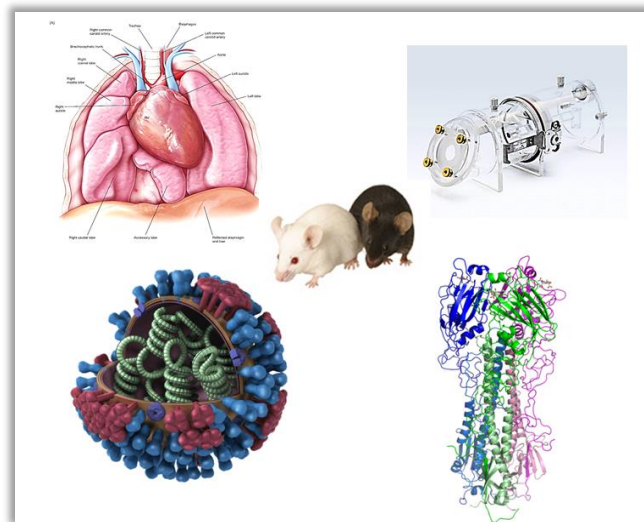
Jean Belt Adélite HABYARIMANA
THESE PRESENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

**INVESTIGATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES
NON-INVASIVES CHEZ LA SOURIS**

LES INTÉRÊTS DE LA MÉTHODE ILLUSTRÉS PAR TROIS APPROCHES DIFFÉRENTES

**NON-INVASIVE FUNCTIONAL RESPIRATORY
INVESTIGATIONS IN THE MOUSE**

THE INTERESTS OF THE METHOD ILLUSTRATED BY THREE DIFFERENT APPROACHES



Jean Belt Adélite HABYARIMANA

THESE PRESENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES
Année académique 2022-2023

William, umpora ku mutima.

*Every breath you take and every move you make...
...I'll be watching you
The Police, 1983.*

REMERCIEMENTS

Angoisses et sueurs froides, ce sont les seules choses qui me viennent à l'esprit, quand je vois arriver la page la plus difficile à écrire de ce manuscrit, j'ai nommé : la page des remerciements! En effet, comment peut-on prétendre à l'excellence, comment oser clamer à la face du monde toute l'étendue de son savoir, toute l'expertise longuement amassée, tout ce labeur accumulé au cours des années ? Comment risquer une telle imposture, quand on sait qu'on doit tout ou presque, à son entourage et à ses amis ?

En guise d'absolution peu avant le péché, permettez-moi d'alléger ici ma conscience et de remercier préalablement mes précieux contributeurs.

Par où commencer ?

Au commencement était le Professeur Albert DEWAELE, combien de générations auront été marquées par sa verve, son humour et son enthousiasme ? Quand même je ne serais qu'une victime de plus, consentante et reconnaissante touchée par son éclat, ma dévotion lui est toute acquise. Professeur DEWAELE, vous m'avez donné goût à la pathologie. Où que vous soyez, je vous en remercie.

Professeur Freddy COIGNOUL, pardonnez-moi de ne vous citer qu'en second, là où toutes les thèses débutent par votre nom. Au-delà de ce crime impardonnable, votre regard pédagogue saura ne voir en cela que mon hommage à cet illustre lignage si charismatique que j'ai longtemps connu à la tête de la pathologie. Vos paroles élégantes, riches de savoir et teintées d'humour, résonneront toujours en mon esprit. Merci.

Je remercie particulièrement les Professeurs Annick LINDEN et Daniel DESMECHT, mes promoteurs, pour m'avoir donné cette chance de prendre part à cette belle expérience, pour leurs conseils avisés, leurs encouragements, leur patience, autant de qualités qui leur ont permis de supporter mes errements et mes tâtonnements des premiers temps. Mais surtout, je les remercie d'avoir su garder espoir à des moments où moi-même je n'y croyais presque plus !

Je me dois de citer cette famille qui m'a adopté, assimilé voire façonné et fait de moi tout ce que je suis. La famille des « souris-men », Dao BUI TRAN ANH, qu'il faut prononcer avec le bon accent, à moins de risquer la méprise, Pedro BRAS MARTIN FAISCA, toi qui continues à croire qu'à chaque appel téléphonique « alowi » est une phrase rwandaise et n'a rien à avoir avec « Allô, oui ! » et Thierry FLANDRE, qui en a eu assez d'entendre parler des United colours of Benetton. Vous avez partagé avec moi cette denrée précieuse, un savant mélange de votre savoir, de votre savoir-faire et de votre expérience du monde des souris. Pour cela, je vous serai à jamais reconnaissant.

Génération spontanée, parthénogénèse, phéromones murines ? Tant d'hypothèses auront circulé mais je pense que ce sont tout simplement la convivialité et la soif du savoir qui pourront expliquer que cette famille des souris-men s'est rapidement accrue, enrôlant tour à tour, Nicolas ANTOINE-MOUSSIAUX alias Nam, dépositaire de l'expression « souris de fantaisie », Martin DERMINE, mon premier vétérinaire-apiculteur et Stéphanie GLINEUR, qui se révélera une souris-woman en définitive, tout comme Els VAN DE PAAR, quelques années plus tard. Echanger, partager avec vous restera pour moi une expérience enrichissante au plus haut point.

Dans ce même esprit, de fervents adeptes ont suivi le même sillage : Etienne LEVY, tes photos sont extraordinaires et tu mérites bien le titre d'assistant-multimédia, Gautier GILLIAUX, Tomás CASANOVA dit « l'autre Tomas sans h », Phai DAM VAN, et Hoang LE, Merci !

Une autre famille aura marqué mon parcours, celle des « Biocell ». Adopté malgré moi, leurs nombreuses tentatives visant à m'initier à leur art : biologie moléculaire, culture cellulaire et autres pratiques en «-aire» aussi mystérieuses les unes que les autres, n'auront pas été vaines. Gregory PIRE alias Greg, admettras-tu un jour que je n'ai rien à voir avec la contamination de tes étuves ? Thomas FETT, Mélanie PALM, Michaël LEROY ok « Mike », feu Etienne BAISE, ce 4X4 de la science, habile en toute discipline, Joël GERARDIN dit « Jojo », « casse-cou » dans le travail comme dans la vie, Philippe VANDEN BERGH, Mutien-Marie GARIGLIANY ok « Mumu », mais seulement quand il n'est pas là ! Anne THOMAS; François CORNET, habiles et discrets, tout mon contraire, Anne CORNET, Nidal ALZAMEL, Aurore BROERS, donnez-lui le "la" (ou toute autre note !), elle en fera une enzyme de restriction « tchak-tchak » ! Laurent ZECCHINON, mon maître à penser quand il s'agit de placer les mots les plus incongrus

dans une dissertation des plus sérieuses. Vous m'avez pris sous votre aile, au détriment de vos propres tâches, avec humour, avec bonne humeur, avec rigueur ou avec vigueur, vous avez usé de tous les stratagèmes pour m'instruire quelque peu. Tout ce que je sais de cet univers, c'est à vous que je le dois !

Je ne peux manquer de remercier d'autres personnes qui, elles aussi, ont jalonné ma longue marche vers la connaissance, du fait de leur savoir ô combien étendu ou de leurs compétences multiples, elles resteront pour moi des inclassables. Dominique CASSART alias « Mamy, no soucis » ou la voix de la sagesse incarnée, je commence à peine à saisir la teneur de tes sages conseils, Sandra JOLLY, Thierry JAUNIAUX, Cédric THOMAS alias « Ketchup », Calixte BAYROU, Michael SARLET encore un « Mike » sans doute pour le « Mike Gyver » des techniques histologiques en tous genres, Michel JANSEN dit « Miche » comme l'ont tant crié des générations entières de jeunes étudiantes, Carine GAROT et Sandy CLAUWAERT, vous m'avez donné de votre temps, sans compter, merci du fond du cœur.

Cette thèse, comme toutes les thèses, n'aura pas été un cheminement tranquille, elle aura eu son lot d'embûches, de déboires et de découragements. Elle aura aussi été un périple, un très long périple, peut-être le plus long qu'aura connu le département. Mais tout au long de cette croisade, j'aurais fait tant de rencontres, croisé tant d'âmes charitables, tant de mains secourables, chacune apportant sa pierre à l'œuvre que vous contemplez aujourd'hui. J'en apprécie chaque instant.

Pour toutes ces personnes qui n'ont reculé devant aucun effort pour m'aider à surmonter les obstacles, je fais l'exercice de les nommer ici, mais l'ultime crainte reste d'en omettre ! Les noms me viennent par bribes : Nathalie GUILLAUME mon ultime secours en toutes circonstances, Jessy MBOUMBA, Audrey TROMME, Anne WLASOWSKI, Camille CHAUFFRAY, Soumya PASTORET, Hussein ZEZAFOUN, Karine CLOQUETTE, Annabelle DECREUX, Amélie HALLEUX. Mais, tant d'années se sont écoulées, tant d'équipes se sont succédées. Des chercheurs sont arrivés et d'autres sont repartis. A toutes ces personnes et à celles englouties dans les abîmes de ma mémoire, je suis profondément reconnaissant et j'implore leur compréhension si elles ne figurent pas nommément ici.

Au-delà de cet aspect professionnel, nombre de ces personnes sont aujourd'hui des amis, autant de joyeux drilles avec lesquels j'ai mangé, j'ai bu, j'ai ri, parfois même pleuré et bien d'autres encore, me faisant me sentir apprécié et soutenu en toutes circonstances. Pour votre amitié, je vous remercie.

A tous ceux qui ont cru en moi, le meilleur hommage que je puisse vous rendre serait de poursuivre cette quête de connaissance que vous m'avez insufflée. Dans le secret espoir qu'un jour j'entraînerai par la main une autre âme errante, comme moi à mes débuts, vers des contrées où il fait... moins sombre. A ce moment-là seulement, j'aurai l'espoir de payer, dans une infime fraction, l'incommensurable dette de ce que vous tous m'avez donné !

Je remercie enfin, ma famille, Père et Mère qui m'observent de là-haut, frère et sœurs au soutien indéfectible, compagne et enfant au cœur débordant de compréhension, sans vous, tout ceci n'aurait pas eu de sens.

Quand ayant scruté les moindres recoins de ma mémoire, je pense avoir tous cités, il me reste encore un dernier mot à dire :

Merci aux souris qui jamais ne m'ont quitté tout au long de cette aventure.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	5
Table des matières	7
Résumé	11
Summary	13
Partie I Données de la littérature	16
I. Système respiratoire chez la souris	16
1.1. Notions anatomiques et physiologiques	16
1.2. Les cavités nasales	16
1.3. Le pharynx et le larynx	18
1.4. La trachée	18
1.5. La cavité thoracique	18
II. Le tractus respiratoire de la souris en tant que modèle expérimental	22
2.1. Quelques avantages de la souris de laboratoire	22
2.2. Quelques différences avec le tractus respiratoire humain	23
III. Evaluations fonctionnelles respiratoires chez la souris	28
3.1. Mesure du volume pulmonaire	30
3.2. Tests de mécanique respiratoire	33
3.3. Tests de distribution de la ventilation	34
3.4. Echanges gazeux pulmonaires	37
3.5. Tests du contrôle ventilatoire	39
IV. Techniques invasives d'évaluations fonctionnelles pulmonaires applicables chez la souris	42
4.1. Exemple de mesures <i>In vitro</i> de la fonction respiratoire	42
4.2. Exemple de mesure <i>Ex-vivo</i> de la fonction pulmonaire sur organes isolés et perfusés	43
4.3. Exploration <i>In vivo et invasive</i> de la fonction pulmonaire	43
V. Techniques non-invasives d'évaluations fonctionnelles pulmonaires et équipements utilisables chez la souris	48
5.1. Le spiromètre	48
5.2. Le pléthysmographe	50
5.3. La mesure de la capacité d'extraction du monoxyde de carbone	58
VI. Conclusions sur les approches invasives et non-invasives des explorations respiratoires fonctionnelles chez la souris	62
VII. Modèles infectieux à virus respiratoires	64
7.1. Modèle à Respirovirus murin (RM)	65
7.2. Modèle à virus influenza A	75
7.3. Modèle utilisant un virus Influenza murinisé	90
7.4. Sensibilité variable aux pathologies virales des souches de souris	91
VIII. Généralités sur les Strategies anti virus Influenza	95
8.1. La chimioprophylaxie et les traitements anti-influenza	95
8.2. Les stratégies ayant recours à l'immunité	108
8.3. Anticorps adaptés au traitement anti-influenza et leur cibles antigéniques	114
8.4. Les stratégies ayant recours aux cytokines et leur effet anti-influenza	117
8.5. Stratégie antivirale : La réponse immunitaire	122
Partie II Données expérimentales	125
Objectifs généraux de ce travail	125
Evaluations fonctionnelles respiratoires non-invasives :	128

<i>Etude en conditions physiologiques</i>	128
I. Objectifs de l'étude 1	128
II. Matériel et méthode	128
2.1. Hébergement des souris	131
2.2. Identification des souris	131
2.3. Structuration de l'expérience	131
2.4. Evaluations fonctionnelles respiratoires	132
III. Traitement statistique et analyse des données expérimentales	133
IV. Résultats	135
4.1. Expériences d'orientation	135
4.2. Expérience principale	139
V. Etude 1 : Discussion	144
5.1. Effet de la souche	144
5.2. Effet de la croissance somatique	144
5.3. Effet du genre	146
5.4. Expérience de confirmation	147
<i>Evaluations fonctionnelles respiratoires non-invasives :</i>	150
<i>Etude en conditions pathologiques</i>	150
I. Modèle à Respirovirus Murin	150
1.1. Objectifs de l'étude 2 (partie 1)	150
1.2. Matériel et méthode	150
1.3. Evaluations fonctionnelles respiratoires	154
1.4. Evaluation morphologique	155
1.5. Résultats	157
1.6. Etude 2 (partie 1) : Discussion	159
II. Modèle à virus Influenza A H5N2 en cours de murinisation	162
2.1. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 2 (PARTIE 2)	162
2.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE	163
2.3. Statistiques	166
2.4. Résultats	166
2.5. Etude 2 (partie 2) : Discussion	169
<i>Evaluations fonctionnelles respiratoires non-invasives :</i>	172
<i>Comparaison de l'efficacité de deux traitements</i>	172
I. Objectifs de l'étude 3	172
II. Matériel et méthodes	173
2.1. Hébergement des souris	173
2.2. Identification des souris	176
2.3. Genèse de 3 Immunoglobulines (IgG) anti-Hémagglutinine (H5)	176
2.4. Immunisation passive des souris	177
2.5. Virus Influenza A	180
2.6. Procédure d'inoculation	181
2.7. Calcul de la DL ₅₀	181
2.8. Evaluations des paramètres fonctionnels	182
2.9. Suivi du comportement exploratoire	184
2.10. Evaluation morphologique	184
2.11. Techniques virologiques	185
2.12. Quantification des cytokines pulmonaires	186
III. Statistiques	188

IV. Résultats	188
4.1. Calcul de la DL ₅₀	188
4.2. Expériences d'orientation	189
4.3. Expérience principale	200
V. Etude 3 : Discussion	216
Partie III Discussion générale	222
I. Etude 1 EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES non-invasives : ETUDE EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES	222
1.1 Expériences d'orientation	222
1.2 Effet de la souche	223
1.3 Effet de la croissance somatique	223
1.4 Effet du genre	223
1.5 Reproductibilité	224
1.6 Comparaison avec d'autres résultats de la littérature	224
II. Etude 2 : EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES non-invasives : ETUDE EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES	226
2.1. CHOIX DE LA MESURE DU CO-UPTAKE	226
2.2. CHOIX DES FACTEURS D'INFLUENCE	226
2.3. CHOIX DU MODÈLE MURIN	227
2.4. CHOIX DU RESPIROVIRUS MURIN (RM)	227
2.5. CHOIX DU VIRUS INFLUENZA A (H5N2)	227
2.6. Résultats de pléthysmographie et du CO-uptake	228
III. Etude 3 : EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES non-invasives : COMPARAISON DE L'EFFICACITE DE DEUX TRAITEMENTS	229
3.1. Choix de la souche de souris CD-1	229
3.2. Choix des anticorps	229
3.3. Paramètres évalués	231
3.4. Mesure CO-uptake et pléthysmographie dans l'étude 3	232
3.5. Anticorps et immunothérapie	233
Considérations importantes	236
Partie IV Conclusions et perspectives	239
Etude 1:	239
Etude 2:	240
Etude 3:	241
Perspectives	244
Partie V Références bibliographiques	260

Résumé - Summary

RÉSUMÉ

Plusieurs technologies d'investigations respiratoires non-invasives pour l'animal avaient été validées précédemment. Ici, nous avons établi les conditions d'utilisation et l'intérêt d'un instrument capable de mesurer la diffusion des gaz entre air inspiré et sang circulant ainsi que la capacité d'extraction du monoxyde de carbone (ou CO-uptake). Cette fonction, conservée lors de maladies des voies respiratoires, est altérée lors de pathologies pulmonaires (œdème alvéolaire, œdème interstitiel, pneumonie et fibrose interstitielles).

Premièrement, nous avons établi les conditions dans lesquelles la mesure du CO-uptake sur la souris éveillée et non instrumentée est reproductible, puis nous avons examiné l'effet de la croissance somatique, l'effet du genre des animaux et du fond génétique, lesquels se sont tous trois avérés significatifs. Un travail similaire avait été déjà mené sur la pléthysmographie barométrique en chambre double. Nous avons démontré que nos mesures réalisées dans les conditions établies, étaient fiables, répétables et suffisamment sensibles pour l'application souhaitée.

Deuxièmement, nous avons testé l'hypothèse stipulant que la mesure du CO-uptake complèterait idéalement la pléthysmographie. En effet, en utilisant des virus très différents par leur tropisme cellulaire - un virus à tropisme respiratoire antérieur strict (Respirovirus Murin), ce dernier a causé une augmentation de résistance (sRaw) associée à une modification modérée du CO-uptake ainsi que plusieurs virus Influenza A H5N2 présentant différentes étapes dans leur processus de murinisation (après 7 et 11 passages) et donc au tropisme différent - on note une augmentation de sRaw et une décre du CO-uptake ; un virus influenza A ultra-murinisé (après 14 passages), exclusivement pneumotrope a quant à lui causé un effondrement du CO-uptake sans modification de sRaw. Enfin, un virus influenza A peu murinisé (après 2 passages), avec un tropisme des voies respiratoires, n'a modifié aucun de ces deux paramètres.

Troisièmement, nous avons examiné le patron dysfonctionnel de la respiration dans le cadre d'une comparaison d'efficacité de deux traitements établie entre deux groupes de souris infectées par une dose létale d'un virus influenza A H5N2 murinisé selon qu'elles avaient reçu ou non une immunothérapie passive préalable.

Nous avons établi avec succès les conditions de notre challenge viral, en administrant un mélange d'anticorps mAb MD1 et mAb BF7 (Dose unique, IP), vingt-quatre heures avant une infection létale du virus Influenza (2xDL₅₀, Intranasale) à des souris CD-1. Nous avons observé une réduction de la mortalité, une réduction de la perte de poids, une réduction des lésions pulmonaires (histopathologie), une diminution de la charge virale (titre viral et immunohistochimie) et une diminution dans la production des cytokines inflammatoires chez les souris traitées. Nous avons identifié une association d'anticorps capable de protéger les souris.

Un événement relatif à notre instrumentation (explicité dans le manuscrit) est survenu inopinément et nous a privé des mesures de CO-uptake et de pléthysmographie. Bien que n'ayant pu être formellement testée et démontrée, nos études ont fourni un faisceau de preuves suffisantes permettant de formuler l'hypothèse que l'apport que constituerait la combinaison des techniques de CO-uptake et de pléthysmographie, aurait permis une discrimination entre un groupe d'animaux traités (immunisation passive) et un groupe témoin, soumis tous deux à un challenge viral létal.

En conclusion, des ajustements et des expériences complémentaires sont encore nécessaires, mais nous estimons, sur base de nos résultats que nos découvertes permettent de réels progrès en associant les techniques de pléthysmographie et de CO-uptake dans notre analyse. Cette association de techniques non-invasives apporte plus de raffinement à nos mesures, permet d'évaluer rapidement l'état des souris et un diagnostic tenant compte de points limites plus acceptables. Enfin, cette association permettrait de comparer rapidement et de manière non-invasive l'efficacité de deux traitements lors d'un challenge viral à manifestation respiratoire chez la souris.

SUMMARY

Several non-invasive respiratory investigation technologies for animals had been previously validated. Here, we have established the conditions of use and the interest of an instrument capable of measuring the diffusion of gases between inspired air and circulating blood, the carbon monoxide uptake capacity (or CO-uptake). This function, which is preserved during diseases of the respiratory tract, is altered during pulmonary pathologies (alveolar oedema, interstitial oedema, pneumonia and interstitial fibrosis).

First, we established the conditions under which the measurement of CO-uptake on awake and uninstrumented mice is reproducible, and then we examined the effect of somatic growth, gender and genetic background, all were found to be significant. Similar work had already been carried out on barometric plethysmography in a double chamber. We have demonstrated that our measurements, carried out under the established conditions, were reliable, repeatable and sensitive enough for the desired application.

Second, we tested the hypothesis that CO-uptake measurement would ideally complement plethysmography. Indeed, by using viruses different by their cellular tropism, a virus with strict anterior respiratory tropism (Murine Respirivirus), the latter caused an increase in resistance (sRaw) associated with a moderate modification of the CO-uptake; several Influenza A H5N2 viruses presenting different stages in their murinization process (after 7 and 11 passages) and therefore with different tropism, caused an increase in sRaw and a decrease in CO-uptake; an ultra-murinized (after 14 passages), exclusively pneumotropic influenza A virus caused a collapse of CO-uptake without modifying sRaw. Finally, a slightly murinized influenza A virus (after 2 passages), with a tropism of the respiratory tract, did not modify any of these two parameters.

Third, we examined the dysfunctional pattern of respiration in the context of a therapeutic comparison established between two groups of mice infected with a lethal dose of a murinized influenza A H5N2 virus according to whether or not they had received prior a passive immunotherapy.

We have successfully established the conditions of our viral challenge, by administering a mixture of mAb MD1 and mAb BF7 antibodies (Single dose, IP), twenty-four hours before a lethal Influenza virus infection (2xDL50, Intranasal) to CD-1 mice. We observed a reduction in mortality, a reduction in weight loss, a reduction in lung lesions (histopathology), a reduction in viral load (viral titer and immunohistochemistry) and a reduction in the production of inflammatory cytokines in treated mice. We have identified an association of antibodies able to protect the mice.

An event relating to our instrumentation (explained in the manuscript) occurred unexpectedly and deprived us of CO-uptake and plethysmography measurements. Although it could not be formally tested and demonstrated, our studies provided sufficient evidence to formulate the hypothesis that the combination of

CO-uptake and plethysmography techniques would have allowed discrimination between a group of treated animals (passive immunization) and a control group, both subjected to a lethal viral challenge.

In conclusion, adjustments and additional experiments are still necessary, but we believe, based on our results, that our results allow real progress by combining plethysmography and CO-uptake techniques in our analysis. This combination of non-invasive techniques brings more refinement to our measurements, allows rapid assessment of mice's health and a diagnosis with the consideration of more acceptable endpoints. Finally, this combination would make possible to quickly and non-invasively compare the efficacy of two treatments during a viral challenge with respiratory manifestation in mice.

Données de la littérature

PARTIE I DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

I. SYSTÈME RESPIRATOIRE CHEZ LA SOURIS

1.1. NOTIONS ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES

Chez les animaux, la respiration désigne à la fois les mécanismes qui permettent les transferts de gaz entre l'organisme et l'environnement (absorption d'oxygène O₂ et rejet de dioxyde de carbone CO₂) et la respiration cellulaire. Au sens strict, l'appareil respiratoire est l'ensemble des organes qui permettent la respiration, c'est-à-dire les échanges gazeux entre l'organisme et l'environnement (138).

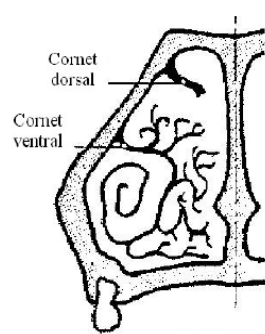
L'appareil respiratoire est composé d'une série de structures anatomiques connectées et complémentaires. L'appareil respiratoire comprend, d'une part, les voies aërières (cavités nasales, larynx, trachée, bronches) et d'autre part, les poumons dont les alvéoles constituent le siège principal des échanges.

1.2. LES CAVITÉS NASALES

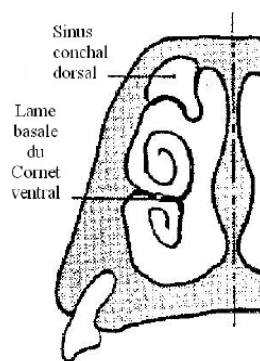
Les voies respiratoires chez la souris sont étroites. Comme dans les cavités nasales des autres mammifères, de minces lames osseuses, fixées latéralement à la paroi, s'enroulent sur elles-mêmes et forment les cornets nasaux. Ces formations sont richement vascularisées et ont un aspect dichotomique à la manière des branches d'un arbre, chez les rongeurs. Cette ramification importante des cornets nasaux augmente considérablement la surface de contact entre la muqueuse nasale et l'air ambiant. Ce phénomène a un impact notamment au niveau de la muqueuse olfactive où cet accroissement de la surface de contact (comparée à l'homme) et le grand nombre de récepteurs olfactifs (près de 1300 pour l'ensemble de la zone olfactive de la muqueuse nasale chez la souris) sont susceptibles d'expliquer l'odorat développé au sein de cette espèce (236).

Le cloisonnement observé est différent d'une espèce à l'autre. A titre d'exemple (Fig. 1), on observe un enroulement simple chez les primates et le cheval, un cornet à double enroulement chez la chèvre et le porc, des cornets rameux chez les carnivores et les lagomorphes.

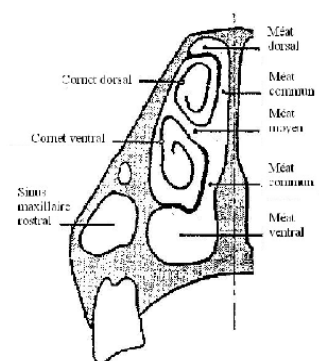
Les cornets nasaux renferment l'appareil voméronasal qui est un organe chémorécepteur responsable de la détection des phéromones et des odeurs (138).



A. Enroulement rameux: souris



B. Enroulement double: Porc et Lapin



C. Enroulement simple: Cheval

Figure 1 : Structure anatomique des cornets nasaux chez la souris en comparaison avec le lapin, le porc et le cheval. Source : The Anatomy of the Laboratory Mouse (404)

1.3. LE PHARYNX ET LE LARYNX

Le pharynx est le carrefour entre les voies aériennes et digestives. Le larynx se situe dans le prolongement de la cavité buccale, entre le pharynx et la trachée. Dans sa partie dorsale, il reçoit les ouvertures des trompes d'Eustache (290, 306).

1.4. LA TRACHÉE

La trachée connecte le larynx aux bronches principales gauche et droite. Elle est localisée ventralement à l'œsophage dans la région cervicale. Elle est formée de 15 à 18 anneaux cartilagineux en forme de « C ». Les extrémités des cartilages sont reliées par de fins muscles lisses. La muqueuse se présente sous la forme d'un épithélium pseudostratifié composé de cellules de Clara, de cellules ciliées, de cellules à mucus et de cellules de la lame basale. Cette composition varie tout au long de la trachée en direction des poumons.

1.5. LA CAVITÉ THORACIQUE

Si l'on compare à d'autres mammifères, la cavité thoracique chez la souris est proportionnellement très petite en comparaison à la cavité abdominale (138).

LE THORAX

Les poumons sont localisés dans la cavité thoracique (Fig. 2), ils sont entièrement recouverts par la plèvre. Chaque poumon constitue une masse présentant deux faces : la face latérale (ou costale) et la face médiale (ou médiastinale) ; deux bords : dorsal et ventral et enfin deux extrémités : l'extrémité crâniale (ou apex) et l'extrémité caudale (ou basse).

Le poumon est découpé en lobes par des scissures interlobaires. Chaque lobe est organisé autour d'une bronche lobaire propre. Les scissures interlobaires sont extrêmement profondes chez les rongeurs et chez la souris en particulier (Fig. 3).

Le poumon droit, le plus volumineux, est typiquement divisé en quatre lobes (un lobe crânial, un lobe moyen, un lobe caudal et un lobe accessoire ou azygos). Pour le poumon gauche, les lobes diffèrent selon les espèces étudiées. Chez la souris, le rat et le hamster, celui-ci n'est constitué que d'un seul lobe. Dans d'autres espèces (Fig. 3) les lobes sont plus nombreux tels que le lapin (2 lobes) et le cobaye (3 lobes) (138).

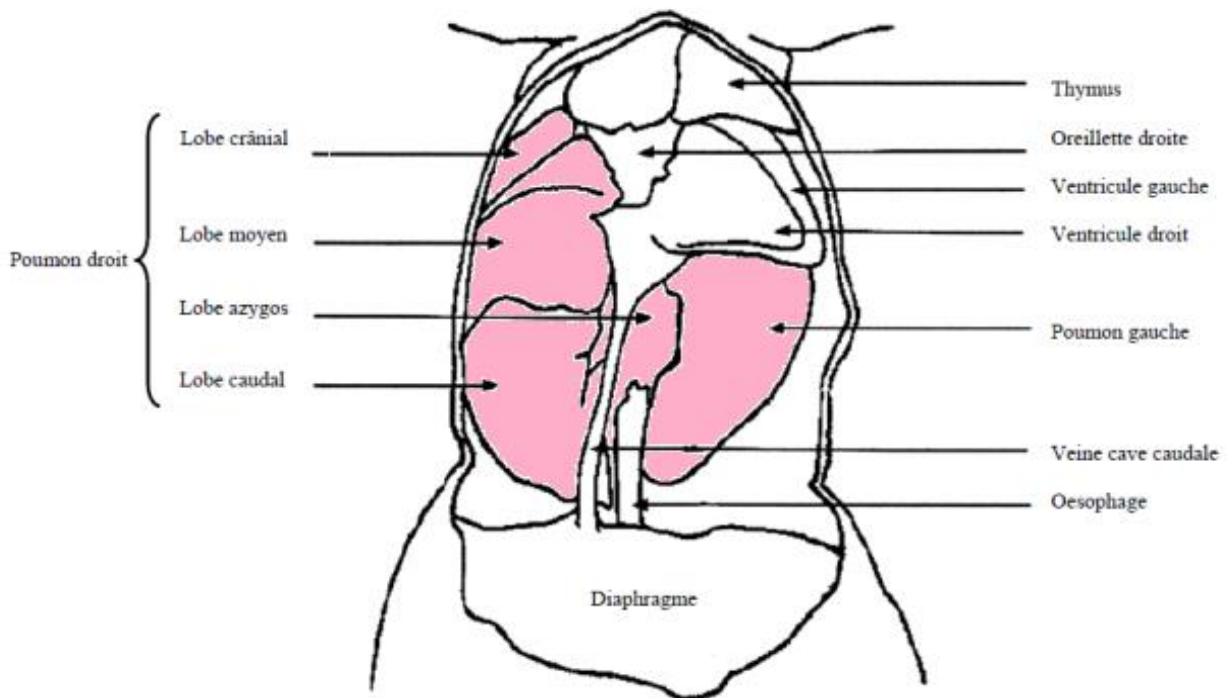


Figure 2: Disposition de l'appareil respiratoire et relations anatomiques au sein de la cavité thoracique chez la souris. Vue ventrale et dissection partielle. Source : Anatomie comparée des mammifères domestiques (19).

LES POUMONS

On distingue un poumon gauche et un poumon droit. Chaque poumon est connecté à une bronche majeure issue de la bifurcation de la trachée. Dans le tissu pulmonaire, la bronche forme des bronches mineures de diamètres de plus en plus petits, jusqu'à se terminer en bronchioles. Les voies respiratoires les plus larges sont recouvertes par des cellules épithéliales, des cellules de Clara non ciliées, des cellules ciliées, quelques cellules neuroendocrines, des cellules à mucus et des cellules en brosse (brush cells ou Pneumocytes III).

Les cellules à mucus décrites chez la souris sont des cellules de petite taille présentant un aspect granuleux. Ces cellules dites caliciformes, présentant généralement un cytoplasme proéminent dans l'espace alvéolaire que l'on rencontre dans les autres espèces, sont absentes chez la souris. Les voies respiratoires les plus étroites, les bronchioles terminales, aboutissent dans les conduits alvéolaires et ces derniers conduisent aux sacs alvéolaires. L'épithélium des alvéoles consiste en une fine paroi composée de cellules pulmonaires de type I et de cellules cuboïdes de type II. Le tissu lymphoïde (BALT : Bronchus-Associated Lymphoid Tissue) n'est que rarement observé dans les poumons de la souris saine (138).

Concernant les formations lymphoïdes associées aux muqueuses (MALT : Mucosal Associated Lymphoid Tissue) chez l'homme, ces dernières sont d'autant plus abondantes dans les muqueuses des organes où le contact avec le milieu extérieur est facile. Il se fait au travers de l'épithélium favorisant dès lors une exposition aux antigènes.

Ainsi, le BALT chez l'homme sera observé de manière plus fréquente dans la muqueuse des voies aériennes de gros diamètre, mais absent dans les bronches de petit diamètre, comme dans les bronchioles (19).

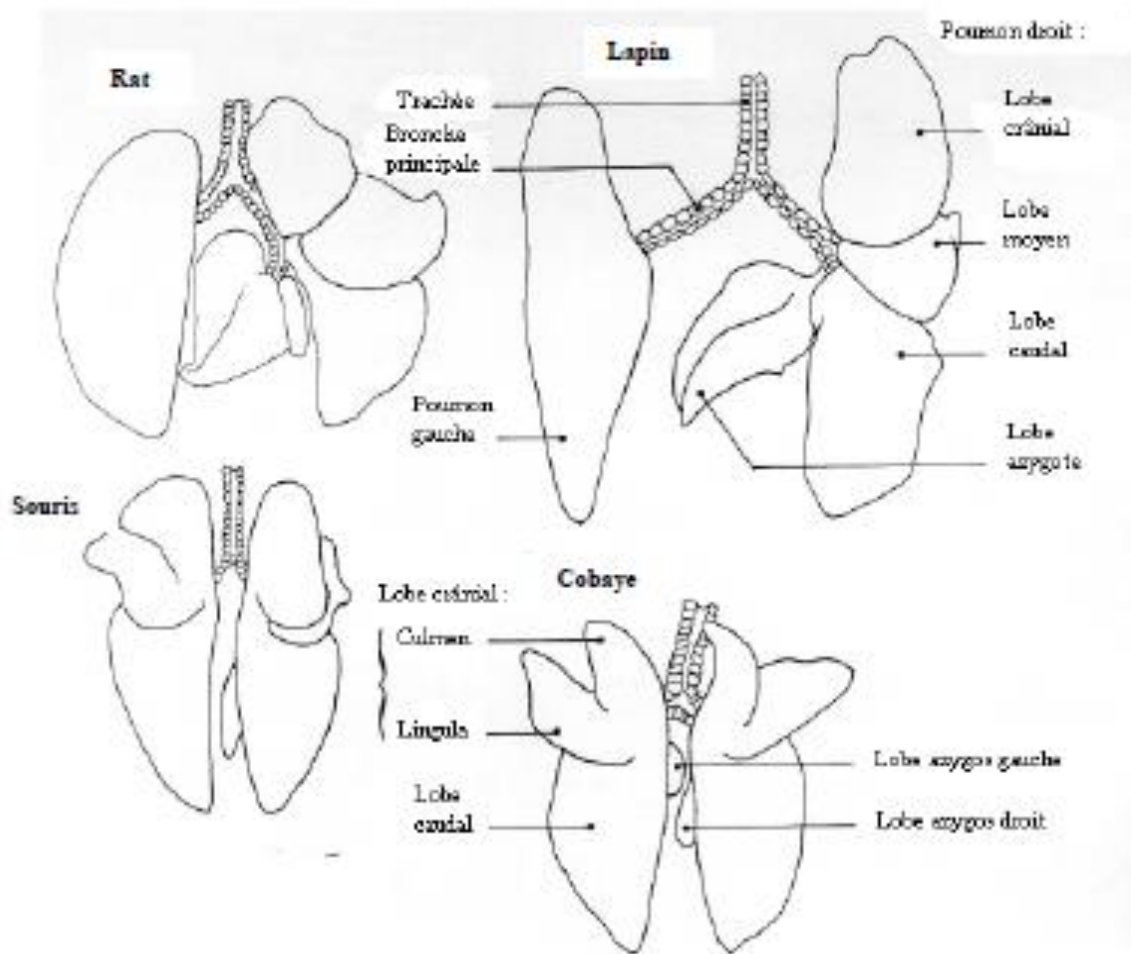


Figure 3 : Anatomie comparée des poumons et structure lobaire chez la souris en comparaison avec le rat, le lapin et le cobaye. Une vue dorsale des organes isolés. Source : The Anatomy of the Laboratory Mouse (404).

II. LE TRACTUS RESPIRATOIRE DE LA SOURIS EN TANT QUE MODÈLE EXPÉRIMENTAL

2.1. QUELQUES AVANTAGES DE LA SOURIS DE LABORATOIRE

La souris en tant que modèle respiratoire dans la recherche biomédicale est un modèle en développement. Une cartographie du génome de la souris est disponible dans le domaine public (405), ceci constitue un argument de poids pour les recherches visant une analyse ultérieure des gènes impliqués dans les processus découverts. On remarque que la présence de deux gènes sur le même chromosome chez la souris se retrouve dans des proportions similaires chez l'homme et chez la souris (notion de syntonie). Ainsi les découvertes réalisées chez la souris bénéficient dès lors d'une valeur prédictive pour les recherches en médecine humaine (138, 384).

Les connaissances acquises en immunologie chez la souris se sont largement accrues, de nombreuses situations impliquant une réaction inflammatoire pulmonaire ont été analysées en détails et de nombreuses données ont pu être collectées sur les gènes et leurs expressions. Ainsi, leurs surexpressions fonctionnelles telles que la synthèse de protéines (protéomique) ainsi que les techniques visant la suppression des protéines produites (Knock-out ou KO), sont des domaines mieux connus aujourd'hui car ils ont subi une évolution importante ces dernières années (84).

Enfin, les technologies visant la création de souris humanisées se sont affinées et ont permis elles aussi de nombreuses avancées. Pour toutes ces raisons, la fonction pulmonaire de la souris est devenue le centre de nombreuses recherches en physiologie, en toxicologie ou encore dans le cadre de développement de nouvelles substances médicamenteuses (292).

La souris de laboratoire présente de nombreux avantages: elle comporte une large gamme de souches différentes bien caractérisées, sa maintenance est aisée (besoins alimentaires faibles et un espace de vie réduit), son coût est faible, sa petite taille facilite les manipulations et sa proximité avec l'homme tant sur le plan génétique que physiologique est souvent mise en évidence (224). De nombreux gènes observés chez l'homme semblent disposer d'un pendant similaire chez la souris. De plus, les techniques de mutagenèse ont largement évolué au sein de cette espèce, ouvrant la possibilité de recourir à une large gamme de modèles de souris au patrimoine génétique modifié (AGM ou OGM).

La souris a servi entre autres de modèle dans l'étude de maladies à manifestations respiratoires, dans diverses tumeurs localisées dans le poumon et dans des affections d'origines infectieuses telles que le Virus Syncytial Respiratoire humain ou RSVh (26). Il en est de même dans certaines formes de maladies pulmonaires chroniques et obstructives, soit COPD (111) ainsi que dans les essais sur la tuberculose

pulmonaire. Certaines souches de souris ont été développées dans le cadre de la génomique fonctionnelle, ciblant des processus biologiques intervenant dans la physiologie respiratoire. Enfin, la souris a servi de modèle dans de nombreux tests d'hypersensibilité et dans des pathologies respiratoires d'origine allergique comme l'asthme.

2.2. QUELQUES DIFFÉRENCES AVEC LE TRACTUS RESPIRATOIRE HUMAIN

Même si le modèle murin peut être considéré comme un bon modèle en ce qui concerne le tractus respiratoire, on ne peut pas strictement dire qu'il y a équivalence entre le modèle murin et le tractus respiratoire humain.

Observons la cavité nasale : proportionnellement, les souris disposent d'une surface totale de contact au sein de la cavité nasale supérieure à celle de l'homme. Au niveau du voile du palais, ce dernier étant particulièrement long et l'épiglotte anatomiquement proche chez la souris, il en résulte que chez celle-ci, la respiration est fonctionnellement obligée de se faire via le nez, contrairement à l'homme (292).

Comme décrit précédemment, les bronchioles chez la souris ont une section en « C » incomplet, cette structure cartilagineuse est différente de la forme complète observée chez l'homme. L'épithélium respiratoire chez la souris dans la zone de transition entre la trachée et les bronches, puis entre les bronches et les bronchioles comparativement à l'homme, comporte moins de cellules à mucus et ne comporte pas de glandes sous muco-sales (169).

Tableau 1 : Comparaison entre voies respiratoires de l'homme et de la souris

Critères	Souris	Homme
ANATOMIE DU POUMON	Droit : 4 lobes Gauche : 1 lobe	Droit : 3 lobes Gauche : 2 lobes
DIAMÈTRE BRONCHES PRINCIPALES	1 mm	10-15 mm
DIAMÈTRE BRONCHIOLES TERMINALES	0.01-0.05 mm 0.01 mm	< 1 mm 0.6 mm
DIAMÈTRE BRONCHIOLES RESPIRATOIRES	N'existent pas	0.5 mm
DIAMÈTRE ALVÉOLES	0.0039-0.0069 mm	0.2-0.4 mm

Source: The Anatomy of the laboratory mouse (404)

En ce qui concerne le poumon (Tab. 1), on remarque que le poumon chez la souris comporte approximativement 2 000 000 d'alvéoles avec un diamètre moyen de 50µm, tandis que chez l'homme on note environ 300 000 000 d'alvéoles d'un diamètre moyen de 300µm. L'innervation des voies respiratoires

aussi est différente et moins développée chez la souris, ceci semble être une des explications retenues au fait que la souris soit incapable de tousser en réponse à une stimulation mécanique des voies respiratoires les plus fines (268).

Le terme de « ventilation collatérale » fait référence à la ventilation d'une région pulmonaire par les voies respiratoires autres que les voies principales, désignées comme « collatérales ». Chez l'homme il existe trois voies possibles décrites pour une telle ventilation (239), ces voies constituent donc une communication entre les alvéoles, les acini, les lobules et même certains segments pulmonaires. On distingue trois structures (Fig. 4).

Les canaux de Martin

Les voies décrites par Martin sont de petites voies respiratoires qui prennent naissance au niveau de la bronchiole respiratoire mais qui peuvent se connecter à des conduits alvéolaires quelque peu éloignés de ceux normalement alimentés par ces voies respiratoires. Une voie typique reconstruite et tirée des données rapportées par Martin est illustrée à la figure susmentionnée (Fig.4). Ces voies peuvent relier les régions du parenchyme de lobules adjacents ou faire communiquer deux bronchioles entre elles.

Dans une étude détaillée de la ventilation collatérale menée par Mitzner, il a été avancé que les canaux de Martin constituaient les canaux de premiers rangs (canaux primaires) (238). Cette démarche reposait essentiellement sur les observations collectées et un raisonnement par élimination.

Les canaux de Lambert

Les canaux de Lambert n'existent qu'au niveau des plus petits passages d'air et fournissent un raccourci potentiel vers une alvéole locale. Ce sont des connexions broncho-alvéolaires ayant un diamètre d'environ 30µm chez l'homme. Ils relient les voies aériennes terminales à d'autres alvéoles dans un même lobule. Les calculs basés sur la taille et le nombre estimé de canaux décrits par Martin indiquent une résistance suffisamment faible pour rendre compte quantitativement du degré de ventilation collatérale mesuré dans les poumons (238, 132).

Cependant, l'anatomie décrite de ces structures en limite le pouvoir à fournir une ventilation collatérale aux alvéoles adjacentes en cas d'obstruction au niveau de la bronchiole terminale, ce qui pourrait être déterminant dans certaines pathologies pulmonaires comme la pneumoconiose (85).

Les pores de Köhn

Situées entre les mailles du réseau capillaire, ces ouvertures alvéolaires sont circulaires ou ovales et sont bordées d'extensions de pneumocytes de type I. Les pneumocytes de type II sont souvent situés à proximité. La quantification des pores de Köhn chez différentes espèces montre de grandes variations selon la technique de fixation, l'âge des animaux et l'emplacement des alvéoles dans le tissu pulmonaire. La taille de ces ouvertures dépend également des espèces, variant de 0,8 à 15 micromètres. Chez l'homme, les pores

alvéolaires de Köhn sont remplis de liquide du revêtement alvéolaire, ce qui empêche la circulation de gaz entre les alvéoles (21, 270). Les calculs montrent qu'il faudrait plusieurs centaines de cmH₂O de pression alvéolaire afin d'ouvrir un pore de 5 µm (214). Ils constituent donc une communication virtuelle, inter-alvéolaire d'un diamètre plutôt proche de 3µm.

Le rôle des pores alvéolaires de Köhn dans la ventilation collatérale semble relativement faible à l'état physiologique, alors qu'il est certain qu'en cas de pathologie pulmonaire, ils contribuent à la propagation des infections bactériennes chez l'adulte et aux modifications des conditions ventilatoires locales dans l'atélectasie et la bronchoconstriction asthmatique (21). Ces ouvertures alvéolaires peuvent expliquer la propagation spécifique de certains cancers périphériques épithéliotropiques (carcinome bronchioloalvéolaire) (75).

Les pores de Köhn, à la différence des canaux de Martin et des canaux de Lambert, sont les seules structures supposées de ventilation collatérale décrites chez la souris ; ce sont des ouvertures dans le septum alvéolaire qui permettent la communication de deux alvéoles adjacentes. Leur existence a été longtemps contestée, mais a finalement été étayée chez le chien (238, 132) et chez d'autres mammifères dont le rat (21) et finalement confirmée chez la souris par des observations de microscopie électronique.

Plus particulièrement chez les rongeurs, les pores inter-alvéolaires de Köhn, sont de petites ouvertures doublées d'épithélium, de taille uniforme, présentes dans les parois alvéolaires du poumon normal. Ils sont invariablement remplis de matière, cette observation est faite lorsque l'eau et le surfactant sont conservés lors de l'examen par microscopie électronique à balayage à basse température. Chez la souris normale, 16 pores vides ouverts par alvéole ont été trouvés dans le poumon séché et fixé par instillation contre moins de 1 pore par alvéole dans le poumon hydraté et congelé ($P < 0,001$). Chez le rat normal, 13 pores ont été observés par alvéole dans les mêmes conditions ($P < 0,001$).

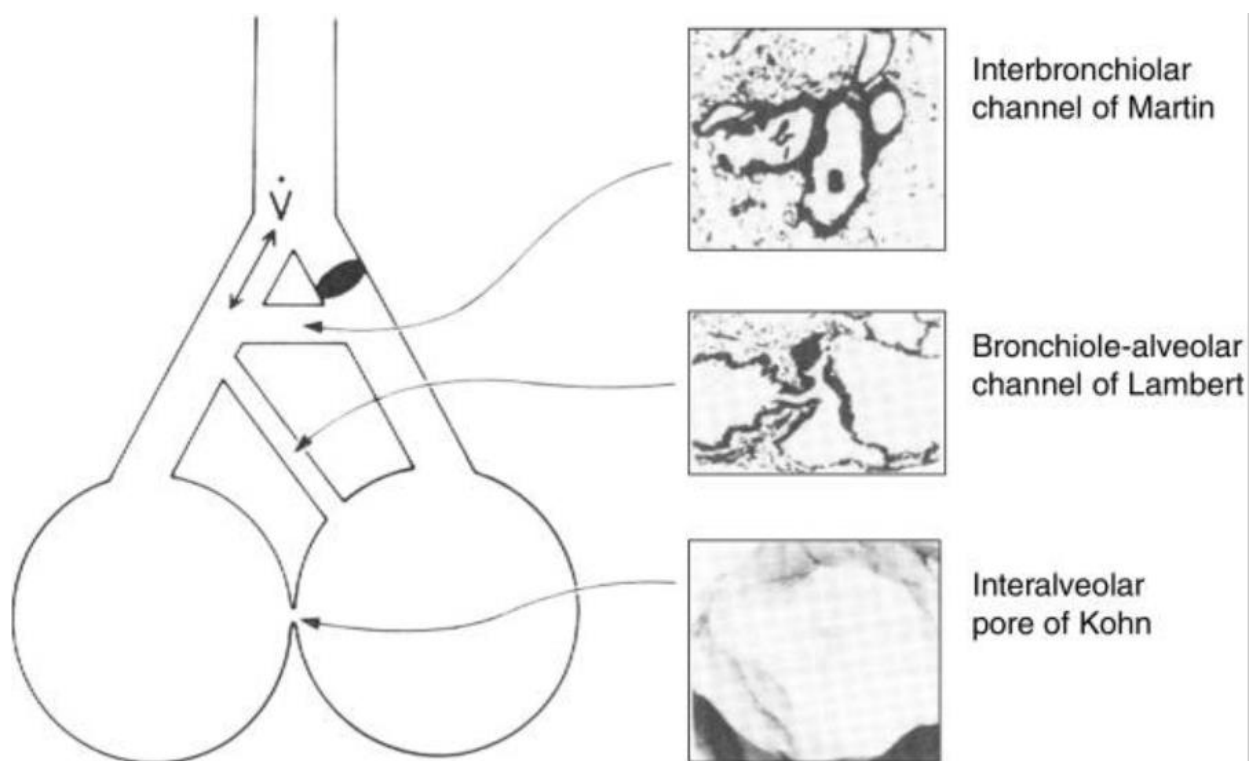


Figure 4 : Anatomie comparée : Illustration des structures de ventilation collatérales présentes chez l'homme. Source : The Clinical Significance of Collateral Ventilation (354).

Bastacky (21) suggère donc que les pores de Köhn :

- ✓ Fonctionnent principalement comme des conduits pour le mouvement inter-alvéolaire du liquide alvéolaire, des composants tensioactifs et des macrophages.
- ✓ Fournissent des sites pour le stockage tubulaire de la myéline sans perturber la diffusion des gaz dans l'espace alvéolaire.
- ✓ Ne fonctionnent pas comme des voies de ventilation collatérale pendant la respiration normale en l'absence d'atélectasie ou d'obstruction.

On peut donc conclure que les voies collatérales de ventilation n'interviennent pratiquement pas dans la ventilation pulmonaire chez la souris en dehors d'une situation pathologique.

Ces différences sont à considérer dans l'extrapolation des résultats qui serait faite entre l'homme et la souris. Au titre d'exemple, les différences observées dans la constitution des voies respiratoires dans les deux espèces expliquent les différences notées dans la distribution des particules dans les poumons dans les cas de diffusion de substances par inhalation ainsi que dans la clearance (temps d'élimination complète) de substances à activité pharmacologique (292).

A la lumière de ces informations, il apparaît évident que la souris en tant que modèle ne peut pas être considérée au même titre que le modèle humain et qu'une simple extrapolation des résultats ne peut être envisagée aussi facilement. Toutefois, il faut garder à l'esprit que les valeurs et les exemples repris ici (Tab. 2) constituent des moyennes, de nombreuses différences tant structurelles que fonctionnelles ont déjà été mises en évidence entre souches de souris (101). Aussi, le choix de la souche la plus adéquate, en rapport avec l'investigation envisagée au sein du modèle constitue un enjeu majeur (241).

Tableau 2 : Caractéristiques respiratoires fonctionnelles chez l'homme et chez la souris

ESPÈCE	Vol. pulmonaire (ml)	Vol. Courant (ml)	Fréquence (/min)	Consommation O ₂ (ml/g/h)
SOURIS	1,8 90*	0,15 7,5**	160	1,7
HOMME	4930 82,2*	344 5,7**	12	0,13

Volume pulmonaire spécifique (*) et volume courant spécifique (**) calculés en ml/kg chez la souris et chez l'homme (respectivement poids moyens de 20g et 60Kg). Source: The Anatomy of the laboratory mouse (404).

III. EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES CHEZ LA SOURIS

Une importante variation est observée dans les paramètres de la fonction respiratoire chez la souris de laboratoire. Une étude menée par Reinhard et collaborateurs (289) prouve les effets de plusieurs facteurs significatifs que sont le poids, la souche et le sexe.

La manière de récolter les données, le protocole expérimental ainsi que le matériel, ont donc leur importance (23). De ce fait, on constate que les données qui sont généralement relevées sur des sujets anesthésiés, que le type d'anesthésie utilisée, ainsi que leurs éventuels effets sur la fonction respiratoire ne peuvent être négligés. Il en est de même lorsqu'il est fait l'usage de substances curarisantes.

Dans l'expérience de Reinhard et collaborateurs, des conditions strictes destinées à assurer la répétabilité des manipulations ont dû être mises en place. Pour mesurer la capacité fonctionnelle résiduelle (FRC) et le volume du poumon (Total Lung Capacity, TLC), il a été nécessaire de déterminer une pression minimale et une pression maximale intrapulmonaires arbitrairement choisies et contrôlées à l'aide d'une sonde intratrachéale. Les valeurs imposées ont été déterminées entre 10 et 25 cm H₂O. Ces valeurs (Tab. 3), basées sur des observations, étaient choisies car on estimait que ces valeurs limites permettraient de protéger les structures anatomiques contre des lésions artificiellement induites (déchirures des tissus alvéolaires par exemple) et qu'elles mimaient l'activité physiologique.

La compliance en situation statique ou quasi-statique a été déterminée en établissant une courbe pression-volume (Fig. 5) lors du passage de TLC au volume résiduel (RV). Il a alors été possible d'exploiter la zone linéaire de cette courbe ainsi établie.

On peut classer les tests fonctionnels respiratoires disponibles en cinq groupes, i) les tests de volumétrie (spirométrie), ii) les tests de mécanique respiratoire, iii) les tests de distribution de la ventilation, iv) les tests d'échanges gazeux et v) les tests de contrôle de la ventilation. Ces tests ont été développés dans un cadre de diagnostic, pour le suivi d'un patient souffrant d'une maladie pulmonaire.

Ces tests en majorité issus de ceux développés en médecine humaine ont nécessité certaines adaptations. En effet, ces derniers exigent souvent la collaboration volontaire du patient, tandis que, pour les animaux de laboratoire, les tests fonctionnels sont généralement appliqués sur des sujets anesthésiés et éventuellement curarisés.

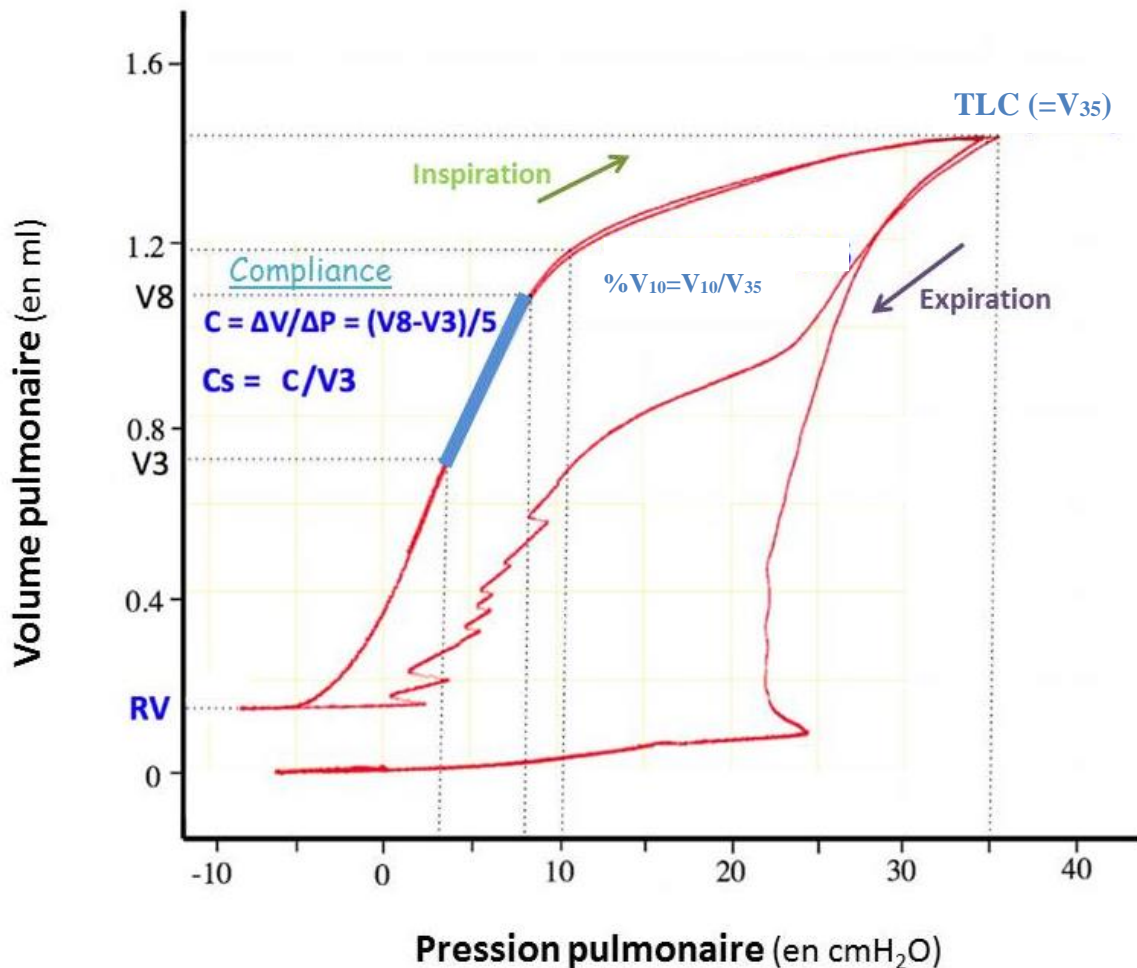


Figure 5: Représentation de la courbe de relation pression-volume pulmonaire sur toute la gamme d'amplitude respiratoire chez la souris. Les paramètres qui en dérivent sont ici notés: TLC, Total Lung Capacity ou capacité totale du poumon; RV, Residual Volume ou volume résiduel; C, la compliance pulmonaire. Des valeurs repères ont également été désignées: RV : le volume résiduel mesuré ; V3,... V8 les volumes pulmonaires mesurés dans les conditions de pression indiquées par la courbe. V₁₀, le volume pulmonaire total normalisé pour la valeur de pression intrapulmonaire de 10 cmH₂O (V₁₀). Idem pour V₃₅ le volume pulmonaire total normalisé pour la valeur de pression intrapulmonaire de 35 cmH₂O (V₃₅). Source: Automated full-range pressure-volume curves in mice and rats (294)

Tableau 3 : Poids et valeurs de la fonction respiratoire chez les souris femelles des souches C3H, BALB/c, C57B, A/j, FVB, et 129/Sv

Paramètres	C3H	BALB/c	C57B	A/J	FVB	129/Sv
POIDS CORPOREL P (g)	22,4	25,4	20,3	21,6	21,6	22,3
VOLUME PULMONAIRE						
TLC (µl)	1443	1457	1174	1232	1129	1289
TLC/P (µl/g)	64,9	58,0	58,0	57,2	52,9	58,5
FRC (µl)	404	410	341	317	322	309
FRC/TLC	0,28	0,28	0,29	0,26	0,29	0,24
VD (µl)	227	237	226	228	223	231
VD /TLC	0,16	0,16	0,19	0,19	0,20	0,18
COMPLIANCE						
CL (µl/cmH2O)	84,8	86,6	54,9	89,1	65,5	58,4
CL /TLC (l/cmH2O)	0,058	0,059	0,047	0,072	0,058	0,045
CDyn (µl/cmH2O)	40,9	41,3	33,1	39,1	33,7	34,7
CDyn/TLC (l/cm H2O)	0,028	0,028	0,028	0,032	0,030	0,027
RÉSISTANCE RESPIRATOIRE						
R (cm H2O/ml/s)	0,80	0,78	0,77	0,97	0,81	0,88
RxTLC (cm H2O s)	1,15	1,15	0,90	1,20	0,91	1,14
CAPACITÉ DE DIFFUSION						
DCO (µmol/min/hPa)	12,4	15,4	11,2	11,7	15,7	11,8
DCO/Va (µmol/min/hPa/ml)	9,3	11,4	10,3	10,4	10,4	10,1

Source : Reinhardt et al.(284). Les symboles suivants représentent : TLC: Total lung capacity; FRC: Functional residual capacity; VD: Dead space volume; CL: Compliance of the lung; CDyn: Dynamic lung compliance at the rate of 130 breaths per min; R: Respiratory system resistance; DCO: Diffusing capacity for carbon monoxide et Va: Alveolar volume.

Afin de rendre les tests de la fonction pulmonaire aisément reproductibles en laboratoire, les chercheurs se sont imposés des conditions extrêmement rigoureuses lors des mesures. Ces précautions ont permis de développer chez la souris de laboratoire des procédés standardisés de travail et ainsi de développer des modèles pour l'étude des affections respiratoires humaines.

La petite taille des individus, la gamme des valeurs mesurées et la rapidité des mouvements exigent du matériel hautement sensible et dont le temps de réponse est faible. De nombreux tests ont été décrits dans la littérature. Dans ce texte, nous nous limiterons aux tests physiologiques applicables à la souris de laboratoire.

3.1. MESURE DU VOLUME PULMONAIRE

Dans le cadre des petits animaux de laboratoire, il a été nécessaire de recourir à des volumes respiratoires imposés mécaniquement. Comme décrit précédemment, les mesures disponibles ayant été déterminées afin d'assurer des conditions reproductibles d'expérimentation, il est important d'imposer des pressions barométriques pulmonaires minimale et maximale.

Les volumes pulmonaires peuvent se mesurer chez la souris de laboratoire selon trois techniques empiriques.

La première, la méthode est basée sur la mesure de la dilution d'un gaz inerte et est la plus simple à utiliser : elle consiste à déterminer le volume d'un gaz inerte tel que l'azote (N₂) ou le néon (Ne), lorsqu'un volume connu du gaz est mis en communication avec l'espace pulmonaire du sujet.

La deuxième, la méthode est basée sur le principe de la loi de Boyle-Mariotte: le volume d'une quantité fixée de gaz varie à température constante de manière inversement proportionnelle à la variation de pression absolue. Si on obstrue les voies respiratoires à l'issue de l'expiration, les variations de pression et de volume induits par les efforts de l'animal tentant d'inspirer une nouvelle fois, servent de valeurs donnant lieu à la mesure des volumes respiratoires. Cette technique demande l'usage d'un pléthysmographe afin de mesurer ces variations de pression. Développée à l'origine pour le rat, cette méthode a été utilisée avec succès chez les animaux de laboratoire de plus petite taille tels que la souris (263).

La troisième est la méthode dénommée *Oxygen absorption atelectasis* (ou *gas induced atelectasis*). L'animal est ventilé avec de l'oxygène à 100% (O₂), jusqu'à atteindre d'un taux minimal d'azote (N₂) dans l'air expiré. A ce moment, une occlusion des voies respiratoires et de l'ensemble du poumon survient et elle correspond à la fin de l'expiration. Tout l'air présent dans les poumons est donc absorbé et le changement de volume ainsi provoqué peut être mesuré par pléthysmographie. On peut ainsi en déduire le volume alvéolaire correspondant.

Chez les animaux de laboratoire et tout particulièrement chez la souris, la tolérance à l'atélectasie est telle que cette dernière ne développe pas de dépression thoracique excessive ni de troubles circulatoires susceptibles de causer la mort du sujet comme observé dans d'autres espèces.

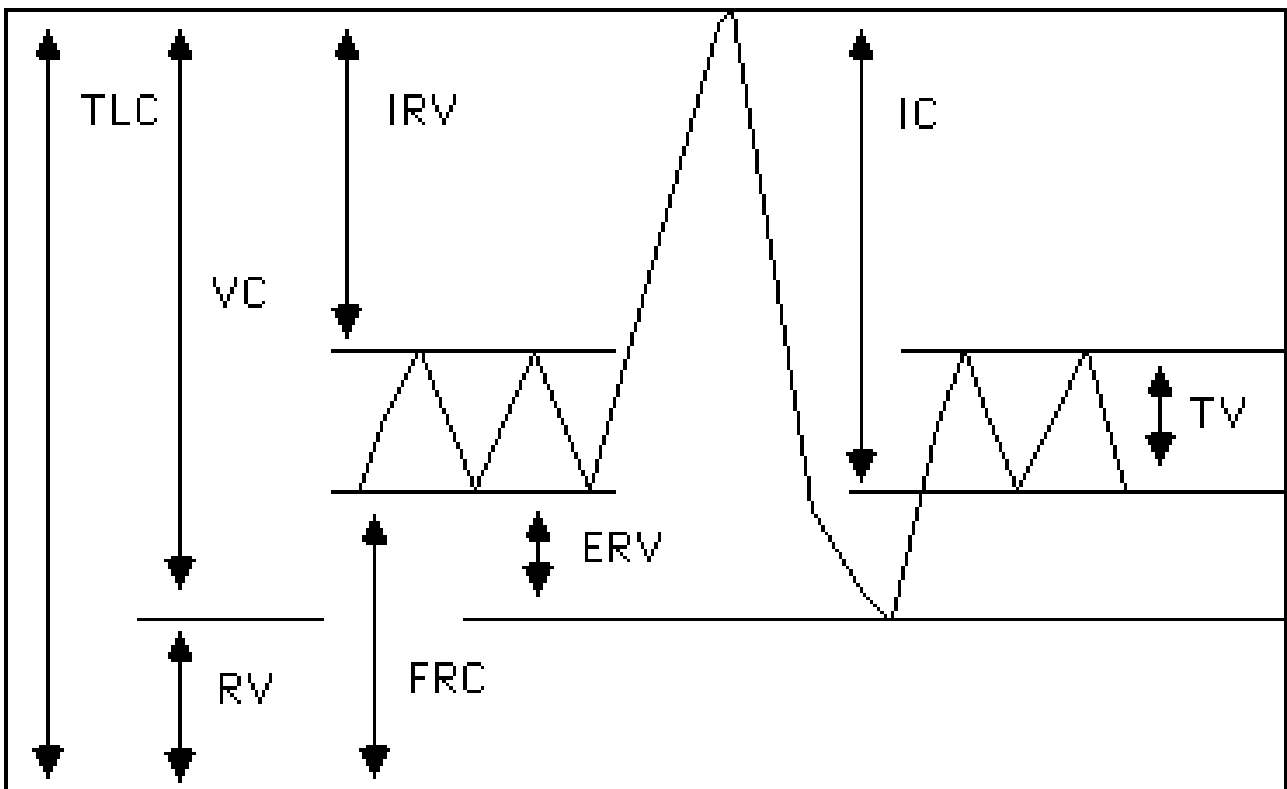


Figure 6 : Spirogramme. Schéma représentant les variations de volumes de la respiration chez la souris telles qu'enregistrées par un spiromètre. En ordonnée: les variations de volumes; en abscisse : le temps écoulé. TLC: Total lung capacity; VC: Vital capacity; RV: Residual volume; IRV: Inspiratory reserve volume; ERV: Expiratory reserve volume; TV: Tidal volume; IC: Inspiratory capacity; FRC: Functional residual capacity. Source: Pulmonary function testing in small laboratory mammals (263)

3.2. TESTS DE MÉCANIQUE RESPIRATOIRE

La mécanique respiratoire est déterminée par l'ensemble des propriétés statiques et dynamiques des poumons. Ces propriétés sont dépendantes de la structure élastique du poumon, des forces de surface agissant au niveau de l'interface air-liquide alvéolaire, des muscles respiratoires, du diamètre des voies respiratoires et de leur activité sécrétoire (61).

Les propriétés statiques se mesurent en établissant une courbe de relation volume-pression durant l'inspiration et/ou l'expiration. Les mesures nécessaires pour établir une telle courbe sont effectuées à l'aide d'un pléthysmographe (Tab. 4) ou d'un spiromètre. Ce dernier permet la réalisation d'un spirogramme (Fig.6).

Les propriétés dynamiques sont évaluées en établissant une courbe de relation débit en fonction du volume (Fig. 5). Il faut également déterminer les valeurs des 3 paramètres suivants : la valeur de résistance des voies aériennes, la compliance et l'impédance totale du système respiratoire. Dans le cas des petits mammifères, les manipulations nécessaires à ces mesures nécessitent l'anesthésie du sujet et la mise en place d'un tube trachéal (289). La mécanique oscillatoire est définie comme l'impédance de l'ensemble du système respiratoire pendant les cycles respiratoires normaux chez la souris anesthésiée. Cette technique nécessite un équipement permettant un bon contrôle des flux et des fréquences (285).

Tableau 4 : Paramètres de mécanique respiratoire accessibles par pléthysmographie en chambre double chez la souris et description de ceux-ci.

Paramètre	Symbole	Unité	Description
Temps inspiratoire	TI	ms	Temps du début à la fin de l'inspiration
Temps expiratoire	TE	ms	Temps du début à la fin de l'expiration
Fréquence respiratoire	RR	bpm	$RR = 60/(TI+TE)$
Duty cycle	%TI	%	$\%TI = TI/(TI+TE)$
Pic de débit inspiratoire	PIF	ml/s	Débit maximum inspiratoire
Pic de débit expiratoire	PEF	ml/s	Débit maximum expiratoire
Volume courant	TV	ml	Intégration de la courbe de débit inspiratoire en fonction du temps
Volume minute	MV	ml/min	Volume total respiré pendant une minute: $MV = (RR \times TV)$
Pause de fin d'expiration	EEP	ms	Durée pour expirer les derniers 5% de TV
Specific airway resistance	Sraw	cmH ₂ O.s	$(TI+TE)/(2x\pi) \times (Patm-47) \times 1.36 \times 2 \times dT/(TI+TE)$
Enhanced Pause	Penh	-	$\{(TE/TE^{30\%})-1\} \times (PEF/PIF)$

Paramètres décrivant la mécanique respiratoires chez la souris de laboratoire accessibles par des fonctions respiratoires mesurées par pléthysmographie en chambre double, description et formules. Source : Effect of somatic growth, strain, and sex on double-chamber plethysmography respiratory function values in healthy mice (102)

Tableau 5 : Exemples de valeurs de paramètres de mécanique respiratoire obtenus par pléthysmographie en chambre double en situation pathologique et contrôles.

Values	Strain	Time							
		Day 1		Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
		bi	pi	pi	pi	pi	pi	pi	pi
RR	BALB/cBy	253±2 ^a	246±32 ^a	262±22 ^a	261±18 ^b	287±18 ^c	271±22 ^c	282±57 ^c	277±62 ^c
	DBA/2	224±18 ^a	219±13 ^a	221±15 ^a	368±61 ^b	410±44 ^c	394±31 ^c	375±27 ^{bc}	353±41 ^b
	129Sv	221±22 ^a	205±13 ^a	217±10 ^a	280±27 ^b	335±32 ^c	328±37 ^c	348±36 ^c	338±54 ^c
MV	BALB/cBy	50±7 ^a	46±8 ^a	45±5 ^a	47±4 ^a	52±9 ^a	51±8 ^a	51±8 ^a	51±10 ^a
	DBA/2	53±9 ^a	48±3 ^a	47±7 ^a	59±17 ^a	68±10 ^b	64±6 ^b	68±12 ^b	55±9 ^a
	129Sv	58±8 ^a	49±7 ^a	53±6 ^a	62±3 ^a	61±9 ^a	63±6 ^a	58±8 ^a	59±16 ^a
sRaw	BALB/cBy	1.18±0.4 ^a	1.13±0.4 ^a	0.97±0.3 ^a	1.22±0.4 ^a	1.30±0.4 ^a	1.40±0.3 ^a	1.12±0.3 ^a	1.19±0.3 ^a
	DBA/2	1.08±0.3 ^a	0.92±0.2 ^a	0.98±0.3 ^a	1.80±0.7 ^b	2.14±0.6 ^{bc}	2.25±0.6 ^c	1.68±0.4 ^b	1.63±0.4 ^b
	129Sv	1.09±0.6 ^a	1.00±0.3 ^a	1.18±0.3 ^a	1.38±0.3 ^{ab}	1.54±0.3 ^b	1.49±0.4 ^b	1.48±0.4 ^b	1.70±0.3 ^b
CO-up-take	BALB/cBy	29.9±7.1 ^a	31.3±4.2 ^a	34.3±4.9 ^a	31.1±5.5 ^a	30.9±6.7 ^a	29.8±2.6 ^a	31.5±3.3 ^a	31.3±5.5 ^a
	DBA/2	32.1±4.7 ^a	34.6±7.7 ^a	34.2±3.5 ^a	29.7±4.8 ^a	30.4±5.0 ^a	29.2±7.6 ^a	29.9±4.7 ^a	31.4±5.1 ^a
	129Sv	30.8±6.5 ^a	29.9±4.3 ^a	31.4±5.1 ^a	30.1±4.1 ^a	29.6±5.3 ^a	27.7±3.3 ^a	29.5±4.5 ^a	26.8±5.2 ^b

Les valeurs sont des moyennes (\pm SD) de souris femelles de 6 à 13 semaines d'âge, pour les souches mentionnées. Les unités pour les paramètres mentionnés sont: fréquence respiratoire, RR (/min); volume Minute, MV (ml/min); Résistance Spécifique, sRaw (cmH₂O/s). Autres paramètres ne relevant pas de la mécanique respiratoire: CO-up-take (μ l/min). Les valeurs sont indiquées avant inoculation virale expérimentale des animaux (bi), ces valeurs sont considérées comme contrôles dans l'expérience et après inoculation (pi) soit post-inoculation. Dans chaque souche, les moyennes avec des lettres différentes sont à considérer comme significativement différentes au seuil ($P < 0,05$). Source : A Critical Appraisal of Carbon Monoxide Uptake Measurements for the Follow-up of Experimental Respiratory Diseases in the Laboratory Mouse (406).

3.3. TESTS DE DISTRIBUTION DE LA VENTILATION

Les gaz inspirés ne sont pas distribués uniformément au sein des poumons, quelques différences régionales sont présentes. Elles sont la combinaison de plusieurs facteurs comme la distribution de la pression pleurale, le poids des tissus pulmonaires (effet de la gravité), la structure de la paroi thoracique, la résistance et la compliance du poumon. Plusieurs tests sont affectés par les changements dans la distribution de la ventilation et peuvent s'avérer utiles dans la détection des pathologies pulmonaires chez les petits mammifères (23).

Le *Single breath oxygen test* (ou *closing volume*) permet de recueillir des informations sur le volume pulmonaire par l'exposition du sujet à une inspiration unique d'oxygène (O₂) à 100% et en rapportant le taux d'azote (N₂) expiré en fonction du volume, dans l'expiration qui suit. Le même principe peut être appliqué en utilisant un mélange d'oxygène et d'hélium de concentrations connues. On peut alors calculer

les volumes respiratoires par la mesure de la concentration en hélium dans le mélange expiré et en utilisant la formule de Fowler (Single breath Helium test) (Fig. 7).

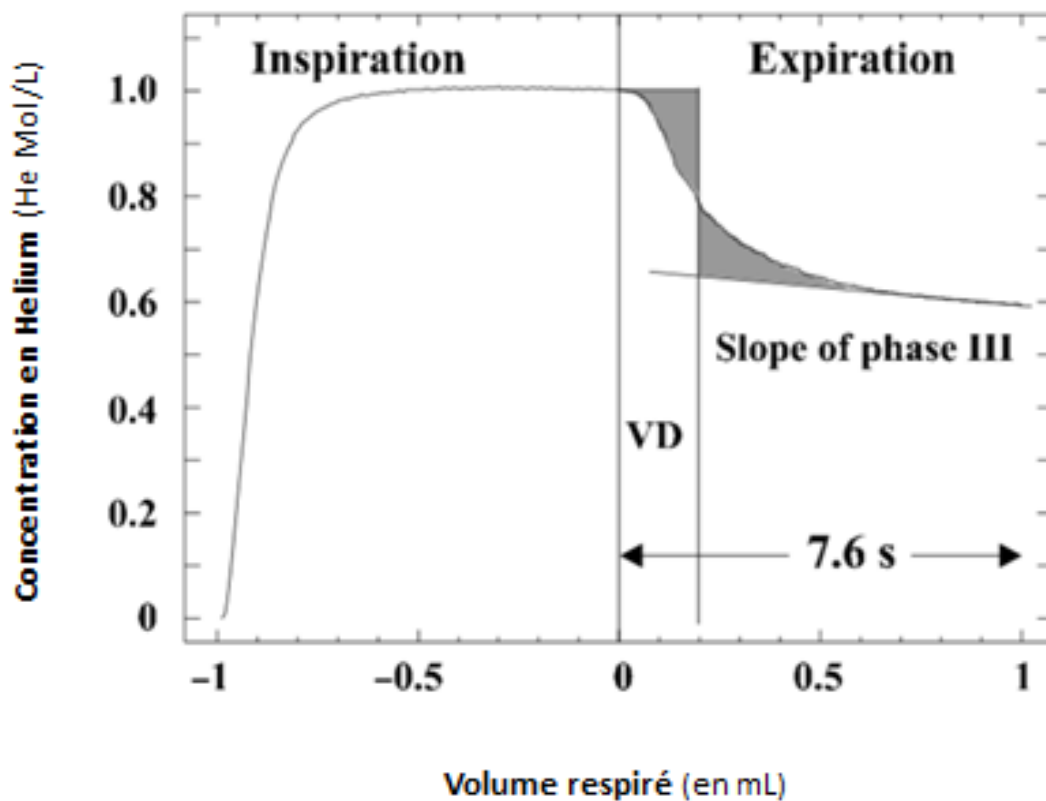


Figure 7: *Single breath Helium test.* Expirogramme tracé sur la base de la concentration du gaz hélium dans le mélange gazeux respiré (inspiration et expiration). Le tracé d'origine de la concentration en fonction du volume respiré s'affiche. L'estimation du volume de l'espace mort et de la distribution intrapulmonaire du gaz hélium (He) à l'aide de la pente alvéolaire obtenue par ajustement des moindres carrés et le volume spatial mort en série déterminé par la méthode de Fowler. Source : *Respiratory mechanics in mice: strain and sex specific differences* (315).

Dans le *Multiple breath nitrogen washout*, le sujet est ventilé avec de l'oxygène à 100% (O₂). A chaque nouvelle inspiration, la concentration en azote (N₂) du volume expiré est mesurée de manière continue et suivie jusqu'à élimination complète de ce dernier. On trace la courbe correspondante grâce aux informations recueillies. Le nombre de respirations nécessaires pour atteindre un taux d'azote de 2% permet de caractériser la distribution de la ventilation (315).

3.4. ECHANGES GAZEUX PULMONAIRES

Il est possible d'évaluer les échanges gazeux pulmonaires par deux tests différents : la capacité d'extraction du monoxyde de carbone (CO^{up}) (Tab. 5) et la mesure des gaz sanguins.

Dans la mesure de la capacité d'extraction du monoxyde de carbone (CO-uptake ou CO^{up}), on teste l'efficacité de la membrane alvéolo-capillaire assurant la fonction de barrière, en mesurant le taux de prélèvement et donc le passage du CO vers le sang. Pour un gaz tel que le monoxyde de carbone, l'avidité de ce dernier pour l'hémoglobine ainsi que la liaison covalente qui en résulte assurent à ce gaz une pression partielle quasi nulle dans les alvéoles, ceci après quelques minutes d'échanges (98).

En cas de perturbation des échanges gazeux pulmonaires, on constate une augmentation du taux de dioxyde de carbone (CO₂), une diminution de l'oxygène sanguin (O₂) et une variation du CO^{up} (Fig. 8), ce point particulier est discuté dans l'article (406) annexé au manuscrit. Dans la même idée, une mesure des gaz sanguins donnera une indication permettant d'évaluer la qualité de ces échanges.

Le CO^{up} est calculé sur base du taux de prélèvement et sur le gradient de transfert au travers de la membrane alvéolo-capillaire.

L'effet de la croissance somatique a également été démontré. L'évolution des paramètres respiratoires est la plus marquée entre 5 et 9 semaines d'âge. Toutes les valeurs mesurées progressent rapidement. Dans la période suivant les 9 semaines d'âge, une stabilisation des valeurs qui sera définitive autour de 12,5 semaines commence à se marquer.

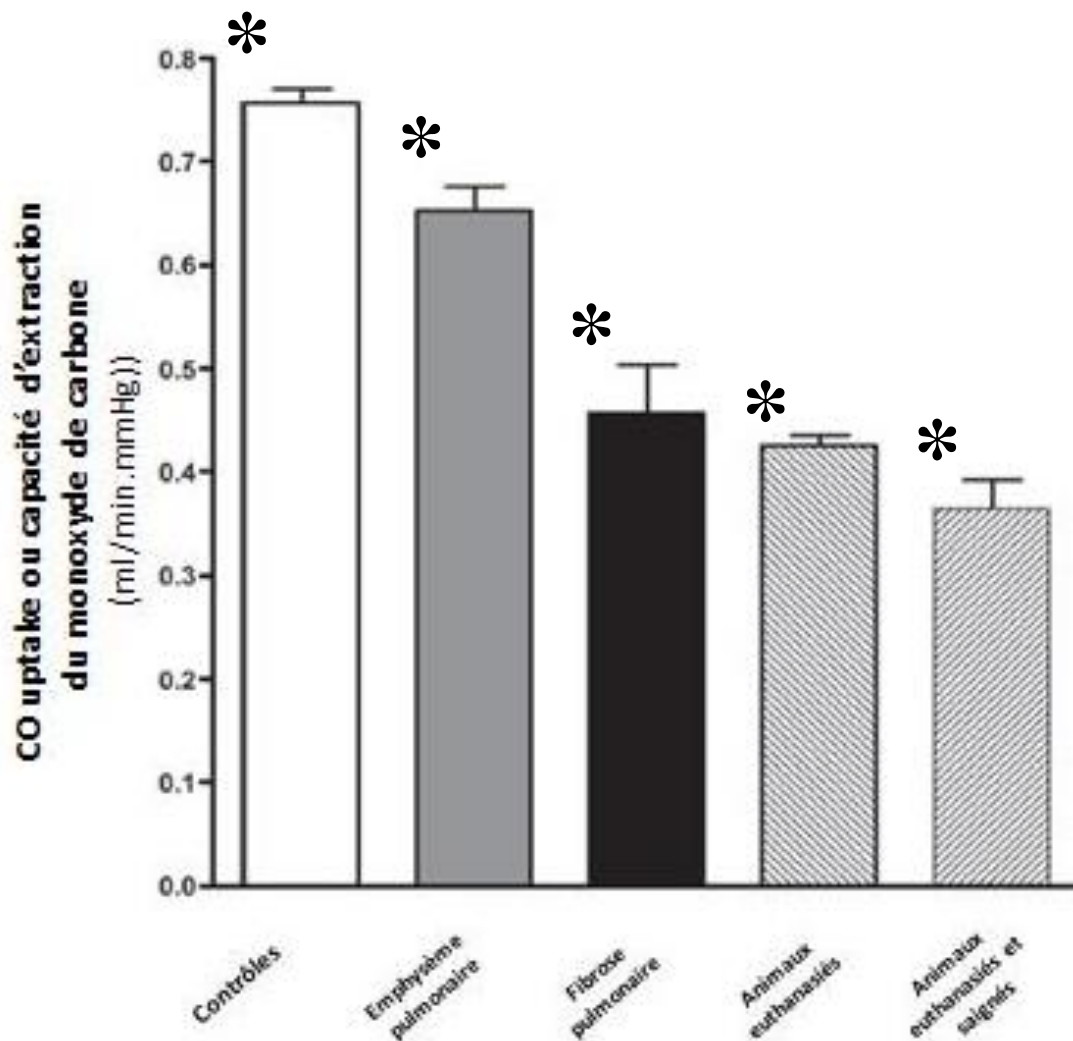


Figure 8 : CO-uptake. Mesures de la valeur moyenne du CO-uptake chez la souris C57BL/6J (6-8 semaines) sous différentes conditions. Toutes les souris sont sous anesthésie (kétamine 90mg/Kg et xylazine 15mg/kg). Les souris "contrôles", sont vivantes, trachéotomisées et anesthésiées. Les souris "Emphysème", sont anesthésiés et on subit une induction expérimentale de lésions emphysemateuses respiratoires. Les souris "Fibrose" sont anesthésiées et on subit une induction expérimentale de lésions de fibrose pulmonaire. Les souris "Euthanasiées" ont été euthanasiées par surdosage de l'anesthésique. Les souris "Euthanasiées et saignées" ont été préalablement incisées afin de provoquer une perte de sang ayant causé la mort. Les (*) indiquent une différence significative au seuil (P= 0,05). Les valeurs collectées illustrent la variation de la capacité d'extraction du monoxyde de carbone dépendamment des pathologies pulmonaires envisagées. Source : Application of carbon monoxide diffusing capacity in the mouse lung (98).

3.5. TESTS DU CONTRÔLE VENTILATOIRE

Dans le processus de respiration pulmonaire, la ventilation permet la circulation de l'air. La ventilation pulmonaire fait intervenir d'une part, le jeu des pressions: atmosphérique, intra-alvéolaire, intra-pleurale et d'autre part la contraction et/ou le relâchement des muscles dits respiratoires.

La ventilation est une fonction autonome de nature rythmique et dont le contrôle nécessite l'intégration d'au moins deux types de commandes (Fig. 9) : l'une, automatique (contrôle ventilatoire involontaire), provenant des réseaux de neurones bulbaires et pontiques ; l'autre, émotionnelle ou comportementale (contrôle ventilatoire volontaire), prenant sa source dans des structures suprapontiques.

Le contrôle involontaire de la ventilation a pour but principal d'établir et de maintenir la rythmicité automatique des contractions musculaires nécessaires à la circulation de l'air pulmonaire et donc à la respiration. Les contractions des muscles respiratoires sont donc initiées au niveau du système nerveux central, plus particulièrement au sein de deux groupes de neurones, l'un situé dans le pont rachidien et l'autre situé dans le bulbe rachidien. Le contrôle nerveux de la respiration se situe au niveau du pont et du bulbe rachidiens. Ce "centre respiratoire" envoie des influx nerveux aux muscles de la respiration, qui se contractent. On distingue trois zones fonctionnelles : le centre bulbaire de la rythmicité dans le bulbe rachidien, le centre pneumotaxique et le centre apneustique dans le pont. Les centres respiratoires fonctionnent de façon autonome réflexe. Mais ils peuvent aussi fonctionner de façon volontaire (287).

Le contrôle de la ventilation pulmonaire via la voie volontaire a pour rôle d'ajuster la ventilation respiratoire selon les besoins physiologiques ou métaboliques variables de l'animal. Contrôlé par le système nerveux autonome, il est influencé par des phénomènes tels que le stress ou l'exercice. La régulation autonome nécessite l'intervention de quatre composantes que sont i) le contrôle du système nerveux central, ii) les chémorécepteurs (CO_2 , O_2 et pH) distribués dans les poumons, le sang et le liquide céphalo-rachidien, iii) un contrôle mécanique responsable des réflexes pulmonaires et musculo-respiratoires et iv) les récepteurs de substances irritantes (nocicepteurs).

Dans la pratique, l'évaluation des contrôles ventilatoires se fait par une mesure des modifications de la ventilation totale du système respiratoire. La réponse ventilatoire au taux de dioxyde de carbone est la méthode couramment pratiquée. Dans ce cas, une courbe de ventilation est établie lorsque l'animal est soumis à des taux croissants de dioxyde de carbone. On peut également accroître ou réduire la pression environnante exercée sur la paroi thoracique des sujets en induisant divers réflexes pulmonaires (316).

Le diaphragme est innervé par le nerf phrénique tandis que les muscles intercostaux sont innervés par les nerfs intercostaux. Les autres nerfs afférents font partie du plexus cervical et du plexus bronchial. Les réflexes respiratoires, dont le rôle est primordial dans la régulation de la respiration, sont des réflexes d'origine pulmonaire et sont acheminés aux centres nerveux par le nerf pneumogastrique (234).

Au repos, l'aire inspiratoire produit spontanément des influx nerveux qui se propagent aux muscles intercostaux externes et au diaphragme. Lorsque ces muscles se contractent, l'inspiration a lieu. Au bout de 2 secondes, l'aire inspiratoire devient inactive et n'envoie donc plus d'influx nerveux. Les muscles se relâchent, c'est l'expiration. Au repos, l'aire expiratoire est donc inactive (263).

Tableau 6 : Valeurs constatées de ventilation spontanée chez la souris saine selon la souche.

Mouse Strain	BW (g)	Condition	RR (/min)	VT (ml)	Ti/Tt	Ve (ml/min)
wild type	(adult)	(?)	84–230	0.09–0.23	(?)	11–36
129 Sv/J x ICR	37.9	restrained	195	0.12	0.47	24.0
CF-1	25.0	restrained	272	0.12	(?)	32.6
C3H/HeJ	23.5	unrestr.	177	0.24	0.32	24.7
AKR/J	29.7	unrestr.	222	0.29	0.29	37.1
129/J	18.1	unrestr.	230	0.17	0.29	23.2
DBA/2J	25.1	unrestr.	237	0.19	0.37	26.6
BALB/cJ	22.1	unrestr.	241	0.17	0.31	23.9
A/J	22.9	unrestr.	247	0.19	0.29	28.9
SJL/L	22.3	unrestr.	266	0.14	0.33	23.2
C57BL/6J	23.4	unrestr.	272	0.16	0.29	25.5
wild type	30.0	(?)	180	0.15	(?)	27.0
BALB/c	22–26	restrained	307	(?)	0.47	(?)
BALB/c	22–26	restr.+rsv	420	(?)	0.33	(?)
C57BL/6	(?)	unrestr.	210	(?)	(?)	(?)
overex.Gsa	(?)	unrestr.	269	(?)	(?)	(?)
wild type	(?)	(?)	(?)	(?)	(?)	0.72*
wild type	(?)	(?)	(?)	(?)	(?)	1.1–1.3*
ICR pregnant	46	(?)	(?)	(?)	(?)	3.5*
ICR non-pregn.	35	(?)	(?)	(?)	(?)	3.0*
wild type	20–40	unrestr.	94–163	(?)	(?)	(?)

Quand le poids corporel est inconnu (*), alors Ve est exprimé en (ml/g.min) sinon en (ml/min). Poids corporel BW, Fréquence respiratoire RR, volume courant Vt, fraction inspiratoire Ti/Tt et volume minute Ve. Source : Mechanical ventilation of mice (316).

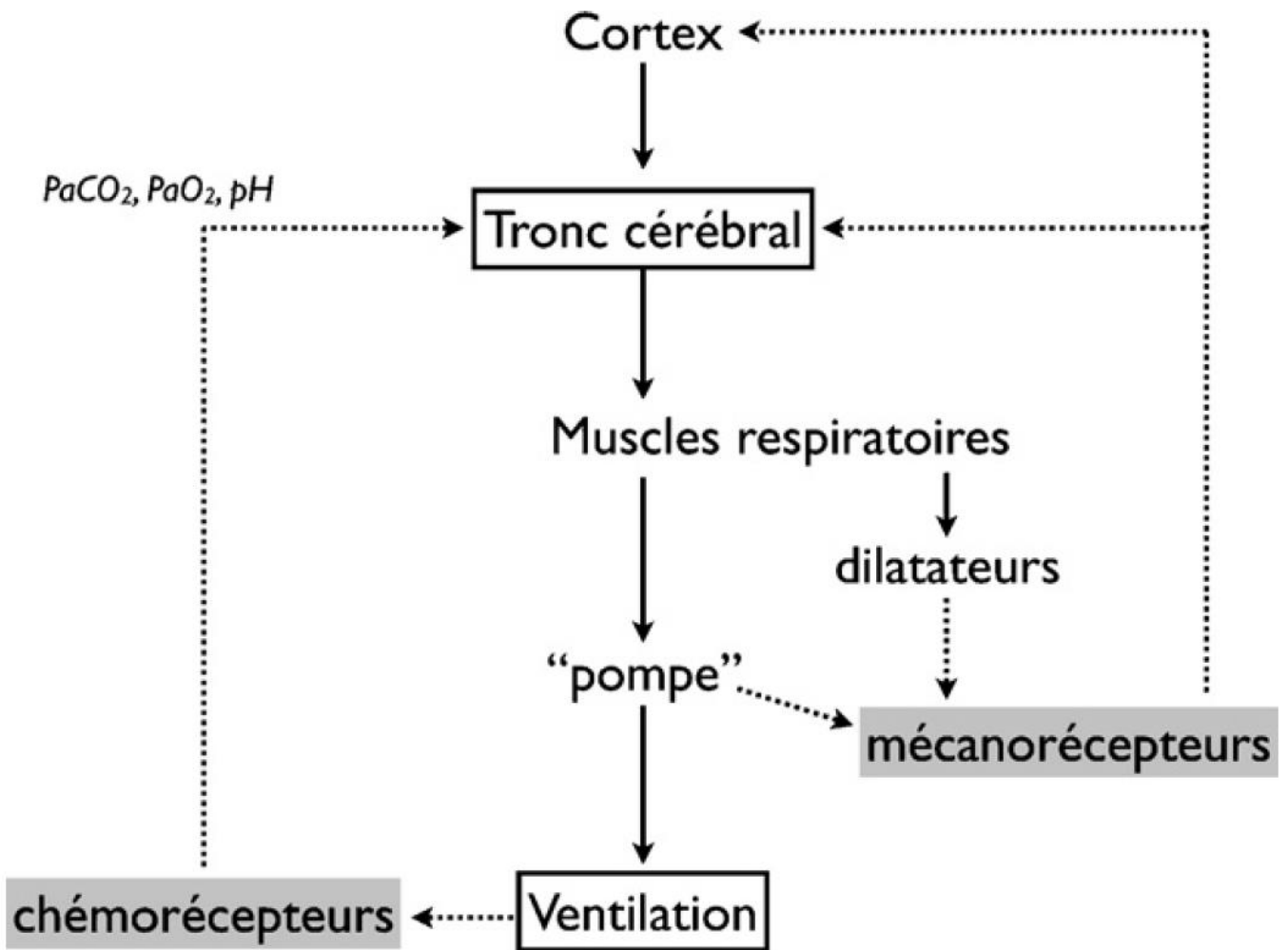


Figure 9: La commande ventilatoire naît dans le tronc cérébral. Elle est transmise aux muscles respiratoires (dilatateurs des voies aériennes) dont la contraction produit la ventilation (grandeur réglée). En tout temps, le générateur situé dans le tronc cérébral reçoit des afférences provenant des chémorécepteurs et des mécanorécepteurs, lui permettant d'adapter la ventilation au niveau de $PaCO_2$ (grandeur réglée) et au niveau de PaO_2 . Source : *Control of breathing: Physiology and functional testing in intensive care* (287).

Tableau 7 : Nature des mesures obtenues dans les différentes techniques évoquées

		Spiromètre	Pléthysmo. chambre simple	Pléthysmo. chambre double	CO-uptake monitor®
VOLUMES PULMONAIRES					
Volume minute	Mv	X	X	X	
VENTILATION					
Fréquence respiratoire	FR	X	X	X	X
Volume courant	Tv	X	X	X	
Temps expiratoire	Te	X	X	X	
Temps inspiratoire	Ti	X	X	X	
Pic de débit expiratoire	PEF	X	X		
Pic de débit inspiratoire	PIF	X	X	X	
Pause de fin d'inspiration	EIP	X	X	X	
Pause de fin d'expiration	EEP	X	X	X	
Temps de relaxation		X	X	X	
DIFFUSION ALVEOLOCAPILLAIRE					
Taux de prélèvement du CO	CO^{up}				X
MECANIQUE RESPIRATOIRE					
Compliance					
Résistance respiratoire spécifique	SRaw			X	
Résistance respiratoire indirecte	Penh		X	X	
Conductance respiratoire spécifique	SGraw			X	
Temps Delta	ΔT			X	

IV. TECHNIQUES INVASIVES D'ÉVALUATIONS FONCTIONNELLES PULMONAIRES APPLICABLES CHEZ LA SOURIS

4.1. EXEMPLE DE MESURES *IN VITRO* DE LA FONCTION RESPIRATOIRE

Il a été démontré que la stimulation *in vitro* par champ électrique (Electrical Field Stimulation, EFS) des segments de trachée reflète spécifiquement l'obstruction des voies aériennes (10). La réactivité des muscles lisses des voies respiratoires peut être évaluée par EFS (Fig. 10). Les segments de muscles lisses trachéaux sont retirés et accrochés entre des supports de fil triangulaire en acier inoxydable. La contraction en réponse au stimulus EFS (12V, 200 mA, 0,5-30 Hz) est mesurée au moyen d'un transducteur de force isométrique (89). La fréquence qui cause 50% de la contraction maximale est calculée à partir des courbes logarithmiques de la réponse contractile par rapport à la fréquence de l'EFS et exprimée en ES₅₀.

4.2. EXEMPLE DE MESURE *EX-VIVO* DE LA FONCTION PULMONAIRE SUR ORGANES ISOLÉS ET PERFUSÉS

La perfusion de poumons de souris de laboratoire a été rarement rapportée et rarement documentée. Son utilisation a été principalement limitée aux investigations en toxicologie. L'adaptation de la technique a été faite à la souris comme une extension d'une technique qui avait précédemment été décrite en détail pour les poumons de rats isolés et perfusés (140). L'utilisation des poumons de souris perfusés permet d'étudier plusieurs aspects importants de la physiologie pulmonaire : i) la mécanique respiratoire, notamment la résistance pulmonaire et la compliance pulmonaire ii) la réactivité vasculaire (141) et iii) la libération de médiateurs cellulaires comme par exemple des cytokines telles que la Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) et l'interleukine (IL-6)(139).

4.3. EXPLORATION *IN VIVO ET INVASIVE* DE LA FONCTION PULMONAIRE

La mesure par méthode invasive est la méthode de référence pour la détermination exacte de la fonction pulmonaire car elle permet de mesurer la résistance pulmonaire et la compliance dynamique, qui sont les paramètres les plus spécifiques et les plus sensibles dans l'objectivation de l'obstruction des voies respiratoires (Fig. 11). Ces paramètres sont calculés en mesurant en continu, tout au long des respirations, le débit courant, le volume courant et la pression transpulmonaire. Un exemple largement utilisé pour la mesure invasive de la fonction pulmonaire consiste à appliquer une ventilation mécanique chez des souris trachéotomisées et immobilisées (229). Cette méthode permet également d'associer à cela un oscillateur basse fréquence (technique d'oscillation forcée) et d'en déduire la mesure de l'impédance pulmonaire (313). Cet ajout a pour avantage de faire la différence entre la résistance d'origine centrale (due aux voies respiratoires) de celle due mécaniquement aux tissus environnants ou élastance (23).

Les mesures chez les animaux respirant spontanément après intubation endotrachéale par voie orale sont plus proches des conditions physiologiques que celles réalisées chez les animaux ventilés. Cette technique a l'avantage de permettre des études répétées. La souris est placée en position couchée dans un pléthysmographe, le débit respiratoire et la pression transpulmonaire sont mesurés au moyen de transducteurs de pression. Cette technique a été publiée pour les rats et a été adaptée à la souris entre 1999 et 2005 (151).

Dans de telles conditions, des traitements aérosols ciblés et des essais thérapeutiques précis peuvent être réalisés. Les principaux avantages sont : i) la respiration spontanée des animaux est possible, ii) on a une meilleure précision diagnostique, iii) l'administration de doses importantes et un dosage précis des traitements médicamenteux peuvent être réalisés lors des challenges, iv) on court-circuite totalement le

passage par les voies nasales (et donc on diminue le risque de perte de produit) lorsque le poumon est la cible visée et v) les mesures répétées sur les sujets sont possibles.

Parmi les inconvénients de l'utilisation d'une méthode invasive, on notera particulièrement que les mesures de la pression transpulmonaire et du débit courant sont techniquement impossibles ou nécessiteraient un équipement plus conséquent. De plus, les animaux doivent être anesthésiés. Les agents anesthésiques peuvent modifier la fonction pulmonaire en raison de leur influence sur les fonctions neuronales. Une étude plus exhaustive des avantages et inconvénients relatifs à l'usage d'une méthode d'investigation invasive ou non-invasive est résumée dans le Tab 10 (123). Chez l'animal livré à lui-même (sans assistance respiratoire), les mesures obtenues sont également dépendantes de facteurs mécaniques liés aux voies respiratoires (exemples dans Tab 6) : la contractilité des muscles lisses tout le long des voies aériennes, la compliance de la paroi thoracique, l'action obstructrice du mucus ou d'une éventuelle fibrose des voies respiratoires (204).

En utilisant des techniques invasives, il a été démontré que, par exemple, le paramètre d'Early Airway Responsiveness (EAR) peut être déterminé chez la souris intubée par voie orotrachéale pendant et immédiatement après l'exposition à un allergène (152). Ce paramètre est représentatif de l'augmentation de la résistance pulmonaire et de la diminution de la compliance pulmonaire dynamique. De même, un indicateur comme l'Airway Hyper Responsiveness (AHR) dans la phase suivant immédiatement la réponse allergique peut également être déterminé en réponse à l'exposition à un allergène ou à de l'histamine. On peut ainsi augmenter les doses sur des périodes de 24 heures par exemple (152).

Toutes ces techniques nécessitent une anesthésie de l'animal qui, suivant les substances utilisées, engendreraient des répercussions plus ou moins importantes sur les paramètres respiratoires et les valeurs de résistance mesurées (valeurs obtenues selon la technique dans Tab. 7). Il en est de même lors de l'usage de curare ou de composés similaires. Par exemple, l'usage d'un capteur œsophagien ne peut pas convenir à la mesure des paramètres respiratoires chez la souris de laboratoire. Ceci est dû au fait que cette opération nécessiterait un cathéter extrêmement fin et que les mesures obtenues d'un tel cathéter en seraient faussées (92). De plus, un tel capteur nécessiterait une intervention chirurgicale importante qui à son tour influencerait les paramètres respiratoires.

L'intubation nécessite une trachéotomie et bien qu'une telle pratique puisse finir par être maîtrisée avec de la pratique, mais dans tous les cas, cette manipulation nécessite des gestes précis et par conséquent une anesthésie de l'animal. Durant un tel procédé, la souris doit être ventilée artificiellement, les valeurs à paramétrer variant selon les articles (58, 364). On constate que des résultats collectés dans des conditions

différentes sont difficilement interprétables et surtout ne sont pas comparables (la résistance des poumons variant en fonction de la fréquence) (145).

L'usage des techniques invasives conduit habituellement à l'euthanasie des souris testées à l'issue des expériences. Les séquelles importantes résultant de ces méthodes s'avérant trop importantes et la douleur qui en découlerait seraient trop inconfortables pour la souris. Des mesures répétées ou poursuivies durant de longues périodes ne peuvent donc pas être effectuées. Ce sont par conséquent des techniques à utiliser chez la souris pour une collecte unique de données ou limitée à un seul lot de souris. Ces méthodes restent toutefois avantageuses du point de vue de leur exactitude car réalisées sur un animal immobilisé.

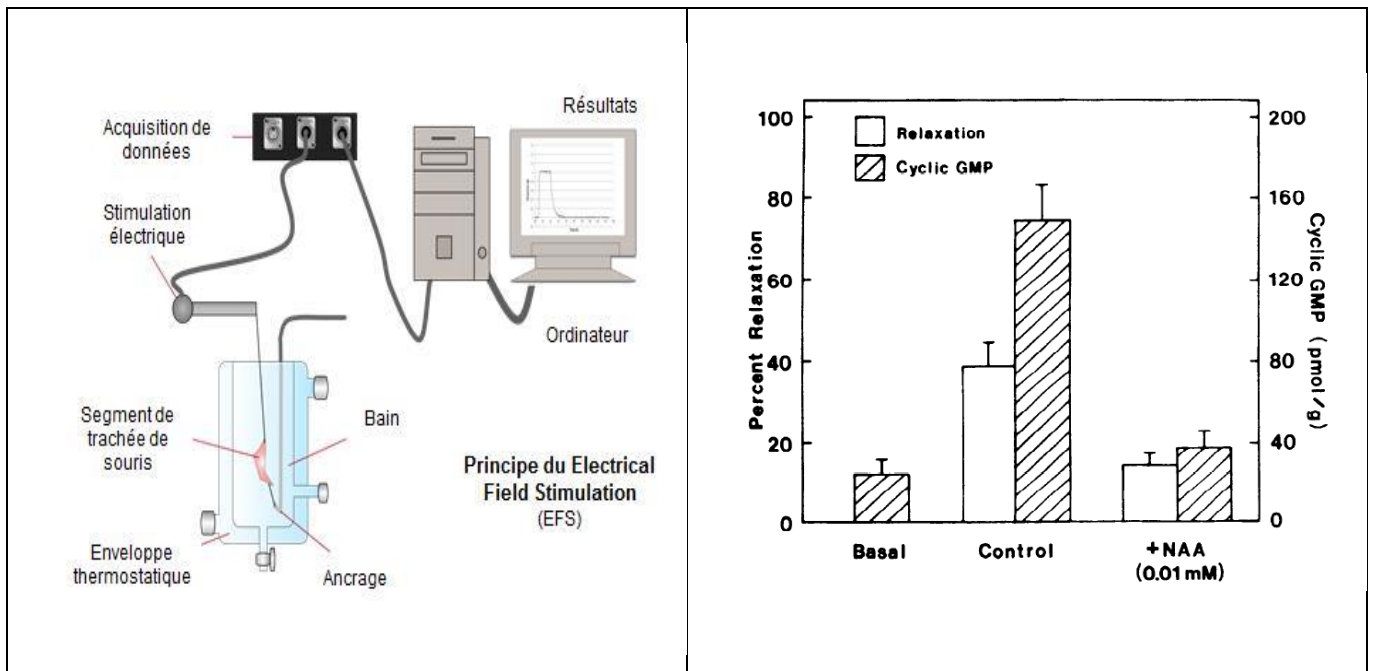


Figure 10: Schéma du principe de l'*Electrical Field Stimulation* (EFS) sur préparation de trachée de souris. Un segment de trachée est prélevé et ancré à un support à la base du bain d'organe via un filetage. L'autre extrémité est attachée à un transducteur de force par un deuxième filetage. Les contractions des muscles du segment de trachée sont converties en un signal électrique. Un transducteur permet l'enregistrement des variations, le tout est enregistré sur l'ordinateur via un logiciel d'acquisition de données. Les données typiques qui en sont issues sont converties en pourcentage de temps de relaxation selon le type d'organe et le traitement qui lui a été réalisé (Basal, control, altéré). Les barres verticales sur l'histogramme représentent les déviations standards des valeurs (SD). Source: *Airway response to electrical field stimulation in sensitized inbred mice* (197).

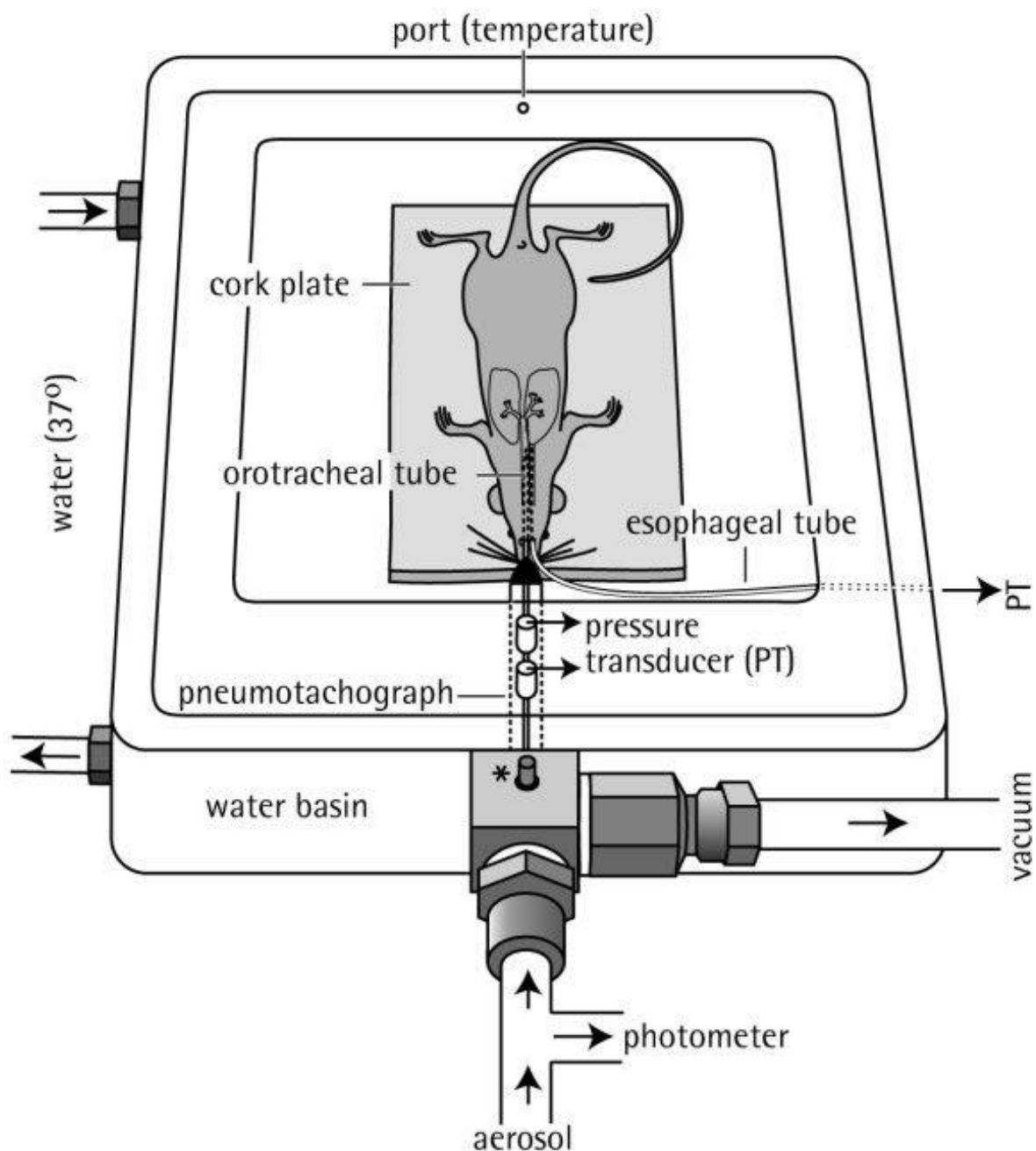


Figure 11 : Schéma représentant un système de mesure forcée de la fonction pulmonaire chez la souris. Dérivée de l'intubation endotrachéale, la technique des oscillations forcées à basses fréquences ou LFOT est une technique qui permet d'estimer l'impédance des poumons et ainsi de compartimenter la résistance respiratoire totale en résistance des voies aériennes (R_{aw}) et du parenchyme pulmonaire (R_{ti}), mais aussi la réactance/compliance pulmonaire. Le poumon de la souris est relié à un tube endotrachéal de taille adaptée et reçoit un débit précis provenant soit d'un haut-parleur, soit d'un piston contrôlé par ordinateur. L'avantage de cette technique est de permettre une analyse détaillée de la fonction des voies respiratoires centrales à la suite de changements liés à leur environnement immédiat. Source : *Comparative respiratory system mechanics in rodents* (126).

V. TECHNIQUES NON-INVASIVES D'ÉVALUATIONS FONCTIONNELLES PULMONAIRES ET ÉQUIPEMENTS UTILISABLES CHEZ LA SOURIS

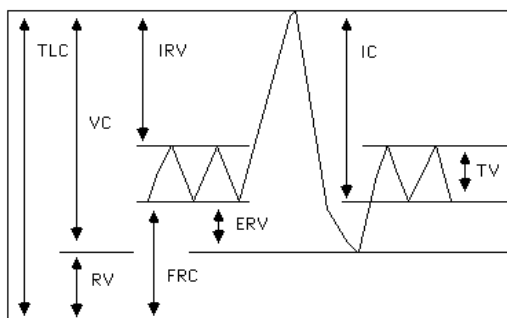
5.1. LE SPIROMÈTRE

Le spiromètre est un des premiers instruments d'évaluation quantitative de la fonction respiratoire adaptés aux animaux (Fig. 12) de laboratoire par les chercheurs (22). Chez la souris de laboratoire, cette fonction intéresse particulièrement les physiologistes et les toxicologues soucieux de mesurer les effets de l'inhalation de produits potentiellement dangereux. Son principe est inspiré de celui utilisé pour le diagnostic chez l'homme. En médecine humaine, il est l'un des tests fonctionnels de base de la fonction pulmonaire (Tab. 9). L'appareil se compose de deux récipients imbriqués l'un dans l'autre, délimitant un espace clos dans lequel aboutissent deux tubes. Ce système est rendu étanche par l'ajout d'eau dans le plus grand des récipients. La présence d'un procédé de rétention du dioxyde de carbone (généralement de la chaux sodée) et d'une valve orientée, permettent de diriger le flux d'air et d'attribuer ainsi un des tubes au flux expiratoire tandis que l'autre sert au flux inspiratoire de l'animal à tester. Les variations de flux sont traduites par l'appareil en variation de volumes. Un spirogramme typique et les volumes mesurés à l'aide de cette méthode sont schématisés dans la (Fig. 6). Toutefois les appareillages modernes ne sont plus constitués que d'un seul espace clos (permettant toutefois le passage de l'air via un filtre). Les instruments de mesures de volumes connectés à cet espace ont été remplacés par un ou plusieurs transducteurs reliés à un ordinateur (Fig. 12). Le logiciel assure la transposition et l'affichage des valeurs mesurées.

Tableau 8: Exemples de valeurs calculées à l'aide du spiromètre

Paramètre	Sigle	Définition
VOLUME COURANT	TV	Volume mobilisé à chaque cycle respiratoire pendant une respiration normale (de repos).
VOL. DE RÉSERVE INSPIRATOIRE	IRV	Volume maximum pouvant être inspiré en plus du TV à l'occasion d'une inspiration forcée.
VOL. DE RÉSERVE EXPIRATOIRE	ERV	Volume maximum pouvant être rejeté en plus du TV à l'occasion d'une expiration forcée.
VOL. RÉSIDUEL	RV	Volume d'air se trouvant dans les poumons à la fin d'expiration forcée. Autrement dit, il est impossible d'expirer. Il est impossible de mesurer ce volume avec des tests de spirométrie. Pour mesurer le RV, des tests plus sophistiqués, comme la méthode de dilution à l'Azote ou la pléthysmographie, sont nécessaires.

Tableau 9: Formules et calculs de quelques valeurs obtenues par spirométrie



Le tableau ci-après se base sur la Fig. 6 : Spirogramme

CAPACITÉS	Sigle	Formules
CAPACITÉ VITALE	VC	IRV + TV + ERV
CAPACITÉ INSPIRATOIRE	IC	TV + IRV
CAPACITÉ RÉSIDUELLE FONCTIONNELLE	FRC	ERV + RV
CAPACITÉ PULMONAIRE TOTALE	TLC	VC+RV

Cette technique a un avantage notoire : simple et non-invasive, elle permet un examen de l'animal prolongé dans le temps et n'affecte pas ses capacités respiratoires. En reliant le circuit à un espace clos, on dispose d'une enceinte pouvant contenir l'animal à tester durant le temps de l'expérience.

Il faut noter que dans le cas de très petits animaux de laboratoire comme la souris, les espaces morts entrant en compte dans le circuit respiratoire sont trop grands en considération des volumes mesurés. Ils peuvent être la source d'erreurs de mesures (102). Si l'on prend en considération l'équation suivante décrivant la ventilation alvéolaire respiratoire :

$$V_a = (V_T - V_D).f$$

Où V_a est la ventilation alvéolaire en L/min.

V_T le volume total (alvéolaire, voies respiratoire et spiromètre) en ml.

V_D le volume total dans les espaces morts (voies respiratoires et spiromètre) en ml.

Et enfin f , la fréquence respiratoire en /min.

On constate que si le volume des espaces morts (espaces qui comprennent les voies respiratoires ajoutées du volume compris dans le spiromètre) augmente, la souris devra augmenter la fréquence respiratoire afin de maintenir un niveau de ventilation alvéolaire équivalent. Le niveau de ventilation alvéolaire se doit d'être suffisant afin de permettre l'apport en oxygène vital de l'animal. Dans le cas de la souris, la disproportion entre V_T (de l'ordre d'1 à 2 ml) et V_D (dépendant de l'appareil de mesure) peut rapidement atteindre des proportions telles qu'elle ne peut être compensée par f . Une augmentation de la résistance du circuit de l'appareil de mesure et/ou une fuite dans celui-ci aboutiront au même résultat en accroissant le volume des espaces morts.

En adaptant le principe de base du spiromètre à un rouleau défilant à vitesse constante, il est possible de déterminer d'autres valeurs dépendantes du temps de mesure : les temps inspiratoires et expiratoires ainsi que la fréquence respiratoire.

Par calcul, en multipliant les données de volumes (Tab.8 et 9) et les temps respiratoires, on peut déterminer les valeurs de débit telles que les pics de débits inspiratoire et expiratoire. Les périodes de volumes constants donnent accès aux mesures des temps de pauses inspiratoire et expiratoire ainsi qu'au temps de relaxation.

5.2. LE PLÉTHYSMOGRAPHE

On distingue *le pléthysmographe barométrique* et *le pléthysmographe volumétrique*. Le pléthysmographe à pression se base sur le fait que la pression et le volume sont intimement liés tant que le système fonctionne dans les conditions isothermes (adiabatique). En mesurant les très faibles variations de pression, l'appareil est en mesure de déduire les volumes engendrés (223).

Le pléthysmographe volumétrique est bâti sur le même principe que son homologue à pression mais il comporte une ouverture qui peut être connectée directement à un spiromètre mesurant ainsi les modifications de volume.

Dans la mesure où le pléthysmographe barométrique permet un approvisionnement permanent en air frais et donc des mesures durant de longues périodes (mesures répétées du même animal), nous préférons cette méthode par rapport au pléthysmographe volumétrique.

5.2.1. LA PLETHYSMOGRAPHIE BAROMETRIQUE EN CHAMBRE SIMPLE

Le pléthysmographe barométrique en chambre simple (Fig. 14) constitue une avancée dans la mesure des paramètres respiratoires chez la souris de laboratoire (Tab. 7). Il se compose d'un espace clos dans lequel le sujet à tester est enfermé. La souris reste libre dans cet espace. A l'aide d'un transducteur de pression, la pression mesurée dans la chambre est comparée à celle régnant dans la chambre de référence (généralement à pression ambiante). Ces variations de pressions sont amplifiées puis transmises à un ordinateur. Elles sont alors traduites en paramètres respiratoires (Fig. 13) selon la méthode barométrique de mesure de la ventilation chez les petits animaux (102).

Comme pour le spiromètre, cette technique nécessite peu de manipulations par l'expérimentateur et ne laisse aucune lésion chez le sujet. La chambre de pléthysmographie permet au sujet à étudier de rester libre, de se mouvoir ainsi que de se nourrir, ceci permet d'envisager des mesures prolongées dans le temps.

Les mouvements du sujet d'expérimentation peuvent provoquer des variations de pressions qui ne sont pas d'origine respiratoire. Toutefois, avec les logiciels modernes, ceci peut être contourné si les mesures sont limitées à des variations ne dépassant pas une fourchette déterminée à l'avance par l'examineur. Le risque d'enregistrements de valeurs indésirables persiste toutefois pour des variations « parasites » ne dépassant pas les seuils fixés par l'expérimentateur.

Grâce à la pléthysmographie barométrique en chambre simple, de nombreuses informations peuvent être relevées sur la fonction pulmonaire chez la souris de laboratoire (223). On pourra ainsi déterminer le volume expiratoire, le volume inspiratoire, le volume minute, le volume courant, la fréquence respiratoire, les temps respiratoires, les durées de pause respiratoire, les pics de débit tant inspiratoire qu'expiratoire, le temps de relaxation et la résistance respiratoire indirecte telle que définie par Pennock et collaborateurs (273).

La Penh a été proposée en 1997 par Hamelmann (128) et est une mesure indirecte de la résistance respiratoire. La résistance indirecte reflète la facilité avec laquelle l'animal initie la ventilation pulmonaire.

Il a été remarqué que pendant une bronchoconstriction, la principale altération dans le signal provenant du pléthysmographe survient au début de l'expiration ce qui induit une modification de la forme de la courbe (Fig.13). Ce changement peut-être quantifié en comparant la variation de pression en début d'expiration avec la variation de pression en fin d'expiration.

De même, durant une bronchoconstriction, le changement au niveau du pic de débit expiratoire (PEF) est plus prononcé que celui du pic de débit inspiratoire (PIF). La formule de calcul de la Penh peut donc s'exprimer comme suit :

$$\text{Pause} = \frac{\text{TE} - \text{RT}}{\text{RT}} = \frac{\text{TE}}{\text{RT}} - 1$$

$$\text{Penh} = \text{Pause} \times \frac{\text{PEF}}{\text{PIF}} = \left(\frac{\text{TE}}{\text{RT}} - 1 \right) \times \left(\frac{\text{PEF}}{\text{PIF}} \right)$$

Où PEF: Pic de débit expiratoire
 PIF: Pic de débit inspiratoire
 Penh : (Enhanced Pause) Résistance spécifique des voies respiratoires
 TE: Temps d'expiration
 TI: Temps d'inspiration
 RT : temps de relaxation (temps nécessaire pour l'expiration des 30% de volume expiratoire en fin d'expiration).

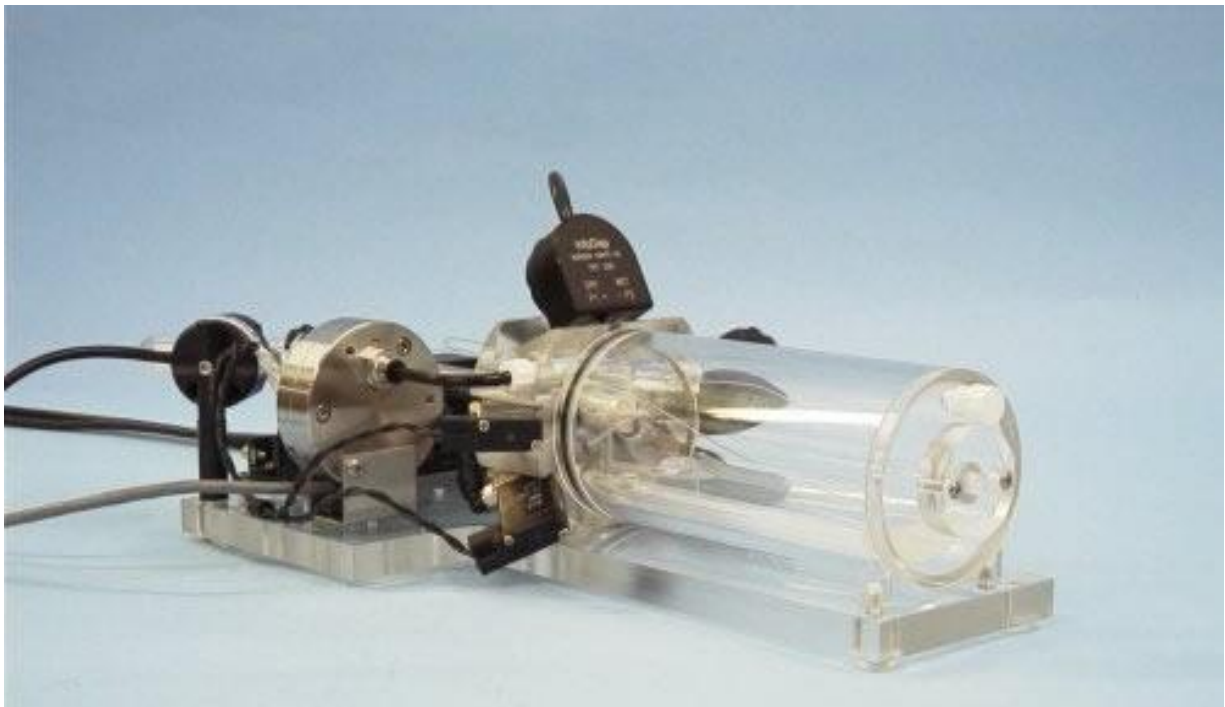


Figure 12: Photo de spiromètre moderne. Les instruments de mesures sont connectés à un espace clos pouvant contenir la souris, le temps de la mesure. Source EMMS Solutions®.

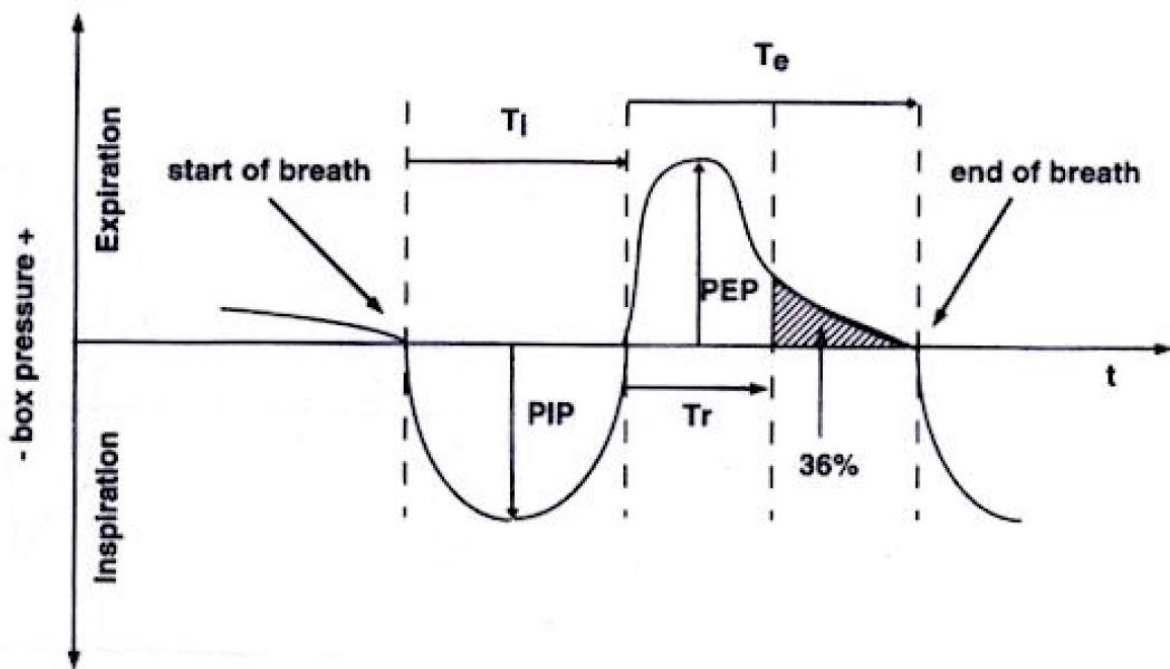


Figure 13: Courbe de pression de la chambre pléthysmographique en fonction du temps avec les paramètres intervenant dans le calcul de la Penh. Source: Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography (128).



Figure 14: Photo de pléthysmographe barométrique en chambre simple pour souris. On observe les souris en position pour la mesure. Source : site web de Therassay®.

5.2.2. LA PLETHYSMOGRAPHIE BAROMETRIQUE EN CHAMBRE DOUBLE

L'appareil de pléthysmographie barométrique en chambre double (Fig. 15) est formé de deux cellules cylindriques accolées l'une à l'autre. Une ouverture entre ces deux cellules permet de placer le sujet à tester de telle sorte que la tête et les voies respiratoires antérieures se situent dans une des chambres, on parlera de la chambre nasale de pléthysmographie. Le thorax, quant à lui, reste dans la seconde cellule, appelée la chambre thoracique de pléthysmographie. On assure l'étanchéité entre les deux chambres au moyen d'un collier de caoutchouc adapté à la taille de la souris à examiner. Chaque chambre est reliée à un transducteur de pression qui permet une mesure directe dans chaque cellule. Dans la chambre thoracique, comme dans le pléthysmographe en chambre simple, l'analyse de la courbe de pression permet de déduire les valeurs respiratoires du sujet (Tab. 7). La comparaison avec la chambre antérieure donne, par calcul, en tenant compte du temps, les valeurs de résistance des voies respiratoires antérieures.

Tout comme les précédentes, cette technique s'avère simple et non-invasive et convient donc comme technique de suivi lors de mesures répétées sur un sujet, sans influencer sur sa fonction respiratoire. Cet appareil permet de mesurer le temps séparant la dépression respiratoire antérieure et la dépression thoracique et fournit donc une mesure directe et spécifique de la résistance respiratoire (sRaw).

Les manipulations nécessaires pour mettre en place les sujets expérimentaux sont longues et délicates pour l'expérimentateur. Il doit vérifier en permanence le bon positionnement des souris dans les chambres. En effet, un mauvais positionnement de l'animal d'expérience, ou une sortie d'une des deux chambres (exemple la tête sortant de la chambre nasale pour se loger avec le thorax) peut conduire à des mesures faussées et à des résultats erronés. En raison de la contention nécessaire du sujet d'examen, cette technique occasionne dans certains cas un stress important. Ce stress peut être surmonté par une période « d'accoutumance » aux conditions d'expérimentations (102).

Le collier de séparation des deux chambres doit être judicieusement choisi pour assurer son étanchéité, mais s'il s'avère trop serré, la résistance mesurée sur les voies antérieures peut en être faussée. On ne peut pas réaliser de mesures à long terme du fait que la souris ne pourrait dans ces conditions ni boire ni manger.

La pléthysmographie barométrique en chambre double recueille les mêmes informations que son équivalent en chambre simple. Cependant, de par la présence de deux chambres et de par les mesures distinctes réalisées dans chacune d'elles, il devient possible de prendre en considération le décalage existant entre les variations de pressions survenant dans la chambre antérieure (chambre nasale) et celles de la chambre postérieure (chambre thoracique) : le temps delta. Cet atout donne accès par calcul, à des valeurs supplémentaires dont les valeurs de résistance et de conductance respiratoires spécifiques (Tab. 7). Le

temps delta représente en pratique le décalage entre la dépression respiratoire des voies antérieures et la dépression créée dans les voies respiratoires profondes.

La résistance respiratoire spécifique ou sRaw (Specific airway resistance) a été décrite en 1979 par Pennock (273). Elle est basée sur la mesure du délai entre les changements de volume de la chambre thoracique et de la chambre nasale durant un même cycle respiratoire. Ce délai dépend de la résistance des voies aériennes et de la pression de l'air.

L'avantage de la sRaw sur la Penh est d'être une mesure directe de la résistance qui possède une unité (cmH₂O•s). Cette mesure n'est pas dépendante d'une éventuelle augmentation de la résistance des voies respiratoires. Elle est influencée par les variations de résistance des voies aériennes supérieures comme la Penh, mais aussi à celles pouvant exister au niveau des voies aériennes inférieures (342). Elle est fortement corrélée (r = 0.81) aux mesures de résistance effectuées à l'aide d'un cathéter intra-pleural (273).

La valeur de la sRaw se calcule comme suit :

$$sRaw = \left(\frac{TT}{2 \cdot \pi} \right) \cdot (Patm - 47) \cdot 1,36 \cdot \tan\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot dT}{TT} \right)$$

- Où
- TT: Le temps total d'une respiration, temps mesuré du début de l'inspiration à la fin de l'expiration d'un même cycle respiratoire.
 - dT: Le délai entre les changements de volumes mesurés entre la chambre thoracique et la chambre nasale du pléthysmographe.
 - Patm: La pression atmosphérique ambiante
 - Pi: Constante Pi de valeur 3,14



Figure 15: Chambres nasale et thoracique du pléthysmographe barométrique en chambre double. On peut observer, au milieu, le joint en silicone nécessaire pour assurer l'étanchéité entre les deux chambres (Source EMKA®).

5.3. LA MESURE DE LA CAPACITÉ D'EXTRACTION DU MONOXYDE DE CARBONE

Au moment de la mise en place des expériences décrites dans ce manuscrit, le seul appareillage à notre connaissance réalisant ce type de mesure chez la souris était l'appareil commercialisé par Columbus Instruments dénommé *Carbon monoxide uptake monitor*® (Fig. 25). Le manuscrit s'appuie donc sur cet exemple précis. Le *Carbon monoxide uptake monitor*® permettait d'effectuer un suivi dans le temps du taux de gaz CO contenu dans une chambre hermétiquement close où se trouvait le sujet d'expérience (Tab. 7). Le sujet était préalablement exposé à un gaz de composition connue, dans lequel l'équipement introduisait à un temps donné un « bolus » de CO (généralement 0,1 à 0,2% du volume de la chambre). Plusieurs relevés étaient effectués durant un laps de temps court déterminé par l'expérimentateur. L'appareil était équipé pour ce faire d'un analyseur de gaz à infrarouge.

Cet équipement était également muni d'un transducteur de pression qui, avant l'exposition au CO, mesurait les paramètres respiratoires tout comme l'aurait fait la pléthysmographie en chambre simple. On pouvait donc assimiler le *Carbon monoxide uptake monitor*® à l'association entre un pléthysmographe barométrique en chambre simple et un analyseur de gaz de type monoxyde de carbone.

La mesure de la capacité d'extraction du CO ainsi que celle des autres paramètres respiratoires étaient réalisées sur deux sujets placés chacun dans une chambre indépendante. Cinq étapes alors se succédaient : le placement du sujet ; une période d'acclimatation ; la mesure des paramètres respiratoires ; la mesure de la concentration en CO et enfin la purge des chambres.

Ce modèle du commerce (Columbus Instrument®) permettait l'examen alterné de deux souris. Plus précisément, l'appareil effectuait un test sur le CO chez le sujet A pendant qu'il réalisait un relevé de type pléthysmographie sur le sujet B. Il permutait les mesures à l'issue de cette opération (site web Columbus Ins).

De par sa simplicité, le *Carbon monoxide uptake monitor*® convenait dans les mesures de paramètres respiratoires chez les animaux de laboratoire. L'exposition à de très faibles taux de CO semblant n'avoir aucun effet significatif sur les fonctions physiologiques respiratoires, l'animal pouvait subir sans danger plusieurs expositions de courtes durées (98).

Toutefois, aucune mesure de la résistance spécifique sur les voies respiratoires antérieures ne pouvait être réalisée.

Le *Carbon monoxide uptake monitor*® permettait ainsi une évaluation quantitative des capacités de diffusion gazeuse au travers de la paroi alvéolo-capillaires pulmonaire (Fig. 16).

Les paramètres classiques de la fonction respiratoire (fréquence, volumes, etc.) évaluaient la ventilation pulmonaire sans s'assurer de son efficacité en termes d'échanges gazeux avec le sang. Le *Carbon monoxide uptake monitor*® donnait une appréciation sur le bilan respiratoire puisqu'il évaluait qualitativement le passage des gaz des alvéoles jusqu'à l'hémoglobine du sang. Il donnait également une évaluation quantitative si cette mesure était réalisée dans des conditions standardisées. Ainsi, une étape clé de la fonction respiratoire - la perméabilité de la paroi alvéolaire - pouvait dès lors être évaluée. La validation de cette technique chez la souris de laboratoire constituait une avancée technologique clé pour évaluer les dysfonctions périphériques pulmonaires lors de maladies expérimentales (11) induisant une chute de la perméabilité alvéolaire.

Par la mesure de la capacité d'extraction du monoxyde de carbone (CO-uptake), on mesure le passage de l'oxygène des alvéoles vers le sang, la composante ventilatoire est ici absente (contrairement à pléthysmographie). On quantifie donc l'état de la fonction respiratoire et non les propriétés mécaniques du système respiratoire.

Cette mesure chez la souris permet de mesurer toutes les étapes de l'échange gazeux : la diffusion en phase gazeuse, la diffusion en phase liquide (à travers la membrane alvéolo-capillaire) et la réaction chimique de liaison à l'hémoglobine dans les capillaires pulmonaires.

Nous avons besoin de mesurer tout premièrement la diffusion alvéolaire du monoxyde de carbone (VCO), celle-ci est en fait une mesure de conductance et s'exprime en (ml*mmHg⁻¹*min⁻¹). Elle exprime la vitesse de passage du monoxyde de carbone au-travers de la paroi alvéolo-capillaire par diffusion (Fig. 16). VCO dépend du volume pulmonaire qui participe aux échanges gazeux (en fait la capacité résiduelle fonctionnelle ou RFC) et du coefficient d'échange (Kgas), qui représente le pourcentage de monoxyde de carbone capté par unité de temps (221).

La diffusion alvéolaire du monoxyde de de carbone (V_{CO}) se calcule donc selon:

$$\dot{V}_{CO} = (\%CO_I - \%CO_F) \times 0.6 \times CF_{He}$$

$$CO-Utptake = \frac{\dot{V}_{CO}}{P_{ACO} - P_{aCO}}$$

Où %CO_I est le pourcentage de monoxyde de carbone initial (au début de la période allouée à l'inspiration)

%CO_F est le pourcentage de monoxyde de carbone final

CF_{He} est le facteur de correction pour l'hélium.

Au départ de la connaissance de la diffusion alvéolaire du monoxyde de carbone (V_{CO}), on peut calculer le CO-uptake

Où P_{ACO} est la pression alvéolaire moyenne en CO

P_{aCO} est la pression capillaire moyenne en CO

Les valeurs de P_{ACO} et P_{aCO} ne sont pas mesurables chez la souris malade, mais elles peuvent être estimées chez la souris saine. La P_{ACO} diffère peu de la pression partielle en CO inspiré et peut être considérée comme la moyenne des pressions partielles initiale et finale à l'inspiration. La P_{aCO} est très faible et peut donc être considérée comme nulle (74).

Les pathologies perturbant la diffusion des gaz dans le sang peuvent influencer le CO-uptake (hypothèse de ce travail et Tab.5) (98). Certains paramètres peuvent influencer sur le CO-uptake en dehors de toute pathologie pulmonaire (66) : ainsi i) la concentration en hémoglobine est un paramètre dont il faut tenir compte car lorsque la concentration en hémoglobine augmente, l'absorption de CO augmente également, ii) les souches de souris présentant des variations en taux d'hémoglobine, chaque souche possède donc sa propre valeur de référence de CO-uptake (406), iii) l'absorption de CO est proportionnelle à la surface alvéolaire (332). En effet, au plus il y a d'alvéoles développées, au plus la surface de diffusion augmente et donc le CO-uptake augmente. Néanmoins on constate que lorsque les espaces alvéolaires sont élargis comme lors d'emphysème, le CO-uptake est diminué (201).

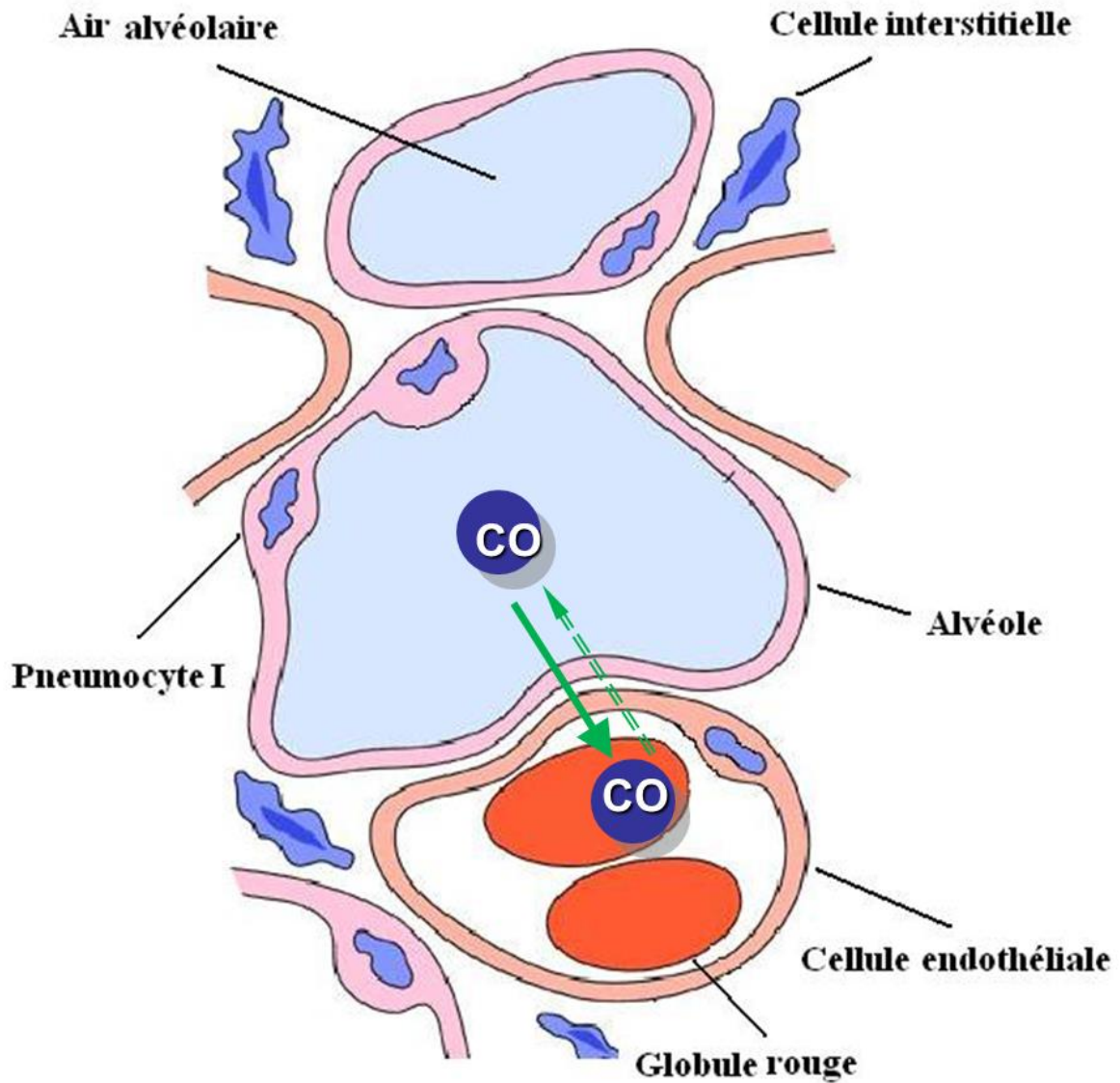


Figure 16: Passage du CO au travers de la barrière alvéolo-capillaire par diffusion. Le passage est théoriquement possible dans les deux sens, néanmoins, la forte attractivité du CO pour l'hémoglobine et la liaison covalente qui s'ensuit rend la diffusion retour vers l'espace alvéolaire largement minoritaire, voir négligeable.

VI. CONCLUSIONS SUR LES APPROCHES INVASIVES ET NON-INVASIVES DES EXPLORATIONS RESPIRATOIRES FONCTIONNELLES CHEZ LA SOURIS

L'évaluation quantitative de la fonction pulmonaire chez les rongeurs (et plus fréquemment chez la souris) est un outil important dans la recherche expérimentale et dans le développement de futures thérapies (206). C'est à ce titre que les investigations fonctionnelles intéressent tout particulièrement le pathologiste et le toxicologiste. L'étude de ces variations fonctionnelles est un atout majeur dans l'évaluation des suites d'une exposition à un toxique, par inhalation par exemple. Très rapidement, les tests physiologiques visant à évaluer la fonction pulmonaire ont été développés ou adaptés pour les animaux de petite taille tels que les rongeurs de laboratoire.

L'ensemble des tests respiratoires appliqués chez la souris de laboratoire sont hérités des tests réalisés en médecine humaine ou à défaut en médecine vétérinaire des animaux domestiques. Leurs utilisations, l'interprétations des résultats qui en sont issues sont basées sur le postulat que les principes de mécanique respiratoire et de physiologie restent similaires chez la souris (206).

On aura compris que le but final du système respiratoire est de permettre le transport de l'oxygène depuis l'air ambiant vers le sang et de permettre l'oxygénation des tissus. On peut grossièrement, subdiviser "la respiration", en deux étapes mesurables, ceci par différentes techniques.

La première étape est la ventilation qui est l'apport de l'oxygène dans le parenchyme pulmonaire et l'élimination du gaz carbonique de ce dernier. Elle est évaluée par la spirométrie, les volumes pulmonaires et la résistance des voies aériennes. La seconde étape, la diffusion, débute avec le transfert de l'oxygène depuis les alvéoles vers le sang dans les capillaires pulmonaires et elle est établie par la mesure des gaz sanguins.

Une multitude de techniques sont utilisées chez les animaux de grande taille ainsi que chez l'homme mais ne peuvent être aussi facilement appliquées aux souris sans compromettre la validité des valeurs ou sans respecter les conditions physiologiques de celle-ci.

Si on tient donc compte des avantages et des inconvénients de ces techniques, on constate que pour la souris, en ce qui concerne la ventilation pulmonaire, il existe deux techniques d'une très grande précision considérées comme des standards: la méthode endotrachéale et celle dite «à oscillations forcées». Concernant la diffusion des gaz respiratoires, la technique la plus précise est la mesure des gaz sanguins (mesure du taux d'oxygène et du taux de dioxyde de carbone, notamment).

Cependant, il est communément admis que ces techniques invasives induisent des modifications fonctionnelles (suite à l'anesthésie généralement utilisée dans ce type de mesures par exemple) et ne permettent pas toujours des mesures répétées (nécessité d'euthanasier l'animal) au cours de l'expérience (59, 122). Pour ces raisons, des techniques non-invasives ont été mises au point pour la mesure de la ventilation pulmonaire, il s'agit de la pléthysmographie en chambre simple (244) ou en chambre double (273). Dans la perspective de mesurer les gaz diffusants dans l'alvéole, à notre connaissance aucun appareillage n'était disponible, hormis la technique de CO-uptake (74) sous réserve qu'elle soit en mesure de quantifier le CO capté par le sang, donnant ainsi une appréciation de la perméabilité alvéolaire.

Chaque outil a donc des avantages et des limites (Tab 7). Dans notre étude, le pari initial est d'associer la pléthysmographie en chambre double, démontrée comme fiable dans l'évaluation fonctionnelle respiratoire (102) avec la mesure du CO-uptake (406) afin d'obtenir une complémentarité avantageuse.

De ces premières constatations dans la littérature nous pouvons formuler et d'ores et déjà répondre à la question sous-jacente à tout ce travail :

Q 0— Existe-il un intérêt à utiliser une technique d'évaluation fonctionnelle pulmonaire non-invasive, plutôt qu'une technique invasive ?

Réponse à la question Q 0 ci-après

La réalisation du présent travail implique que nous répondions d'emblée « oui » à cette question. Il nous incombe dès lors de rencontrer les objectifs suivants qui en découlent logiquement :

- ✓ Comblent le manque d'information au sein de la littérature, en validant pour la première fois, le *Carbon monoxide uptake monitor*® chez la souris et en établissant des valeurs de référence ;
- ✓ Etablir si celui-ci est d'intérêt dans l'évaluation des effets d'une infection respiratoire ;
- ✓ Etablir son apport spécifique dans une démarche de diagnostic.

C'est l'objectif visé et rencontré en partie par la publication : *A critical appraisal of monoxide uptake measurements for the follow-up of experimental respiratory diseases in the laboratory mouse* (406), réalisée sur base de nos résultats. Les résultats de cette publication sont repris tels quels à l'issue de ce manuscrit mais on retrouve ces résultats réorganisés ici, afin de comprendre les questions posées et les réponses apportées au cours de ce travail.

Tableau 10: Avantages et inconvénients des méthodes invasives et non-invasives

Méthode	Avantages	Inconvénients
INVASIVE	<p>Sensibles et adaptées à la mesure de la mécanique respiratoire</p> <p>Basée sur les principes de physiologie</p> <p>Respect des connections anatomiques du poumon</p> <p>On court-circuite la résistance des voies respiratoires supérieures, ventilation contrôlée, administration de substances pharmacologiques via la trachée.</p> <p>La récolte d'échantillons de lavages broncho-alvéolaires est aisée</p> <p>Mesures répétées et mesures long terme possibles sur des animaux intubés</p> <p>Applicable sur les pathologies obstructives et restrictives des voies respiratoires</p>	<p>Nécessite un équipement adapté et important (sondes, instruments adaptés à la trachée chez la souris)</p> <p>Nécessite une instrumentation adaptée et une anesthésie de l'animal</p> <p>La mise en place nécessite beaucoup de temps</p> <p>Pas de mesures répétées chez les animaux trachéotomisés</p> <p>Nécessite une certaine habitude</p>
NON- INVASIVE	<p>Rapide et manipulations aisées</p> <p>Mesures répétées et/ou prolongées dans le temps de la réponse respiratoire possible avec le même animal.</p> <p>Etablissement des valeurs de base sans anesthésie ou d'une instrumentation trachéale</p>	<p>Pas d'accès direct aux valeurs de mécanique pulmonaire</p> <p>Sensibles aux artéfacts (mouvements, température)</p> <p>La résistance des voies respiratoires supérieures est tenue en compte (changements dans l'ouverture de la glotte ; passages des voies nasales)</p> <p>Incertitude sur l'intensité exacte et sur la localisation des phénomènes de bronchoconstriction</p>

Source: Glaab et al. (123)

VII. MODÈLES INFECTIEUX À VIRUS RESPIRATOIRES

Au sein du laboratoire de pathologie, une maîtrise a été acquise en matière d'infections virales respiratoires expérimentalement induites chez la souris de laboratoire (48, 93, 94, 125). Il était naturel que ce soit au sein de ces modèles établis et pour certains éprouvés, que nous fassions un choix pour nos essais. Les modèles d'infections respiratoires expérimentalement induites chez la souris à l'aide du Respirivirus Murin (anciennement Sendai virus, SeV ou Parainfluenza virus type 1 ou encore Virus hémagglutinant du Japon, HVJ) et à l'aide du virus Influenza A murinisé, ayant été étudiés au sein du laboratoire, ils nous ont semblé adéquats du fait des manifestations cliniques différentes qui en résulteraient. Cette situation explique également l'orientation dans notre exploration de la littérature.

Au sein de ce travail, la souche de Respirivirus Murin (RM) a été acquise auprès de la société ATTC. Ce virus a notamment été utilisé comme agent pathogène dans un modèle d'infection expérimentalement induite et a également servi comme agent de comparaison avec le virus Influenza murinisé. Une revue de littérature détaillée sur le Respirivirus Murin avait déjà été publiée par le laboratoire (94, 96).

7.1. Modèle à Respirivirus murin (RM)

Le Respirivirus Murin (RM) a été initialement nommé d'après la ville de Sendai (Japon) où il a d'abord été isolé chez la souris. Historiquement, l'infection s'est avérée relativement commune dans les colonies de souris et de rats du monde entier. Il existe des preuves que les hamsters, les cochons d'Inde et les lapins soient susceptibles d'être également infectés (220, 275).

Le RM a été choisi au cours de cette expérimentation car suffisamment caractérisé et maîtrisé au sein de notre laboratoire. Il a constitué un outil de choix afin de tester la technique de mesure du CO₂-uptake que nous souhaitions valider chez la souris en situation d'infection virale respiratoire.

Le RM est un virus de la famille des *Paramyxoviridae*. Il regroupe les principales caractéristiques biologiques, biochimiques et moléculaires. Il fait partie du genre Respirivirus (311) et est un pathogène respiratoire commun endémique chez la souris (son hôte naturel). Il est la cause principale de pneumonies et représente l'une des infections naturelles les plus fréquentes de la souris.

Le RM est pneumotropique et provoque une maladie respiratoire importante. Le pneumotropisme est partiellement une conséquence de l'action de la sérine protéase respiratoire telle que la tryptase Clara, qui active le caractère infectieux viral par un clivage spécifique de la glycoprotéine de fusion virale (350).

7.1.1. Morphologie et structure

Le RM est un virus de 150 à 200 nm de diamètre (20). La particule virale est composée d'une enveloppe lipoprotéique entourant une nucléocapside non segmentée (Fig. 17). L'enveloppe virale est quant à elle composée d'une double couche de lipides contenant différentes protéines virales (F, HN et M), entourant une nucléocapside et contenant le génome viral constitué d'un ARN monocaténaire de polarité négative. La nucléocapside contient trois protéines majeures : NP, P et L (195, 311). Il n'est pas pathogène pour les humains ou les animaux domestiques autres que la souris, le rat, le hamster, le cochon d'Inde et le lapin.

7.1.2. Cycle biologique

Le RM se réplique principalement dans l'épithélium respiratoire même si le récepteur pour le RM figure sur d'autres cellules et sur d'autres organes (350, 351). La protéase activant la protéine F (tryptase Clara) est seulement présente au niveau de l'épithélium respiratoire, ce qui explique le tropisme du RM pour l'appareil respiratoire (195, 352).

Le comportement de bourgeonnement apical du RM peut empêcher la propagation du virus dans les tissus sous-épithéliaux et ensuite dans les organes éloignés via le sang.

La protéine F de RM est une glycoprotéine membranaire de type I qui est synthétisée sous forme de précurseur inactif (F0) qui doit être activée par clivage protéolytique au niveau du résidu arginine-116 (94). Après le clivage, le précurseur F0 donne deux sous-unités F1 et F2 liées par un disulfure. Les paramyxovirus utilisent différentes protéases de la cellule hôte pour activer leurs protéines F. Le virus RM utilise des protéases activatrices qui sont des sérines endopeptidases représentées par la tryptase bêta 2 (353). Il est très probable que le facteur de coagulation sanguine X (F10) soit capable de cliver et d'activer RM F0 (264). Il est possible que d'autres protéases cellulaires, non encore identifiées, puissent également traiter la protéine F0 de RM.

Les souches de Respirivirus, qui présentent la protéine HN dans leurs enveloppes, utilisent l'acide sialique comme récepteur d'entrée dans la cellule. RM, utilise des molécules contenant des résidus d'acides sialiques tels que des glycoprotéines et des gangliosides. RM peut également, via des lectines, pénétrer les cellules cibles. Comme RM est un virus à ARN à brin négatif, le cycle de vie complet du virus est achevé dans le cytoplasme de la cellule hôte en utilisant sa propre ARN polymérase.

Le RM initie le processus d'infection par adsorption de la cellule hôte médiée par la reconnaissance de molécules de récepteurs spécifiques. L'hémagglutinine neuraminidase (HN) sert de protéine d'attachement virale qui interagit avec un récepteur d'entrée spécifique de la cellule. NH a une activité sialidase et cette protéine est capable de cliver les résidus d'acide sialique du récepteur cellulaire (265). Ce clivage déclenche le processus de fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire, ce phénomène est favorisé par la coopération de NH avec la protéine de fusion virale (F). Pour réaliser la fonction de fusion, la protéine F doit être préalablement activée par protéolyse (194). Cette activation nécessite un clivage de F0 avant l'adsorption du virus.

Après la fusion de la membrane de l'hôte et de l'enveloppe virale, le RM, selon un modèle, est «non enrobé» et il y a diffusion des protéines de l'enveloppe virale dans la membrane plasmique de l'hôte. Selon un autre modèle, le virus ne libère pas ses protéines d'enveloppe dans la membrane hôte car les membranes virales sont fusionnées et une structure de connexion est alors créée. Cette structure de connexion sert de « route » de transport pour la ribonucléoprotéine virale (RNP). Ainsi, la RNP se déplace à travers la structure de connexion pour atteindre l'intérieur de la cellule, permettant au matériel génétique de RM d'entrer dans le cytoplasme de la cellule hôte (168).

Une fois dans le cytoplasme, l'ARN génomique de RM sert de modèle dans deux processus de synthèse d'ARN différents réalisés par l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (ce sont les protéines L et P): (1) transcription pour générer des ARNm et (2) réplication pour produire un ARN antigénome de sens positif qui à son tour agit comme un modèle pour la production de génomes à brin négatif de la descendance (262).

On pense que la protéine NP possède des rôles à la fois structurels et fonctionnels. La présence de cette protéine est censée réguler le passage de la transcription de l'ARN et sa réplication. L'ARN génomique fonctionne comme modèle pour la transcription de l'ARN viral jusqu'à ce que la protéine soit présente en suffisance. Au fur et à mesure que la protéine NP s'accumule, la transition du processus de transcription vers le processus de réplication est effective (305).

Deux ensembles différents de protéines sont traduits à partir de l'ARNm viral: le premier ensemble est représenté par six protéines structurales qui sont la protéine de nucléocapside (NP), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la protéine de fusion (F), la neuraminidase (NA) et la grande protéine (L). Toutes ces protéines ont des fonctions variables et sont incorporées dans la capsid virale. Le deuxième ensemble est représenté par sept protéines non structurales ou accessoires qui sont traduites à partir de l'ARNm polycistronique du gène P. Cet ARNm code pour huit produits de traduction et la protéine P n'est que l'un d'entre eux. D'autres variantes de traduction sont représentées par les protéines V, W, C, C', Y, Y' et X. Les protéines C', C, Y1, Y2 sont des produits du cadre de lecture alternatif de l'ARNm, elles sont collectivement appelées protéines C ou protéines nichées C et partagent une extrémité C-terminale commune (94).

Toutes ces protéines non structurales ont de multiples fonctions, notamment l'organisation de la synthèse de l'ARN viral, l'aide au virus pour infecter les cellules hôtes et notamment pour lui permettre d'échapper à l'immunité de l'hôte (Tab. 11) (118).

7.1.3. La pathogénie

Le virus est responsable d'une infection des voies respiratoires supérieures, hautement transmissible chez la souris, le hamster, le cobaye, le rat (94) et ce par contact direct.

Prévalence dans les animaleries

Le virus peut être détecté dans les colonies de souris du monde entier (407), généralement chez les jeunes souris allaitantes. Une étude en France a rapporté la présence d'anticorps anti-RM dans 17% des colonies examinées (404). Les infections de types épizootiques chez la souris sont généralement associées à un taux de mortalité élevé, tandis que les infections de types enzootiques suggèrent que le virus serait latent et pourrait éventuellement être éliminé dans un délai d'un an (94). Une exposition à une charge virale sublétales

de RM peut déclencher une immunité de longue durée, efficace contre de nouvelles expositions au virus (117).

Symptômes, diagnostic et prophylaxie

On observe généralement les symptômes suivants :

- ✓ Des éternuements
- ✓ Une posture voûtée
- ✓ De la détresse respiratoire et/ou une dyspnée
- ✓ De la léthargie et de l'anorexie
- ✓ Un développement ralenti chez les nouveau-nés et les jeunes animaux ayant échappé à la mortalité du virus.

Le RM induit des lésions dans les voies respiratoires, elles sont généralement associées à une inflammation et liées à une surinfection bactérienne de la trachée et du poumon. Cependant, les lésions sont limitées et ne sont pas pathognomoniques d'une infection à RM. La détection du virus vise donc des antigènes spécifiques du RM dans plusieurs méthodes sérologiques : les tests ELISA, les tests d'immunofluorescence et les tests d'hémagglutination. La préférence est nettement marquée pour l'utilisation des tests ELISA, ceci pour leur haute sensibilité (par opposition au tests d' hémagglutination, faiblement sensibles) et leur précocité pour la détection du virus (par opposition au test d'immunofluorescence par exemple) (189). L'infection par le RM est à considérer comme hautement contagieuse chez la souris.

Les différentes souches de RM n'ont pas la même virulence, laquelle proviendrait de variations au niveau de la protéine de fusion F et de la protéine C responsables de l'inactivation de la réponse antivirale par l'interféron. La souche de souris est également importante de même que sa compétence immunitaire (96, 291). La cavité nasale présente une légère hyperplasie de l'épithélium respiratoire avec infiltration de la *lamina propria* par des cellules inflammatoires. Les lésions évoluent rapidement en desquamations accompagnées de nécroses. La trachée et les bronches sont plus sévèrement affectées, avec une nécrose de l'épithélium respiratoire suivie de l'hyperplasie de ce dernier. La sous-muqueuse est massivement infiltrée de cellules inflammatoires (essentiellement des lymphocytes). Les lésions, incluant une trachéite et une bronchopneumonie pouvant aller de moyenne à sévère, ont été observées à différents niveaux de l'arbre respiratoire chez la souris (12, 163, 295).

Deux profils épidémiologiques de l'infection au RM ont été reconnus dans des conditions naturelles. Un de type enzootique (subclinique) et un autre de type épizootique (cliniquement apparent) (43). Les infections enzootiques se produisent généralement au sein des souches de souris élevées en consanguinité ou dans les colonies ouvertes. Dans ces deux situations, l'approvisionnement constant d'animaux sensibles perpétue l'infection. Dans les colonies nicheuses (colonies où les individus forment des nids et limitent les

déplacements des jeunes souriceaux), les souris sont infectées rapidement après le sevrage alors que les taux d'anticorps maternels diminuent. Normalement, l'infection est subclinique. On observe que le virus persiste pendant environ 2 semaines, les animaux présentent une séroconversion qui se poursuit pendant un an ou plus.

En général, aucun signe clinique n'est observé chez les souris des colonies infectées de manière endémique. Dans les infections cliniquement apparentes, les signes sont variables mais peuvent inclure une détresse respiratoire légère, une respiration difficile, une diminution de la fécondité chez les adultes, des décès (éventuellement des portées entières) chez les nouveau-nés et les jeunes animaux de moins de 3 semaines d'âge, une faible croissance chez les souris sevrées et les jeunes souris adultes. Chez les souris DBA/2 et chez les souris immunodéficientes, l'infection est généralement mortelle. Les souris C57BL/6 sont plutôt résistantes et expriment moins les signes cliniques de la maladie. Ce virus est immunosuppresseur et prédispose donc aux infections bactériennes secondaires.

Les infections épizootiques se produisent lors de la première introduction du virus dans une colonie. Les souris meurent après 2 à 7 mois ou deviennent enzootiques (autoguérison) selon les conditions de tenue de la colonie. La forme épizootique est généralement aiguë et la morbidité est très élevée, ce qui fait que presque tous les animaux sensibles deviennent infectés en peu de temps.

Les signes cliniques varient et comprennent un pelage rugueux et une posture voûtée. Les souris présentent une détresse respiratoire marquée. Lors de gestation, celle-ci est prolongée dans le temps et la mort des nouveau-nés est fréquemment observée. Il n'y a pas de preuve d'infection persistante chez les souris immunocompétentes, mais une infection persistante ou prolongée peut survenir chez des souris immunodéprimées et peut entraîner la mort en raison d'une pneumonie évolutive (274). Histologiquement, trois phases de la maladie peuvent être reconnues chez les souris sensibles : les phases aiguës, réparatrices et de résolution (20).

Les lésions de la phase aiguë qui dure de huit à douze jours sont principalement attribuées à la réponse immunitaire à médiation cellulaire qui détruit les cellules épithéliales respiratoires infectées. On observe de la rhinite, de la trachéite, de la bronchiolite et des lésions d'alvéolite exsudative.

La phase réparatrice peut chevaucher la phase aiguë mais elle ne peut se poursuivre au-delà de la troisième semaine après l'infection. Elle se caractérise par une régénération excessive de l'épithélium des voies respiratoires. L'hyperplasie adénomateuse et la métaplasie squameuse qui s'installent dans les bronchioles terminales et les alvéoles sont à considérer comme des signes caractéristiques de la pneumonie à RM. Les

infiltrats de cellules inflammatoires mixtes durant cette phase sont localisés dans les espaces interstitiels plutôt que dans les espaces alvéolaires.

La phase de résolution est complète à la quatrième semaine après l'infection et les lésions de cette phase peuvent s'avérer difficiles à identifier par la suite. Les lésions persistantes résiduelles qui peuvent survenir comprennent de l'alvéolite et des lésions de bronchiolite fibreuse oblitérante. Les structure des alvéoles et des bronchioles sont alors remplacées par du collagène et des fibroblastes. Ces débris représentent des tentatives d'organisation et de confinement des débris nécrotiques comprenant surtout de la fibrine (381). Durant cette phase de résolution, les lésions observées sont alors de la bronchiolite proliférative et une accumulation de monocytes-lymphocytes dans les espaces alvéolaires adjacents. On observe également des manchons périvasculaires caractéristiques des affections virales, formés de monocytes et de lymphocytes (291).

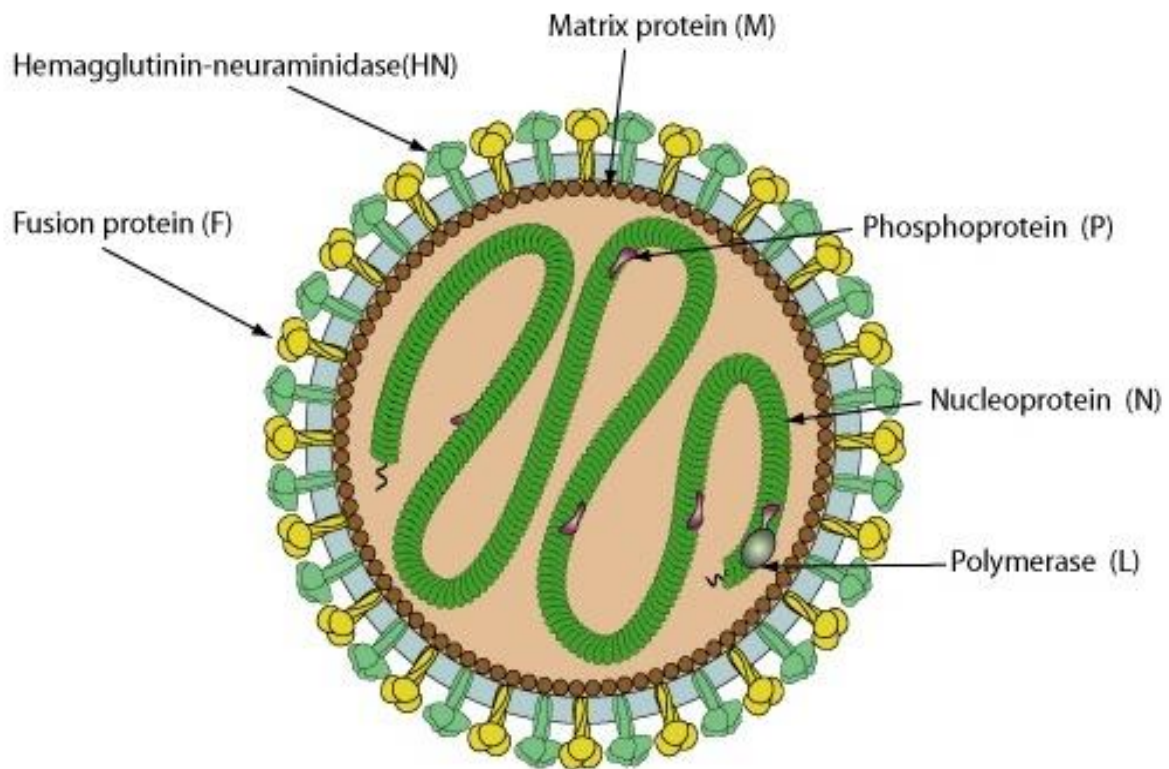


Figure 17 : Schéma de la structure du Respirivirus murin. Le RM est un virus enveloppé, pléomorphe, sphérique ou filamenteux de la famille des *Paramyxoviridae*. Il a un génome d'ARN monocaténaire qui code pour six protéines dont une glycoprotéine HN de surface avec des fractions hémagglutinine, une neuraminidase responsable de l'adsorption sur les cellules hôtes et une glycoprotéine F de surface qui facilite la fusion cellulaire. Elle est importante pour l'entrée du virus (43). Source : *Other Negative-Strand RNA Viruses* (305).

RM en tant qu'agent infectieux

La réplication du RM se produit exclusivement dans le cytoplasme de la cellule hôte. Le virus utilise sa propre ARN polymérase. Un cycle de réplication prend environ 12 à 15 heures, une cellule produisant des milliers de virions (407).

Sensibilité au RM et évolution de l'infection

Les souches de souris consanguines ont une sensibilité très différente à l'infection par le virus (45). Les souris 129/J testées étaient environ 25 000 fois plus sensibles que les souris SJL/J. Les souris C57BL/6J se sont avérées très résistantes au virus tandis que les souris DBA/2J y étaient sensibles. Un taux de mortalité de 10% seulement a été observé chez les souris C57BL/6J après l'administration d'une dose élevée de 10^5 TCID₅₀ (12, 269, 327). Le traitement des deux souches avec une IFN exogène avant et pendant l'infection virale a conduit à une augmentation du temps de survie chez les souris C57BL/6J mais les animaux des deux souches ont finalement succombé à la maladie causée par RM. Toutefois, il apparaît que, si une souris parvient à survivre à l'infection, celle-ci développe par la suite, une immunité à vie contre les infections virales ultérieures (310).

Dans les voies respiratoires de l'hôte, le titre du virus atteint un pic après cinq à six jours après le début de l'infection qui diminue à des niveaux indétectables au jour 14. Le virus favorise une infection respiratoire descendante, qui commence dans les voies nasales, traverse la trachée vers les poumons et provoque une nécrose de l'épithélium respiratoire. La nécrose est légère au cours des premiers jours de l'infection mais est devenue plus tard sévère, en atteignant un pic vers le jour 5. Au jour 9, les cellules de la surface des voies respiratoires se régénèrent. La pneumonie interstitielle focale peut se développer, accompagnée d'une inflammation et de lésions de divers degrés au niveau pulmonaire (339).

Le virus est un puissant immunomodulateur. Le RM peut agir dans les deux sens: il peut activer ou supprimer la réponse immunitaire en fonction du type de cellule de l'hôte et de la période suivant le début de l'infection. Le virus peut supprimer la production d'IFN et les voies de réponse ainsi que la voie de l'inflammation.

Le génome de RM code pour les protéines antagonistes immunitaires V et C qui inhibent l'activation de l'interféron des cellules infectées (Tab 12). La protéine V interfère avec la signalisation MDA5 et RIG-1 inhibant la transcription de l'IFN de type I. La protéine C inhibe la réponse aux IFN de type I dans la cellule infectée en se liant aux récepteurs IFN de type I. À la suite d'une infection par des cellules RM, elles produisent de petits niveaux d'IFN de type I et un nombre très limité de produits de gènes immunostimulés (ISG).

Tableau 11 : Protéines virales impliquées dans l'immunosuppression chez l'hôte

PROTEINE	LIAISON AVEC	EFFET
PROTEINE C	IKKα sérine/thréonine kinase sous-unité 2 du récepteur de l'interféron alpha / bêta (IFNAR2) Domaine N-terminal de STAT1	La liaison empêche la phosphorylation de l' IRF7 et inhibe une voie qui comprend un récepteur Toll-like (TLR7) et TLR9 -induction d'IFN alpha dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes La liaison inhibe la phosphorylation de la tyrosine stimulée par IFN α des kinases TYK2 et JAK1 associées aux récepteurs en amont La liaison supprime les voies de transduction du signal de l' interféron alpha/bêta (IFN α/β) et IFN γ La protéine C inhibe la production d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages murins qui ont une activité cytotoxique contre les virus La protéine C diminue la génération d'ARNdb, c'est pourquoi elle maintient la PKR inactive pour maintenir la traduction des protéines dans la cellule hôte
PROTEINE V	MDA5 RIG-I TRIM25	La liaison inhibe l'activation MDA5 en aval du promoteur de l'IFN La liaison empêche la signalisation RIG-I en aval de la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS) en perturbant l'ubiquitination (modification biochimique pour aboutir à la fixation covalente d'une ou de plusieurs protéines) de RIG-I médiée par TRIM25. La liaison supprime la NO synthase inductible (iNOS) via la voie RIG-I/TRIM25 et diminue la production d'oxyde nitrique (NO) dans les macrophages infectés. La protéine V supprime la production d' interleukine-1 β en inhibant l'assemblage de NLRP3.

Source : Loss of V protein expression in human parainfluenza virus type 1 is not a recent event (296)

Le virus empêche la production d' IFN de type 1 et l'apoptose cellulaire subséquente en réponse à une infection virale en inhibant l'activation de l'IRF-3 (161, 177, 183). L'activité anti-IFN de la protéine C est partagée dans la famille des *Paramyxovirinae* et semble donc jouer un rôle important dans l'évasion immunitaire des paramyxovirus (395).

7.1.4. Perspectives

Sur le plan de sa pathogénie, le RM est perçu comme un pathogène respiratoire commun qui est endémique dans de nombreuses colonies de rongeurs. Actuellement, on pense que RM est la principale cause de pneumonie chez la souris, avec le virus de l'hépatite murine, lui aussi très répandu ; ce sont les causes les plus importantes des infections naturelles chez la souris (94).

La communauté scientifique considère le RM comme l'exemple type de la famille des *Paramyxoviridae* car la plupart des propriétés biologiques découvertes au sein de ce groupe sont en lien direct avec les structures

mises en évidence chez le virus RM. Récemment, l'intérêt scientifique pour cet ancien pathogène est réapparu, cette fois en raison de sa valeur potentielle en tant que vecteur de transfert de gènes (34).

De nombreuses preuves s'accumulent chez l'homme indiquant que des facteurs génétiques sont impliqués à la fois dans le contrôle des maladies infectieuses et dans la régulation des niveaux d'infection et de leur évolution clinique, comme le démontrent les différences de sensibilités ethniques et familiales aux infections par les agents pathogènes (2, 6, 321). Ce phénomène est particulièrement observé dans les régions où les affections sont endémiques (116, 281, 282).

L'identification des gènes qui contrôlent la réponse inflammatoire pulmonaire aux paramyxovirus est une étape cruciale pour élucider la possible affectation des processus physiopathologiques sous-jacents et la gravité des cas cliniques observés. Étant donné que la sensibilité aux infections est généralement une caractéristique génétique contrôlée par plusieurs gènes, le défi serait de la décomposer en phénotypes mesurables supposément monogéniques et à en étudier la distribution et leur expression. Sur un plan théorique, une telle entreprise se ferait plus efficacement en étudiant des gènes comparables chez différentes souches de souris de laboratoire (42).

RM en tant qu'agent oncolytique

La thérapie anticancéreuse basée sur le RM possède des propriétés oncolytiques démontrées dans des modèles animaux et dans des cancers naturels observés chez les animaux et rapportés dans la littérature scientifique (158). Les études décrites démontrent que le virus a le potentiel de devenir un agent thérapeutique sûr et efficace contre un large éventail de cancers humains. Une stabilité génomique élevée du RM est un trait très souhaitable pour les virus oncolytiques. La réplication cytoplasmique du virus entraîne un manque d'intégration et de recombinaison du génome de l'hôte, ce qui fait de RM un candidat plus sûr et plus attractif pour l'oncolyse thérapeutique largement utilisée par rapport à certains virus à ADN ou rétrovirus (175).

Le virus est infectieux pour de nombreuses lignées de cellules cancéreuses et possède des propriétés oncolytiques démontrées dans des modèles animaux (175). La capacité de RM à faire fusionner les cellules eucaryotes et à former ainsi un syncytium a été utilisée pour produire des cellules hybridomes capables de fabriquer des anticorps monoclonaux en grandes quantités (185). Les applications récentes des vecteurs utilisant RM incluent la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites et la création de vaccins (110).

À des fins de vaccination, les constructions à base de virus RM peuvent être administrées sous forme de gouttes nasales, ce qui peut être un avantage quand on souhaite induire une réponse immunitaire via les

surfaces muqueuses. Il présente plusieurs caractéristiques avantageuses : il ne s'intègre pas dans le génome de l'hôte, ne subit pas de recombinaison génétique, ne se réplique uniquement que dans le cytoplasme, sans intermédiaires ADN ou une phase nucléaire et enfin, il ne provoque pas de maladie décelable chez l'homme ou chez les autres animaux domestiques non-rongeurs.

Le RM a été utilisé pour le développement d'un vaccin contre *Mycobacterium tuberculosis* (154), contre le VIH-1 ainsi que contre le virus respiratoire syncytial (RSV) (304).

7.2. MODÈLE À VIRUS INFLUENZA A

Les premières observations de phénomènes pathologiques causés par un agent infectieux du groupe Influenza datent des années 1930 (129, 414). Depuis cette époque, les chercheurs n'ont cessé de mettre au point des méthodes permettant d'étudier ce type de virus dans un environnement maîtrisé et donc dans des conditions dites « de laboratoire ». Cette démarche va de pair avec le développement de modèles animaux présentant chacun leurs avantages. Le premier succès de cette démarche a été l'infection de furets par instillations intranasales de matériel infectieux, issu de frottis de gorge de patients grippés (129, 414).

A la suite de cette découverte, les réactions de plusieurs autres mammifères ont été largement étudiées et caractérisées afin de servir de modèles animaux dans les recherches sur les virus Influenza. A ce jour, de nombreuses données ont été collectées, tant sur les souches virales, sur les hôtes possibles ainsi que sur leurs éventuelles combinaisons.

Pour étudier un aspect spécifique lié à une infection à virus Influenza A et ainsi répondre à une question précise, il faut choisir soigneusement son modèle animal et déterminer les conditions optimales d'expérimentations. Afin de réaliser le choix le plus judicieux, il faut préalablement avoir une bonne connaissance de la pathogénie du virus, ceci tant au sein de l'espèce animale choisie que chez l'homme. Parmi les modèles historiques développés, on pointera l'usage du porc (218) et des primates non humains (macaques Rhésus, singes verts d'Afrique) (176).

En dehors de ces modèles, plusieurs autres espèces animales ont été occasionnellement utilisées pour les études sur le virus Influenza. L'un des modèles animaux le plus prisé a été le cobaye (213) qui est l'animal idéal pour les études portant sur la transmission du virus. Dans ce modèle, le virus se réplique dans les voies respiratoires supérieures à des titres élevés. Un autre avantage de ce modèle est que le cobaye est très docile et relativement petit, ceci en comparaison avec le furet par exemple. Cela permet un plus grand nombre d'animaux par groupe d'étude. Il a été démontré que les virus Influenza B se transmettent bien également chez le cobaye, ce qui en fait un modèle de choix et pratiquement le seul disponible pour l'étude de la transmission des virus Influenza B (277). Par contre, les cobayes ne présentent pas de signes cliniques après

infection et sont donc de moins bons modèles pour tester l'efficacité d'un vaccin. Ils restent toutefois des outils précieux pour l'étude de l'impact des vaccins dans les phénomènes de contagion.

Les virus Influenza sont généralement associés aux maladies dénommées « gripes », cette désignation est peu précise et ne semble pas être exclusive, certains virus du groupe des rhinovirus bénéficiant également de cette appellation (408).

D'autres petits rongeurs comme les hamsters (68) et les sigmodons (87) ont également été mis brièvement à l'étude. Enfin, des espèces d'importance agricole comme les poules et les oies ont été utilisées pour tester les vaccins contre la grippe aviaire (346). Des infections utilisant des pigeons (330) et des essais sur des vaccins contre les virus Influenza équin ou canins ont également été expérimentées (53, 202). Cependant, ces modèles ne sont pas à considérer comme des modèles standards pour la recherche sur les virus Influenza.

De nos jours, le modèle murin constitue une approche couramment recourue, bien documentée (plus de 1 200 000 occurrences sur PubMed en juin 2021) et pour laquelle de nombreux outils d'analyse et de diagnostic (cf. les publications commerciales de sociétés comme BioRad et QM Diagnostics spécialisées dans cette espèce) sont disponibles sur le marché. Il est normal qu'un tel succès se reflète également dans les recherches menées sur les virus Influenza A (plus de 11 289 occurrences sur PubMed en juin 2021). De nombreuses souches de souris, chacune avec ses particularités, ont déjà été utilisées (355).

7.2.1. LA SOURIS EN TANT QUE MODELE ANIMAL POUR ETUDIER LES VIRUS INFLUENZA A

La souris est à l'heure actuelle le modèle le plus utilisé dans la recherche sur les virus Influenza A (355). Même si la souris à l'état sauvage ne constitue pas un hôte naturel pour les virus Influenza A, on constate que de nombreuses souches de souris de laboratoire peuvent être infectées par de nombreuses souches virales. Bien souvent, ceci nécessite une adaptation préalable du virus avant d'observer une certaine virulence et des effets pathogènes. Le degré de sensibilité de ces animaux dépend de la souche de virus envisagée (120). L'adaptation du virus implique la mise en place de plusieurs passages *in vivo* dans les poumons de différentes souris, un processus qui entraîne des changements au sein de la souche virale. C'est le cas des modifications des acides sialiques qui régissent notamment la liaison avec les récepteurs des cellules épithéliales respiratoires de l'hôte. Ces modifications permettent un accroissement de la réplication virale et font augmenter la virulence des isolats (57).

Il y a des avantages à ce processus : plusieurs virus Influenza, moyennant cette adaptation, peuvent être étudiés chez la souris ; les modifications liées à l'adaptation du virus reflètent la grande plasticité de ce

groupe viral et permettent d'expliquer la pathogénie de la maladie affectant d'autres espèces (dont l'homme). Il y a malheureusement aussi des inconvénients : devenu plus ou moins virulent, le virus adapté peut être très différent de la souche initiale, sur le plan antigénique ou phénotypique ou même les deux. Il y a aussi des situations dont l'interprétation devient difficile, c'est notamment le cas des souches virales particulièrement pathogènes chez l'homme et qui ne nécessitent pas d'adaptation préalable chez la souris. On citera, par exemple, la souche pandémique H1N1 (1918)(235), la souche H5N1(113) et certaines souches H7(394).

Globalement, la souris reste un modèle animal avantageux pour les recherches axées sur les virus Influenza A, comparée à d'autres espèces : sa petite taille, son faible coût, la disponibilité de nombreuses souches transgéniques avec des modifications ciblées de leurs gènes. Ces caractéristiques permettent des recherches ciblées sur des processus précis, par exemple dans la réponse infectieuse liée à l'hôte.

De plus, cette démarche est favorisée par le développement dans le commerce d'une large gamme de réactifs (par exemple des réactifs immunologiques) compatibles avec les échantillons collectés chez la souris.

7.2.2. LES LIMITES DU MODELE MURIN DANS L'ETUDE SUR LES VIRUS INFLUENZA

Après avoir évoqué les avantages du modèle murin dans l'étude sur les virus influenza A, il est légitime d'en préciser les limitations observées à ce jour. Ces limitations ont toutes leur importance dans le cas où les résultats obtenus chez la souris sont destinés à une comparaison avec ceux obtenus (ou attendus) chez l'homme.

Contrairement aux autres espèces cibles, c'est-à-dire les espèces hôtes naturels du virus, la souris développe des signes cliniques propres. On ne retrouve dans l'espèce murine, ni sécrétions nasales ni fièvre. On rapporte régulièrement de l'hypothermie et de la dyspnée (46).

En ce qui concerne la transmission du virus Influenza A, les recherches au sein de souches murines indiquent peu ou pas de transmission, ceci contrairement aux autres espèces. Cette constatation a été à la base des études relatives à la transmissibilité des souches du virus menées dans d'autres espèces d'animaux de laboratoire, dont le cobaye et le furet (213, 251, 314).

La liste des souches considérées comme induisant une maladie sévère chez la souris diffère de celle constatée chez l'homme. Cette différence dans la virulence des souches virales trouve son origine dans leur différence de tropisme (30, 172).

L'inoculation intranasale chez la souris est réalisée avec de gros volume d'inoculum, ceci comparativement à la taille de l'animal. Ce point constitue une différence avec la situation chez l'homme où quelques microgouttelettes transmises d'un individu à l'autre peuvent permettre une transmission de l'infection. Lors de l'inoculation expérimentale, le volume de l'inoculum est tel qu'une plus grande quantité de liquide arrive dans les voies respiratoires profondes et finalement dans les alvéoles. Virtuellement, on accède donc chez la souris directement aux voies respiratoires profondes. Cette différence, sans que ceci n'ait encore pu être démontré constituerait, dans son principe, une cause de mauvaise interprétation des résultats obtenus, notamment dans les extrapolations de la souris vers l'homme.

Ces constatations sont autant de facteurs qui limitent les interprétations et les extrapolations qui peuvent être tirées des résultats issus de la recherche sur les virus Influenza effectuée en modèle murin.

7.2.3. LA VARIABILITE GENETIQUE DU VIRUS INFLUENZA DE TYPE A

Les virus Influenza A sont pourvus d'une grande plasticité génétique. La dérive génétique et les réassortiments géniques sont les mécanismes connus contribuant à leurs variations antigéniques (1, 227).

La dérive génétique (*genetic drift*)

La dérive génétique est la conséquence du caractère peu fidèle de l'enzyme ARN polymérase, ARN dépendante dont les erreurs de lecture commises au cours de la réplication virale ne sont pas réparées; elle résulte également de la pression de sélection exercée par les anticorps neutralisants sur les sites antigéniques de l'HA (3). Ces erreurs aboutissent à des mutations ponctuelles au niveau des bases nucléotidiques des gènes viraux et, par conséquent, à des modifications au niveau des protéines pour lesquelles ils codent (Tab 16).

Ces variations antigéniques sont mineures, surviennent environ tous les deux à trois ans et apparaissent essentiellement pour l'hémagglutinine et à moindre titre pour la neuraminidase. Tous les gènes codant pour les autres protéines virales peuvent *a priori* subir des mutations, dans la limite où les protéines codées par ces gènes conservent des fonctions compatibles avec la réplication virale.

Le glissement antigénique concerne un sous-type pour lequel apparaissent des variants génétiques successifs qui diffèrent progressivement de la souche d'origine. Il concourt dans la population humaine à l'apparition d'épidémies annuelles limitées en raison de l'échappement partiel du virus à la réponse immunitaire de l'hôte. Il apparaît que chaque nouveau variant de virus Influenza A, capable de réinfecter un individu préalablement exposé, présente *a minima* quatre substitutions d'acides aminés au niveau d'au moins deux sites antigéniques de l'hémagglutinine.

Exemple: L'étude de l'évolution génétique de l'hémagglutinine des virus Influenza humains A (H1N1) et A (H1N2), isolés dans le sud de la France au cours des hivers 2001 à 2004, met en évidence 28 substitutions d'acides aminés exclusivement au niveau de la région HA1 des virus A (H1N1) ou A (H1N2), voire des deux. Par ailleurs, neuf isolats A (H1N2) présentent une substitution de l'acide aminé en position 90 ; il en résulte l'introduction d'un nouveau site de glycosylation adjacent au site antigénique E de HA et la possibilité d'une modification de l'antigénicité du virus A (H1N2) (3). Le taux d'évolution des virus Influenza aviaires est beaucoup plus important chez les volailles que chez l'hôte naturel, représenté par les oiseaux sauvages (345). Les erreurs dans les gènes codant pour les protéines de la neuraminidase et de l'hémagglutinine sont les plus fréquentes.

La cassure antigénique (*genetic shift*)

Elle est rendue possible par le caractère segmenté du génome des virus Influenza A et constitue le second mécanisme de variation antigénique. Elle correspond au remplacement complet d'un ou plusieurs gènes ou segments de gènes d'une souche virale par un gène ou un segment équivalent d'une autre souche virale. Ce réassortiment génétique peut conduire à l'apparition de nouveaux sous types de virus et être à l'origine de pandémies: la grippe asiatique en 1957 et la grippe de Hong Kong en 1968 (200) sont des exemples illustrant une telle situation.

Exemple: L'analyse phylogénétique des huit segments du génome des virus Influenza A humains A(H2N2), isolés entre 1957 et 1968 et des virus Influenza A humains A(H3N2) isolés entre 1968 et 1972 montre que le sous-type A(H2N2) continue de circuler après 1968 et l'émergence des virus A(H3N2) chez l'homme est associée à de multiples réassortiments qui contribuent à leur diversité génétique (207).

Au sein des populations humaines ou des populations animales, de nombreuses souches circulent. Cette situation est propice aux réassortiments génétiques en cas d'infection concomitante de deux virus différents.

7.2.4. TAXONOMIE

Les virus Influenza sont des virus faisant partie de la famille *Orthomyxoviridae*. Cette famille est décrite comme comprenant les virus dont le génome est constitué d'ARN monocaténaire, segmenté et de polarité négative (Fig. 19). Les *Orthomyxoviridae* sont une famille de virus à ARN qui comprend sept genres principaux : Virus Influenza A, B, C et D, *Isavirus*, *Thogotovirus* et *Quaranjavirus*.

Le genre *Virus Influenza A* est la cause de pandémies de grippe chez l'homme, chez les oiseaux et chez d'autres mammifères ; le genre *Virus Influenza B* infecte les humains et les phoques ; le genre *Virus Influenza C* infecte les humains et les porcs ; le genre *Virus Influenza D* a été retrouvé chez les bovins et

les porcs (135). Le genre *Isavirus* comporte un seul virus, celui de l'anémie infectieuse du saumon (VAIS) ; le genre *Thogotovirus* infecte les vertébrés et est transmis par l'intermédiaire des tiques (exemple du virus de Bourbon), des moustiques et de certains parasites des poissons ; le genre *Quarantavirus* comprend le virus Johnston Atoll, le virus de la Rivière Cygnet, le virus du lac Tchad, le virus Tyulek et le virus de Wellfleet Bay. Les *Quarantavirus* infectent principalement les arthropodes et les oiseaux (18, 322).

Nous considérerons tout particulièrement les Influenza A dans la suite de ce travail. Ceux-ci sont répartis en plusieurs sous-types, en se basant sur les propriétés antigéniques de leur hémagglutinine (HA) et de leur neuraminidase (NA), les deux glycoprotéines de leur enveloppe virale. A ce jour, 18 sous-types d'HA et 11 sous-types de NA(358) ont été décrits (104, 383).

La dénomination complète des virus Influenza A tient compte du type d'hémagglutinine et de neuraminidase, de l'espèce animale chez laquelle la souche virale a été isolée, du lieu, de l'année, du numéro attribué à la souche et de son sous-type.

7.2.5. STRUCTURE DU VIRUS

Présentation générale

Ils apparaissent comme des particules sphériques de 80 à 120 nanomètres de diamètre (Fig. 19). En microscopie électronique, cette sphère est recouverte de spicules correspondant aux deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), toutes deux ancrées dans une bicouche lipidique dérivée de la cellule hôte, qui entoure la particule virale. Sous et dans cette enveloppe se trouvent les protéines matricielles M1 et M2: la protéine M1 est la plus abondante des protéines virales, elle est associée à la partie intracellulaire des protéines de surface et à la nucléoprotéine. Elle assure la rigidité de l'enveloppe virale. La protéine M2 constitue un canal à ion au travers de l'enveloppe.

Génome

Les Influenza virus A appartient à la famille des *Orthomyxoviridae* et leur génome est constitué de huit segments d'ARN de sens négatif qui codent au moins pour 17 protéines (367). Les grands groupes sont décrits ci-après, tandis que la liste à jour des protéines codées par chaque segment d'ARN est reprise dans un tableau (Tab. 12).

Les virus influenza, comme la plupart des virus à ARN, ont un génome très compact qui subit une pression sélective constante et intense. Dix principales protéines du virus influenza A, pour la plupart structurales, ont été déterminées dans les années 1980. Cependant, il est maintenant clair que la capacité de codage

protéique du génome du virus influenza A n'a pas été entièrement déterminée. La synthèse des protéines virales dépend de la machinerie traductionnelle de la cellule hôte.

Le protéome du virus est beaucoup plus complexe qu'on ne le pensait auparavant. Il sera nécessaire à l'avenir de recourir non seulement une approche génomique, mais aussi à une approche protéomique, car toutes les protéines ne peuvent pas être détectées au niveau du génome et des ARNm.

Alors que les ARNm cellulaires sont généralement monocistroniques, les virus à ARN doivent souvent exprimer plusieurs protéines à partir d'un seul type d'ARNm. Afin d'optimiser l'utilisation de l'espace de séquence du génome disponible, les virus influenza A ont développé différents mécanismes de traduction non-canonique. Ils utilisent la fonction ribosomale pour la traduction PB1-N40, PB1-F2, PA-N155 et PA-182. PB1-F2 est traduit de l'ORF alternatif. La protéine PA-X est exprimée en utilisant un mécanisme de décalage du ribosome. Contrairement à la majorité des virus à ARN, la transcription et la réplication des virus influenza A se produisent dans le noyau des cellules infectées. Le virus a donc la capacité d'utiliser la machinerie d'épissage de l'hôte pour la production de ses protéines M2, M42, NS2 et NS3. Cette localisation nucléaire de la transcription et de la réplication virales favorise également la possibilité de régions codant pour des micro-ARN dans le génome du virus qui coderaient aussi pour un mécanisme supplémentaire de régulation (367).

Chaque segment génomique comporte une molécule d'ARN à simple brin de polarité négative et de longueur variable en fonction des protéines virales codées. L'ARN viral est entièrement recouvert de nucléoprotéines. Les extrémités 5' et 3' se rejoignent de façon à former une structure complexe avec la polymérase qui est localisée à l'une des extrémités. Ce complexe ARN/NP/polymérase est dénommé ribonucléoprotéine virale ou vRNP (Fig. 18).

Les protéines du virus Influenza A

Les protéines du virus Influenza A peuvent être classées en deux groupes : les protéines dites externes et celles dites internes, ceci en fonction de leur lieu de traduction.

Les protéines externes sont les protéines virales HA (hémagglutinine) (254), NA (neuraminidase) (386) et le canal ionique M2 (259). Elles sont présentes à la surface de la particule virale et sont fabriquées par les ribosomes liés au réticulum endoplasmique.

Les protéines dites internes sont celles qui sont synthétisées par les ribosomes libres dans le cytoplasme. Ce sont : les protéines NP, les sous-unités de la polymérase (PB1, PB2, PA) (13, 205), la protéine NS1 et les deux protéines M1 (25, 302) et NEP (ou NS2). M1 est une protéine exprimée en phase tardive du cycle viral et qui est détectée dans le cytoplasme et le noyau.

La protéine non-structurale NS1 (erronément appelée ainsi) est codée par le segment 8 du génome viral (160, 193). Cette protéine ne s'exprime qu'une fois le virus présent dans les cellules infectées. Elle a plusieurs fonctions définies durant le cycle viral, ce sont : l'inhibition de la réponse antivirale cellulaire (31, 115, 133, 378), l'inhibition de la maturation et de l'export nucléaire des ARNm cellulaires en se fixant sur les protéines cellulaires CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) et PABII (PolyA binding Protein II) (55, 256) et enfin, l'augmentation de la traduction des ARNm viraux (72, 90, 308).

Concernant la protéine NS2 (ou NEP pour Nuclear Export Protein) il existe peu de données sur les caractéristiques fonctionnelles et structurales. Bien qu'elle porte le nom de protéine non structurale (NS2), elle est néanmoins présente en plusieurs exemplaires (100 à 230 exemplaires) dans la particule virale (293, 400).

7.2.6. LE CYCLE VIRAL

Pour débiter leur cycle répliatif, les virus Influenza A doivent adhérer à la surface des cellules de l'hôte, via les acides sialiques terminaux des glycoprotéines des membranes cellulaires. Cette interaction entre les virus et les acides sialiques se fait par l'intermédiaire de leur hémagglutinine (385). Celle-ci présente une spécificité plus ou moins marquée quant au type de liaison entre l'acide sialique et le résidu galactose ou galactosamine sous-jacent (Fig. 21). Ainsi, l'hémagglutinine des virus Influenza A humains présente généralement une affinité supérieure pour les acides sialiques liés en α 2,6, majoritaires dans l'arbre respiratoire humain, celle des souches virales aviaires se liant préférentiellement aux acides sialiques liés en α 2,3 (62, 64). Chez la souris, les deux types de récepteurs sont rencontrés au niveau de l'arbre respiratoire mais les liaisons en α 2,3 sont prédominantes (157).

Le virus entre alors dans la cellule par endocytose. Les virus Influenza A infectent les cellules par de multiples voies de type endocytose, avec une voie induite par la clathrine et une voie indépendante à la fois de la clathrine et de la cavéoline. Les deux voies conduisent à la fusion virale avec une efficacité similaire une fois les virus intériorisés (192). L'internalisation du virus par macropinocytose a également été observée (301).

Dans l'endosome, la diminution du pH induit un changement de conformation de l'hémagglutinine, ce qui permet la fusion des membranes virale et endosomale. Parallèlement, le canal à protons M2 permet l'acidification interne de la particule virale et la séparation des ribonucléoprotéines virales (vRNPs) de la protéine de matrice 1 (M1) à laquelle elles sont liées. Les vRNPs rejoignent ensuite le noyau cellulaire (387).

Tableau 12 : Les principales protéines virales (Influenza A) et leurs fonctions

Genome segment	Protein	mRNA	Expression	Length	Function
1	PB2	Segment 1 non-spliced mRNA	Translation from AUG1	759	PB2 is the subunit of the viral polymerase. It directly interacts with PA. PB2 is involved in the recognition of 5'-capped host pre-mRNAs. PB2 has been found to affect host range as well as the virulence of influenza viruses
2	PB1	Segment 2 non-spliced mRNA	Translation from AUG1	757	PB1 is the catalytical subunit of the viral RNA-dependent RNA polymerase responsible for RNA chain elongation and required for both replication and transcription. PB1 interacts with PB2 and PA
	PB1-N40	Segment 2 non-spliced mRNA	Translation from AUG5 as the result of leaky ribosomal scanning	718	PB1-N40 is the N-terminally truncated form of PB1. PB1-N40 maintains the balance between PB1 and PB1-F2 expression
	PB1-F2	Segment 2 non-spliced mRNA	Translation from AUG4 in alternative (+1 relative to PB1) ORF as the result of leaky ribosomal scanning	90 (can be truncated in some viral strains)	PB1-F2 is the virulence factor. PB1-F2 induces mitochondria-associated apoptosis, interacts with PB1 and influences the polymerase activity
3	PA	Segment 3 non-spliced mRNA	Translation from AUG1	716	PA is the subunit of the viral RNA-dependent RNA polymerase. PA provides an RNA endonuclease activity (cap snatching). PA interacts with PB1
	PA-X	Segment 3 non-spliced mRNA	Translation from AUG1 and +1 ribosomal frame-shifting at codons 190-193	252	PA-X modulates the host response and viral virulence
	PA-N155	Segment 3 non-spliced mRNA	Translation from AUG11 as the result of leaky ribosomal scanning	568	?
	PA-N182	Segment 3 non-spliced mRNA	Translation from AUG13 as the result of leaky ribosomal scanning	535	?
4	HA	Segment 4 non-spliced mRNA	Translation from AUG1	560	HA is responsible for recognition and binding with receptors (sialic acid) on the membrane of target cells
5	NP	Segment 5 non-spliced mRNA	Translation from AUG1	498	NP is the major component of the viral RNP complex. NP controls the nuclear cytoplasmic transport of RNA
6	NA	Segment 6 non-spliced mRNA	Translation from AUG1	465	NA cleaves off sialic acid from cellular receptors of HA to enable progeny escape from infected cells
7	M1	Segment 7 non-spliced mRNA (mRNA1)	Translation from AUG1	252	M1 is the main component of the viral membrane; it underlies the viral envelope and plays multiple roles in virion assembly and infection
	M2	Segment 7 alternatively spliced mRNA (mRNA2)	Translation from AUG1	97	M2 is a membrane protein that forms a proton channel that is activated under low pH conditions; important for genome unpacking during virus entry
	M42	Segment 7 alternatively spliced mRNA (mRNA4)	Translation from AUG1 of mRNA4	99	M42 can functionally replace M2 in M2-null viruses
8	NS1	Segment 8 non-spliced mRNA (NS1 mRNA)	Translation from AUG1	217	NS1 is a multifunctional protein that is involved in numerous virus - host interactions, including escape from the antiviral mechanisms of host cells as well as regulation of host and viral gene expression
	NS2 (NEP)	Segment 8 alternatively spliced mRNA (NS2 mRNA)	Translation from AUG1	121	NS2 is a structural component of the viral particle and mediates vRNP export from the nucleus to the cytoplasm
	NS3	Segment 8 alternatively spliced mRNA (NS3 mRNA)	Translation from AUG1	174	The role of NS3 is potentially associated with adaptation of influenza A virus to mouse host; however, it has not been proven
	NEG8 (NSP) (?)	Segment 8 negative sense mRNA (NS4 mRNA) (?)	Translation from the negative sense ORF (?)	156 (216 in the majority of human influenza A viruses)	?

Source : Vasin et al. (367)

Les virus Influenza ont la particularité - parmi les virus à ARN - d'avoir toutes les étapes de synthèse de leur ARN (transcription et réplication) qui se réalisent dans le noyau cellulaire (comme les *Bormaviridae*). Les virus qui se répliquent via un intermédiaire en ARN doivent obligatoirement se servir d'une ARN

polymérase dépendante de l'ARN mais une telle activité enzymatique n'existe pas de manière naturelle chez la cellule hôte. Tous les virus à ARN codent donc pour une ARN polymérase dépendante de l'ARN.

Aucune protéine virale ne peut être traduite tant qu'un ARNm viral n'est pas disponible. De ce fait, la stratégie de réplication des virus à ARN est dépendante de la nature de l'ARN contenu dans la particule virale. On notera donc que l'ARN génomique des virus à ARN brin (+) peut servir d'ARNm directement dans la cellule hôte, ce qui n'est pas le cas de l'ARN génomique des virus à ARN brin (-) et des virus à ARN double brin, ces derniers devant préalablement être « traduits ». Chez ces virus, l'ARN génomique est de sens négatif (c'est-à-dire, complémentaire de l'ARNm). Il doit donc être copié en un ARN (+) afin de permettre la production par la cellule hôte des protéines virales.

En plus de coder pour une ARN polymérase dépendante de l'ARN dans leur génome, les virus à ARN brin (-) doivent également l'incorporer dans la particule virale et la délivrer à l'intérieur de la cellule hôte après l'entrée du virus afin de produire les ARNm viraux. Ce cycle intracellulaire chez la cellule hôte se retrouve donc parmi les *Orthomyxoviridae* (dont Influenza) ; les *Mononegavirales* ; les *Rhabdoviridae* (dont le virus de la rage) et les *Paramyxoviridae* (dont le virus de la rougeole et le virus des oreillons) (216, 409).

Le processus de transcription en ARNm nécessite une amorce, sous la forme de l'extrémité 5' d'un ARNm cellulaire, que la polymérase virale obtient par liaison de la coiffe et clivage de l'ARNm cellulaire 10 à 13 nucléotides en aval de cette coiffe, selon un processus appelé cap-snatching(109). C'est par élongation de cette amorce que la polymérase virale transcrit un ARNm viral. Les ARN messagers sont exportés dans le cytoplasme où ils sont traduits en protéines virales. Ensuite, les protéines HA, NA et M2 rejoignent la membrane plasmique cellulaire et les protéines NP, PB1, PB2, PA, M1, NS1 et NS2 sont transportées dans le noyau.

Dans le noyau, les néoribonucléoprotéines se forment par assemblages de nucléoprotéines, de l'ARN génomique viral et des protéines du complexe polymérase. Les vRNPs sont exportées du noyau grâce aux protéines M1 et NS2. Les vRNPs rejoignent la surface de la cellule où la protéine M1 assure le bourgeonnement des nouvelles particules virales. Au cours de ce processus, elles entraînent la membrane cytoplasmique cellulaire et acquièrent donc leur enveloppe.

L'hémagglutinine précédemment décrite (Fig. 20) est une des deux protéines antigéniques retrouvées à la surface des virus Influenza type A. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif HA0 par l'intermédiaire du virus et de la cellule hôte.

La structure tridimensionnelle de l'hémagglutinine révèle qu'il s'agit d'un homotrimère (molécule formée de trois monomères identiques). Chaque monomère est une glycoprotéine HA0 constituée de deux sous-unités: (i) la partie extracellulaire globulaire ou HA1 présente le site de liaison, appelé site RBS, au récepteur des cellules cibles comportant une molécule d'acide sialique et (ii) la partie formant une tige où HA2 permet la fusion de la membrane phospholipidique qui recouvre la particule virale avec la membrane de l'endosome de la cellule hôte lors du processus libérant les segments génomiques dans le cytoplasme.

Cette partie HA2 présente un domaine transmembranaire hydrophobe et une queue intracellulaire. Une fois attachées à la surface de la cellule hôte, pour être fonctionnelles et permettre l'infection, les parties de l'hémagglutinine HA1 et HA2 doivent être séparées l'une de l'autre grâce à un clivage au niveau d'un peptide reliant les deux sous-unités. Tant que la coupure n'a pas eu lieu, les virus ne sont pas capables d'infecter une cellule.

Dans le cas des virus H5N1, selon que l'on ait à faire à une souche hautement pathogène (H5N1-IAHP) ou à une souche faiblement pathogène (H5N1-IAFP), la séquence de base présente au site de clivage sera différente. Ainsi le site de clivage de l'hémagglutinine HA0 sera différent. Les souches faiblement pathogènes présentent au niveau du site de clivage de HA0 un ou deux résidus basiques : l'arginine (R) qui sera la cible de protéases de type trypsine présentes essentiellement au niveau des tissus respiratoires chez l'homme et respiratoires et/ou digestifs chez l'oiseau.

Les souches hautement pathogènes présentent un site de clivage de HA0 enrichi en acides aminés basiques. Cette séquence de type RERRRKKR, entraîne une modification de l'organisation de ce site de clivage qui permet une meilleure accessibilité pour toutes sortes de protéases intracellulaires exprimées dans la plupart des tissus. Ce type de site conduit à une infection et une réplication du virus dans des tissus habituellement non permissifs (par exemple hors du tractus respiratoire). Pour certaines formes hautement pathogènes, le clivage ne nécessite même plus d'enzymes et peut se réaliser spontanément (337).

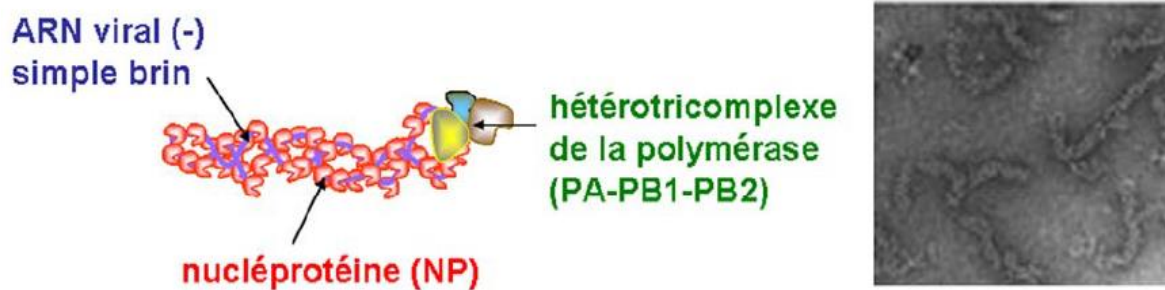


Figure 18 : Un segment génomique de virus Influenza A. La ribonucléoprotéine virale (vRNP). L'ARN viral simple brin négatif est entièrement recouvert de nucléoprotéines tous les 24 nucléotides environ. Les extrémités 5' et 3' de l'ARN viral se rejoignent et sont liées par l'ARN polymérase virale ARN-dépendante. La vRNP adopte ainsi une forme hélicoïdale. Source : *Structure of influenza virus RNP. I* (24).

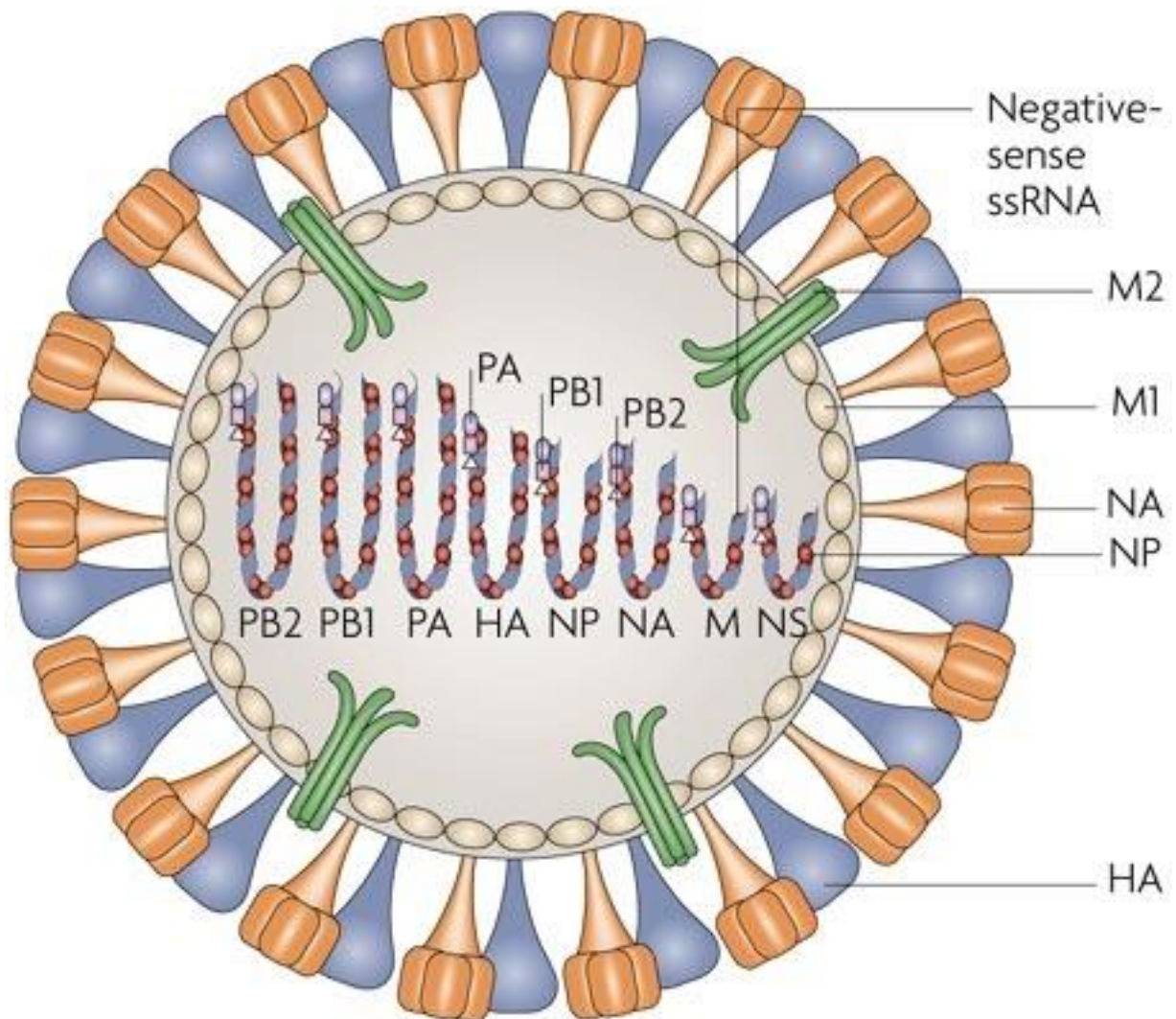


Figure 19 : Structure du virus Influenza A. Trois protéines sont insérées au niveau de l'enveloppe virale ; l'hémagglutinine (HA), la neuraminidase (NA) et la protéine matrice 2 (M2). La protéine de matrice 1 (M1) constitue le lien entre l'enveloppe et les ribonucléoprotéines. Ces ribonucléoprotéines sont constituées chacune d'une hélice de nucléoprotéines autour de laquelle s'enroule un segment génomique viral. A son extrémité se trouve le complexe des polymérase. Source : *The evolution of the epidemic influenza* (255)

Outre son rôle dans l'entrée du virus dans la cellule hôte, l'HA est l'antigène majeur du virus Influenza A (254, 380).

Des anticorps peuvent être induits contre les deux glycoprotéines de surface du virus de l'Influenza, l'hémagglutinine et la neuraminidase. Cependant, des anticorps à activité neutralisante ont été uniquement décrits contre l'hémagglutinine. De plus, l'hémagglutinine est la cible majeure des anticorps produits par le système immunitaire lors d'un premier contact avec l'agent infectieux.

L'hémagglutinine (Fig. 23) est constituée de deux types de chaînes (HA1 et HA2) et comporte deux régions distinctes : i) une région fibreuse, la tige, proche de la membrane cellulaire qui contient des résidus provenant à la fois de la chaîne HA1 et de la chaîne HA2, le tout structuré en alpha hélice à triple brin et ii) une région globulaire, la tête globulaire, contenant des résidus provenant uniquement de la chaîne HA1. Cette région est la plus éloignée de la membrane et présente une structure de type bêta à 8 feuillets. Le nombre de sites antigéniques de l'hémagglutinine a pu être déterminé à l'aide de sérums hyperimmuns et d'anticorps monoclonaux utilisés dans des tests de compétition et par analyse aux rayons X après cristallisation.

Ces sites antigéniques, bien que dépendants des spécificités des souches virales (165, 392), présentent des caractéristiques communes (Fig. 20 droite). On localise globalement cinq sites antigéniques à la surface de la molécule (389): le site A qui représente le site majoritaire de fixation des anticorps et est situé au niveau de la boucle formée entre les acides aminés 140 et 146 ; le site B qui comprend les résidus externes 187-196 d'une hélice alpha et des résidus adjacents du bord supérieur de la poche qui constituerait le site de fixation du virus à son récepteur cellulaire ; le site C qui est situé au niveau d'une protubérance créée par un pont disulfure entre les cystéines en position 52 ; le site D qui est situé au niveau des interfaces entre les différentes sous-unités HA1 et HA2 et enfin le site E. On notera que les sites A, B et D sont situés dans la zone globulaire, le site E se situe en marge de la zone globulaire, tandis que le site C se situe dans la tige sur HA1 (343).

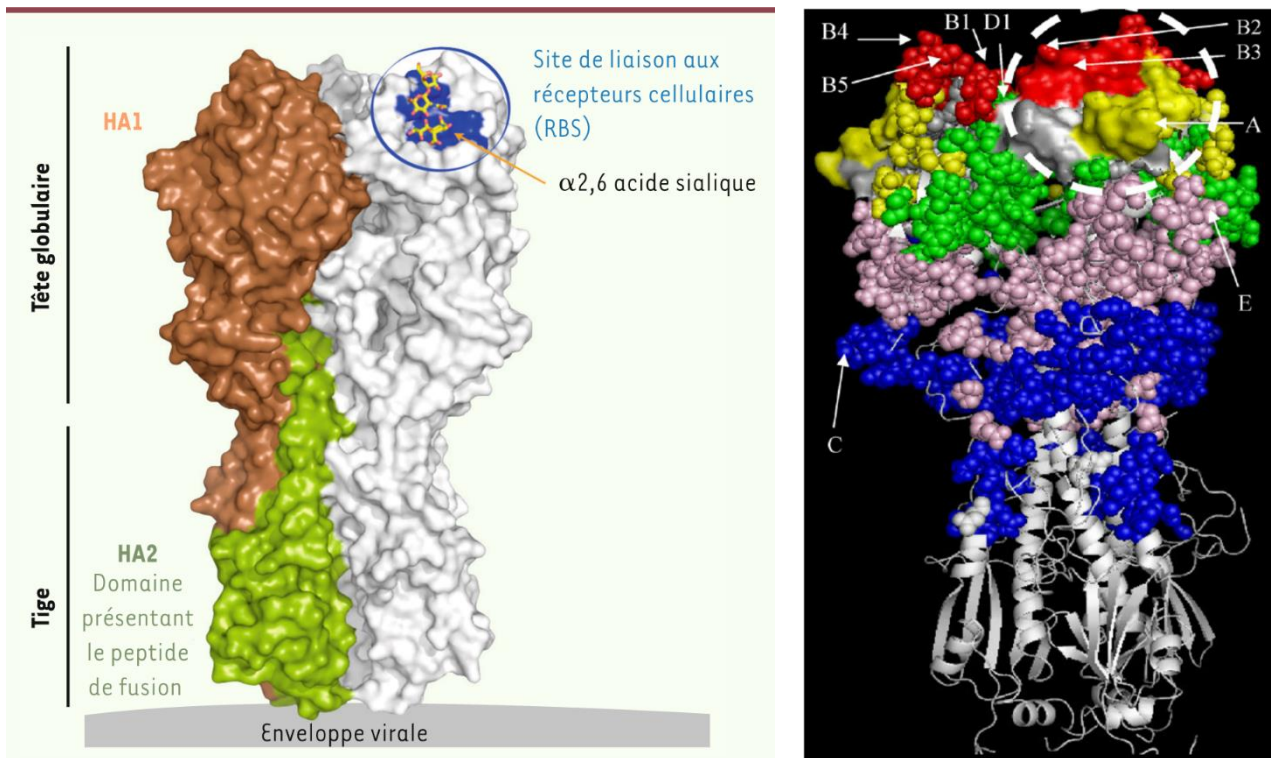


Figure 20: Gauche : Structure tridimensionnelle de l'hémagglutinine virale (HA). L'HA est une protéine homotrimerique synthétisée sous la forme d'un précurseur HA0. Pour être fonctionnelle, l'HA est ensuite clivée par protéolyse en deux sous-unités HA1 (marron) et HA2 (vert), ce qui libère le peptide de fusion du côté de l'extrémité amino-terminale de HA2. L'HA peut être divisée en deux parties : une partie proche de la membrane virale (tige) et une partie distante (tête globulaire). HA1 contient le site de liaison aux récepteurs des cellules cibles (RBS). Un α 2,6 acide sialique est représenté au niveau du RBS.

Droite : Structure cristalline de la glycoprotéine HA Influenza A. L'emplacement des épitopes définis dans le modèle rempli d'espace du trimère HA. Les épitopes dans le site A sont représentés sous forme de boules jaunes, le site B en rouge, le site C en bleu, le site D en vert et le site E en rose. La zone de liaison au récepteur de la cellule hôte est représentée par la zone encerclée. Source : *Deceptive imprinting and immune refocusing in vaccine design* (357)

7.3. MODÈLE UTILISANT UN VIRUS INFLUENZA MURINISÉ

La souris n'est pas un hôte naturel des virus Influenza. Ceci signifie qu'aucune observation dans la nature d'affection à virus Influenza n'a été faite chez la souris et aucune situation de ce type n'a conduit à l'apparition de symptômes ou de lésions.

Les virus Influenza, pour acquérir de la virulence envers la souris, doivent subir un processus d'adaptation, appelé murinisation (en anglais murinization). Ceci est réalisé par des passages *in vivo* répétés, par exemple en inoculation pulmonaire par instillation intranasale. Au terme de plusieurs cycles, variables selon la souche virale et la souche de souris considérées, le virus parvient à se multiplier efficacement et devient virulent.

L'explication de cette adaptabilité (plasticité typique des virus à ARN) réside dans l'accumulation de multiples mutations ponctuelles et aléatoires apparaissant dans le génome du virus et affectant les virions des générations suivantes, phénomène connu sous le nom de dérive génétique (*Genetic drift*). Parmi les mutations qui apparaissent spontanément et aléatoirement, le processus de murinisation tend classiquement à sélectionner des modifications qui concernent le site de liaison entre l'hémagglutinine virale et son récepteur (379).

Chez la souris, les cellules épithéliales des voies respiratoires présentent, à la surface de leurs membranes, des chaînes glucosiques dont les galactoses. Les galactoses sont liés par liaison covalente à des molécules d'acide sialique (acide N-acétylneuraminique), cible de la liaison à l'hémagglutinine (Fig. 21). Ces liaisons covalentes peuvent être de deux types $\alpha 2,6$ ou $\alpha 2,3$. Chez la souris les deux types de liaisons sont présentes, mais les liaisons en $\alpha 2,3$ prédominent (157). Ainsi, la murinisation est un processus qui tend à sélectionner l'hémagglutinine la plus apte à former une liaison avec ce type de récepteurs.

La protéine polymérase basique 2 (PB2) virale a été mise en cause dans le cas d'adaptation de virus aviaires à des souris. Lors des premiers passages, ces virus d'origine aviaire présentent normalement une répllication très restreinte. Toutefois, après plusieurs passages *in vivo* chez la souris, un variant hautement réplificatif finit par être sélectionné. Celui-ci présente généralement une substitution d'un acide aminé caractéristique, le glutamate, qui est substitué en lysine en position 627 (341). Cette mutation a également été observée dans les souches virales à forte capacité de dissémination, telles que rencontrées avec les souches de virus H5N1 inoculées chez la souris (134, 250, 324). Cette substitution est discutée et n'est pas considérée comme un marqueur d'adaptation, cependant on constate qu'elle est déterminante dans la pathogénicité du virus chez les mammifères.

La lysine en position 627 dans PB2 confère au virus Influenza la capacité de se multiplier dans les voies respiratoires des mammifères, c'est-à-dire à une température corporelle d'environ 33°C, alors qu'un résidu glutamate à la même position se traduit par une activité optimale de la polymérase à une température corporelle supérieure, soit à 37°C. La température de 37°C est celle rencontrée dans les systèmes digestif et respiratoire chez les oiseaux (357).

7.4. SENSIBILITÉ VARIABLE AUX PATHOLOGIES VIRALES DES SOUCHES DE SOURIS

Plusieurs mécanismes potentiels pour expliquer les différences significatives dans la maladie et la charge virale observées entre les souches de souris résistantes et les souches sensibles ont été proposés (37). Une des hypothèses est que la différence d'expression des récepteurs de l'acide sialique dans les voies respiratoires supérieures favorise une infection accrue chez les souches des souris sensibles.

Les virus Influenza A d'origine humaine se lient préférentiellement aux acides sialiques liés en α -2,6, les virus Influenza A aviaires se fixent préférentiellement aux acides sialiques liés en α -2,3. Les Influenza A d'origine porcine peuvent quant à eux se lier indépendamment du type d'hémagglutinine (298).

Des recherches utilisant une approche de cultures primaires de cellules différenciées *ex vivo* (278) ont démontré que les cellules épithéliales trachéales murines (mTEC) dérivées de souris (C57BL/6J dans l'expérience) expriment de manière prédominante le récepteur aviaire de l'acide sialique lié en α -2,3 (157). Une analyse ultérieure des voies respiratoires pulmonaires a également montré que seuls les acides sialiques liés en α -2,3 sur les cellules épithéliales ciliées, étaient de préférence infectées lors d'une infection *in vivo* par le virus Influenza A H1N1 préalablement adapté à la souris. Aussi, un virus H1N1 d'origine humaine n'a-t-il pas réussi à infecter les cultures de cellules mTEC ou les souris directement.

Casanova et al (48) ont adopté une approche phénotypique pour identifier les étapes critiques du processus d'infection. Dans leur expérience, l'expression de l'acide sialique lié α -2,3 a légèrement, mais significativement, augmenté et ceci sur les macrophages alvéolaires et les mTEC dérivés de souris DBA/2 en comparaison à des cellules dérivées de souris C57BL/6J. Il a été constaté dans cette étude que l'infection des DBA/2 par un virus H1N1 adapté à la souris a également entraîné une augmentation des titres viraux par rapport aux C57BL/6J et suggère donc que les différences d'expression des récepteurs peuvent expliquer en partie les différences constatées en charge virale au début de l'infection. Ils ont conclu à la fois qu'un dysfonctionnement des macrophages alvéolaires et une permissivité accrue des cellules respiratoires rendaient une souche (DBA/2J) plus sensible qu'une autre (C57BL/6J) à l'infection à influenza A (48).

D'autres mécanismes jouant le rôle de facteurs aggravant de la maladie chez les souris doivent participer à ce mécanisme, notamment la réponse immunitaire innée de l'hôte.

La réponse immunitaire innée en réponse à une infection à Influenza A chez des souches de souris sensibles a été étudiée et désignée comme « hyper-inflammatoire » dans certains cas spécifiques (5). Dans cette étude les souches de souris sensibles ont montré une augmentation de l'infiltration de neutrophiles et de macrophages dans les poumons entre deux et six jours après l'infection (DBA/2) en comparaison à la souche témoin (C57BL/6J) (48, 335). Il a été démontré également que les macrophages alvéolaires dérivés de souris DBA/2 avaient une activité phagocytaire supérieure à celle des macrophages dérivés de C57BL/6J. Ces données issues de la littérature suggèrent que la réponse immunitaire hyper-inflammatoire chez les souris n'est que partiellement due à la charge virale, et que la génétique de l'hôte régulant la réponse immunitaire innée y contribue également.

Quelques études s'accordent à dire que neutrophiles et macrophages réalisent une infiltration accrue (48), mais aussi qu'une production accrue de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires contribue à la réponse hyper-inflammatoire observée. Les cytokines pro-inflammatoires (dont $TNF\alpha$, IL-6 et $IFN\gamma$) étaient produites à des niveaux plus élevés dans les poumons des souris sensibles un à sept jours après l'infection. Une démonstration moins formelle a été faite des cytokines (MCP1, KC, MIP2, IP-10 et G-CSF) en début d'infection chez les souris sensibles (DBA/2) (38).

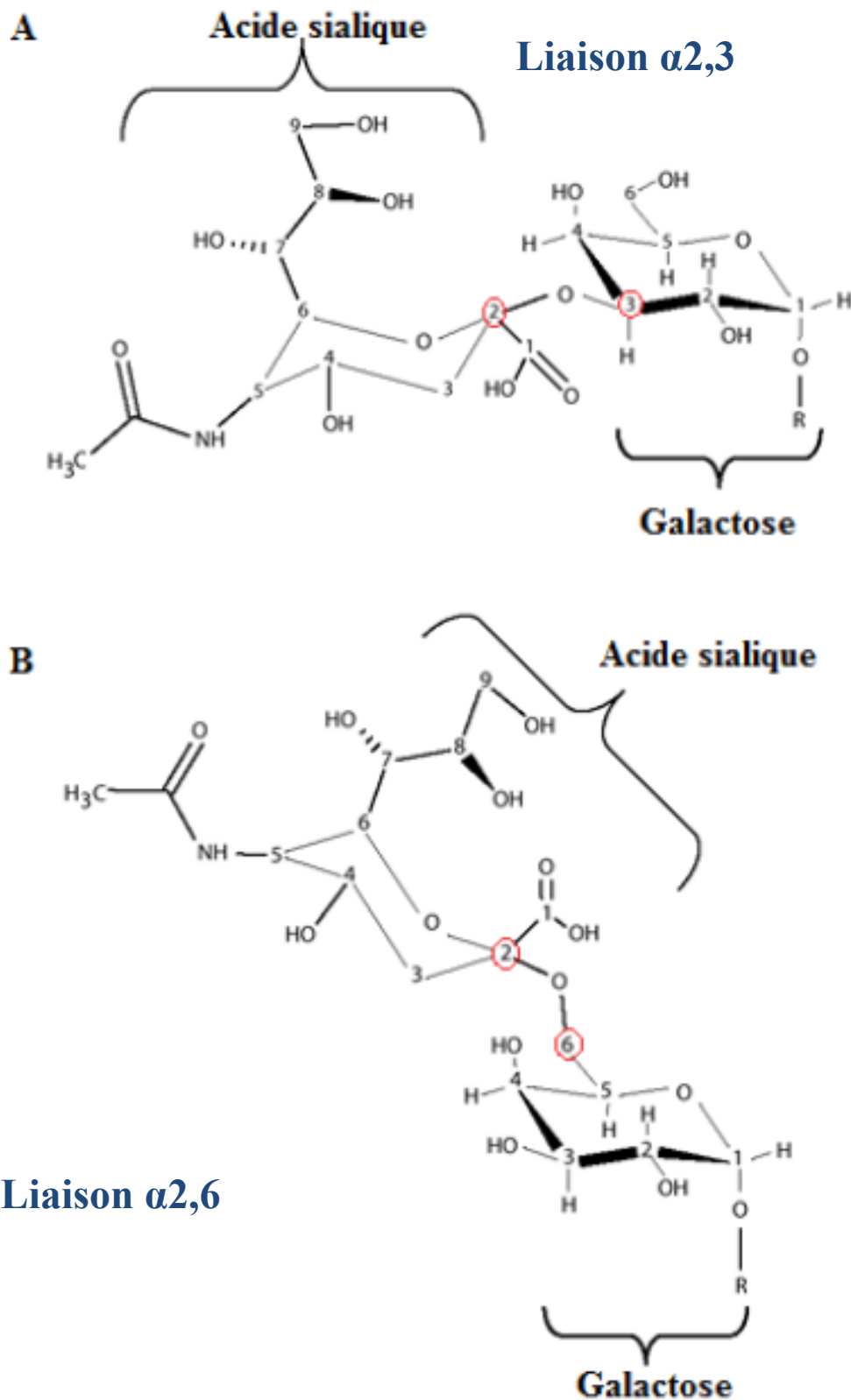


Figure 21: Les deux types de liaisons des acides sialiques à la surface de la cellule cible du virus Influenza A. Schéma A: Dans la liaison $\alpha 2,3$ (majoritaire au niveau digestif dans l'espèce aviaire), la molécule d'acide sialique est liée par son carbone 2 avec le carbone en position 3 du galactose. Schéma B: Pour la liaison $\alpha 2,6$ (type principal au niveau de l'arbre respiratoire humain), la molécule d'acide sialique est attachée au carbone 6 du galactose par son carbone en position 2. Source : *Does Oseltamivir Work against Influenza B?* (391)

Tableau 13 : Caractères résistants/sensibles génétiquement transmissibles chez la souris.

Référence	Etude réalisée	Principale découverte
MX		
Lindenmann J (1962)	Inoculation expérimentale de souris A2G avec le virus H1N1/NWS/1933	Les souris A2G se montrent résistantes à une inoculation intracérébrale et/ou intranasale. Découverte du gène Mx chez la souris.
Stacheli P (1988)	Analyse du gène Mx1 par restriction de fragments (RFLP) et Southern blot.	Etablissement de lignées Mx+ et Mx-, comparables aux souches actuelles A2G et CBA.
Horisberger MA (1995)	Article de revue sur les gènes Mx et les virus Influenza	
Salomon R (2007)	Comparaison des effets d'une inoculation expérimentale de souris avec /sans un gène Mx1 fonctionnel à l'aide du virus H5N1 A/Vietnam/1203/04 et du réassortant non-létale A/chicken/ Vietnam/C58/04.	Comparativement aux souris Mx1 ^{-/-} , les souris Mx1 ^{+/+} étaient protégées contre A/Vietnam/1203/04 : charge virale basse ; maladie moins sévère et moindre mortalité
Zimmermann P (2011)	Etude de l'effet inhibiteur de la protéine Mx1 de souris et de la protéine MxA humaine sur les virus H1N1/09 (A/Hamburg/4/09) et H5N1 aviaire hautement pathogène (A/Thailand/1(KAN-1)/04)	H5N1 (A/Thailand)/1 (KAN-1)/04 était plus sensible aux protéines Mx que H1N1/09(A/Hamburg/4/09). Cette sensibilité était associée au gène NP.
AUTRES GENES DE SENSIBILITE/RESISTANCE		
Toth LA (1999)	Mesure du sommeil de 13 souches consanguines recombinantes, issues d'un croisement entre des souris C57BL/6ByJ et BALB/cByJ en réponse à une infection à H3N2 (HK-X31). Les loci de caractères quantitatifs (QTL) liés au phénotype ont été identifiés à l'aide d'une analyse du couplage large du génome contre 223 loci.	Un intervalle de 10 à 12 cM sur le chromosome 6 entre D6Mit74 et D6Mit188 contient un locus à trait quantitatif (QTL) affectant la réponse à une infection pendant la phase légère.
Ding M (2008)	Analyse complémentaire ADN microarray sur le poumon et le SNC de souris BALB/cByJ et C57BL/6J infectées par le virus H3N2 (HK-X31)	Dans le poumon, 361 gènes différents ont changé d'expression après infection chez la souris BALB/cByJ, contre 16 chez la souris C57BL/6J. Sur 75 gènes liés à la réponse immunitaire, 3 ont présenté une expression accrue dans les poumons de souris C57BL/6J infectées, par rapport à 70 chez des souris BALB/cByJ infectées.
Trammell RA (2008)	Article de synthèse sur des données humaines et animales sur la sensibilité génétique de l'hôte à la grippe.	
Srivastava B (2009)	Comparaison de la réponse à l'infection par le virus Influenza A H1N1 (PR8) chez sept souches de souris consanguines. Comparaison supplémentaire de la réponse à l'infection à H7N7 (SC35M) chez une souche sensible (DBA/2J) et une souche résistante (C57BL/6J).	Différentes souches ont présenté de grandes différences dans leur réponse à l'infection à PR8. Les souris DBA/2J étaient très sensibles aux infections par H1N1 (PR8) et H7N7 (SC35M) par rapport aux souris C57BL/6J. Les souris DBA/2J présentaient des charges virales plus élevées, une expression plus élevée des cytokines et des chemokines et une pathologie pulmonaire plus étendue par rapport aux souris C57BL/6J.
Boon AC (2009)	Comparaison de la réponse des souris sensibles (DBA/2J) et des souris résistantes (C57BL/6J) et de 66 souches de souris recombinantes à l'infection à H5N1 (HK213) à l'aide d'une analyse de liaison à l'échelle du génome et d'une analyse d'expression d'ARN. HK213 a été sélectionnée pour sa létalité réduite chez les souris C57BL/6J tout en conservant la létalité chez les souris DBA/2J.	Après l'infection par le virus HK213, les souches sensibles ont présenté des charges virales et des cytokines pro-inflammatoires plus importantes que les autres. La cartographie des gènes a révélé cinq locus de caractères quantitatifs situés sur les chromosomes 2, 7, 11, 15 et 17 associés à une résistance au virus HK213. 121 gènes candidats uniques ont été identifiés dont les polymorphismes génétiques ou les niveaux d'expression différents peuvent avoir une incidence sur la pathogénèse du virus H5N1.
Alberts R (2010)	Comparaison de la réponse à l'infection par le virus H1N1 (PR8) chez des souches de souris sensibles (DBA/2J) et résistantes (C57BL/6J), analysée par analyse de l'expression microarray gene expression.	Les souris DBA/2J avaient une réponse plus forte en chemokines/cytokines. Les gènes de la réponse immunitaire innée ont été régulés positivement dans les deux souches, mais dans une plus grande mesure dans la souche sensible, et dans l'ensemble, un grand nombre de gènes ont été régulés à la hausse ou à la baisse uniquement dans la souche sensible.
Boon AC (2011)	Comparaison des charges virales et des réponses de l'hôte chez 21 souches de souris consanguines infectées par le virus H5N1 (HK213). L'expression de l'ARN et l'analyse des chemokines/cytokines ont été entreprises dans trois souches sensibles (DBA/2S, 129/SvImS et A/JS) et trois souches résistantes (SMR, C57BL/6Rj et BALB/cRj).	Les souches sensibles présentaient des charges virales et des concentrations en médiateurs pro-inflammatoires et une expression des gènes pro-inflammatoires plus élevées que les souches résistantes. La relation entre la charge virale et les concentrations de cytokines était la même chez les souches résistantes et susceptibles.
Trammell RA (2011)	Évaluation de la survie, de la charge virale et des réponses cytokines/chemokines dans le poumon de quatre souches de souris consanguines (BALB/cByJ, C57BL/6J, A/J et DBA/2J) et QTL cartographiant 21 souches consanguines recombinantes à la suite d'une exposition à H3N2 (HK - X31).	Les souris DBA/2J ont démontré une plus grande sensibilité à une pathologie sévère. Les profils de réponse des souches de souris étaient variables après une exposition <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> à HK-X31. Aucun QTL significatif n'a été détecté.

VIII. GÉNÉRALITÉS SUR LES STRATEGIES ANTI VIRUS INFLUENZA

8.1. LA CHIMIOPROPHYLAXIE ET LES TRAITEMENTS ANTI-INFLUENZA

Les traitements anti-influenza comprennent une large gamme de substances médicamenteuses utilisées soit en prévention des risques infectieux, soit en réponse à la maladie. Les traitements peuvent viser directement le virus Influenza lui-même, ou dans d'autres cas juste offrir le soulagement des symptômes de la maladie, abaissant ainsi la morbidité et/ou la mortalité. Durant ce laps de temps gagné, le système immunitaire propre de l'animal peut concevoir et mettre en œuvre une réponse capable de contenir ou d'éliminer l'infection.

Parmi les différentes classes de médicaments antiviraux, les inhibiteurs de la protéine M2 virale (amantadine et rimantadine) et les inhibiteurs de la neuraminidase (zanamivir et oseltamivir) revêtent un caractère historique. Ces médicaments ont prouvé leur efficacité dans la réduction de la gravité des symptômes surtout s'ils sont pris peu de temps après l'infection. Ils peuvent également être administrés dans le but de diminuer le risque d'infection (usage prophylactique). Malgré cette efficacité prouvée, des souches virales ont émergé et elles montrent une résistance à ces deux classes pharmacologiques.

D'autres molécules, plus récentes ou dont un usage antiviral n'a pu être démontré que tardivement, sont également brièvement décrites.

8.1.1. INHIBITEURS DE LA PROTEINE M2

L'amantadine et la rimantadine sont les principaux inhibiteurs de la protéine M2, ils figurent parmi la première génération d'agents antiviraux utilisés contre les virus Influenza A.

Amantadine

L'amantadine est l'un des premiers médicaments utilisés pour son effet antiviral en médecine humaine contre le virus Influenza A. Aux États-Unis, il est également autorisé par la *Food and Drug Administration* (FDA) comme médicament antiparkinsonien. Un tel usage reste controversé puisqu'en 2003, la revue Cochrane (articles systématiques) a conclu que l'amantadine n'était pas efficace dans le traitement de la maladie de Parkinson.

L'amantadine se fixe à la protéine M2 (Fig. 22), la protéine membranaire formant le canal ionique dans l'enveloppe du virus (375). La protéine M2 est constituée de quatre molécules identiques qui forment un canal à ions. Après la fusion entre la bicouche lipidique virale et la membrane endosomale, l'acidification

de l'intérieur de la particule virale grâce à la pompe à protons permet la déstabilisation de la protéine M1 et la libération des ribonucléoprotéines dans le cytoplasme.

La protéine M2 est un composant de l'enveloppe virale, elle fonctionne comme un canal ionique et régule le pH par le transport d'ions H⁺ dans les vésicules d'endocytose des particules virales. C'est en s'acidifiant que le virus détruit son enveloppe et libère ses huit fragments d'ARN pour infecter la cellule qu'il a pénétrée. La protéine M2 intervient aussi dans la conformation de l'hémagglutinine qui permet la fixation du virus à la cellule cible. L'amantadine agit spécifiquement sur la protéine M2 en la bloquant. Quand le canal ionique est bloqué par l'amantadine, il ne peut plus assurer sa fonction et les molécules d'HA ne peuvent plus migrer dans la cellule hôte, ni prendre la conformation adéquate, ce qui empêche la formation de nouvelles particules infectieuses (243).

L'amantadine, un antagoniste faible des récepteurs au glutamate de type *N-méthyl-D-aspartate* (NMDA), augmente la libération de dopamine en bloquant la réabsorption de celle-ci. Ceci justifie en partie les soupçons concernant son éventuelle efficacité dans le traitement de la maladie de Parkinson.

L'amantadine peut être utilisée autant dans un but préventif que curatif. Toutefois, les phénomènes de résistance ne peuvent apparaître que durant le traitement curatif. En effet, la quantité de virus présents étant déjà importante à ce stade de la maladie, le médicament participe à la sélection des quelques particules résistantes présentes. Grâce aux mutations fréquentes propres aux virus Influenza A, des souches résistantes finissent par supplanter les virus sensibles.

Une étude pour évaluer son utilisation dans la récupération à la suite de traumatismes cérébraux sévères est actuellement en cours. En 2005 et 2006, en Amérique du Nord notamment, la résistance à l'amantadine de certains virus saisonniers circulants a été mise en évidence. Depuis 2009, il a été démontré que lors de pandémies saisonnières, certaines souches virales (dont H3N2) présentent des résistances aux traitements à base d'amantadine. Ce phénomène prend progressivement de l'ampleur, à tel point que certaines recommandations déconseillent l'usage de l'amantadine dans le traitement courant de la grippe à Influenza A.

L'amantadine présente des inconvénients signalés chez l'homme : elle est mal métabolisée ; diffuse largement dans l'organisme (volume de distribution important) et son excrétion se fait presque exclusivement via la filtration glomérulaire et la sécrétion tubulaire. Ceci implique qu'il faille ajuster la posologie lorsque le traitement est administré à des patients souffrant de dysfonctionnements rénaux. Chez d'autres patients, des effets indésirables ont été signalés : des effets orthostatiques (hypotension, nausées) ;

des signes d'insuffisance cardiaque (162) ainsi que des troubles du système nerveux central (confusion, désorientation et des troubles de l'humeur). Ces symptômes sont d'autant plus fréquents lorsque le traitement est utilisé pendant de longues périodes (pouvant aller jusqu'à plusieurs semaines).

Rimantadine

La rimantadine (α -méthyl-1-Chlorhydrate d'adamantaneméthylamine) est une molécule dérivée de l'amantadine.

Elle agit comme l'amantadine et empêche la libération des segments génomiques dans le cytoplasme de la cellule infectée. Elle inactive donc la protéine M2. La rimantadine est à usage exclusivement préventif et n'est efficace qu'envers les virus Influenza A. Pour assurer son efficacité, le traitement doit être administré le plus tôt possible après l'infection et se poursuivre au moins durant dix jours.

Cette molécule plus récente, présente beaucoup moins d'effets indésirables que sa molécule parente l'amantadine. Elle est mieux métabolisée que cette dernière car seulement 25% restent inchangés après métabolisation. Elle se lie aux protéines plasmatiques avec un taux d'environ 40%. La rimantadine est mieux tolérée par les enfants et les personnes âgées et est recommandée précisément dans ces deux cas.

Malheureusement, on note l'apparition de souches virales d'Influenza résistantes envers les inhibiteurs de la protéine M2 dont la rimantadine. Ceci limite donc l'utilisation de cette catégorie de traitement et a suscité la recherche d'alternatives (153).

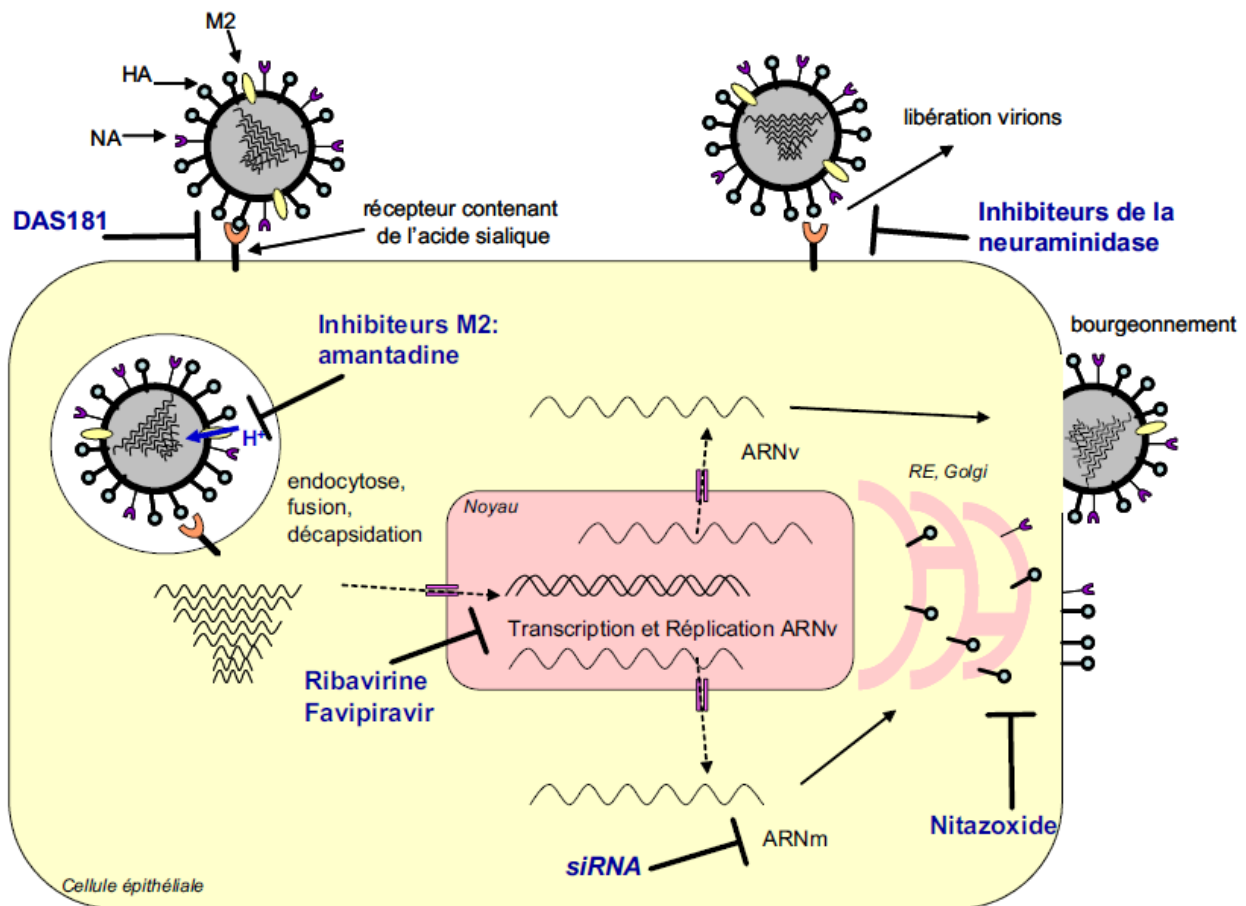


Figure 22: Cycle viral et interaction avec différentes substances médicamenteuses. Les deux glycoprotéines majeures de surface d'Influenza A sont observables, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). L'HA1 permet la fixation des virus aux acides sialiques présents à la surface des cellules épithéliales. Après endocytose de la particule virale, le canal M2, provoque l'acidification de la particule virale. L'acidité permet la décapsulation (dissociation des interactions entre la protéine de matrice M1 et les ribonucléoprotéines virales vRNP) et le changement conformationnel de la région HA2 assurant la fusion entre enveloppes virale et endosomale. Les vRNP sont alors libérées dans le cytoplasme puis transportées vers le noyau où aura lieu la transcription. Arrive ensuite la réplication des ARN viraux (ARNv). Les ARN messagers (ARNm) sont exportés vers le cytoplasme et traduits en protéines. Les vRNP formés au niveau du noyau et complexés à M1 sont transportés vers la membrane plasmique au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Du fait de l'interaction entre M1 et les régions cytoplasmiques d'HA et de NA, les nouveaux virions sont assemblés puis bourgeonnent à la surface de la cellule. La libération finale n'est possible que grâce à l'activité de la NA qui clive le lien entre les résidus d'acide sialique et l'HA qui maintient les virus collés à la surface des cellules. Les différentes étapes du cycle viral sont des cibles d'antiviraux connus ou à l'étude. Les dérivés d'adamantanes (amantadine et rimantadine) agissent en bloquant le canal à protons M2 des virus influenza de type A empêchant ainsi l'acidification, la décapsulation et bloquent ainsi le cycle viral. Les siRNA (small interfering RNA) sont capables de bloquer spécifiquement des molécules d'ARN et empêchent l'expression du gène cible. La ribavirine, analogue de la guanosine, est capable de bloquer la réplication des virus influenza. Le favipiravir (T-705), inhibe aussi la réplication des virus influenza. En ce qui concerne les phases plus tardives du cycle viral, on citera le nitazoxanide qui bloque les étapes de glycosylation de l'HA empêchant le passage de l'HA entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et son transport à la surface des cellules. Les Inhibiteurs de la Neuraminidase (INA) sont des analogues des acides sialiques et agissent en bloquant de manière compétitive l'activité de la NA, ceci empêche la fluidification du mucus et agit tout à la fin du cycle viral en empêchant la propagation des virions néoformés. Certains facteurs produits par l'hôte peuvent aussi être la cible d'antiviraux. Ainsi, la sialidase (DAS181), construction correspondante à la fusion entre une sialidase et une protéine d'ancrage dans l'épithélium respiratoire, est capable de cliver les acides sialiques des surfaces cellulaires. Source :Grippe et antiviraux (91).

8.1.2. INHIBITEURS DE LA NEURAMINIDASE

Zanamivir et oseltamivir

Le zanamivir (Relenza© n'est plus en vente en Belgique depuis 2013) et l'oseltamivir (Tamiflu©) sont les principaux représentants du groupe des inhibiteurs compétitifs de la neuraminidase (NA). Leur action s'étend à la fois sur les virus Influenza A et B en mimant le substrat de l'enzyme neuraminidase et en bloquant celle-ci de façon irréversible (Fig. 22). Elle empêche ainsi la pénétration du virus et bloque le détachement des virions nouvellement synthétisés à la surface de la cellule cible. Leur action favorise l'autoagrégation des virions et empêche leur dissémination. Les nouveaux virus ne peuvent plus être libérés et donc ne peuvent plus aller infecter d'autres cellules de l'organisme.

Ils agissent comme des inhibiteurs de la neuraminidase présente à la surface des virus Influenza A et B. Le rôle de la neuraminidase est de détacher les résidus glycoconjugués de l'acide N-acétyl neuraminique (ou acide sialique). Cette hydrolyse aboutit au détachement des virions néoformés de la cellule cible et participe à la diffusion de l'infection virale.

Un traitement précoce durant les deux premiers jours de l'infection permet de raccourcir la durée des symptômes et permet de reprendre une activité habituelle un à deux jours plus tôt. Le traitement doit se poursuivre au moins pendant sept à dix jours.

Les inhibiteurs de la neuraminidase sont utilisés autant en curatif qu'en préventif face à des affections à virus Influenza A et B. Le zanamivir a été historiquement la première molécule de ce groupe à avoir été mise sur le marché. Récemment, des études ont montré que le zanamivir aurait des avantages par rapport à l'oseltamivir grâce à son pouvoir de liaison plus important en présence de la neuraminidase du virus.

Le zanamivir a la particularité d'être disponible sous la forme de poudre. Il a été utilisé avec succès dans le traitement de jeunes patients (291) et figure parmi les recommandations de l'OMS à la suite de l'épidémie de virus Influenza A(H1N1) en 2015. L'oseltamivir quant à lui, ne peut être administré que par voie orale afin d'obtenir des effets similaires. On constate toutefois que des cas de résistance ont été signalés (105).

Les principales caractéristiques des deux molécules sont rapportées dans un tableau (Tab 14) :

Tableau 14 : Tableau comparatif du zanamivir et de l'oseltamivir

Comparatif	Zanamivir	oseltamivir
MODE D'ACTION	Inhibiteurs de la neuraminidase	
SITE D'ACTION	Action locale (tractus respiratoire)	Action systémique
INDICATION	Affection à virus Influenza A et B	
TR. CURATIF	Oui	Oui
TR. PROPHYLACTIQUE	Pas d'indication	Oui
ADMINISTRATION	Inhalation	Voie orale
EFFETS INDÉSIRABLES	Réactions cutanées Réactions d'hypersensibilité Bronchospasmes, dyspnée Sensation de constriction (gorge)	Réactions cutanées Réactions d'hypersensibilité Troubles gastro-intestinaux Perturbation de la fonction hépatique

Source : *Comparison of efficacy and safety of oseltamivir and zanamivir in pandemic influenza treatment* (362).

D'abord recommandé indifféremment en curatif ou en préventif, l'oseltamivir est, depuis 2005, recommandé par le fabricant pour une utilisation en curatif, mais si la nécessité d'un traitement préventif se fait sentir, celui-ci devrait se faire sous surveillance médicale car un usage exagéré ou anarchique pourrait permettre au virus de développer une résistance à ce type de médicament.

Dans le cas de virus responsables d'épisodes de grippe aviaire, l'utilisation des inhibiteurs de la neuraminidase a été proposée, mais elle n'a pu éviter un certain nombre de décès et avec des preuves d'efficacité considérées comme faibles (83).

L'efficacité de l'oseltamivir face au virus H5N1 a été testée (99) via l'infection de 80 souris, dont une partie traitée avec de l'oseltamivir. Au terme de l'étude, cinq souris parmi dix traitées durant cinq jours avec la dose quotidienne la plus élevée d'oseltamivir ont survécu. Huit souris sur dix ayant été traitées durant huit jours ont survécu. Durant cette même expérience, aucune des souris traitées avec un placebo et ensuite exposées au H5N1 n'a survécu. Les chercheurs notent au passage que le variant H5N1 vietnamien de 2005 a été considéré comme le virus le plus virulent connu depuis 1997.

L'oseltamivir et le zanamivir sont comparables en termes de profils cliniques (Tab 14) et restent supérieurs aux amantadines (166). En ce qui concerne l'efficacité clinique des deux médicaments, une récente méta-analyse (142) a révélé que les deux médicaments avaient un effet thérapeutique modeste chez les adultes et en tant que traitement prophylactique.

Quand on remarque que de plus en plus de souches virales (Influenza A, surtout H1N1 et H3N2) sont résistantes aux amantadines, il est à noter que les résistances envers l'oseltamivir et le zanamivir restent faibles. Pour ces raisons, le *Center for Disease Control and prevention* (CDC, USA) et l'Organisation

Mondiale de la Santé (OMS) recommandent leur utilisation tant dans la prévention que le traitement de la grippe saisonnière que dans le cas d'un virus Influenza à caractère pandémique (388).

Peramivir

Le peramivir est un médicament antiviral anti-influenza développé par BioCryst Pharmaceuticals®. C'est un inhibiteur de la neuraminidase qui possède une activité antivirale contre les virus Influenza de types A et B comparable, voire légèrement supérieure à l'activité de l'oseltamivir ou du zanamivir. Ce résultat obtenu *in vitro*, en cellules MDCK (226) a conduit à des premiers essais en modèle souris avec administration *per os* qui ont confirmé cette efficacité.

Les essais se sont alors orientés vers l'étude de la tolérance et de l'efficacité du peramivir administré par voie parentérale. L'ensemble de ces données a conduit la *Food and Drug Administration* (FDA) à délivrer une autorisation temporaire d'utilisation dans le cadre de la pandémie de 2009 malgré des effets secondaires essentiellement digestifs de type diarrhées, nausées et vomissements.

Il est éliminé essentiellement par voie rénale et peu métabolisé par le foie (33). Le peramivir a également été approuvé au Japon (Rapiacta®) et en Corée du Sud (Peramiflu®). Depuis 2015, il constitue une des seules options intraveineuses car il a un très faible volume de distribution, pour le traitement en cas d'infection à Influenza A chez le porc (52).

Laninamivir

Le laninamivir (octanoate hydrate) est un composé élaboré à partir du zanamivir (multimère), il est à l'essai en Australie et au Japon. Il serait capable d'inhiber l'activité neuraminidase de types N1 à N9. Dans un modèle de souris infectées par le virus influenza A/PuertoRico/8/34, l'administration intranasale a mis en évidence une efficacité maximale du laninamivir qui permettait une survie prolongée après une seule administration, dans la période allant de sept jours avant l'infection à dix jours post-infection (396). Cet effet prolongé serait lié à une longue rétention du laninamivir dans le tractus respiratoire de la souris et à sa conversion progressive en R-125489 (188).

8.1.3. RIBAVIRINE

La ribavirine, également connue sous le nom commercial de Virazole®, est une molécule analogue à la guanosine (1-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide). Son mécanisme d'action n'est pas complètement connu, mais l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) semble être la cible principale de la molécule (340). Cette inhibition diminue la concentration intracellulaire de guanosine-

triphosphate (GTP), ce qui arrêterait la synthèse des protéines virales et limiterait la réplication de l'ARNv (Fig.22).

La ribavirine est un mutagène mortel de l'ARNv qui provoque des mutations dans sa réplication. Cependant, la nécessité d'administrer des doses élevées du médicament pour avoir de bons résultats cliniques a limité son utilisation en tant que médicament anti-influenza. Une revue de la littérature récente suggère qu'il n'y a pas de résultats concluants sur l'utilisation bénéfique de la ribavirine dans un schéma thérapeutique de routine pour les cas de gripes (54). La ribavirine peut être administrée par voie orale, par aérosolisation et occasionnellement par voie intraveineuse.

8.1.4. INHIBITEURS DE L'HEMAGGLUTININE

Au sein de cette catégorie il existe plusieurs molécules potentiellement efficaces. Cependant, un seul médicament, un petit dérivé de l'indole, l'arbidol (ARB ou Umifenovir®), a été autorisé. L'ARB a été créé par le *Centre for Drug Chemistry* à Moscou (323), il y a vingt ans et depuis a été utilisée en Chine pour la prophylaxie et le traitement de la pneumonie causée par les virus Influenza A et B. L'ARB exerce probablement une action antivirale multiple : un effet virucide direct, un blocage du virus au niveau de l'entrée cellulaire (attachement et internalisation) et une altération de la réplication virale. Ces effets seraient en partie expliqués par sa capacité à se lier aux protéines et aux lipides.

Plusieurs études ont démontré que l'ARB est également efficace contre d'autres virus enveloppés et non enveloppés tels que le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C (HCV), le virus respiratoire syncytial (RSV), certains picornavirus, le poliovirus, le paravirus Influenza de type 3 (PIV3), le virus de la bronchite infectieuse, le virus chikungunya, le réovirus, le virus hantaan, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et le virus de la maladie de Marek (323).

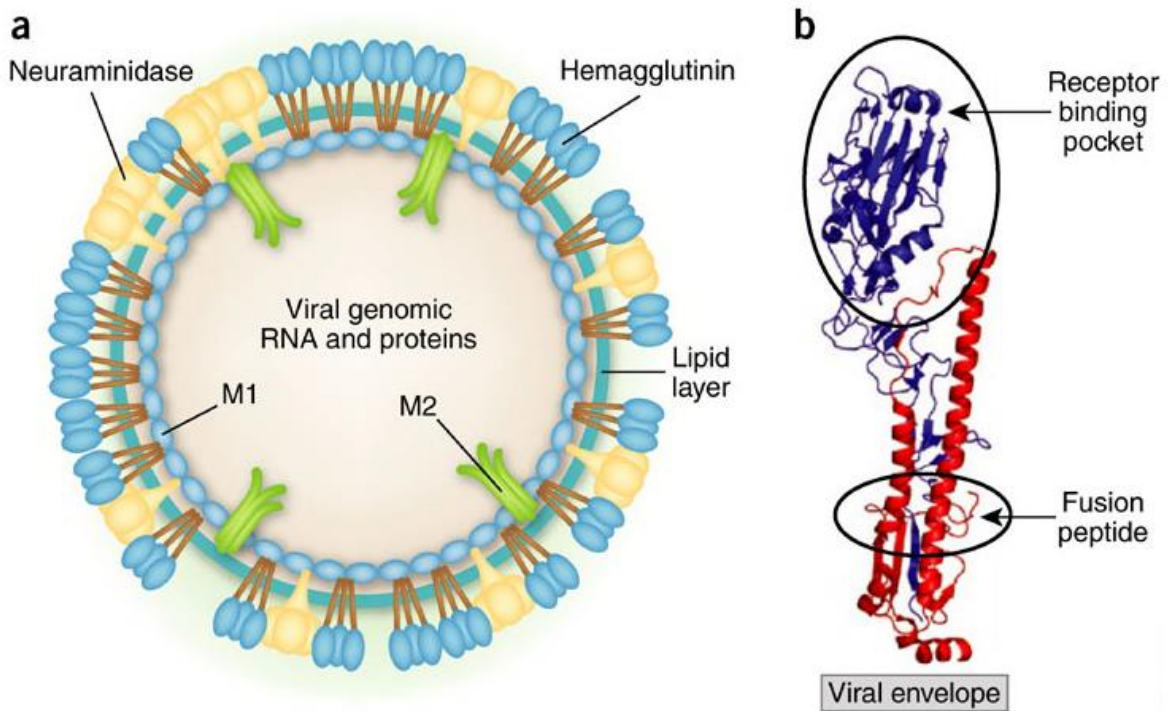


Figure 23: (a) Virion Influenza. L'hémagglutinine est représentée par une glycoprotéine trimère à la surface de l'enveloppe virale. (b) Structure d'un monomère de l'hémagglutinine. Chaque monomère est constitué de deux segments, HA1 (bleu) et HA2 (rouge), qui comprend le peptide de fusion. La zone contenant les sites antigéniques les plus couramment reconnus par la majorité des anticorps neutralisants est encerclée sur le dessus de la structure. Source: *Nature Structural & Molecular Biology* (377)

8.1.5. INHIBITEURS DE LA POLYMERASE VIRALE

T-705 ou favipiravir

En 2002, une nouvelle molécule, le T-705 ou favipiravir, une pyrazine organofluorée produite par la société japonaise Toyama Chemical®, a montré une efficacité en culture cellulaire MDCK contre des virus Influenza A, B et C, y compris sur des virus résistants aux inhibiteurs de la neuraminidase ou à l'amantadine, ainsi qu'une efficacité en modèle murin infecté par Influenza A (A/PuertoRico/8/34). Le mécanisme d'action procède par inhibition sélective de l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus (Fig.22). Il n'interagit ni avec la transcription de l'ADN en ARN ni avec la réplication de l'ADN dans les cellules de mammifères. Le favipiravir agirait en inhibant spécifiquement la polymérase des virus Influenza après conversion en un dérivé ribofuranose puis par phosphorylation par les enzymes cellulaires.

In vivo, le favipiravir s'est avéré efficace pour protéger des souris infectées par un virus Influenza A(H5N1) hautement pathogène. L'association de l'oseltamivir et du favipiravir s'est avérée synergique chez des souris infectées par un virus Influenza A (329).

Baloxavir Marboxil

Le baloxavir marboxil (Xofluza®) est un médicament antiviral contre la grippe pour le traitement des infections à Influenza virus A et Influenza virus B. Il a été approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) des États-Unis et au Japon (410). Le baloxavir marboxil a été développé en tant que stratégie de pro-médicament, c'est-à-dire que sa métabolisation libère son agent actif, l'acide baloxavir (BXA). La BXA fonctionne alors comme un inhibiteur d'enzyme, ciblant l'activité endonucléase dépendante de la polymérase acide du virus, cette endonucléase est essentielle dans le processus dit de «cap-snatching» du virus. L'inhibition de la polymérase empêche la réplication virale (371). Il est administré en une dose unique, par voie orale. Les premiers essais indiquent qu'il permet de réduire la durée des symptômes grippaux d'environ un jour. Toutefois le médicament provoquerait la sélection de mutants résistants qui le rendraient progressivement inefficace (261). Les recherches se poursuivent et des inquiétudes cliniques concernant des résistances apparaissant chez les patients à la suite du traitement sont relevées (159).

8.1.6. CLARITHROMYCINE ET LA RIFAMPICINE

La clarithromycine

La clarithromycine est un antibiotique macrolide utilisé pour traiter des pathologies diverses : les pharyngites, les angines, les sinusites aiguës. En association avec d'autres antibiotiques il permet de traiter les ulcères de l'estomac (ulcères à *Helicobacter pylori*) (219), les complications bactériennes de la bronchite chronique, les pneumonies, les infections cutanées et l'infection disséminée dite à *Mycobacterium avium*

complex (chez les patients porteurs de VIH). La clarithromycine n'est donc pas à proprement parler un médicament anti-influenza, mais certaines de ses caractéristiques peuvent s'avérer utiles en ce sens. Ce sont :

✓ **La clarithromycine a des effets anti-inflammatoires**

La clarithromycine et l'azithromycine sont bien connues pour avoir des effets immunomodulateurs qui peuvent réduire les lésions pulmonaires. Par exemple, chez la souris, la clarithromycine a réduit l'inflammation observée dans les dispositifs expérimentaux où la ventilation, mal réglée était supérieure au volume courant de la souris (9). Une grande partie des avantages observés avec ce type de médicament est probablement liée à cette activité immunomodulatrice.

✓ **La clarithromycine peut inhiber la réplication virale**

Le virus Influenza pénètre dans les cellules respiratoires via la liaison avec l'acide sialique puis est partiellement dégradé par suite de modifications survenant dans les endosomes. Il semblerait que la clarithromycine soit en mesure d'agir négativement sur deux processus : elle réduit significativement le taux de la liaison de l'acide sialique au virus et réduit également la formation de vacuoles d'endosomes. Dès lors, la réplication virale est fortement réduite dans les cellules épithéliales trachéales (397).

✓ **La clarithromycine réduit la libération de cytokines**

La clarithromycine réduit la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales trachéales, ce phénomène a été démontré particulièrement pour les cytokines IL-1, IL-6 et IL-8 (14).

Quant aux preuves cliniques concernant l'efficacité de la clarithromycine dans le traitement de l'affection à virus Influenza, Higashi a réalisé en 2004 un essai clinique (essai avec un nombre limité de cas) portant sur l'utilisation de la clarithromycine dans le traitement contre le virus Influenza. Les patients de l'étude ont reçu pour moitié des inhibiteurs de la neuraminidase (oseltamavir), l'autre moitié recevant un traitement à base de clarithromycine (144). Les résultats cliniques ont indiqué que les deux groupes réagissaient de manière très semblable. Un léger effet en faveur de l'usage de la clarithromycine après quatre jours de traitement semblait apparaître mais le faible échantillon n'a pas permis de conclure de manière indiscutable.

Une étude à plus large échelle a été tentée en 2002 sur l'usage des macrolides (258). Pour cette étude, 365 enfants souffrant d'affection à Influenza ont été sélectionnés de manière aléatoire, 148 ont reçu de la clarithromycine et 63 ont reçu de l'érythromycine. Les patients traités avec la clarithromycine présentèrent rapidement une chute de la fièvre et eurent moins tendance à développer des pneumonies. Cette étude permet de suggérer un effet bénéfique de l'usage des macrolides en complément dans ce type de traitement.

Rifampicine

La rifampicine est un antibiotique de la famille des rifamycines utilisé pour traiter un certain nombre d'infections bactériennes (tuberculose, lèpre, légionellose et *Haemophilus Influenzae*). La rifampicine est administrable par voie orale et par injection intraveineuse.

La rifampicine a été isolée à partir de la bactérie *Amycolatopsis rifamycinica* pour la première fois en 1957, elle est commercialisée depuis 1971. Cet antibiotique fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'OMS. Il agit en bloquant la synthèse de l'ARN dans les bactéries cibles.

La rifampicine, à l'instar de la sélénocystamine, exerce un effet inhibiteur sur l'activité *in vitro* de l'ARN polymérase ARN dépendante du virus Influenza A. La rifampicine a été étudiée sur une infection expérimentale en œufs embryonnés infectés à l'aide de la souche influenza A/PR/8/34 (H1N1) avec succès. Les deux antibiotiques diminuent significativement les titres viraux. Cet effet est mieux marqué lorsque ces antibiotiques sont présents à un stade précoce de l'infection virale et à des doses maximales proches de la cytotoxicité (130). La littérature ne décrit pas d'essais cliniques faisant appel à la rifampicine.

Au cours des dernières décennies, plusieurs médicaments antiviraux contre les infections par les virus Influenza A ont donc été développés. Malgré cela, les formules commercialisées ont été nettement moins nombreuses. Il faut tenir compte du fait que d'y recourir régulièrement (grippe saisonnière, pandémies récentes, par exemple) a sans doute contribué à l'émergence de souches virales résistantes. Les médicaments antiviraux utilisés pendant les épidémies saisonnières et les pandémies ont généralement été administrés en monothérapie, parfois, de manière incontrôlée chez des patients humains ou par des propriétaires d'animaux de ferme. Ceci a conduit à l'émergence de souches virales résistantes, un phénomène particulièrement remarqué avec les composés de la famille des amantadines.

On remarque donc qu'*in fine*, les médicaments d'usage courant contre les virus Influenza ne sont pas très nombreux, ceci malgré les recherches menées en ce sens. Aussi, leur efficacité est temporaire et reste fortement influencée par l'émergence de nouvelles souches virales résistantes. Ceci explique le nombre important de médicaments en cours d'essai ou d'expérimentation.

8.1.7. AUTRES ANTIVIRAUX EN COURS D'EXPERIMENTATION

Les sialidases (ou DAS181)

Les sialidases permettent d'empêcher la fixation des virus sur les récepteurs, les acides sialiques des cellules épithéliales de l'hôte et d'empêcher leur infection (Fig.22). La DAS181 est une protéine de fusion recombinante composée d'un domaine catalytique sialidase dérivé d'*Actinomyces viscosus* et d'un domaine d'ancrage dans les cellules de l'épithélium respiratoire. L'administration de DAS181 par inhalation permet de cliver les acides sialiques de l'épithélium respiratoire et s'est avérée efficace *in vivo* dans un modèle de souris infectées par un virus Influenza A aviaire A(H5N1) (30) hautement pathogène, ainsi que par le virus H1N1 (360). En 2015, l'évaluation en phase d'essai clinique (phase 1) a été réalisée avec des résultats encourageants (403).

Les thiazolides

Les thiazolides (dont le nitazoxide) sont une classe de molécules connues pour leur action antiparasitaire, ils se sont avérés capables d'inhiber la réplication de virus Influenza A (Fig. 22). Les thiazolides agissent au niveau post-translationnel en bloquant la voie finale de glycosylation de l'hémagglutinine, empêchant son insertion au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte et bloquant ainsi le cycle viral (300). Ces molécules sont efficaces *in vitro*, mais leur efficacité *in vivo* reste à démontrer.

Les petits ARN interférants (small interfering RNAs, siRNA)

Les siRNAs (Fig.22) sont de courtes séquences d'ARN double brin (21 à 26 nucléotides) ciblant et inhibant spécifiquement l'expression d'un gène. Des siRNAs ciblant des gènes de virus Influenza A se sont avérés protecteurs *in vitro* et *in vivo* chez la souris. Ces molécules n'ont cependant pas encore fait l'objet d'études sur l'homme dans le traitement de la grippe humaine.

L'approche RNA-omique

Il s'agit d'approches nommées «omiques» car elles analysent la réponse globale de la cellule à l'infection par l'analyse de sa réponse en ARN messagers (ARNomique) ou en contenu protéique (PROTEomique) par exemple. Cette stratégie a été récemment utilisée pour identifier de nouvelles molécules antivirales à partir de banques de données existantes (173).

Des pistes existent dans la recherche de nouveaux traitements anti-influenza. Dans le contexte présent, peu de médicaments sont disponibles pour un usage régulier. Le risque permanent de voir émerger de nouvelles souches résistantes et le risque récurrent de voir surgir une nouvelle pandémie humaine ou animale ne sont

pas couverts par les médications courantes disponibles ou les médicaments en cours d'expérimentation. Pour toutes ces raisons, il est particulièrement important de développer de nouvelles méthodes de lutte anti-influenza, ceci soit par le développement de nouveaux médicaments antiviraux, soit en réfléchissant à de nouvelles stratégies antivirales (136).

De telles stratégies devraient recourir à des traitements ne laissant que peu ou pas de place à la résistance virale et visant des cibles stables et constantes du virus. Les thérapies recourant à la combinaison de traitements ou la mise au point de vaccins dits universels constituent des pistes prometteuses en ce sens.

8.2. LES STRATÉGIES AYANT RECOURS À L'IMMUNITÉ

Le système immunitaire chez les vertébrés, chargé de protéger le corps contre les agents infectieux, comporte une importante gamme de moyens défensifs dont : i) des molécules (ayant un rôle de senseurs) médiatrices de signaux intercellulaires, communes à toutes les cellules et ii) un système spécialisé de cellules hématopoïétiques et de protéines du sérum qui ensemble, fournissent les mécanismes nécessaires à la reconnaissance des différents organismes pathogènes dans tous les sites qu'ils colonisent et dans un grand nombre de situations et qui peuvent procéder à leur élimination (186).

L'immunisation est un bon moyen d'assurer une protection spécifique contre de nombreux agents pathogènes courants. Par ce principe, l'organisme dispose en vue de sa protection soit d'anticorps dirigés contre l'agent pathogène, on parle alors d'immunité à médiation humorale; soit de cellules lymphocytaires (cellules lymphocytes T) dirigées par exemple contre des toxines produites par l'agent pathogène, on parle dès lors d'immunité à médiation cellulaire. L'immunité spécifique peut résulter d'une immunisation active ou d'une immunisation passive.

L'immunité nécessite la reconnaissance et l'élimination ou pour le moins, le confinement des organismes infectieux. Ces tâches sont effectuées par deux systèmes définis de façon assez large comme l'immunité innée et l'immunité acquise. Le système immunitaire inné est composé de molécules et de cellules qui distinguent les cellules de l'hôte de celles d'agents infectieux, en partie par la reconnaissance de motifs conservés chez les agents pathogènes; les composants du système sont activés dans les heures qui suivent l'exposition et leur efficacité n'est pas augmentée significativement à la suite d'un contact précédent. Par contre, les lymphocytes du système immunitaire acquis et les anticorps qu'ils produisent peuvent reconnaître un nombre pratiquement illimité de cibles différentes mais ils ne deviennent efficaces que deux à quatre jours après le premier contact avec un agent pathogène particulier. Les lymphocytes et leurs

produits dirigés spécifiquement contre ces agents pathogènes persistent ensuite sous forme d'une mémoire immunitaire qui assurera une protection rapide lors d'une nouvelle exposition au même agent infectieux. La plupart des mécanismes qui éliminent les organismes infectieux sont fournis par le système immunitaire inné. Ils peuvent être mis en œuvre soit directement, soit indirectement, via la reconnaissance par des cellules du système immunitaire acquis qui activent ensuite les défenses immunitaires innées (178).

Les défenses immunitaires innées commencent au niveau de la peau et des épithéliums des tractus respiratoire, intestinal, urinaire et reproducteur, en mettant en jeu des peptides antimicrobiens qui confèrent une protection importante contre les infections bactériennes et fongiques. Dans le sang et les tissus, l'immunité innée est assurée principalement par les cellules immunitaires qui reconnaissent les motifs bactériens communs et phagocytent ces derniers par les protéines du système du complément qui circulent dans le sang, lieu où elles sont activées par les membranes microbiennes pour détruire les pathogènes directement ou indirectement en recrutant des phagocytes.

Les phagocytes de l'immunité innée jouent un rôle central à deux niveaux dans la réponse immunitaire. D'abord, après activation par les antigènes des surfaces microbiennes, ils libèrent des cytokines : c'est-à-dire des molécules signaux de nature polypeptidique qui modulent les autres acteurs du système immunitaire. Parmi eux on retrouvera les chémokines qui sont des membres de cette famille de cytokines de nature basique, agissant principalement comme agents attractifs de nature chimique. Le terme de chémokine est la résultante de la contraction de cytokine et de chimiotactique. Ils participent à l'amplification de la réponse immunitaire. Les cytokines et les chémokines sont des médiateurs moléculaires, ils sont produits par les phagocytes et remplissent un grand nombre de fonctions dans l'immunité : i) ils augmentent la perméabilité des vaisseaux sanguins ; ii) ils changent les propriétés d'adhérence de ces mêmes vaisseaux et iii) ils agissent par signalisation directe, c'est-à-dire qu'ils attirent d'autres cellules et molécules vers le site de l'infection. Parmi l'ensemble des cytokines et chémokines, ceux qui sont libérés par les phagocytes activés ou par les cellules lymphoïdes activées sont dits cytokines inflammatoires.

Les cytokines inflammatoires sont les causes, entre autres, des principales pathologies à manifestations immunitaires telles que le choc septique et l'arthrite rhumatoïde (271).

La défense immunitaire acquise est elle aussi activée par les phagocytes, elle fait intervenir les lymphocytes. Les deux catégories principales sont les lymphocytes T et les lymphocytes B, les lymphocytes T s'attaquent aux cellules infectées par des virus et activent d'autres cellules immunitaires. Parmi ces cellules, on retrouve d'autres phagocytes (ceux impliqués dans la destruction des bactéries intracellulaires et des lymphocytes

B) afin que ceux-ci puissent sécréter des anticorps. Les anticorps sont des protéines hautement spécialisées qui reconnaissent les agents infectieux et qui les marquent en vue de leur destruction.

Les récepteurs extrêmement variables à la surface des lymphocytes ne peuvent pas distinguer les composants des agents infectieux d'autres molécules quelconques. L'efficacité de la réponse immunitaire acquise dépend des phagocytes de l'immunité innée qui doivent tout d'abord cibler les micro-organismes infectieux. Interviennent alors d'autres cellules hautement spécialisées, les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques commencent leur vie comme des phagocytes, jusqu'au moment où elles sont activées par des motifs bactériens ou par des cytokines inflammatoires. Elles se spécialisent dans la présentation de composants variables des micro-organismes auprès des lymphocytes T, dans l'activation et la prolifération du lymphocyte suivie de sa différenciation en cellule T effectrice (326).

Ces interactions cruciales entre les cellules dendritiques activées et les lymphocytes ont lieu dans un système spécialisé, les tissus lymphoïdes, ce sont des tissus adaptés à cette fonction et disséminés dans les organes.

8.2.1. IMMUNISATION ACTIVE

Dans l'immunisation active, comme la vaccination, l'organisme est soumis à des agents immunisants (antigènes) et l'organisme produit par lui-même les anticorps ou les cellules T nécessaires à sa protection contre l'agent infectieux.

La vaccination est, en médecine, l'option prophylactique la plus efficace et la plus rentable en termes de rapports entre coûts et bénéfices. Elle permet à la fois de réduire le taux de mortalité et le taux de morbidité chez les sujets face à un processus infectieux. Dans le cas de la vaccination contre les virus Influenza, celle-ci induit une immunité spécifique en relation avec la souche virale contractée. Ainsi, le processus de vaccination doit régulièrement être réévalué afin de remettre à jour la composition du vaccin. Généralement, une base annuelle est adoptée pour les affections saisonnières dans la population humaine. Les souches virales qui sont actuellement utilisées dans la fabrication de vaccins sont choisies sur base des études épidémiologiques et sur l'historique des virus circulants chez les humains et chez les animaux. Malgré une démarche rigoureuse et les nombreuses données récoltées sur les virus Influenza, on constate que ces virus continuent à provoquer des problèmes significatifs tant chez l'homme que chez les animaux.

L'immunisation active telle que pratiquée lors de la vaccination est considérée comme persistante, par exemple l'immunité procurée chez l'homme apparaît en deux à trois semaines et persiste cinq à six mois. Elle réduit très significativement la mortalité chez les personnes à risque mais elle ne permet pas un contrôle satisfaisant susceptible de faire face en cas d'épisodes épidémiques.

Il faut répéter la vaccination chaque année, d'une part car la durée de l'immunité est courte et d'autre part parce que la composition du vaccin est modifiée tous les ans afin qu'elle s'adapte aux modifications antigéniques des virus. Ce réajustement antigénique ne fait que suivre et non précéder les glissements et les cassures antigéniques observés dans le virus. A l'occasion d'une cassure antigénique, le délai nécessaire à la préparation d'un nouveau vaccin risque de ne pas permettre de prévenir une prochaine pandémie. Les populations ne sont donc pas à l'abri d'une soudaine émergence d'une souche particulièrement virulente ou d'un virus à potentiel pandémique.

Les vaccins actuels contre les virus Influenza se composent de déterminants antigéniques (Tab. 15) provenant de glycoprotéines de l'ectodomaine de l'hémagglutinine (HA) et de la neuraminidase (NA). Les protéines virales des souches circulantes de virus Influenza évoluent progressivement par mutations ponctuelles, permettant aux variants génétiques résultants d'échapper à l'immunité de l'hôte (dérive antigénique). Plus rarement, les virus Influenza A évoluent par échanges de courts segments (gènes ou fragments de gènes) avec d'autres virus humains ou animaux, c'est la cassure antigénique. Cette variation plus rapide peut entraîner à terme une épidémie mondiale étendue (88). La dérive antigénique est donc la cause majeure obligeant une mise à jour régulière de la composition vaccinale (36).

8.2.2. IMMUNISATION PASSIVE

Dans l'immunisation passive, l'immunité est obtenue sans que le système immunitaire n'ait été exposé à un antigène. Cela se produit par un transfert à un receveur non immunisé, de sérum, de gamma globulines ou de cellules T provenant d'un donneur immunisé. L'immunité passive peut être naturelle ou artificiellement acquise.

L'immunisation passive naturelle se produit pendant la grossesse et l'allaitement chez les mammifères : les anticorps maternels sont transmis au travers du placenta ou dans le lait les premiers jours de vie (39). Chez les oiseaux, les anticorps sont transmis par le jaune de l'œuf aux oisillons, pendant la couvaison, peu de temps avant l'éclosion.

L'immunité passive artificielle est acquise par injection du sérum à partir de sujets immunisés (ou préalablement infectés) ou de préparations d'anticorps. Le type d'immunité nécessaire pour neutraliser un agent infectieux spécifique dépend du site où se localise l'agent ainsi que des mécanismes de sa pathogénicité.

Par exemple, certains agents infectieux causent des maladies en sécrétant des exotoxines. Dans ce cas, le seul mécanisme immunitaire efficace contre cet organisme est basé sur les anticorps neutralisants qui

empêchent l'exotoxine de se lier à son récepteur présent sur la cellule cible et l'empêchent d'exercer ses effets néfastes. Une fois ce mécanisme enrayé, la dégradation de l'agent pathogène, de l'exotoxine ou du complexe formé avec les anticorps est pris en charge par les phagocytes.

Si l'agent infectieux agit de manière transitoire par voie intracellulaire, une autre stratégie consiste en une réaction entre les anticorps et l'agent lui-même afin de l'éliminer. Le mécanisme de lyse dépendante du complément ou la phagocytose par les macrophages sont alors deux alternatives possibles dans l'évolution de la réaction immunitaire. Il en résulte à la fin du processus une destruction de l'agent.

Si enfin, l'organisme infectieux est localisé de manière permanente dans le compartiment intracellulaire, il ne sera pas accessible aux anticorps. C'est alors la cellule hébergeant l'agent qui devra être détruite ; c'est seulement à cette condition que les anticorps pourront avoir un effet sur l'agent infectieux. La plupart des virus, des bactéries intracellulaires et des protozoaires sont des exemples de tels agents infectieux intracellulaires. Pour eux, l'implication de l'immunité à médiation cellulaire permet, à terme, la destruction des cellules hébergeant l'agent (211).

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons tout particulièrement à l'immunité passive acquise de façon artificielle. En effet, le transfert passif de l'immunité par l'injection d'immunoglobulines est utilisé dans des situations d'infection aiguë (exemples : la diphtérie, le tétanos, la rougeole, la rage) (121) ou dans des situations d'empoisonnement (piqûres d'insectes, morsures de reptiles ou botulisme) et ceci à des fins curatives. L'immunisation passive artificielle peut également s'avérer efficace dans le cadre d'une approche prophylactique telle qu'en cas d'hypogammaglobulinémie. Cette forme d'immunisation offre donc les avantages d'une protection spécifique, immédiate et efficace. Malheureusement, cette protection n'est efficace que durant une période beaucoup plus limitée que la vaccination (qui correspond à la durée de vie des anticorps selon l'espèce considérée). Certaines complications peuvent survenir de manière exceptionnelle, telles que la maladie sérique et l'anaphylaxie.

Des groupes de recherche indépendants ont travaillé sur la sélection, la vérification et la caractérisation détaillée des anticorps polyclonaux et monoclonaux contre les virus Influenza A. Des préparations d'anticorps ont été testées dans des expériences *in vitro* et *in vivo* pour leur efficacité dans la neutralisation virale.

L'immunisation passive utilisant des anticorps monoclonaux semble une alternative prometteuse parmi les options de traitements antiviraux. Le potentiel de protection découlant d'une seule injection d'anticorps est attrayant et a été poursuivi pour un certain nombre d'agents infectieux comme le virus de la dengue et le VIH (373, 376).

La pureté et l'efficacité initiale des anticorps monoclonaux spécifiques sont bien définies. Ils permettent d'atteindre des épitopes spécifiques et sont faciles à produire. On remarque que sur le long terme les anticorps polyclonaux sont plus faciles à développer (moins d'étapes de purification) et plus rentables en comparaison avec les monoclonaux, grâce à leur efficacité à long terme qui s'avère supérieure. Si l'on recourt à des anticorps largement neutralisants (parmi les polyclonaux) les résultats sont prolongés dans le temps et la protection contre les variants est plus complète (32).

La neutralisation virale est la suppression du caractère infectieux des particules virales. Les mécanismes d'action entrant en jeu pour ces anticorps neutralisants sont variables et dépendent de leurs cibles. Ainsi dans le cas de l'hémagglutinine, les anticorps ciblant et perturbant la liaison des virions aux récepteurs cellulaires bloquent soit l'endocytose des virions dans les cellules, soit empêchent la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale de l'hôte. Dans différentes études menées précédemment, les anticorps neutralisants ciblant diverses zones antigéniques des virus Influenza A sont documentés dans la littérature. Une étude menée par Mancini et collaborateurs a examiné les anticorps monoclonaux dirigés contre diverses protéines virales (225). Au cours de l'étude réalisée par Clémenti, complétée par la suite par Laursen, les chercheurs ont examiné les anticorps ayant un pouvoir neutralisant lors d'une infection par différents virus Influenza (60, 199) et enfin, une analyse de Vlekov et collaborateurs explorant les connaissances sur les sites antigéniques de la molécule H5 de HA (368) sont des exemples significatifs.

Les stratégies basées sur les anticorps pour la lutte contre les agents infectieux rencontrent cependant un obstacle majeur : la plupart des anticorps sont spécifiques d'une souche virale et n'agissent qu'au sein d'une espèce donnée.

L'immunisation passive artificielle basée sur le transfert de cellules immunitaires peut aussi être envisagée. Il est cependant difficile d'envisager cette approche dans le cadre d'un traitement courant et facile d'accès. A l'heure actuelle, la technique reste compliquée et nécessite le recours à un nouveau donneur histocompatible, ceci constitue une difficulté pratique majeure encore insurmontée. On observe que lors d'abus dans l'utilisation de cette technique, quelques cas extrêmes peuvent conduire à l'apparition de la maladie dite du greffon, une maladie dans laquelle l'immunité est erronément dirigée contre l'hôte.

Tableau 15 : Cibles virales antigéniques des vaccins anti-influenza

VIRAL PROTEIN	Target	Proposed protection mechanism
HEMAGGLUTININ (HA1)	Receptor binding globular head domain	Strain specific neutralizing antibodies block the virus entry; weak cellular immunity
HEMAGGLUTININ (HA2)	Stalk domain with fusion activity	(Non-neutralizing) antibodies, inhibition of fusion, maturation of the HA, and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
MATRIX 2 ION CHANNEL (M2)	Ectodomain of M2 (M2e)	Non-neutralizing antibodies, alveolar macrophages, Fc receptor, antibody dependent natural killer cell activity, complement mediated lysis, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, CD4 and CD8 T cell mediated protection
NUCLEOPROTEIN (NP)	T-cell epitopes	Cell lysis by CD8+ cytotoxic T-lymphocytes (CTL), CD4+ T lymphocyte mediated cytolysis
NEURAMINIDASE (NA)	Conserved sialidase active site	Non-neutralizing antibodies, Inhibition of virus release, virus spread
MATRIX (M1)	T-cell epitopes	Cell lysis by CD8+ CTL, CD4+ T lymphocyte mediated cytolysis

Source : *New vaccines against influenza virus (203)*

8.3. ANTICORPS ADAPTÉS AU TRAITEMENT ANTI-INFLUENZA ET LEUR CIBLES ANTIGÉNIQUES

La neutralisation virale est interprétée comme l'élimination du caractère infectieux du virus. Le mécanisme d'action des anticorps neutralisants dépend de leur mode d'action mais aussi de leurs cibles antigéniques. Quelques exemples de cibles antigéniques visées par les anticorps sont décrits ci-après.

8.3.1. LES ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-HEMAGGLUTININE

L'hémagglutinine (HA) est la principale protéine de surface des virus Influenza A. Elle forme des trimères et joue un rôle pivot dans le cycle de l'infection virale. En tant que cible privilégiée de nombreux anticorps neutralisants, l'HA est sous haute pression évolutive, c'est donc la protéine la plus variable du virus Influenza. On décrit dix-huit types d'HA différentes au sein des virus Influenza A (H1 à H18), cependant, H17 et H18 n'ont été constatées que chez les chauves-souris américaines (358).

Les différentes hémagglutinines HA ont par la suite été reclassées en sous-types: on distingue les sous-type1 comprenant H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 et H18 et le sous-type 2 avec H3, H4, H7, H10, H14 et H15. Les anticorps reconnaissant des épitopes conservés dans le domaine globulaire ou dans la tige de l'hémagglutinine (HA) sont ceux qui, sur base de la littérature, présentent potentiellement

le plus d'intérêts parce qu'a priori, ils peuvent être considérés comme reconnaissant plusieurs hémagglutinines différentes et donc s'avérer à large spectre.

La plupart des anticorps dirigés contre le domaine globulaire de l'HA sont couramment utilisés comme outils de diagnostic. Leur large utilisation thérapeutique ou même prophylactique reste quant à elle encore problématique (225).

Les anticorps monoclonaux (mAb) reconnaissant le domaine globulaire démontrent une certaine réactivité croisée. Les mAb neutralisants et qui présentent une spécificité élargie (anticorps largement neutralisants) pour les sites antigéniques du domaine globulaire de l'HA ou même d'un sous-type particulier d'HA sont assez rares.

En revanche, le domaine tige de l'HA est hautement conservé dans de multiples sous-types de HA. D'autre part, les immunoglobulines dirigées contre le domaine de la tige de l'HA ne représentent qu'une petite fraction des anticorps produits à la suite d'une infection naturelle par un virus Influenza A. Du fait de la conformation de l'hémagglutinine, la tige de celle-ci n'est que très partiellement exposée. Il en résulte une immunogénicité médiocre comparativement à la zone globulaire de la protéine. Ceci est dû à deux phénomènes : i) la conformation spatiale de l'hémagglutinine ne donne pas un accès aisé aux épitopes. Il en résulte une production d'anticorps moins importante. Il est à noter que lors de lyse cellulaire, on retrouve des fragments d'HA, cette présence dans les débris cellulaires peut aboutir à une stimulation du système immunitaire ; ii) les anticorps produits, ciblant les épitopes de l'HA ne seraient pas en mesure d'atteindre leur cible et de se lier avec ces épitopes. Cette liaison ne pouvant se faire, l'efficacité des anticorps est donc compromise et les étapes suivantes de la réaction immunitaire (immunité cellulaire) ne peuvent se poursuivre.

Le domaine tige de l'HA semble dès lors être une cible prometteuse pour les anticorps neutralisant dans un objectif thérapeutique. Plusieurs mAb dirigés contre la tige de l'HA reconnaissent des épitopes distincts et affichent un potentiel de neutralisation variable. De plus, divers mécanismes de liaisons avec l'antigène ont été observés.

En conclusion, les mécanismes d'action des anticorps neutralisants visant la protéine de l'HA des virus Influenza A ont été étudiés par imagerie en utilisant des cellules vivantes (40). Quatre mécanismes physiologiquement pertinents par lesquels les anticorps neutralisants entravent les fonctions essentielles de l'HA ont pu être mis à jour: i) le blocage de la liaison aux récepteurs ; ii) le blocage de la fusion entre les

enveloppes virale et endosomale ; iii) le blocage du clivage des HA0 néoformés et iv) le blocage de la diffusion des virus nouvellement synthétisés.

Les anticorps ciblant la zone globulaire de l'HA inhibent la liaison aux récepteurs de la cellule hôte et la sortie des nouveaux virions. Il y a donc réduction du nombre de nouveaux virions libérés et circulants.

Les anticorps dirigés contre la zone tige en chevauchant partiellement le peptide de fusion inhibent la fusion membranaire et empêchent le clivage de HA0 en HA1 et en HA2 du cycle viral. Ce mécanisme d'inhibition de la fusion membranaire ne diminue pas les quantités de particules virales libérées par la cellule mais provoquent la réduction de leur caractère infectieux.

Les complexes immuns générés avec des anticorps monoclonaux anti section tige HA nécessiteraient l'apport de fonctions effectrices médiées par les interactions des récepteurs Fc-FcγR des cellules effectrices de la réaction immunitaire à médiation cellulaire pour une efficacité optimale, ce qui n'a pas été constaté avec les complexes immuns issus des anticorps monoclonaux dirigés contre la zone glomérulaire HA. Ces résultats suggèrent que, dans le cas d'une infection à virus Influenza A, les mAb anti-hémagglutinine (anti-HA) neutralisants nécessitent des interactions avec les récepteurs Fc-FcγR pour assurer une protection *in vivo*. Les anticorps dirigés spécifiquement contre la section tige de l'hémagglutinine seraient dépendants de l'Ab-dépendant cellulaire cytotoxicité (ADCC) afin d'exercer un effet cytotoxique spécifique ayant un effet protecteur *in vivo*. Ainsi, ces découvertes suggèrent que l'ampleur de la réactivité des anticorps anti-influenza, quels que soient leurs épitopes, pourraient être modulés par des interactions avec les cellules effectrices ADCC dans leur action de protection *in vivo* (79, 80).

8.3.2. LES ANTICORPS ANTI-NEURAMINIDASE

La neuraminidase (NA) est la deuxième glycoprotéine la plus abondante des virus Influenza A, localisée dans la membrane virale externe. Elle se présente sous la forme d'une homotétramère. Elle est moins variable que HA, mais a également tendance à subir un changement antigénique (*antigenic shift and drift*). Les anticorps anti-NA ne neutralisent pas le virus mais en limitent la réplication en altérant la libération des virions-progénitures à partir des cellules infectées. Ceci aboutit à réduire la sévérité de la maladie (225). Quatre sites antigéniques ont été identifiés sur la NA.

Certains mAb anti-NA inhibent l'activité de la sialidase de NA. En conséquence, ils bloquent la libération du virus de la cellule hôte (112). Ils peuvent également renforcer la réponse anti-influenza en provoquant la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (248).

8.3.3. LES ANTICORPS ANTI-PROTEINE M2

La protéine M2 est située dans l'enveloppe externe du virus et forme un canal homotétramérique (164). La partie extracellulaire de la protéine M2 (M2e) est fortement conservée parmi tous les virus Influenza A. Par conséquent, malgré sa faible immunogénicité et en l'absence d'anticorps anti-M2e produits à la suite d'une infection naturelle, c'est un candidat prometteur si on veut générer des anticorps monoclonaux à large spectre (225). Les mAb anti-M2e n'ont pas d'activité neutralisante, ils peuvent cependant réduire la réplication virale via la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps et la cytotoxicité dépendante du complément (317). La liaison de mAb à la partie hautement conservée N-terminale de la protéine M2e semble également restreindre la libération du virus.

Il est à noter qu'un anticorps anti-M2 (mAb D005) a par le passé prouvé ses propriétés dans un usage prophylactique et un usage thérapeutique chez la souris infectée par le virus influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (28).

8.3.4. LES ANTICORPS DIRIGES CONTRE DES PROTEINES INTERNES

D'autres protéines du virus Influenza, en raison de leur localisation interne, n'interagissent pas directement avec les anticorps. Les protéines internes seraient susceptibles d'induire une réaction immunitaire spécifique, mais du fait de leur localisation, dans les conditions naturelles, les anticorps produits contre les protéines internes sont peu nombreux. Les rares anticorps circulants dirigés contre de telles protéines ne peuvent que très difficilement accéder à leurs sites spécifiques et ne constituent que peu (ou pas) de complexes potentiellement neutralisants. Cependant, certains anticorps tels que ceux dirigés contre la protéine NP du virus ont démontré leur efficacité dans l'élimination du virus, en activant la cytotoxicité dépendante du complément (401) ou en stimulant la réponse des lymphocytes T (356). Il a également été démontré que des cellules MDCK exprimant des anticorps anti-protéine PB2 sont résistantes à l'infection à influenza A(H5N3), probablement en bloquant la transcription virale (108).

8.4. LES STRATÉGIES AYANT RECOURS AUX CYTOKINES ET LEUR EFFET ANTI-INFLUENZA

Les cytokines agissent sur de nombreux types cellulaires de façon redondante et coordonnées à la fois. Si on estime à au moins une centaine le nombre de cytokines actives dans le système immunitaire, on remarque que beaucoup d'entre elles agissent sur plusieurs cellules cibles différentes avec des effets multiples. On dit que leur action est pléiotrope (272).

D'autre part, une cellule particulière peut répondre de façon identique quand elle est la cible de plusieurs signaux de cytokines différentes, on désigne ce phénomène sous le nom de redondance. Ces deux caractéristiques de pléiotropie et de redondance dans la réponse aux cytokines sont des complications qui rendent difficile une interprétation du rôle de chaque cytokine. On peut toutefois avancer que la plupart des cytokines sont caractérisées par des fonctions principales (Tab. 16). On gardera à l'esprit que ces cytokines peuvent individuellement avoir des fonctions supplémentaires (272). Dans certaines conditions, des combinaisons de cytokines vont être produites et vont agir de façon coordonnée pour susciter une réponse particulière. On donnera comme exemple la réaction d'inflammation considérée au niveau du tissu ou, autre exemple, la différenciation des lymphocytes B.

Une réponse fréquente à une cytokine est la régulation de la production d'une autre cytokine. En exemple, on citera les cytokines pro-inflammatoires TNF et IL-1 qui induisent la production d'autres cytokines pro-inflammatoires par les cellules voisines. Ce type de réaction entraîne une réaction en chaîne qui peut trouver son utilité dans la propagation du signal, de proche en proche jusqu'à la cellule cible (372).

En conclusion, de nombreuses cytokines induisent des réponses immunitaires par une stimulation positive, mais d'autres peuvent opérer des régulations en induisant des réponses négatives.

Tableau 16 : Classification des différentes cytokines selon leurs actions supposées

TYPE DE CYTOKINE
INHIBITION DE LA RÉPLICATION VIRALE
IFN α ; IFN β
ACTIVATION DES MACROPHAGES
IFN γ
CYTOKINES ATTRACTIVES POUR LES NEUTROPHILES
KC (CXCL1) ; GCP-2 (CXCL6) ; MIP2 (CXCL2)
CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES
TNF ; IL-1 ; IL-6 et Plusieurs chémokines
CYTOKINES ATTRACTIVES POUR LES MONOCYTES
MCP1 ; MIP1 α ; MIP1 β ; RANTES ; MCP2 ; IP10
CYTOKINES ANTI-INFLAMMATOIRES
IL-10 ; IL-1 ; TGF- β
ACTIVATION DES LYMPHOCYTES B
IL-4 ; IL-5 ; IL-6 ; IL-21
ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T
IL-2 ; IL-4 ; IL-12 ; IFN γ
ACTIVATION DES ÉOSINOPHILES ET/OU DES MASTOCYTES
IL-3 ; IL-4 ; IL-5 ; IL-13

Source : Immunité (411).

8.4.1. INTERFERONS DE TYPE I

Les cytokines sont des médiateurs de l'inflammation. Parmi celles-ci, les interférons de type I (IFN) jouent un rôle central dans la protection contre l'infection par le virus Influenza A. Ces cytokines aux propriétés antivirales ont été découvertes grâce aux recherches menées par Lindemann sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'œuf embryonné en 1957 (127). Les IFNs ont été associées à la protéine NS1 du virus Influenza car on soupçonnait que la principale fonction de la protéine virale NS1 ait été d'inhiber la production et la signalisation des interférons de type I. Une preuve scientifique a résidé dans le fait que les mutations ou les délétions aboutissant à l'inactivation fonctionnelle de la protéine NS1 du virus Influenza, entraînaient un accroissement des taux d'interférons produits en cas d'infection (170). Les interférons de type I sont de puissants inhibiteurs de la réplication et de la dissémination du virus (114). Ils limitent la propagation virale par induction de l'apoptose chez les cellules infectées ou en induisant un accroissement de la résistance cellulaire à l'infection virale. Ce phénomène implique aussi l'activation des cellules Natural Killer (NK) et des lymphocytes T cytotoxiques. Les IFNs sont impliquées à la fois dans l'immunité innée mais aussi de l'immunité adaptative (336, 180).

L'action des interférons de type I se fait via la stimulation des *interferons stimulated genes* (ISGs), ce groupe de gènes contient notamment les gènes de résistance MX dont l'action protectrice contre le virus Influenza est bien connue (149). Malgré les propriétés antivirales indéniables des interférons de type I, plusieurs études leur attribuent également un rôle dans la pathogénie de la pneumonie à Influenza, principalement via la production de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, le développement des signes cliniques est corrélé avec l'apparition d'IFN α dans les lavages broncho-alvéolaires des patients malades (137, 365).

8.4.2. LES CYTOKINES AYANT UNE ACTION SUR LES NEUTROPHILES

Quand des souris sont infectées avec la souche PR8 du virus Influenza, une surproduction de la cytokine attractante des neutrophiles KC (CXCL8) est constatée, induisant un infiltrat de neutrophiles ainsi qu'une augmentation de la mortalité des souris, ceci en comparaison à des souris contrôles (320).

En l'absence d'interférons de type I, les monocytes de type CCR2-Ly6C^{int} sont recrutés dans les poumons infectés où ils vont produire de grandes quantités d'interleukine IL-8, une cytokine agissant sur les neutrophiles. Ce type d'expression est associée à une pneumonie sévère et une mortalité importante (82, 320).

L'IFN β produit par les macrophages alvéolaires participe activement à l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires en cas de pneumonie sévère à Influenza (147).

Les interférons de type II sont représentés par l'IFN γ , produit par les macrophages au début de l'infection (3 jours), puis par les cellules NK (entre 3 et 5 jours post-infection) ; la production est relayée par les lymphocytes T CD4 et CD8 (entre 5 et 10 jours post-infection). Il a été démontré que l'expression d'IFN γ au début de l'infection par le virus Influenza A avait des propriétés protectrices et antivirales. L'action de l'IFN γ est médiée par la *Proteinase-Activated Receptor 2* (PAR2) qui réduit les titres viraux, améliorant ainsi la survie des souris infectées.

L'interféron lambda (IFN λ), un interféron de type III, produit au départ de cellules épithéliales des voies respiratoires et des poumons de souris, a été détecté en plus grandes quantités après une infection par le virus Influenza A. L'administration d'IFN λ avant une infection par un virus Influenza de type A semble protéger les souris contre l'infection. Il semble aussi, que l'IFN λ ait une fonction antivirale similaire à celle des interférons de type I (291).

8.4.3. CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES

L'IL-1 β active le récepteur IL-1R pour induire l'expression de gènes pro-inflammatoires par la voie MyD88-dépendante (280). Il a été démontré que la signalisation dépendante du récepteur IL-1R contribue à la protection de l'hôte mais est également responsable de l'immunopathologie présentée suite à l'infection par le virus Influenza A (312). Elle consiste en une moindre production d'IgM anti-influenza chez les souris déficientes pour IL-1R, en un retard dans l'élimination des particules virales et une mortalité accrue.

Des niveaux élevés en TNF- α sont associés à de plus grandes morbidités et mortalités après infection par des souches Influenza HPAI chez l'homme et les modèles animaux (347). Chez la souris, un traitement avec un anticorps anti-TNF- α provoque une diminution du recrutement des cellules inflammatoires, une diminution de la production de cytokines en général et une morbidité accrue dans les infections expérimentales à virus Influenza A (156).

L'IL-6 aurait un rôle modéré dans le développement des lésions pulmonaires après infection par le virus Influenza. Il a été démontré que la déficience en IL-6 ou en son récepteur IL-6R provoque la persistance du virus dans le poumon et par conséquent des lésions pulmonaires plus sévères et une mortalité accrue (78).

8.4.4. CYTOKINES ATTRACTIVES POUR LES LEUCOCYTES MONONUCLEAIRES

Plusieurs autres molécules chimiotaxiques (phénomène d'attraction cellulaire via un médiateur chimique) sont exprimées après une infection expérimentale par le virus Influenza A chez l'homme ainsi que dans les modèles animaux. La production locale et systémique de certaines d'entre elles a été corrélée avec le développement de lésions associées à l'infection par le virus Influenza A (184, 365).

Des niveaux élevés en MCP1 (CCL2) et en IP-10 (CXCL10) ont été retrouvés dans le sérum de patients infectés par un virus H5N1 hautement pathogène, en concentration plus élevées, en comparaison avec des patients infectés par des souches moins pathogènes (70). De même, des ARNm de RANTES (CCL5) sont davantage exprimés dans des cultures primaires de macrophages humains infectées par le virus H5N1 que dans celles infectées par des souches de virus H1N1 ou H3N2 (56). Bien qu'il existe une corrélation entre la surproduction de cytokines et la sévérité de l'infection par le virus Influenza A, la responsabilité individuelle de chaque cytokine dans ce processus pathologique est à ce jour difficile à prouver.

Lors d'une infection à virus Influenza, les interférons de type I produits par les macrophages alvéolaires induisent une différenciation et une prolifération des cellules souches hématopoïétiques ainsi qu'une augmentation de l'expression de la cytokine MCP1 (CCL2). Cette cytokine va forcer le recrutement des monocytes CCR2-dépendants Ly6Chi provenant de la moelle osseuse.

Pendant l'infection par le virus Influenza A, les cellules dendritiques présentes dans le poumon jouent un rôle essentiel dans l'activation des lymphocytes T au niveau des ganglions lymphatiques médiastinaux (196). Des études ont mis en évidence un lien entre la réponse des cellules dendritiques et la sévérité de la pathologie présentée suite à l'infection (230).

Une corrélation a été établie entre l'infection par des virus Influenza A hautement pathogènes avec une augmentation des cellules dendritiques productrices de TNF α (TipDcs), ce phénomène n'est pas observé lors d'une infection par des virus Influenza faiblement pathogènes. Une réduction de l'infiltration de TipDCs et de la production des cytokines MCP1 et MCP3 augmenteraient la survie à la suite de l'infection (7).

8.4.5. CYTOKINES ANTI-INFLAMMATOIRES

Certaines cytokines, aux propriétés anti-inflammatoires, ont pour effet de prévenir ou de limiter les lésions associées à l'activation du système immunitaire. Ainsi, l'IL-10 constitue un élément central dans la régulation de la réponse immunitaire contre les infections virales, bactériennes et parasitaires (65). Les principales sources d'IL-10 sont les lymphocytes T CD8 et CD4 infiltrant le poumon après infection par le virus Influenza A. Des niveaux élevés en IL-10 ont été décrits chez des patients atteints par le virus Influenza A (70). Cette surexpression d'IL-10 a été interprétée comme une réponse secondaire à une inflammation excessive. Une autre étude a montré qu'en inhibant le récepteur IL-10R, une infection aux symptômes mineurs devenait une maladie sévère et mortelle (344).

Les cytokines produites par les lymphocytes T helper 2, dont l'IL-4 et l'IL-13, induisent une polarisation des macrophages en macrophages M2 (51, 237). Le statut de polarisation M1 inclut donc les macrophages

activés par des cytokines de type Th1 ou des médiateurs pro-inflammatoires dont le facteur stimulateur des colonies granulocytes-monocytes (GM-CSF), la $TNF\alpha$, l'IL-6, l'IL-1 β , l'IL-12. Une signalisation plutôt anti-inflammatoire provoque la polarisation en macrophages M2, où interviennent des molécules telles que le facteur stimulant les macrophages (M-CSF), l'IL-10 et l'IL-4 (17, 253, 17, 51).

Le processus de polarisation apparaît plus complexe. On parle d'un spectre multipolaire en lieu et place de l'activation bipolaire précédemment décrite. Le processus de polarisation répond à plusieurs médiateurs endogènes et à des stimuli exogènes. Par exemple, l'IL-4 peut induire la production d'IL6, d'IL-12p70 et de $TNF\alpha$ par les macrophages M1 (366).

Le processus d'activation a été démontré pour les situations d'infections dues à des bactéries ou des virus, on ne peut pas attribuer aux virus un type d'activation de macrophages en particulier. Il faut donc analyser dans chaque situation le type de macrophages impliqués (325).

8.5. STRATÉGIE ANTIVIRALE : LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

Comme décrit précédemment, une partie des affections dues à des agents pathogènes sont le fait des virus. Si elle doit être décrite très globalement, l'immunité antivirale innée est basée sur la production d'interférons et notamment les interférons de type I et sur l'activation des cellules NK.

Les principales réponses du système immunitaire acquis sont quant à elles les cellules lymphocytes T cytotoxiques et les anticorps neutralisants. Ils permettent d'assurer une protection à long terme contre les virus.

A l'opposé, des facteurs liés au virus lui-même tels que son taux de mutations élevé, ceci notamment chez les virus à ARN et chez les rétrovirus et sa capacité à échapper aux défenses immunitaires sont des facteurs qui réduisent la capacité de l'hôte à établir une protection durable contre la réinfection par certains virus (411).

DES RÉCEPTEURS SPÉCIFIQUES DES TISSUS EXPLIQUENT LE TROPISME VIRAL

Pour infecter leur hôte, les virus doivent franchir les barrières épithéliales cutanées ou les muqueuses. Les virus à tropisme intestinal tels que les réovirus chez la souris ou le poliovirus chez l'homme utilisent les cellules M transporteuses d'antigènes pour pénétrer l'hôte. Les virus à tropisme respiratoire comme les Influenza A et les rhinovirus s'établissent dans les cellules épithéliales des voies nasales ou des voies respiratoires. D'autres virus comme celui de la Dengue ou le virus du Nil occidental sont transmis par les morsures d'insectes vecteurs.

Enfin, les virus transportés par le sang tels que le VIH ou le virus de l'hépatite B peuvent traverser les muqueuses ou pénétrer la peau à l'occasion de traumatismes microscopiques (35).

Certains virus se lient spécifiquement à des molécules de surface largement exprimées, ils peuvent dès lors infecter virtuellement n'importe quelle cellule de mammifères sans distinction, on dira qu'ils n'ont pas un tropisme particulier. D'autres virus quant à eux, utilisent des molécules de surface spécifiques comme récepteurs lors de leurs invasions. Ces récepteurs peuvent s'avérer limités parfois à des tissus bien spécifiques et leurs invasions passeront de manière privilégiée par ces mêmes tissus, on dira alors que ces virus ont un tropisme tissulaire.

Cette co-évolution au sein des différentes espèces de mammifères de couples ligands-récepteurs associant le récepteur de l'hôte à son virus a contribué à la spécificité de la plupart des virus envers une ou plusieurs espèces particulières (81).

SECTION EXPÉRIMENTALE

Contribution personnelle

PARTIE II DONNÉES EXPÉRIMENTALES

OBJECTIFS GÉNÉRAUX DE CE TRAVAIL

L'objectif général visé par ce travail est d'évaluer l'apport spécifique des outils d'investigations fonctionnelles respiratoires non-invasives chez la souris. Plus particulièrement, nous avons souhaité étudier l'association entre deux techniques non-invasives dont le couplage nous semblait *a priori* complémentaire : la pléthysmographie barométrique en chambre double et la mesure du CO-uptake. Pour ce faire, trois situations particulières ont été envisagées au travers de trois études distinctes et complémentaires.

Etude 1: Cette première étude avait pour objectifs (i) de valider la mesure de la capacité d'extraction du monoxyde de carbone (CO-uptake) par les poumons chez la souris saine, (ii) de valider les conditions à satisfaire préalablement pour une bonne standardisation des mesures effectuées et (iii) d'établir les normes physiologiques dans les conditions établies. Concrètement, ce travail visait à répondre aux questions suivantes :

Q1 — Quelles sont les conditions préliminaires à réunir afin de réaliser des mesures standardisées de CO-uptake ?

Q2 — Quelles sont les valeurs de référence et quels sont les paramètres majeurs chez la souris saine?

Etude 2: Cette deuxième étude visait à établir l'apport spécifique de l'association de deux techniques d'évaluations fonctionnelles respiratoires non-invasives (CO-uptake et pléthysmographie) dans deux situations d'infections respiratoires virales distinctes expérimentalement induites. Pour ce faire, nous avons fait appel à deux modèles murins infectieux déjà utilisés au sein du laboratoire. Nous avons orienté notre choix dans la mesure où ces deux modèles avaient précédemment démontré qu'ils affectaient sur le plan lésionnel des segments anatomiques différents du système respiratoire. Notre hypothèse de travail envisageait donc des modifications fonctionnelles différentes qui nous permettraient de tester notre association d'outils de mesures. Nous avons concrètement voulu répondre aux questions suivantes :

Q3 — La mesure du CO-uptake est-elle discriminante dans le cas d'une affection respiratoire profonde ?

Q4 — La mesure du CO-uptake est-elle discriminante dans le cas d'une affection évolutive, c'est-à-dire affectant progressivement différents segments du tractus respiratoire ?

Etude 3: Elle avait pour objectif d'établir l'apport spécifique des techniques d'évaluation fonctionnelles respiratoires non-invasives précitées dans l'établissement de l'efficacité thérapeutique d'un cocktail d'anticorps spécifiques administré à des souris expérimentalement infectées par un virus influenza A très virulent. L'étude visait donc l'évaluation de la maladie observée en la présence ou en l'absence d'anticorps spécifiques. Deux groupes de souris sont tous deux soumis à un challenge viral mortel et soumis à deux traitements différents : l'un attendu pertinent, car ciblant spécifiquement le virus influenza A murinisé utilisé lors de l'inoculation ; l'autre attendu comme non pertinent dans cette situation. Dans notre hypothèse de travail, deux évolutions différentes tant sur le plan lésionnel que sur le point de vue des signes cliniques manifestés étaient attendues. Nos outils d'investigations devaient ainsi être confrontés à des dysfonctions différentes et être susceptibles de rapporter cette situation. Par le fait de cette différence, nos outils de mesures devaient donc permettre de distinguer un traitement efficace d'un traitement inefficace. Concrètement, nous avons tenté de répondre à la question suivante :

Q5 — Les techniques d'investigation fonctionnelles respiratoires non-invasives chez la souris peuvent-elles discriminer des efficacités de traitements différentes dans un modèle d'infection respiratoire par un virus influenza A très virulent ?

Les objectifs généraux résumés ici seront détaillés dans la suite de ce manuscrit en objectifs ponctuels, plus spécifiques, pour chaque étude.

Section expérimentale —

Etude 1

ÉVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES NON-INVASIVES

Etude en conditions physiologiques.

EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES NON- INVASIVES :

ETUDE EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

I. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 1

A la fixation des présents objectifs, la plateforme de physiopathologie respiratoire préclinique non-invasive reposait principalement sur la mise en œuvre de la technologie dénommée « pléthysmographie barométrique en chambre double », laquelle venait d'être dûment validée par le Dr T. Flandre (102). Quoique adéquate pour mesurer la ventilation des poumons et la résistance opposée à l'écoulement de l'air par les voies respiratoires de gros calibres, cette technologie n'était pas en mesure d'évaluer les altérations plus fines comme l'entrave à la circulation de l'air en périphérie des poumons ou l'entrave de la diffusion des gaz au travers de la barrière alvéolo-capillaire. Lorsqu'un instrument présenté comme capable de mesurer de manière non-invasive le taux de prélèvement du monoxyde de carbone (CO-uptake) dans les poumons de la souris est apparu sur le marché, il devenait théoriquement possible d'accéder à de telles mesures. Le premier travail assigné a donc été de réaliser une étude visant l'évaluation d'une exploration fonctionnelle respiratoire non-invasive de ce type dans les conditions physiologiques chez la souris de laboratoire.

De manière pratique, ce travail a nécessité de rencontrer les objectifs détaillés successifs suivants

Q1 — Quelles sont les conditions préliminaires à réunir afin de réaliser des mesures standardisées de CO-uptake ?

Q2 — Quelles sont les valeurs de référence et quels sont les paramètres majeurs chez la souris saine?

II. MATÉRIEL ET MÉTHODE

Un lot de 15 souris, de souche BALB/c, âgées entre 6 et 7 semaines, toutes de sexe femelle et d'un poids variant entre 15 et 18g étaient issues de l'élevage du service de pathologie. Elles ont été réunies en groupes de poids homogènes comportant 5 individus chacun. Ces souris ont été réservées pour la réalisation de l'expérience d'orientation.

Un lot de 120 souris issues de 6 souches consanguines différentes (*inbred mice*) fournies par la société Charles River Laboratories® (Bruxelles, Belgique) ont été étudiées. Elles étaient âgées de 6 à 13 semaines au moment des expériences et avaient un poids de départ variant entre 15 et 26 g. Leur sélection a été

réalisée au sein des souches : 129/Sv (129/SvPasCrI) ; BALB/c (BALB/cByJCrI) ; C3H (C3H/HeNCrI) ; C57BL/6J (C57BL/6JCrI) ; DBA/2 (DBA/2JCrI) et SJL (SJL/JCrI). Le choix de ces souches a été basé à la fois sur l'expertise disponible au sein du service, sur les caractéristiques inhérentes à leur type de respiration qui ont été démontrées comme différentes (102), sur les détails de leurs structures pulmonaires (11) ainsi que sur leurs liens phylogénétiques connus (27) afin de permettre l'étude d'un panel le plus largement réparti parmi les souches murines disponibles. Chaque souche comportait 20 individus, dont 10 mâles et 10 femelles. Les individus étaient logés par groupe de 10 de même sexe et de même souche.

Les souris ont débuté les phases expérimentales à l'âge de 6 semaines et ont été suivies jusqu'à l'âge de 13 semaines. Ces souris ont été réservées à la réalisation de **l'expérience principale**.

Un lot de 5 souris mâles de 8 semaines d'âge de souche BALB/c (BALB/cByJCrI), ont été retenues pour la réalisation de **l'expérience de confirmation**.

129/Sv



BALB/c



C3H



C57BL/6J



DBA/2



SJL



Figure 24 : Souches de souris utilisées durant cette étude. Les souris ont été choisies parmi les souches suivantes : 129/Sv ; BALB/c ; C3H; C57BL/6J ; DBA/2 et SJL. Ce choix était justifié par les connaissances acquises sur les caractéristiques respiratoires de ces souches au sein du service et sur la volonté d'obtenir un panel le plus étendu possible en termes de relation phylogénique. Source : Charles River Laboratories (412).

2.1. HÉBERGEMENT DES SOURIS

Les animaux ont été hébergés dans un local spécialement adapté à cet effet et répondant aux normes fixées par le Comité d’Ethique Animale de l’Université de Liège (Dossier éthique N°1411-ULG). Au sein de l’animalerie, les souris ont été placées dès réception en cages jetables filtrées aux dimensions réglementaires. L’agencement des animaux avec un maximum de 5 souris par cage a permis de respecter la norme établie de 51,62 cm² par animal (106).

L’environnement des cages était enrichi selon les modalités règlementaires à l’aide de pièces de bois, de fibre de cellulose, de carton et de papier. Les conditions d’éclairage, d’aération et de température ont été contrôlées en permanence et maintenues dans des normes compatibles avec le comportement connu des souris.

Les souris ont été commandées au statut *Specific Pathogen Free* (SPF) (222), ce statut est attesté sur base des contrôles réalisés par l’éleveur et des documents officiels transmis. Tels que recommandé par les instances de la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) les souris ont été maintenues sous ce statut par la prise de mesures de protection personnelles (masque, gants, charlotte, over-shoes et blouse spécifique), de mesures de protection concernant l’animalerie et les équipements (gestion du flux entrant et sortant ; accès restreint du personnel ; boîtes de confinement stériles à usage unique). Toutefois aucun contrôle sanitaire n’a été réalisé durant la période d’hébergement dans nos locaux.

2.2. IDENTIFICATION DES SOURIS

Les souris réunies pour les expériences ont été identifiées individuellement. La méthode a consisté en la mise en place d’une boucle auriculaire en laiton, placée de manière définitive et munie d’un numéro d’identification unique. Cette boucle a été systématiquement placée dans la partie la moins vascularisée du pavillon auriculaire gauche, ceci de telle sorte que le numéro unique puisse être lu sans devoir manipuler l’animal.

2.3. STRUCTURATION DE L’EXPÉRIENCE

L’expérience prévue au cours de ce travail a été divisée en trois parties : i) les expériences d’orientation, dont le but était d’évaluer globalement l’impact de certains facteurs et de permettre de fixer les conditions idéales de réalisation de l’expérience principale, ii) une expérience principale, qui a étudié en détails les facteurs suspectés et leurs conséquences et enfin iii) une expérience dite de confirmation qui a permis, moyennant conditions, de confirmer les résultats de l’expérience principale.

Au cours de ces expériences ont été mesurés : la fréquence respiratoire (FR), la capacité d'extraction du monoxyde de carbone (CO^{up}) et le poids. Les paramètres calculés que sont la capacité d'extraction spécifique du monoxyde de carbone (sCO^{up}) et la capacité d'extraction du monoxyde de carbone par unité de poids métabolique (sCO^{Met}) ont été déterminés. Le poids métabolique a été estimé en utilisant l'approximation : Poids métabolique = poids^{0,75}(143).

2.3.1. SUIVI QUOTIDIEN DU POIDS VIF ET DE LA CROISSANCE

Le suivi du poids n'est pas à proprement parler un suivi fonctionnel relatif à la fonction pulmonaire, toutefois notre expérience en la matière a permis de déterminer que cette valeur reflétait fidèlement l'évolution de la maladie respiratoire induite (11). Toutes les souris ont été pesées tous les jours et le poids quotidien de chaque souris a été rapporté.

Le suivi de la croissance a été réalisé en suivant l'âge (exprimé en semaines) et en combinant cette donnée avec le poids précédemment mesuré pour chaque animal de l'expérience.

2.4. EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES

2.4.1. MESURE DES PARAMETRES VENTILATOIRES

Chaque lot de souris soumis à une séance de mesures a donc subi successivement dans l'appareillage i) une mesure de la fréquence respiratoire, suivie de ii) la mesure de CO-uptake.

Les mesures ont été réalisées alternativement sur deux sujets placés dans les deux chambres de l'appareil. On a compté cinq étapes: le placement du sujet, la période d'acclimatation, la mesure de la fréquence respiratoire, la mesure du CO-uptake et la purge des espaces morts.

Le CO-uptake visait à permettre une évaluation qualitative et quantitative des capacités de diffusion de la paroi alvéolo-capillaire pulmonaire de chaque souris au moment de l'examen. La mesure du CO-uptake a été réalisée par un suivi dans le temps du taux de CO contenu dans une chambre close, là où se trouvait la souris.

Lors de la mesure du CO-uptake, l'animal a été exposé pendant une période de 60 secondes à un mélange gazeux de composition connue (CO 0,28%, oxygène 20,8% et Azote 78%). La mesure du taux de CO a été faite au début et à la fin de cette période de 60 secondes, déterminée par le constructeur de l'appareillage.

Un ordinateur et un logiciel spécifique (CO-uptake and respiration v1.0), livré avec l'appareillage de Columbus Instruments ont été nécessaires à la collecte des données.

III. TRAITEMENT STATISTIQUE ET ANALYSE DES DONNÉES EXPÉRIMENTALES

Les différences significatives ont été évaluées au moyen d'une étude d'analyse de variance (ANOVA), de modèles linéaires généraux (GLM) et de l'étude de corrélations en cas de paramètres à comparer, le tout à l'aide du programme de statistique SAS-STAT de SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. La version en cours au moment de l'analyse était la version 8.2 (TS2MO) exécutant sur plateforme Linux 2.4.21-15.EL. La mise en forme des données a été réalisée avec Excel (Office XP, Microsoft Inc.).



Source : Columbus instruments®



Figure 25: Carbon monoxide uptake monitor®. Appareillage tel que conçu par Columbus Ins. et la mise en place des souris (La première image est issue du site web de Columbus Ins®).

IV. RÉSULTATS

Réponse à la question Q 1 ci-après

4.1. EXPÉRIENCES D'ORIENTATION

4.1.1. QUEL INTERVALLE DE MESURES SUCCESSIVES ETABLIR ET EXISTE-IL UNE ACCOUTUMANCE A COURT TERME ?

Un groupe de cinq souris femelles de souche BALB/c a été soumis durant 60 min à plusieurs mesures successives de la fréquence respiratoire et du CO-uptake. Chaque mesure comprenait, dans l'ordre, une minute de mesure de la fréquence respiratoire et une minute d'exposition à un mélange gazeux de composition connue contenant du CO. Les mesures ont été effectuées aux temps T0, 7 minutes, 15 minutes, 20 minutes, 30 minutes, 45 minutes et 60 minutes. Les paramètres recueillis pour chaque souris étaient : la fréquence respiratoire (FR), le CO-uptake (CO^{up}) et le poids relevé une seule fois au début de l'expérience. Le paramètre calculé était la capacité d'extraction spécifique du monoxyde de carbone (sCO^{up}) qui représentait le taux de monoxyde de carbone prélevé par le sujet par unité de poids. Il nous a paru opportun d'exprimer les résultats de mesure d'extraction du monoxyde de carbone par unité de poids métabolique (sCO^{Met}), ce dernier étant par définition plus en relation avec les processus biologiques en cours dans l'absorption supposée du monoxyde de carbone. Les résultats obtenus ont été résumés dans le tableau ci-dessous (Tab. 17).

Tableau 17 : Reproductibilité de mesures successives

	FR (/min)	CO ^{up} (µl/min)	sCO ^{up} (µl/min.g)	sCO ^{Met} (µl/min.g)
T 0	389,4±71 ^a (100)	32,47±5,58 ^a (100)	1,81±0,27 ^a (100)	3,72±0,57 ^a (100%)
7 MIN	248,4±50 ^b (67±24)	14,18±3,94 ^{bd} (45,11±15,34)	0,79±0,22 ^{bd} (45,11±15,34)	1,63±0,22 ^{bd} (45,11%±15,34)
15 MIN	223±18 ^b (58±7)	10,86±1,40 ^{bc} (33,93±4,52)	0,61±0,08 ^{bc} (33,93±4,52)	1,25±0,08 ^{bc} (33,93%±4,52)
20 MIN	219±9 ^b (58±10)	8,78±0,82 ^c (28,03±7,69)	0,49±0,05 ^c (28,03±7,69)	1,01±0,10 ^c (28,03%±7,69)
30 MIN	232±17 ^b (65±13)	9,62±2,14 ^c (30,10±6,90)	0,53±0,11 ^c (30,10±6,90)	1,01±0,23 ^c (30,10%±6,90)
45 MIN	251±44 ^c (69±15)	14,70±1,98 ^d (46,57±11,01)	0,82±0,11 ^d (46,57±11,01)	1,69±0,22 ^d (46,57%±11,01)
60 MIN	275,75±13 ^d (77±13)	15,65±1,33 ^d (49,24±8,31)	0,87±0,07 ^d (49,24±8,31)	1,80±0,15 ^d (49,24%±8,31)

Les mesures n'affichant aucune lettre commune (a, b, etc.) sont considérées comme statistiquement différentes au seuil significatif P (P<0,05). Les intervalles représentent les temps des mesures successives effectuées. Les valeurs représentent la valeur mesurée de fréquence respiratoire, la valeur absolue mesurée de CO-uptake, le CO-uptake rapporté par unité de poids et le CO-uptake rapporté par unité de poids métabolique, annotés des déviations standards mesurées. Les valeurs entre parenthèses représentent les valeurs relatives en comparaison de la première mesure effectuée (%).

4.1.2. EXISTE-T-IL UNE ACCOUTUMANCE A LONG TERME ?

Un lot de 5 souris BALB/c, des femelles âgées entre 6 et 7 semaines et de poids variant entre 16 et 17,5 g, a été soumis à une mesure quotidienne de trois paramètres : poids, fréquence respiratoire (FR) et CO^{up} (CO^{up}). Elles ont été suivies pendant une période de 12 jours. Les paramètres calculés sCO^{up} et sCO^{Met} ont également été déterminés. La mesure a été réalisée immédiatement après la mise en place de l'animal, conformément au fonctionnement du *CO uptake monitor*® décrit dans la section 2.4.1. « Mesure des paramètres ventilatoires ». La procédure prévoyait une acclimatation de quelques minutes préalablement à la mesure. Les résultats ont été regroupés ci-après (Tab. 18) et les valeurs significativement différentes ont été marquées.

Tableau 18 : Reproductibilité des mesures quotidiennes

	FR (/min)	CO ^{up} (µl/min)	sCO ^{up} (µl/min.g)	sCO ^{Met} (µl/min.g)
J 1	356 ±30 ^{abc} (100)	29,1±8,2 ^a (100)	1,27±0,77 ^a (100)	3,51±1,0 ^a (100%)
J 2	356±26 ^{abc} (100±7)	29,6±6,0 ^a (96,5±37,9)	1,77±0,39 ^b (109,1±37,3)	3,59±0,78 ^a (109%±37,4)
J 3	347,6±32 ^{abc} (98±14)	30,7±4,7 ^a (108,1±45,3)	1,84±0,27 ^b (115,3±45,2)	3,71±0,54 ^b (115,18%±45,2)
J 4	322,2±38 ^b (91±14)	28,1±3,6 ^b (94,2±35)	1,69±0,20 ^b (105,1±34,1)	3,42±0,41 ^c (104,9%±34,2)
J 7	334,8b±30 (94±10)	28,6±6,1 ^a (91,8±32,6)	1,72±0,28 ^b (104,6±29,5)	3,47±0,61 ^c (104,4%±30,3)
J 8	369,8±48 ^{ab} (105±19)	36,9±5,8 ^{ab} (128,7±44,2)	2,11±0,26 ^c (130,56±40,51)	4,31±0,56 ^d (132%±41,4)
J 9	344±41 ^{ac} (97±14)	28,1±4,7 ^b (93,63±18,04)	1,62±0,25 ^b (96,66±16,05)	3,30±0,52 ^e (97,5%±16,5)
J 10	378,2±75 ^{ac} (108±28)	29,3±6,6 ^a (105,59±39,62)	1,68±0,35 ^b (104,93±37,83)	3,44±0,73 ^c (105,9%±38,3)
J 11	388,6±30 ^c (110±16)	31,8±5,6 ^b (114,01±34,34)	1,83±0,29 ^c (112,17±32,81)	3,73±0,60 ^b (113,13%±33,19)
J 12	398,2±39 ^c (112±14)	37,6±3,7 ^a (128,40±41,40)	2,17±0,16 ^d (134,29±39,19)	4,44±0,35 ^e (135,31%±39,73)

Les mesures n'affichant aucune lettre commune (^a, ^b, etc.) sont considérées comme statistiquement différentes au seuil significatif P (P<0,05). Les intervalles représentent les temps des mesures successives effectuées. Les valeurs représentent la valeur mesurée de fréquence respiratoire, le CO^{up}, le CO^{up} rapporté par unité de poids (sCO^{up}) et le CO^{up} rapporté par unité de poids métabolique (sCO^{Met}) annotés des déviations standards mesurées. Les valeurs entre parenthèses représentent les valeurs relatives en comparaison de la première mesure effectuée (%).

4.1.3. EXISTE-T-IL UNE INFLUENCE DU RYTHME CIRCADIEN DANS NOS MESURES ?

Deux mesures successives ont été effectuées à 12 heures d'intervalle (mesures réalisées entre 9h00 et 11h00 et ensuite entre 16h00 et 18h00), sur un groupe de cinq souris. Les souris étaient de souche BALB/c et toutes de sexe femelle. Elles avaient un poids compris entre 17,60 et 18,70g. Les mesures ont été effectuées sur une période de 48 heures. Pour chaque individu ont été relevés systématiquement la fréquence respiratoire (FR), le CO-uptake (CO^{up}) et le poids. Les paramètres calculés sCO^{up} et sCO^{Met} ont été également déduits pour chaque animal.

Les motifs du choix de mesures étalées sur 48 heures sont explicités dans la section 4.1.4 « Discussion des expériences d'orientation ».

Les résultats issus de ces mesures ont été réunis dans le tableau ci-dessous.

Tableau 19 : Effet du rythme circadien

	FR (/min)	CO ^{up} (µl/min)	sCO ^{up} (µl/min.g)	sCO ^{Met} (µl/min.g)
AM	375,2±80 ^a (100)	32,66±5,44 ^a (100)	1,8±0,31 ^a (100)	3,71±0,64 ^a (100%)
PM	324,2±56 ^b (88,9±20,0)	30,41±4,08 ^a (94,6±14,3)	1,68±0,25 ^a (94,6±14,3)	3,46±0,50 ^a (91,9%±14,3)

Les valeurs ne présentent pas de différences significatives. Dans ce tableau, les intervalles étaient les temps des mesures successives effectuées. Les valeurs représentées ici sont la fréquence respiratoire (FR), la valeur absolue mesurée de prélèvement de CO (CO^{up}), le CO-uptake rapporté par unité de poids (sCO^{up}) et le CO-uptake rapporté par unité de poids métabolique (sCO^{Met}) et les déviations standards respectives. Les valeurs entre parenthèses représentaient les valeurs relatives en comparaison de la première mesure effectuée (%).

4.1.4. EXPERIENCES D'ORIENTATION : DISCUSSIONS

Les résultats collectés des expériences d'orientation visaient à formuler des recommandations pour la mise en place de l'expérience principale. En examinant les résultats de l'expérience de reproductibilité de mesures successives (Tab. 17), on observe que les valeurs relevées (CO^{up} et sCO^{up}) chutent sensiblement au cours des mesures. Une différence significative existe déjà dès la mesure réalisée à T = 7 minutes et persiste jusque T = 60 minutes. En considérant notre délais maximum mesuré T = 60 minutes, on constate une chute de 51% entre la valeur à T0 et 60 minutes. La mesure naïve T0 est nettement plus élevée et semblable à d'autres mesures réalisées préalablement (cf. Tab. 18).

On constate que deux mesures effectuées à moins de 60 minutes d'intervalle, interfèrent mutuellement. Ceci est cohérent avec les informations recueillies dans la littérature : le temps de demi-vie de la

carboxyhémoglobine est de l'ordre de 4 heures (63) et donc une élimination quasi-totale est attendue au bout de 4 à 5 temps de demi-vie. Afin de réunir les meilleures conditions de répétabilité de nos mesures, il était nécessaire d'éviter plusieurs mesures faites à moins de 16 à 20 heures d'intervalle.

Même si les résultats issus du tableau 18 sur la « Reproductibilité des mesures quotidiennes » présentent des valeurs statistiquement significatives pour le CO^{up} (J3, J7, J8, J11 et J12) aucun biais ne semble systématique. Deux mesures successives apparaissent proches et on peut déduire à ce stade que les valeurs de CO mesurées ne sont pas dépendantes du jour de mesures et que deux mesures réalisées dans un intervalle de deux à douze jours peuvent être considérées comme indépendantes.

Les mesures effectuées sur les effets liés à l'existence d'un rythme circadien (Tab. 19) permettent a priori d'exclure la présence d'une variation systématique sur 48 heures et dépendante d'un rythme physiologique chez la souris. Au moment des choix de protocole pour cette expérience, aucune donnée n'était disponible quant aux variations rythmiques de la capacité d'extraction du monoxyde de carbone chez la souris saine et consciente. Il était moins important pour nous d'établir quelle était la base de cette rythmicité (variation quotidienne, biquotidienne, ou autre) que de s'assurer que cette rythmicité n'ait pas de conséquences sur les mesures que nous souhaitions effectuer. En pratique, la question était de savoir si l'opérateur pouvait réaliser sa mesure à tout moment de la journée ou devait-il se limiter à des plages particulières, le matin ou le soir par exemple ? Le but n'était donc pas de déterminer la nature et les caractéristiques de ce cycle, ceci aurait nécessité plus des mesures sur une plus longue période, mais plutôt de définir les manifestations éventuelles dans nos résultats d'un cycle préexistant chez la souris.

Les résultats de mesure de pléthysmographie, seule technique comparable disposant de données réalisées sur souris, faisaient état du point suivant :

« Il existe également des différences physiologiques en fonction du moment de l'analyse. Les rongeurs sont des créatures naturellement nocturnes et les cycles circadiens, qui génèrent en fin de compte des changements dans la respiration, doivent être pris en compte lors du calendrier des expériences. Il est donc nécessaire de chronométrer et de planifier les expériences de telle sorte que les données expérimentales puissent être comparées avec précision entre les cohortes. » (206). Les expérimentateurs ayant rencontré des différences entre les données récoltées le jour et les données récoltées durant la nuit, une évaluation sur au moins 24 heures semblait nécessaire. Indépendamment de cela, des mesures réalisées à l'aide d'un oscilloscope sur rat conscient avaient mis en évidence une variation dans les paramètres liés à la ventilation pulmonaire évoluant sur 24 heures (318, 319).

Au sein de notre expérience, afin de réunir au mieux les conditions de répétabilité des mesures il était crucial de savoir si les mesures réalisées durant les plages actives de l'opérateur (idéalement 8h00-19h00) étaient équivalentes (reproductibilité intra-journalière). Cette démarche explique notre volonté de comparer les mesures réalisées durant la matinée (AM, soit entre 9h00 et 11h00) et les mesures réalisées en après-midi (PM, soit entre 16h00 et 18h00).

Les résultats présentés dans le tableau 19 nous permettent de déduire que l'opérateur effectuant la mesure peut considérer des mesures réalisées durant la matinée comme équivalentes à des mesures réalisées durant l'après-midi. Autrement dit s'il existe un rythme circadien, il n'exerce pas une influence observable sur des mesures réalisées durant la même journée.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous avons établi les conditions à respecter au cours de notre expérience principale, ceci afin d'assurer la répétabilité de nos futurs résultats.

- ✓ Une seule mesure par animal durant une période de 24 heures
- ✓ Toutes les mesures réalisées sur les souris seraient exclusivement faites en matinée (9h-11h00)

4.2. EXPÉRIENCE PRINCIPALE

Réponse à la question Q 2 ci-après

4.2.1. QUEL EST L'EFFET LIÉ À LA SOUCHE DE SOURIS ?

Cent vingt souris ont été testées chaque semaine, durant 8 semaines. Les souris ont été regroupées en 6 souches et logées par sexes identiques. A chaque séance de mesures, les paramètres suivants ont été collectés pour chaque souris : le poids, la fréquence respiratoire et le CO^{up} , ensuite les valeurs de sCO^{up} et sCO^{Met} ont été calculées.

Les conclusions et les enseignements issus des résultats des expériences d'orientation ont également été pris en compte et appliqués.

Les résultats obtenus pour plus de clarté ont été regroupés dans le tableau (Tab. 20) ci-après :

Tableau 20 : Moyenne des valeurs de CO^{up}, sCO^{up} et sCO^{Met} par souche.

SOUCHES	CO ^{up} (µl/min)	sCO ^{up} (µl/min.g)	sCO ^{Met} (µl/min.g)	Poids moyen (g)
129/Sv	38,17±8,55 ^a	1,57±0,31 ^a	3,46±0,78 ^a	24,55±3,80
BALB/c	35,46±7,02 ^b	1,50±0,32 ^a	3,01±0,60 ^b	26,75±4,43
C3H	31,55±4,98 ^c	1,37±0,20 ^b	3,0±0,47 ^b	23,04±1,96
C57BL	33,05±6,46 ^{bd}	1,58±0,27 ^{ac}	3,36±0,66 ^c	21,09±3,29
DBA/2	35,84±6,03 ^{ab}	1,66±0,26 ^c	3,55±0,60 ^a	21,84±3,14
SJL	30,19±7,38 ^c	1,41±0,34 ^b	3,02±0,74 ^b	21,56±2,26

Les mesures n'affichant aucune lettre commune (a, b, etc.) sont considérées comme statistiquement différentes au seuil significatif P (P<0,05). Les valeurs représentent la valeur absolue mesurée de CO-uptake (CO^{up}), la valeur absolue mesurée de CO-uptake spécifique (sCO^{up}) et la valeur absolue mesurée de CO-uptake spécifique métabolique (sCO^{Met}) pour chaque souche de souris. Ces valeurs ont été complétées des valeurs de déviation standard respectives.

4.2.2. EXISTE-IL UNE INFLUENCE LIEE A LA CROISSANCE SOMATIQUE ?

Tableau 21 : Moyenne des valeurs de CO^{up}, sCO^{up} et sCO^{Met} par semaine d'âge.

	CO ^{up} (µl/min)	sCO ^{up} (µl/min.g)	sCO ^{Met} (µl/min.g)
6 SEMAINES	32,46±6,67 ^a (100)	1,60±0,31 ^a (100)	3,38±0,70 ^a (100%)
7 SEMAINES	34,62±7,75 ^{bc} (106,64±20,55)	1,63±0,38 ^a (101,57±23,28)	3,10±0,69 ^a (91,66±20,53)
8 SEMAINES	34,75±8,06 ^{bc} (107,06±22,4)	1,60±0,30 ^{ac} (99,78±18,72)	3,45±0,80 ^b (101,87±23,61)
9 SEMAINES	35,47±7,99 ^b (109,27±23,18)	1,52±0,29 ^{bc} (95,08±19,35)	3,33±0,75 ^a (98,53±22,18)
10 SEMAINES	33,73±7,42 ^{ac} (103,90±22,51)	1,45±0,28 ^c (90,16±19,5)	3,16±0,70 ^a (93,50±20,57)
11 SEMAINES	34,18±7,07 ^{bcd} (105,30±22,0)	1,46±0,26 ^{bc} (90,99±17,83)	3,20±0,66 ^a (94,51±19,55)
12 SEMAINES	34,38±6,75 ^{bcd} (105,92±20,68)	1,47±0,25 ^{bc} (91,46±17,21)	3,21±0,63 ^a (94,97±18,65)
13 SEMAINES	32,81±6,47 ^{ad} (101,08±19,71)	1,37±0,23 ^d (85,76±17,02)	3,02±0,60 ^c (89,30±17,62)

Les mesures n'affichant aucune lettre commune (a, b, etc.) sont considérées comme statistiquement différentes au seuil significatif P (P<0,05). Les valeurs représentent les mesures effectuées aux différentes semaines d'âge des souris. Les valeurs représentent la valeur absolue mesurée de CO-uptake (CO^{up}), la valeur absolue mesurée de CO-uptake spécifique (sCO^{up}) et la valeur absolue mesurée de CO-uptake spécifique métabolique (sCO^{Met}) et leurs déviations standards respectives. Les valeurs entre parenthèses représentent les valeurs relatives en comparaison de la première mesure effectuée (%).

4.2.3. EXISTE-IL UNE INFLUENCE LIEE AU GENRE DES SOURIS ?

Tableau 22 : Moyenne des valeurs de CO^{up}, sCO^{up} et sCO^{Met} par genre et par souche.

	CO ^{up} (µl/min)	sCO ^{up} (µl/min.g)	sCO ^{Met} (µl/min.g)
FEMELLES			
129/Sv	34,02±6,82	1,60±0,33	3,42±0,69
BALB/c	32,81±6,20	1,61±0,33	2,87±0,54
C3H	29,95±4,12	1,38±0,18	2,97±0,41
C57BL	29,81±3,30	1,63±0,20	3,37±0,37
DBA/2	32,67±4,17	1,68±0,23	3,51±0,45
SJL	29,33±6,41	1,47±0,32	3,11±0,68
TOTAL FEMELLES	31,43±5,61^a (100)	1,56±0,29^a (100)	3,19±0,57^a (100%)
MÂLES			
129/Sv	42,31±8,11	1,53±0,29	3,50±0,67
BALB/c	38,13±6,80	1,38±0,26	3,16±0,56
C3H	33,16±5,27	1,37±0,22	3,03±0,48
C57BL	36,34±7,12	1,53±0,31	3,36±0,66
DBA/2	39,01±5,96	1,63±0,29	3,58±0,55
SJL	31,03±8,17	1,34±0,34	2,94±0,77
TOTAL MALES	36,66±7,89^b (116,64±21,52)	1,46±0,31^b (93,59±21,23)	3,26±0,70^b (102,36±22,03)

Les mesures n'affichant aucune lettre commune (a, b, etc.) sont considérées comme statistiquement différentes au seuil significatif P (P<0,05). Les valeurs représentent les mesures effectuées sur les différentes souches de souris de laboratoire en fonction du genre. Les valeurs représentaient la valeur absolue mesurée de CO-uptake (CO^{up}), la valeur absolue mesurée de CO-uptake spécifique (sCO^{up}) et la valeur absolue mesurée de CO-uptake spécifique métabolique (sCO^{Met}) et leurs déviations standards respectives. Les valeurs entre parenthèses représentent les valeurs relatives en comparaison de la première mesure effectuée (%).

4.2.4. COMMENT CONFIRMER NOTRE MODELE ?

Au cours de cette expérience, cinq souris de souche BALB/c ont été soumises à des mesures quotidiennes durant 10 jours. Au terme de cette période ont été calculés le CO^{up} moyen ainsi que le poids moyen pour chaque individu. On a également calculé les valeurs attendues selon deux équations de régression (Tab. 24), Equations de régression de la relation CO^{up}-poids (D1 et D2). Les résultats obtenus ont été comparés dans le tableau 25 ci-après.

Tableau 23 : Table des corrélations entre les variables

CORRÉLATIONS	FR	CO ^{up}	sCO ^{up}	Poids
FRÉQUENCE RESPIRATOIRE		-0,04950	-0,00356	-0,08389*
CO-UPTAKE	-0,04950		0,70469	0,45889*
CO-UPTAKE SPÉCIFIQUE (sCO^{up})	-0,00356	0,70469*		-0,28031*
POIDS	-0,08389*	0,45889*	-0,28031*	

Les astérisques (*) indiquent des valeurs statistiquement différentes au seuil significatif P (P<0,01).

Tableau 24 : Equations de régression de la relation CO^{up}-poids

	Equations	Coeff. de corrélation
DROITE DE RÉGRESSION SANS CORRECTION (D1)	$Y = 0,96 X + 12,14$	$R^2 = 0,211$
DROITE DE RÉGRESSION APRÈS CORRECTION (D2)	$Y = 0,96 X + 12,23$	$R^2 = 0,228$

Le facteur de correction est déterminé par le logiciel Minitab v10 software, il tient compte des facteurs suivants : dispersion des données, points hors limites et points déviants. Il ne tient plus compte au final que de 95% des points les plus cohérents et les plus représentatifs des données.

Tableau 25 : Résultats de l'expérience de confirmation

Animal	Variables	Mesures	Droite D1	Droite D2
SOURIS 1	CO ^{up} (µl/min)	31,15±5,25	29,24*	29,09*
	Poids (g)	17,54±0,33		
SOURIS 2	CO ^{up} (µl/min)	28,44±5,45	27,84*	27,69*
	Poids (g)	16,09±0,30		
SOURIS 3	CO ^{up} (µl/min)	29,10±6,37	28,43*	28,28*
	Poids (g)	16,69±0,43		
SOURIS 4	CO ^{up} (µl/min)	32,26±6,55	28,83*	28,68*
	Poids (g)	17,11±0,63		
SOURIS 5	CO ^{up} (µl/min)	33,93±6,32	29,38*	29,23*
	Poids (g)	17,68±0,27		

Les astérisques (*) indiquent des valeurs semblables à la mesure correspondante avec une probabilité de 99%. Les valeurs obtenues par calcul à l'aide de la courbe de régression sans correction (D1), les valeurs obtenues par calcul à l'aide de la courbe de régression après application d'un facteur de correction (D2).

Le tableau des résultats de l'expérience de confirmation (Tab 25), nous indique que notre modèle est fidèle à la réalité mesurée. Il explique les résultats obtenus et permet d'en prévoir les valeurs attendues de manière fiable (P value<0,01).

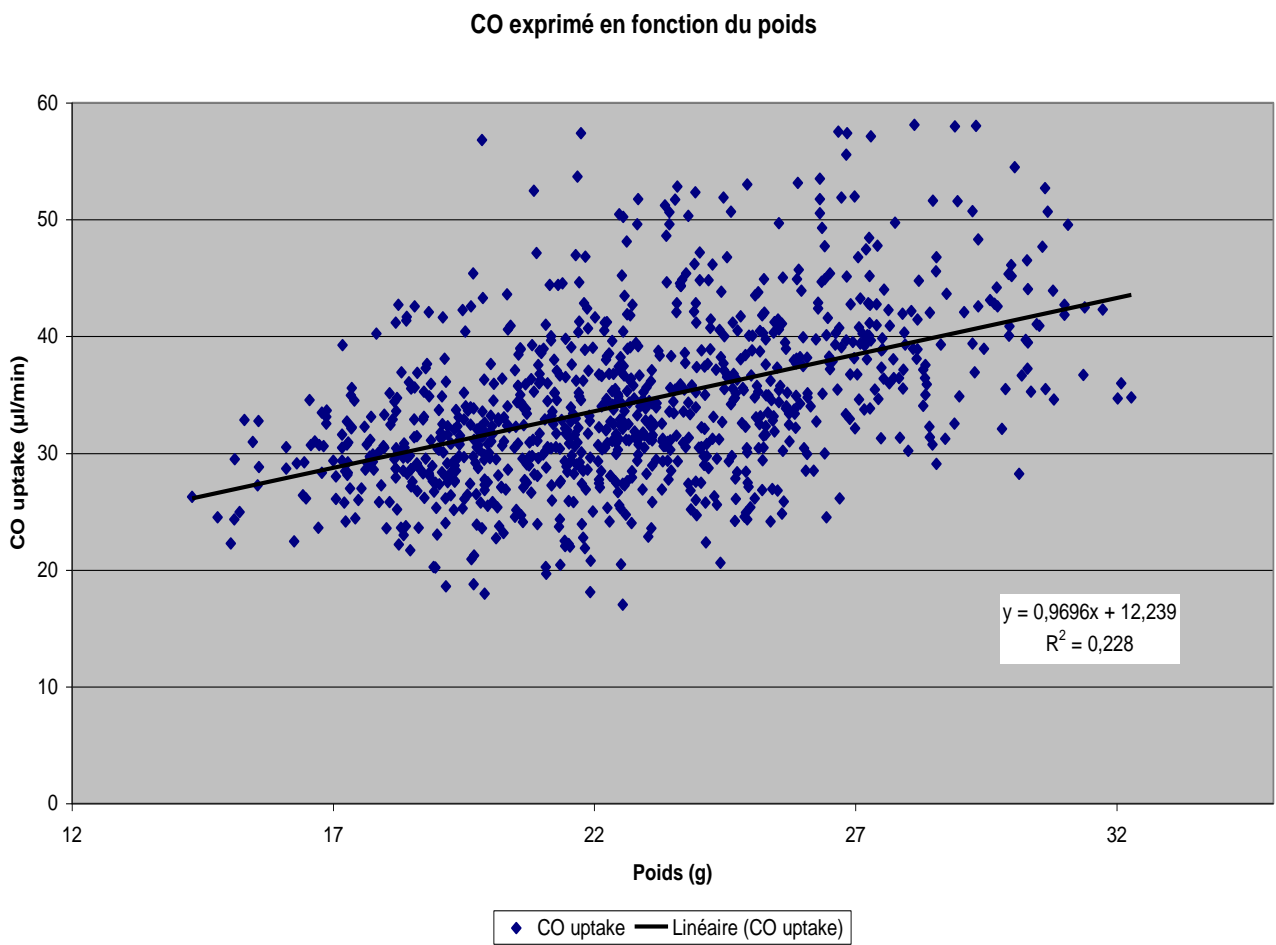


Figure 26: CO-uptake par unité de poids vif. La droite de régression est réalisée avec Minitab v10 software.

V. ÉTUDE 1 : DISCUSSION

5.1. EFFET DE LA SOUCHE

La comparaison des valeurs moyennes de CO^{up} au sein de chaque souche, nous indique qu'il existe une différence significative selon que le sujet appartienne à l'une ou l'autre souche de souris (Tab 20). Si on tient compte des valeurs de CO^{up} , on constate que la souche 129/Sv occupe le premier rang, suivie de la souche DBA/2, la BALB/c, la C57Bl, la C3H et la SJL. La littérature rapporte la relation CO^{up} -Poids (74). Toutefois, nous constatons que la répartition des valeurs de CO^{up} dans nos résultats, ne dépend pas uniquement des poids vifs moyens des souches considérées.

Ceci nous est confirmé par l'examen des valeurs de sCO^{up} et sCO^{Met} . Il existe une différence marquée entre individus appartenant à des souches de souris différentes. Ce résultat nous paraît d'autant plus crédible que des constatations similaires ont été faites dans le cadre de mesure de pléthysmographie en chambre double sur souris saine (102, 334, 349). Ainsi, le trio de tête des souris ayant la capacité d'extraction la plus élevée (relativement à leur poids et à leur métabolisme) sont DBA/2, 129/Sv et C57BL/6J.

La souche DBA/2 ressort première à l'issue de nos mesures, viennent ensuite la souche C57BL/6J, la souche 129/Sv, la souche BALB/c, la souche SJL et enfin la souche C3H. En conclusion, l'effet « souche » observé est bel et bien établi et diffère d'un éventuel effet « poids ».

5.2. EFFET DE LA CROISSANCE SOMATIQUE

Cette étape de validation de la technique visait à mettre en évidence le possible effet de l'âge sur la diffusion du CO. Le CO^{up} a été mesuré dans les vingt souris de chaque souche pendant 8 semaines consécutives, de l'âge de 6 semaines à l'âge final de 13 semaines.

La croissance somatique des individus est ici mesurée en semaines (Tab. 21). Le suivi des valeurs de CO^{up} au cours du temps présente des valeurs statistiquement différentes d'une semaine à l'autre. Les semaines 7, 8, 9 ainsi que les semaines 11 et 12 sont différentes de la semaine 6. Toutefois, aucune orientation particulière (accroissement ou chute systématique) ne semble nettement ressortir.

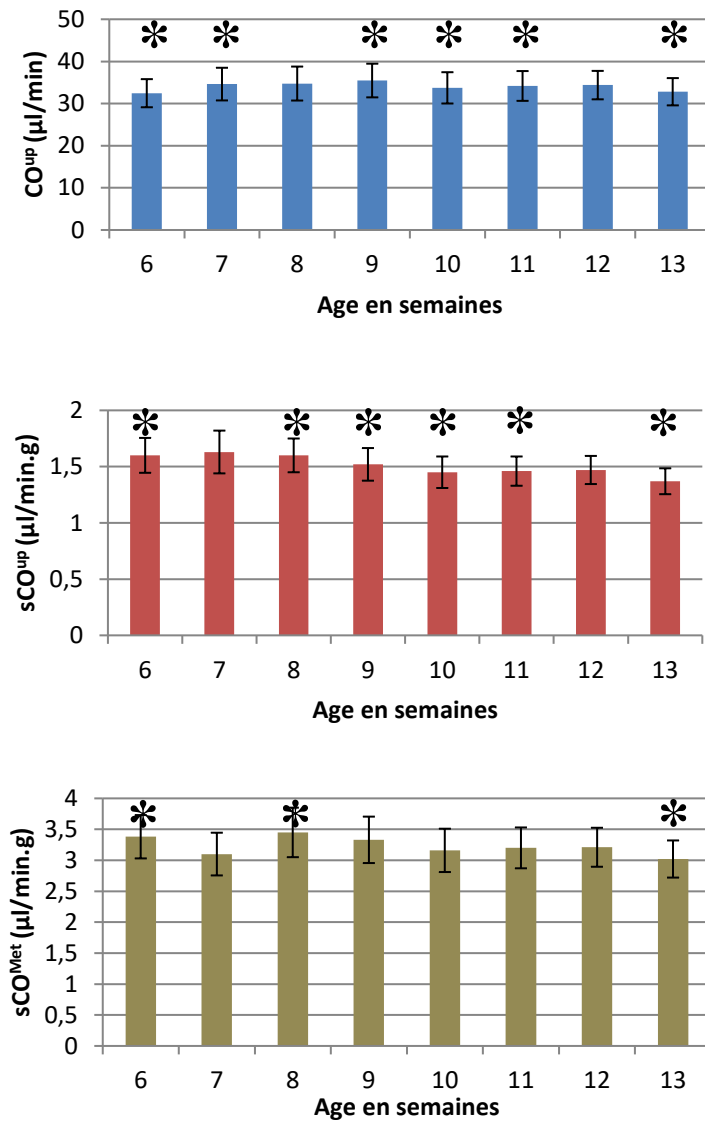


Figure 27: Représentation (histogramme) des valeurs de CO^{up}, sCO^{up} et sCO^{Met} et leur évolution selon l'âge des souris. Les valeurs sont tirées de (Tab. 21). Les barres verticales représentent la déviation standard. On note ici clairement la chute progressive en fonction de l'âge des souris des valeurs de sCO^{up}, cette chute est observable de manière moins évidente pour les valeurs de sCO^{Met}. Les barres verticales représentent les déviations standards des valeurs (SD) et les (*) indiquent une différence statistiquement significative au seuil P (P < 0,05)

Le poids étant variable en fonction de l'âge et de la souche considérée, les mesures de CO^{up} ont été ajustées en sCO^{up} , ceci afin de supprimer tout effet du poids dans nos mesures et il nous a semblé judicieux de calculer sCO^{Met} sur base du poids métabolique. Ces paramètres nous ont parus justifiés dans la mesure où il a précédemment été démontré une relation entre le poids et le CO -uptake (73, 107).

Avec la croissance, la CO^{up} augmente jusqu'à l'âge de 9 semaines avant de diminuer par la suite avec l'âge croissant (Fig. 27). La sCO^{up} diminue de façon linéaire, de l'âge de 6 semaines à 13 semaines. Il en est de même, mais de façon moins flagrante, pour la sCO^{Met} .

Ceci peut être expliqué par plusieurs points :

- ✓ Une diminution du contenu en hémoglobine du sang avec l'âge (405).
- ✓ La capacité pulmonaire relative au poids est plus grande chez le jeune que chez la souris mature (171, 231, 232, 307).
- ✓ Une augmentation de l'épaisseur de la barrière alvéolo-capillaire (179).

En conclusion, en ce qui concerne la mesure de CO^{up} , il existe une variation liée à la croissance de la souris (évolution du poids selon les phases de croissance), il faudra en tenir compte et idéalement il serait préférable d'établir des comparaisons entre des mesures réalisées sur des souris d'âges comparables.

5.3. EFFET DU GENRE

Comme pour l'effet souche, on observe un effet lié au genre, les valeurs sont significativement différentes entre les mâles et les femelles (Tab. 22). La CO^{up} des mâles est supérieure à celle des femelles, si on s'en tient à ce résultats nous pouvons conclure qu'en moyenne les souris mâles extraient plus de CO au terme de la mesure que les femelles. Ce point s'explique par le fait que la capacité d'extraction est relative au poids et que les mâles sont en moyenne plus lourds que les femelles dans toutes les souches de souris que nous avons testées. Ceci est confirmé par le fait que si on rapporte ce résultats par unité de poids, on constate que le sCO^{up} des femelles est supérieur à celui des mâles et qu'ainsi ces dernières sont plus efficaces dans le processus d'extraction du CO dans l'environnement.

Certaines particularités fonctionnelles entre souris mâles et femelles, spécialement sur le plan respiratoire sont bien connues : taille plus petite des femelles, voies respiratoires supérieures plus

étroites et une fréquence respiratoire moins élevée que les mâles. Elles ont déjà été rencontrées dans nos expériences et mises en évidence au sein du laboratoire (102).

Plusieurs facteurs peuvent apporter une explication sur ces points :

- ✓ Les femelles ont une capacité pulmonaire (TLC) plus importante avec des alvéoles plus larges et plus fines apportant ainsi une meilleure ventilation des poumons (279, 289).
- ✓ Les femelles ont également un taux d'hémoglobine et une hématicrite plus élevés. Elles bénéficient donc d'une meilleure perfusion pulmonaire que les mâles (405).

La combinaison de ces facteurs explique la diffusion alvéolo-capillaire qui semble être "facilitée" chez les souris femelles.

Si on s'intéresse à la sCO^{Met} on constate que ce rapport est inversé et que ce sont les mâles qui bénéficient d'une capacité d'extraction spécifique métabolique accrue. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'à masse égale les femelles bénéficient d'un métabolisme plus élevé que les mâles (247, 276) ainsi que des taux hormonaux différents en androgènes notamment (361).

Nos conclusions sont telles qu'il est important de n'enrôler que des souris du même sexe lorsque l'on veut comparer des cohortes différentes.

5.4. EXPÉRIENCE DE CONFIRMATION

En médecine humaine une technique dénommée *Single breath measurement of diffusing capacity* est régulièrement utilisée (415). Cette mesure réalisée à la suite d'une administration en prise unique d'une quantité donnée de gaz CO, permet de déterminer la capacité d'extraction du monoxyde de carbone ainsi que la capacité de diffusion de ce dernier au travers de la membrane alvéolo-capillaire. A l'aide de cette technique, une relation linéaire a pu être établie entre le prélèvement de monoxyde de carbone et le poids du sujet chez l'homme. En raison de sa petite taille et de sa physiologie respiratoire, cette technique n'est pas appliquée chez la souris. Une relation de même type a pu être démontrée chez le rat, le hamster et chez le lapin (107).

Dans la procédure utilisée avec le *CO uptake monitor*®, celle-ci laisse une période réinspiratoire de 60 secondes (*rebreathing*) durant la mesure. Ce point favorise une homogénéisation des échanges respiratoire, dans ces conditions il était intéressant de vérifier s'il existait une relation similaire. Une première approche (Fig. 26) nous permet d'envisager une forte corrélation ($R^2 = 0,459$, dans Tab 23) significative entre les variables poids et CO-uptake. Une étude plus détaillée de cette relation nous permet de dire qu'elle est de type linéaire. Si nous comparons ces résultats avec les données de la littérature nous constatons que deux types de relations sont décrites.

Depledge et collaborateurs (1981) (74) ainsi que Rappaport et Collaborateurs (286) obtiennent tous deux une courbe de relation CO^{up} et poids de type parabole. Le CO^{up} augmente progressivement avec le poids pour atteindre un sommet et chute sensiblement ensuite. Toutefois, on constate que ces auteurs ont suivi l'évolution des souris sur plusieurs mois (Depledge, 15 mois ; Rappaport, 18 mois) et les variations de poids sont importantes (de l'ordre de 20 g). Depledge et collaborateurs effectuent leurs mesures sur des souris de souches CBA dont ils ne précisent pas le sexe.

Franko et Sharplin (107) obtiennent chez des souris témoins une relation de type linéaire. Ils signalent toutefois qu'un effort modéré est exigé des souris durant 50% du temps de contact avec le monoxyde de carbone. Reprenant les mesures sans efforts préalables, ils obtiennent des valeurs plus faibles.

Dans le cadre de ce travail, une relation de type linéaire a pu être observée (Fig.26). Les souris ont été suivies durant 8 semaines et n'ont pu atteindre le poids de 35g autour duquel Depledge et collaborateurs (1981) observent une chute de l'extraction du monoxyde de carbone. Six souches différentes tant au point de vue de leur physiologie respiratoire que de leur croissance ont été étudiées. Certaines de ces souches ne sont pas susceptibles d'atteindre le poids de 35g même à l'âge adulte, ceci est d'autant plus valable que l'échantillon ici considéré est à 50% constitué de femelles (ceci fait chuter le poids vif moyen). Lors de la mise en place de la souris dans le *CO uptake monitor*®, la souris semble soumise à un léger stress du fait des manipulations nécessaires pour fermer la chambre de mesure. Tous ces éléments contribuent à expliquer nos résultats.

Section expérimentale

Etude 2

ÉVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES NON-INVASIVES

Etude en conditions pathologiques

EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES NON- INVASIVES :

ETUDE EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES

I. MODÈLE À RESPIROVIRUS MURIN

1.1. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 2 (PARTIE 1)

Au moment de la fixation des objectifs, un modèle d'infection pulmonaire viral chez la souris à l'aide du Respirovirus Murin (RM), anciennement virus Sendai, venait d'être mis au point dans le département de pathologie (93, 95). Ce modèle était décrit comme un modèle respiratoire d'infection expérimentalement induite d'origine virale, présentant des lésions principalement observées dans les voies respiratoires et pouvant s'étendre jusqu'aux poumons. Nous nous sommes basés sur l'hypothèse de travail soutenant que le CO-uptake chez la souris était particulièrement indiqué pour caractériser les affections évolutives. Ainsi, une affection siégeant au sein des voies respiratoires (zones « superficielles ») dans les premiers stades de la maladie et pouvant évoluer vers les tissus pulmonaires (zones « profondes ») telle qu'observée dans le modèle RM nous a semblé l'outil de choix pour tester notre hypothèse de travail.

Nous avons concrètement voulu répondre à la question suivante :

Q3 — La mesure du CO-uptake est-elle discriminante dans le cas d'une affection respiratoire profonde et/ou superficielle ?

1.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

1.2.1. LES SOURIS

Afin de réaliser les mesures de CO-uptake, 120 souris âgées de 6 semaines, équitablement réparties entre souches et genre ont été utilisées. Les souches BALB/c ; DBA/2 ; 129/Sv ; SJL ; C3H et C57BL/6J ont été obtenues de Charles River Laboratories. Ces souches ont été choisies délibérément car elles étaient issues des lignages différents (27, 50, 100) et on pouvait présumer ainsi de propriétés physiologiques différentes (15).

Elles ont été suivies par CO-uptake et par pléthysmographie en chambre double dans des conditions standardisées de température et d'humidité pendant sept jours consécutifs. Ces opérations ont été

menées conformément aux dossiers remis et acceptés auprès du Comité d’Ethique de l’Université de Liège (Dossier éthique N°1411-ULG et N°1604-ULG).

1.2.2. HEBERGEMENT DES SOURIS

Les animaux ont été hébergés dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Toutefois il est à préciser qu’au sein de l’animalerie, les souris ont été placées dès réception en cages jetables filtrées aux dimensions réglementaires. Ce dispositif de cage jetable est muni d’un filtre cellulose permettant d’éviter la transmission de microgouttelettes susceptibles d’être émises par les souris infectées. L’agencement des animaux avec un maximum de 5 souris par cage a permis de respecter la norme établie.

L’organisation dans l’animalerie était telle qu’elle ne permettait qu’un transport (unique et unidirectionnel) entre deux espaces préalablement délimités dans l’animalerie : la zone dite «saine» et la zone dite «infectée». Au cours du processus expérimental, l’hébergement a été réalisé en deux phases. Durant la première, les souris étaient toutes hébergées dans la zone saine de l’animalerie qui était strictement réservée à l’hébergement des animaux avant l’inoculation. Seules les activités d’élevages y étaient réalisées. Une seconde phase n’est intervenue qu’à partir du moment où les souris devaient subir une manipulation ou un traitement. Dans cette zone infectée, lorsque l’expérience l’a exigé, la souche virale pathogène a été inoculée sous enceinte de sécurité microbiologique (ESM).

Après inoculation, les souris ont été confinées dans la zone « infectée » de l’animalerie. Durant les deux phases, les souris n’ont pas quitté les unités jetables et filtrées de confinement. La durée de séjour totale au sein de l’animalerie n’aura jamais excédé 15 jours dans chaque zone de l’animalerie. Lors des manipulations nécessaires, l’ouverture des unités jetables et filtrées de confinement a été précédée des mesures de protection personnelles adéquates prévues à cet effet et a été effectuée sous ESM.

1.2.3. IDENTIFICATION DES SOURIS

Lors de cette expérience, les souris ont été identifiées par la mise en place d’une boucle auriculaire en laiton, placée de manière définitive et munie d’un numéro d’identification unique.

1.2.4. RESPIROVIRUS MURIN

La souche de virus RM disponible dans le commerce (SeV/52 ; ATCC n° VR-105) a été obtenue et dans un premier temps inoculée à des œufs embryonnés de poules âgées de 11 jours pendant 48 heures

afin de constituer un stock de travail. Le liquide allantoidien a ensuite été récolté et titré (1/1024 titre en Hémagglutinine A) par hémadsorption sur érythrocytes de cobaye.

Le liquide collecté a ensuite été dilué dans une solution commerciale « Minimum Essential Media » (MEM®, Thermo Fisher Scientific). Des aliquotes de 100µl ont été réalisés et stockés à -80°C pour servir d'inoculum. Des aliquotes sélectionnés de manière aléatoire et titrés par plaque assay en cellules LLC-MK2 ont confirmé le titre de $2,1 \times 10^4$ PFU/ml.

1.2.5. PROCEDURE D'INOCULATION

Les procédures réalisées ont été menées dans les conditions de biosécurité de niveau 2 et avec l'accord préalable du Comité d'Ethique Animale (Dossier d'éthique N° 1604-ULG). L'administration de l'inoculum a été réalisée par instillation intranasale de 50µl répartis dans les deux narines. L'opération a été réalisée sous anesthésie générale de courte durée afin d'assurer une inoculation intranasale optimale et d'occasionner le moins de stress possible (11, 93). L'anesthésie a été réalisée par inhalation grâce à la diffusion ad hoc d'un mélange d'oxygène et d'isoflurane selon la demande (bolus).

L'inoculation intranasale a été effectuée avec la souris en position verticale. A l'aide d'une micropipette, on a prélevé 50µl d'inoculum précisément et on a placé l'extrémité de la micropipette en regard de la narine de la souris. L'administration de la gouttelette d'inoculum a été réalisée au rythme de la respiration de la souris anesthésiée et injectée au moment des phases d'inspiration. Lorsque le volume de 50µl a été instillé pour moitié dans une narine puis dans l'autre pour l'autre moitié, la souris a été encore maintenue dans cette position durant 30 secondes afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de reflux ou d'écoulement. L'inoculum a été préparé en diluant le volume désiré d'homogénat (extrait de poumons dans du PBS) afin d'obtenir la charge virale choisie.

1.2.6. SUIVI DU COMPORTEMENT EXPLORATOIRE

Un premier suivi a été effectué durant le réveil post-anesthésique des animaux. Par la suite, les animaux ont été examinés visuellement à l'occasion de la pesée quotidienne. L'agilité et les mouvements effectués par les souris ont pu être appréciés. Parmi les cinq souris regroupées dans une même unité de confinement, les individus restants à l'écart, moins mobiles ou moins alertes que leurs congénères ont été pointés. Les comportements anormaux parmi ceux observés pour ces facteurs, ont été dès lors comptabilisés au crédit de la maladie en développement.



Figure 28 : Inoculation intranasale de l'inoculum viral.

Source : Etienne Lévy, photographe.

1.3. EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES

Au cours de notre étude, plusieurs critères distincts ont été mesurés et analysés. Les caractéristiques des paramètres relevés et suivis sont décrites ci-après.

1.3.1. SUIVI QUOTIDIEN DU POIDS VIF

Nous avons déjà expliqué l'importance du suivi de poids, même s'il ne constituait pas une évaluation fonctionnelle respiratoire. Toutes les souris ont été régulièrement pesées et le poids quotidien a été rapporté. A l'occasion de cet examen, les souris ayant atteint le point limite convenu selon le critère poids (perte de 15% du poids initial) (11, 190) ont été écartées de l'expérience et ont été considérées comme « mortes » pour l'expérience.

1.3.2. SUIVI DU PATRON RESPIRATOIRE

Appréciation visuelle

Au cours de l'expérience, une attention particulière a été portée sur la respiration des souris. Une appréciation visuelle et objectivée a été faite de la fréquence respiratoire : rapide (soit >200 BPM) ou lente (< 100 BPM) ; du type de respiration : respiration thoracique ou respiration costo-abdominale ; de la présence de bruits respiratoires audibles. La présence de tels signes au cours de l'expérience a été révélatrice d'un développement sous-jacent de la maladie.

Pléthysmographie barométrique en chambre double

Les souris ont été préalablement accoutumées à l'environnement pour la pléthysmographie barométrique en chambre double. Elles ont été placées dans la chambre de mesure pendant 15 minutes chaque jour durant les trois jours précédant le début des mesures.

Les souris ont été successivement placées dans la chambre de mesure. Chaque animal y a été mesuré durant une période de 5 minutes conformément à la procédure développée par Flandre et al (102). Lorsque l'infection était programmée pour les souris, deux mesures « pré-infection » étaient réalisées et une mesure quotidienne post-infection durant sept jours consécutifs. Les données sont reprises dans le tableau 26 « Résultats des mesures respiratoires regroupées par souche et par jour » ci-après.

Extraction du monoxyde de carbone

La mesure du CO^{up} a été réalisée à l'aide du *CO uptake monitor*® de Columbus Instruments. La mesure a été planifiée et réalisée aux mêmes dates que la pléthysmographie, sur les mêmes animaux, ceci tant avant qu'après l'infection des souris. La mesure du CO-uptake visait donc à donner une

évaluation qualitative et quantitative des capacités de diffusion de la paroi alvéolo-capillaire pulmonaire.

1.3.3. FIXATION DES POINTS LIMITES

Conformément à la demande adressée au Comité d’Ethique et autorisée par ce dernier, nous avons adopté les points limites ci-après :

- ✓ L’atteinte par la souris d’une température corporelle inférieure ou égale à 32°C.
- ✓ L’atteinte par la souris d’une perte de poids vif supérieure ou égale à 15% du poids vif initial.

Nous nous sommes fondés sur les travaux qui ont montré que la température corporelle et le poids vif pouvaient être utilisés comme marqueurs de points limites dans divers modèles murins de maladies infectieuses (103, 190, 246, 257, 266, 333, 338, 359, 370, 382).

Au cours de toutes les manipulations réalisées, l’atteinte d’au moins un des points limites précédemment cités a entraîné le retrait de l’animal, ainsi considéré comme « mort » pour l’expérience.

1.4. EVALUATION MORPHOLOGIQUE

1.4.1. AUTOPSIE

Lorsque la décision d’euthanasie a été prise, les souris ont été successivement anesthésiées à l’isoflurane, surdosées au pentobarbital (IP) et enfin, une dislocation vertébro-cervicale a été réalisée pour confirmer la mort. Ceci conformément à la procédure préalablement soumise pour accord au Comité d’Ethique de l’Université de Liège.

Le sang a été prélevé en sectionnant l’artère brachiale, centrifugé (3500g, 15 minutes) et le sérum conservé à -80°C. Une autopsie de chaque animal a été réalisée pour déceler toute lésion pulmonaire en relation avec l’infection virale.

Durant l’autopsie, on a procédé au prélèvement du bloc cardio-pulmonaire. Les organes ont été finement disséqués, on a retiré l’œsophage, le cœur et les voies respiratoires supérieures. Les poumons ont été précisément pesés, puis on a prélevé le poumon gauche qui a été immergé dans une solution de paraformaldéhyde 4% (PAF). Le poumon droit de chaque souris a été conservé à une température de -80°C, en vue d’un examen virologique ultérieur.

1.4.2. EXAMENS HISTOPATHOLOGIQUES

Les poumons gauches, issus des souris sacrifiées aux temps de prélèvements déterminés ont été insufflés avec un volume de 300µl de solution PAF et immergés dans cette même solution pour fixation.

Après fixation et inclusion à la paraffine pour permettre l'évaluation histopathologique, des coupes sériées de 5µm d'épaisseur ont été réalisées et traitées avec une coloration à l'hématoxyline-éosine (HE). Ces lames histologiques ont été évaluées à l'aide d'un système de scores.

1.5. RÉSULTATS

Réponse à la question Q 3 ci-après

1.5.1. PLETHYSMOGRAPHIE ET CO-UPTAKE

Tableau 26 : Résultats des mesures respiratoires regroupées par souche et par jour

PARAMÈTRE	Souches	N=	Temps							
			Jour 1		Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7
			Pré-I	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI
FRÉQUENCE RESPIRATOIRE (/MIN)	BALB/c	20	253±2 a	246±32 a	262±22 a	261±18 b	287±18 c	271±22 c	282±57 c	277±62 c
	DBA/2	20	224±18 a	219±13 a	221±15 a	368±61 b	410±44 c	394±31 c	375±27 bc	353±41 b
	129/Sv	20	221±22 a	205±13 a	217±10 a	280±27 b	335±32 c	328±37 c	348±36 c	338±54 c
VOLUME- MINUTE (ml/min)	BALB/c	20	50±7 a	46±8 a	45±5 a	47±4 a	52±9 a	51±8 a	51±8 a	51±10 a
	DBA/2	20	53±9 a	48±3 a	47±7 a	59±17 a	68±10 b	64±6 b	68±12 b	55±9 a
	129/Sv	20	58±8 a	49±7 a	53±6 a	62±3 a	61±9 a	63±6 a	58±8 a	59±16 a
sRAW	BALB/c	20	1,18±0,4 a	1,13±0,4 a	0,97±0,3 a	1,22±0,4 a	1,30±0,4 a	1,40±0,3 a	1,12±0,3 a	1,19±0,3 a
	DBA/2	20	1,08±0,3 a	0,92±0,2 a	0,98±0,3 a	1,80±0,7 b	2,14±0,6 bc	2,25±0,6 c	1,68±0,4 b	1,63±0,4 b
	129/Sv	20	1,09±0,6 a	1,00±0,3 a	1,18±0,3 a	1,38±0,3 ab	1,54±0,3 b	1,49±0,4 b	1,48±0,4 b	1,70±0,3 b
sCO^{UP} (µL/min.g)	BALB/c	20	1,27±0,3a	1,33±0,18b	1,45±0,21c	1,32±0,23b	1,31±0,28a*	1,26±0,11a*	1,33±0,14b	1,33±0,23b
	DBA/2	20	1,49±0,22a	1,6±0,36b	1,58±0,16b	1,38±0,22bc	1,43±0,23c	1,35±0,35cb*	1,38±0,22cd*	1,45±0,24c
	129/Sv	20	1,27±0,27a	1,23±0,18b	1,28±0,21bc	1,24±0,17a	1,22±0,22d*	1,14±0,14d*	1,19±0,19bd*	1,1±0,21e*

Les mesures n'affichant aucune lettre commune (^{a, b, etc.}) sont considérées comme statistiquement différentes au seuil significatif P (P<0,05). Les abréviations ont été utilisées comme suit : Pré-I : Pré-infection et PI : Post-infection. (*) indique les chutes de valeurs observées au sein de la même souche durant au moins deux jours consécutifs.

1.5.2. HISTOPATHOLOGIE

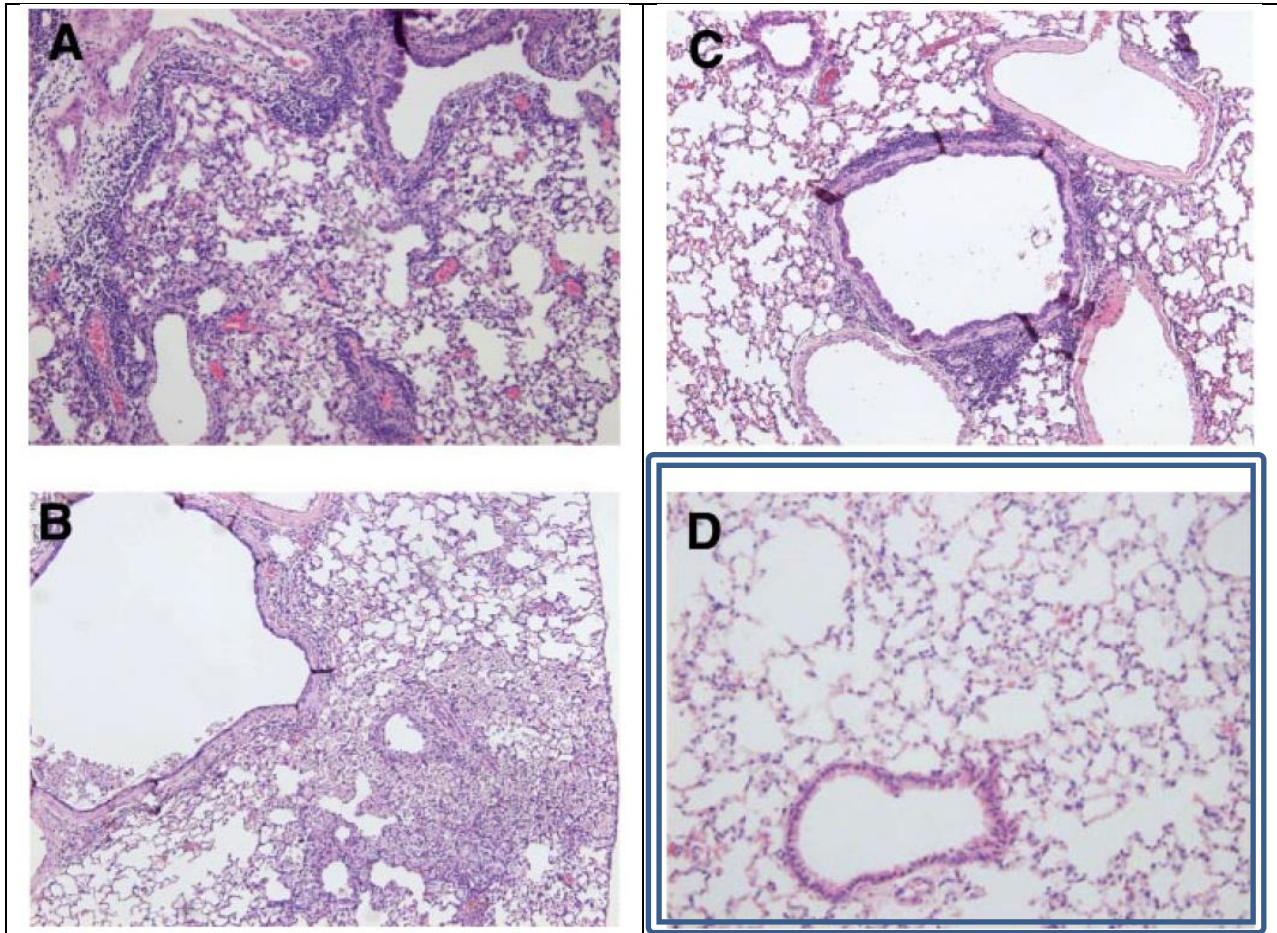


Figure 29 : Lésions du tissu pulmonaire observées selon la souche de souris, après histopathologie (sections équivalentes sur le plan anatomique). Coloration hématoxyline-éosine sur coupe de poumons fixés. Les images présentées ont été choisies car représentatives des sections observées. **A.** Tissu pulmonaire de souris BALB/c ; **B.** Tissu pulmonaire de souris DBA/2 ; **C.** Tissu pulmonaire de souris 129/Sv et **D.** Tissu pulmonaire de souris saine, non-infectée : (Image d'archive ajoutée au titre de référence visuelle ne présentant pas de lésions observables) souris 129/Sv ne figurant pas parmi les souris utilisées au cours de l'expérience. Elles sont d'âge et de gabarit comparables et ne présentent pas de lésions décelables à l'examen histopathologique. Les poumons ont été prélevés à 7 jours post-infection. Une description histologique détaillée est faite dans la rubrique 1.6.2. « Données histopathologiques ».

1.6. ETUDE 2 (PARTIE 1) : DISCUSSION

1.6.1. DONNEES FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES

Les différentes souches présentent globalement, un bon volume minute grâce à une bonne hyperventilation compensatoire provenant d'une respiration plus rapide (Fréquence Respiratoire augmentée) et superficielle (TV diminué). Ainsi, 129/Sv et BALB/c voient leur volume minute stable tout au long des sept jours d'expérimentation quand DBA/2 et C57BL/6J présentent une augmentation aux jours 4 et 6.

C3H et SJL voient leur volume minute augmenter durant toute l'expérience. Suite à cette respiration rapide et superficielle, la compartimentation entre inspiration et expiration est modifiée et varie d'une souche à l'autre. Ainsi l'inspiration reste stable chez C3H, SJL et BALB/c quand elle montre une diminution de la durée de l'inspiration et une augmentation compensatoire du pic inspiratoire pour les autres souches.

Au niveau expiratoire, la souche BALB/c maintient des valeurs stables, les autres souches ont présenté une diminution initiale du temps expiratoire (TE) suivie par une récupération quasi totale. La partie finale et active de l'expiration (End Expiratory Peak, EEP) est plus active comme l'atteste la diminution de ces valeurs.

La résistance respiratoire par contre montre des modifications importantes et classe les différentes souches dans les différentes catégories de résistance/sensibilité. La résistance respiratoire atteste ici d'une diminution dans l'efficacité de la fonction respiratoire. Elle constitue un signe observable de la détérioration fonctionnelle apportée par le développement en cours de la maladie. Elle signe donc une sensibilité de la souche de souris à la maladie induite par l'agent pathogène. Avec une augmentation de 175 à 200% en trois jours avant de se stabiliser, 129 Sv, DBA/2 et SJL sont les souches qui se montrent donc les plus sensibles à l'infection virale.

C57/BL6J et C3H voient leur résistance respiratoire augmenter et se stabiliser mais l'augmentation est plus faible (125%). Pour BALB/c, aucun changement détectable n'est enregistré et cette souche constitue donc la souche la plus résistante dans nos résultats.

Enfin, la fonction d'échange gazeux appréciée par la mesure du CO₂-uptake n'a montré une diminution que pour 129/Sv. Les capacités de diffusion sont restées stables dans les autres souches.

1.6.2. DONNEES HISTOPATHOLOGIQUES

L'examen histopathologique a montré que la souche 129/Sv a été la seule à développer une alvéolite diffuse avec pneumonie interstitielle. Cette constatation est cohérente avec l'altération du CO-uptake observée dans cette souche.

D'un point de vue histopathologique, trois profils lésionnels ont été observés. Pour les BALB/c, les voies respiratoires étaient propres avec un épithélium assez bien conservé, à l'exception de la perte de cils et de zones de légères hyperplasies épithéliales. La lamina propria était très légèrement infiltrée par des cellules mononucléées. Les alvéoles ne montraient pas de modifications, avec une lumière vide ; seul l'interstitium montrait de manière multifocale une augmentation de sa densité cellulaire. Le diagnostic histopathologique a été établi et il s'agit d'une légère broncho-bronchiolite subaiguë.

Les autres souches, à l'exception de 129/Sv, ont présenté des profils comparables allant de modéré à sévère. Un exsudat, composé de débris cellulaires (lymphocytes, neutrophiles et macrophages altérés) a été observé dans la lumière des alvéoles et des voies respiratoires. L'épithélium respiratoire a montré de larges zones de perte des cils, de la dégénérescence, de la nécrose, des zones de desquamation et de l'hyperplasie. La lamina propria était infiltrée de cellules lymphoïdes et de monocytes qui donnaient des images de manchons péribronchioliques et périvasculaires.

L'interstitium pulmonaire était infiltré de cellules à noyaux ronds de type monocytes/lymphocytes et des zones d'alvéolites. Le diagnostic le plus compatible avec les lésions observées était celui de broncho-bronchiolite aiguë nécrosante et purulente avec une pneumonie alvéolaire granulomateuse multifocale (SJL, C3H, C57BL/6J et DBA/2).

La souche 129/Sv présentait des lésions plus sévères que dans les autres souches. Les lésions étaient similaires à celles des autres souches à l'exception des lésions plus diffuses et de l'absence d'exsudat dans les alvéoles. Ces dernières étaient remplies d'un grand nombre de macrophages dont certains indiquaient des signes de dégénérescence ; les alvéoles étant parfois complètement remplies de macrophages. L'interstitium pulmonaire était infiltré de manière diffuse par des cellules à noyaux ronds. Le diagnostic a été posé, se révélant être une sévère hyperplasie broncho-bronchiolaire avec pneumonie aiguë interstitielle diffuse.

L'analyse des données histopathologiques a donc fait ressortir une souche présentant moins de lésions au sein des tissus observés, ces lésions étaient également moins étendues indiquant une meilleure résistance à la maladie induite. Ainsi, la souche BALB/c s'est révélée la plus résistante à la maladie

présentée à la suite d'une infection au RM quand les autres souches montraient des lésions plus importantes, indiquant une atteinte plus sévère (souches sensibles SJL, C3H, C57BL/6J, DBA/2 et 129/Sv).

L'apport du CO-uptake et de la pléthysmographie a permis de faire la différence entre 129/Sv et les autres souches sensibles. Si la résistance respiratoire a fortement augmenté chez 129/Sv, elle l'a également été pour DBA/2, les autres souches sensibles ayant également montré une légère augmentation. Cette augmentation provenaient d'une diminution des sections des voies aériennes et donc de l'altération de la trachée ou des bronchioles (126, 273). Seule la valeur de CO-uptake a permis de réaliser une distinction entre les souches testées.

Cette diminution des capacités de diffusion observée chez 129/Sv est à mettre probablement sur le compte de la pneumonie interstitielle avec une barrière alvéolo-capillaire épaissie (369).

L'analyse des données d'histopathologie nous indique que la souche BALB/c a été la moins affectée par les lésions observées, celles-ci se sont avérées moins nombreuses et moins étendues. Au vu de nos résultats, cette souche est à considérer comme la plus résistante de notre expérience. Les autres souches (129/Sv et DBA/2) présentaient des lésions plus importantes avec une hyperpnée compensatoire. L'association des mesure de CO-uptake à la pléthysmographie barométrique en chambre double, a permis dans ce cas spécifique de faire la différence entre 129/Sv et les autres souches en terme de gradient de sensibilité à la maladie expérimentalement induite.

Cette augmentation a probablement été due à une diminution de la section des voies aériennes, cette dernière provenant de l'altération de la trachée ou des bronchioles comme suggéré dans la littérature (126, 245, 273). Seul le CO-uptake est apparu modifié chez 129/Sv, les autres valeurs de CO-uptake étant restées stables comme chez la souche DBA/2 ainsi que chez la souche Balb/c.

La diminution qui a été observée chez 129/Sv serait à mettre sur le compte de la pneumonie interstitielle avec une barrière alvéolo-capillaire épaissie (observée en histopathologie) plutôt que sur un shunt sanguin ou une perturbation du rapport ventilation/perfusion, plus fréquemment décrits (4, 217, 369).

Un dernier point qui nécessiterait d'être investigué davantage, mais qui a été observé au sein du laboratoire est que la mortalité observée chez 129/Sv aurait pu éventuellement être prédite par observation de la chute rapide des valeurs de CO^{up} dans cette souche deux jours consécutif au moins

avant une dégradation importante de l'état de santé de l'animal, entraînant sa mise à mort (cf. 1.3.3 fixation des points limites). Ceci reste donc à confirmer dans l'avenir. Un dernier avantage, est que cette combinaison de deux outils utilise des méthodes non-invasives pour les souris à examiner.

En conclusion, la pléthysmographie a permis i) de mettre en évidence des patrons respiratoires corrélés aux altérations morphologiques (lésions sous-jacentes) et ii) de discriminer rapidement les souches de souris en fonction de la résistance qu'elles opposent à la maladie induite par une infection à RM. L'association du CO-uptake à la pléthysmographie a permis en outre de discriminer les maladies affectant plutôt les structures respiratoires superficielles (voies respiratoires) de celles qui concernent les structures respiratoires profondes (voies respiratoires terminales et alvéoles).

La combinaison des deux techniques CO-uptake/pléthysmographie a donc permis une discrimination entre individus résistants et sensibles à la maladie expérimentalement induite, par une méthode rapide, facile et non-invasive.

II. MODÈLE À VIRUS INFLUENZA A H5N2 EN COURS DE MURINISATION

2.1. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 2 (PARTIE 2)

Durant le processus d'adaptation de la souris au virus Influenza A (H5N2) d'origine aviaire (ou murinisation), nous avons pu observer que la maladie présentée par la souris différait selon le nombre de passages réalisés (48, 120). Aussi, l'évolution de la maladie pouvait-elle être mise en relation avec la virulence croissante des différentes souches virales. Dans l'hypothèse où cette virulence allait de pair avec une colonisation de zones plus profondes sur le plan anatomique des voies respiratoires, il nous a semblé intéressant de vérifier dans quelle mesure la combinaison d'outils tels que la mesure du CO-uptake et la pléthysmographie serait capable de permettre la discrimination entre une affection des structures respiratoires superficielles, telle que suspectée en début du processus de murinisation et une atteinte des structures profondes, telle qu'attendue en fin de processus de murinisation (71, 210, 324).

Concrètement nous avons tenté de répondre à la question suivante :

Q4 — La mesure du CO-uptake est-elle discriminante dans le cas d'une affection évolutive, c'est-à-dire affectant progressivement différents segments du tractus respiratoire ?

2.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.2.1. PASSAGES MONITORES DANS L'ADAPTATION DU VIRUS H5N2 A LA SOURIS

Dans la perspective d'assurer l'adaptation du virus Influenza A H5N2 (A/chicken/Belgium/150/99), nous avons procédé à 14 passages intrapulmonaires sur 14 groupes de cinq souris (passage *in vivo* 1 à 14). Nous avons procédé à l'infection de cinq souris appartenant à la même souche murine et nous avons changé de souche murine cible lorsqu'une perte de poids significative était observée à jour 5 post-infection. Le choix des souches ainsi que de l'ordre de leurs utilisations successives ont été motivés par les connaissances acquises au sein du laboratoire sur leurs sensibilités respectives au virus Influenza (102, 120). Au cours des passages *in vivo* 2, 7 et 11 nous avons procédé à des mesures de pléthysmographie et des mesures de CO-uptake en début d'infection (mesures à jour 0) et au jour 5 post-infection pour chaque souris. Le jour 5 post-infection était également le jour planifié pour le prélèvement des poumons des souris. Les poumons après broyage ont servi à la préparation de l'inoculum pour le passage *in vivo* suivant.

Ces passages *in vivo* 2, 7 et 11, bénéficiant d'une surveillance particulière via les mesures réalisées, ont été désignés dans ce travail sous le nom de « **passages monitorés** ».

2.2.2. HEBERGEMENT DES SOURIS

Les animaux ont été hébergés dans un local spécialement adapté à cet effet et répondant aux normes fixées par le Comité d'Ethique Animale (Dossier 1411-ULG). Le dispositif de cages jetables était muni de filtres. L'agencement des animaux avec un maximum de cinq souris par cage était conforme aux normes.

Un transport unique et unidirectionnel entre deux espaces délimités dans l'animalerie a été défini afin d'éviter les contaminations. L'environnement des cages était enrichi selon les modalités réglementaires.

2.2.3. PROCEDURE D'INOCULATION

Les procédures réalisées ont été menées dans les conditions de biosécurité de niveau 2, l'administration de l'inoculum a été réalisée par instillation intranasale de 50 µl de surnageant issu de broyats de poumons de souris infectées du passage précédent, répartis dans chaque narine. L'opération a été réalisée sous anesthésie générale gazeuse de courte durée. L'anesthésie a été réalisée par inhalation d'isoflurane selon la demande (bolus).

2.2.4. PREPARATION DE L'INOCULUM ET CALCUL DU TITRE VIRAL

A la fin des passages monitorés déterminés, les cinq souris du passage ont été euthanasiées et leurs poumons prélevés et homogénéisés dans 5ml de PBS (1ml/poumon, valeur arbitrairement choisie). Après une centrifugation de 15 minutes à 3500g, le surnageant a été recueilli dans des cryotubes et conservé à -80°C. La titration virale a été réalisée au moyen d'un kit de détection d'antigène *Influenza A ID Screen® Influenza A Antigen capture* (ID-Vet, Montpellier), suivant le protocole fourni par le fabricant. A l'aide de ce kit, un étalonnage a pu être réalisé en comparaison avec un autre virus Influenza H1N1 murinisé (d'origine porcine) faisant partie de la collection du service de pathologie, préalablement titré sur œufs embryonnés et sur cellules MDCK (120). Les valeurs ainsi obtenues sont donc à considérer comme des équivalents d'Unité Formant Plages (équivalents PFU). Pour simplifier les appellations, nous parlerons de PFU.

2.2.5. EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES

Au cours de notre étude, plusieurs critères distincts ont été mesurés et analysés. Les caractéristiques des paramètres relevés et suivis sont décrites ci-après.

Suivi quotidien du poids vif

En plus de l'évaluation fonctionnelle respiratoire, toutes les souris ont été régulièrement pesées et le poids quotidien de chaque souris a été rapporté. Nous avons précédemment précisé l'importance du suivi de ce paramètre.

Suivi du patron respiratoire

Appréciation visuelle

Au cours de l'expérience, une attention particulière a été portée sur la respiration des souris. Une appréciation visuelle et objectivée a été faite de la fréquence respiratoire : rapide (soit >200 BPM) ou lente (< 100 BPM) ; du type de respiration : respiration thoracique ou respiration costo-abdominale et sur la présence de bruits respiratoires audibles. L'observation de tels signes au cours de l'expérience a été considérée comme indicatrice d'un développement sous-jacent de la maladie.

Mesure du CO-uptake (CO^{up})

Dans le processus de murinisation du virus Influenza A H5N2, plusieurs passages *in vivo* sont requis et au cours de trois passages choisis, des mesures complémentaires ont été réalisées avec le *CO uptake monitor*® combiné au pléthysmographe.

Mesures par pléthysmographie

Notre approche a donc visé une évaluation qualitative et quantitative des paramètres de pléthysmographie et du patron respiratoire observé chez la souris infectée de manière expérimentale par des souches du virus influenza A(H5N2) à des stades différents dans le processus de murinisation.

Au cours de ce travail, l'intérêt ne se situe donc pas dans la comparaison d'une souche avec une autre, mais bien au sein de la même souche (129/Sv ; BALB/c ou C57BL/6J) afin de comparer les mesures effectuées à J0 avec les mesures à J5, ces stades étant supposés correspondre à un virus en cours de murinisation et donc différent sur le plan des lésions ainsi que des altérations fonctionnelles provoquées.

2.2.6. SUIVI DU COMPORTEMENT EXPLORATOIRE

Un premier suivi a été effectué dès le réveil post-anesthésique des individus après inoculation. Par la suite les animaux ont été examinés visuellement à l'occasion de la pesée quotidienne. L'agilité et les mouvements effectués par les souris ont été individuellement évalués.

2.2.7. EVALUATION MORPHOLOGIQUE

Autopsie

Lors de l'euthanasie, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane, s'en est suivi un surdosage au pentobarbital. Enfin, une dislocation vertébro-cervicale a été réalisée afin de confirmer la mort. Le sang a été prélevé par section de l'artère brachiale, il a été centrifugé (3500g, 15 min) et le sérum a été conservé à -80°C.

Durant l'autopsie, on a procédé au prélèvement du bloc cardio-pulmonaire. Les poumons ont été précisément pesés. Pour chaque animal, l'autopsie a été réalisée pour déceler toute lésion pulmonaire en relation avec l'infection virale.

2.3. STATISTIQUES

Afin d'évaluer l'influence de chaque paramètre dans nos mesures: poids vif, paramètre lié à la mesure de la capacité d'extraction du monoxyde de carbone (CO^{up} , sCO^{up} , sCO^{Met}) et les paramètres de pléthysmographie (Ti, Te, PIF, PEF, TV, RT EIP, EEP, Pau, Penh, sRaw, FR et Mv), une comparaison a été réalisée pour chaque paramètre et pour le même passage viral (P2, P7, P11) entre les valeurs à JOPI et les valeurs à J5PI correspondantes. Un test de Student (test de t) a donc été systématiquement réalisé. Une ANOVA 2 a été réalisée afin d'évaluer l'influence de la souche considérée (129/Sv; Balb/c; C57Bl/6J).

2.4. RÉSULTATS

Réponse à la question Q 4 ci-après

Les mesures réalisées au cours d'un passage monitoré étaient les suivantes :

✓ Une mesure de pléthysmographie en chambre double. Les données ainsi collectées ont permis d'établir les paramètres de base (les temps inspiratoire et expiratoire, les pics inspiratoire et expiratoire, les volumes courant, minute et expiratoire, la fréquence respiratoire et l'indice de résistance respiratoire ou sRaw).

- ✓ Une mesure du CO-uptake. Par calcul nous en avons déduit le prélèvement spécifique de monoxyde de carbone par unité de poids vif et son équivalent calculé à partir du poids métabolique (poids^{0.75}).
- ✓ Le poids vif initial de chaque souris. La détermination à terme de la perte de poids durant la période d'incubation a été indicatrice de la sévérité de l'infection en cours.

Ces caractéristiques réunies pour le jour d'infection des souris ont constitué la valeur à jour 0, soit le jour de l'inoculation virale correspondant au passage *in vivo* choisi (P2, P7 ou P11). Les mêmes caractéristiques ont été réunies pour le jour 5 post-infection correspondant au jour de sacrifice et de prélèvement des poumons en vue de la préparation de l'inoculum viral destiné au passage suivant.

Les résultats pour les trois passages monitorés ont été regroupés dans le tableau 27 ci-après :

Tableau 27 : Valeurs moyennes des mesures au cours des passages monitorés avec le virus H5N2 en cours de murinisation

SOUCHE SOURIS PASSAGE VIRAL TITRE VIRAL JOUR	129/Sv		BALB/c		C57Bl/6J	
	Passage monitoré P2		Passage monitoré P7		Passage monitoré P11	
	2.1x10 ⁵ PFU/ml		2.6x10 ⁵ PFU/ml		1.5x10 ⁵ PFU/ml	
POIDS VIF	Jour 0	Jour 5 PI	Jour 0	Jour 5 PI	Jour 0	Jour 5 PI
CO ^{UP}	31,2±5,9 ^a	39,9b±4,4a	32,6±5,4 ^a	12,7±1,9 ^c	39,7±8,4 ^b	20,8±11,5 ^d
sCO ^{UP}	1,5±0,3 ^a	1,9±0,2 ^b	1,4±0,2 ^a	0,7±0,1 ^c	1,7±0,4 ^a	1,2±0,7 ^d
sCO ^{MET}	3,1±0,6 ^a	4,1±0,4 ^c	3,05±0,5 ^a	1,4±0,2 ^d	3,7±0,8 ^b	2,4±1,3 ^e
Ti	139,9±21,7	84,5±11,1	98,9±39,7	84,1±54,5	109,9±18,9	63,9±24,2
Te	142,6±14,3	101,9±10,9	160,8±41,6	175,7±52,6	145,9±14,9	93,97±43,4
PIF	2,5±0,6	3,7±0,8	2,4±0,8	1,9±0,7	2,96±0,62	3,97±1,2
PEF	2,9±0,6	2,9±0,5	2,4±0,7	1,8±0,4	2,4±0,5	3,1±1,1
TV	0,3±0,04	0,2±0,03	0,2±0,04	0,1±0,03	0,2±0,04	0,2±0,1
RT	84,3±11,1	64,3±9,1	85,4±26,8	84,0±19,9	86,6±9,2	65,9±42,7
EIP	1,7±2,5	1,00±0,05	1,5±1,1	1,4±2,1	1,3±1,9	0,998±0,020
EEP	21,4±5,6	13,5±2,4	24,5±16,8	33,5±10,2	19,7±3,6	10,1±2,8
PAU	0,7±0,2	0,7±0,1	0,9±1,2	0,98±1,9	0,7±0,1	0,5±0,6
PENH	0,8±0,2	0,5±0,3	0,97±1,02	1,3±1,7	0,6±0,2	0,7±0,4
SRAW	1,9±0,6	1,02±0,5	1,4±1,9	2,1±0,3	0,8±0,4	1,4±0,6
FR	210,04±22,2 ^a	306,8±28,7 ^b	217,2±69,8 ^c	206,09±35,97 ^a	236,8±29,7 ^d	389,3±129,8 ^e
MV	52,5±11,7	70,7±10,9	36,3±12,3	27,4±10,3	53,5±12,8	62,0±14,1

Les mesures n'affichant aucune lettre commune (^{a, b, etc.}) sont considérées comme statistiquement différentes au seuil significatif P (P<0,05). CO^{UP} est le prélèvement de CO (en µl/min); sCO^{UP} est le prélèvement spécifique du CO (en µl/min.g de poids vif); sCO^{Met} est le prélèvement de CO par unité de poids métabolique (en µl/min.g de poids métabolique); Ti, le temps d'inspiration (en millisecondes); Te, le Temps d'expiration (en ms); PIF, le Pic du flux inspiratoire (en ml/s); PEF, le Pic du flux expiratoire (en ml/s); TV, le volume courant (en ml); RT, le temps de relaxation (en ms); EIP, la fin de pause inspiratoire (en ms); EEP, la fin de pause expiratoire (en ms); Pau, le temps de pause (en ms); Penh, la enhanced pause (sans unités); sRaw, la résistance spécifique (en cm H2O/sec); FR, la fréquence respiratoire (en respirations/minute ou BPM) et MV, le volume minute (ml/min).

2.5. ETUDE 2 (PARTIE 2) : DISCUSSION

Nous avons constaté au sein du laboratoire que la maladie en développement apparaissait de plus en plus sévère à chaque nouveau passage en souris. L'état général des animaux constaté au jour 5 post-infection, nous a paru plus détérioré selon le niveau de passage viral croissant. Cette constatation s'est vérifiée quelle qu'ait été la souche de souris utilisée. Cette affirmation s'est basée sur l'observation de la fréquence respiratoire (rapide >200 BPM ou lente < 100 BPM); sur le type de respiration (type thoracique ou costo-abdominale) ; sur la présence de bruits respiratoires audibles et enfin sur l'agilité et les mouvements effectués par la souris.

Cette appréciation subjective, corroborée par les pertes de poids observées, s'est avérée plus importante au fil des passages viraux. Ces observations réalisées au cours de la murinisation du virus H5N2 ont également été constatées avec le virus H1N1 d'origine porcine dans un processus similaire de murinisation au sein du laboratoire (120).

Les valeurs de pléthysmographie nous indiquent globalement une évolution quant aux conséquences physiopathologiques de la maladie en cours. On distingue une différence entre le jour 0 de mesure et le jour 5 de mesure pour toutes les souches, soit une comparaison entre souris en début et ensuite en cours de maladie. Si on prend en compte les paramètres importants (102), c'est-à-dire : le volume tidal (TV) ; le volume Minute (MV) ; la résistance spécifique (SRaw), on constate qu'ils sont en adéquation avec l'aggravation des symptômes observés.

Les valeurs issues de la mesure du CO-uptake, ainsi que les valeurs calculées, indiquent une différence nette entre les valeurs recueillies au jour 0 et au jour 5 des mesures et corroborent également ces observations.

Plusieurs recherches ont été publiées sur la différence de sensibilité face à un virus influenza A murinisé : Schughart et al sur un virus H1N1 (A/Puerto Rico/8/34, ou PR8) (5, 335) et Webby et al en utilisant un virus H5N1 hautement pathogène (HK213) réalisé par génie génétique inverse (146). Sur base de tels travaux, nous pouvons formuler l'hypothèse que ce gain de virulence serait possiblement favorisé par les facteurs suivants :

✓ Le type de variant du virus: il a été prouvé que différents variants du virus Influenza A peuvent différer dans le type d'infections qu'ils induisent chez l'hôte et montrer des évolutions différentes

(120, 267, 348). Un sous-type différent donne une maladie différente avec différentes cascades physiopathologiques.

✓ La charge virale: la charge virale est un facteur de première importance (37, 335). Elle sera responsable notamment de la rapidité de la réaction immunitaire et du début plus ou moins sévère de l'apparition des symptômes. Dans notre situation, bien que ce facteur n'ait pas été clairement étudié, nous avons remarqué que pour la même charge virale administrée, la sévérité des lésions était amplifiée, mais aussi que dans les cas des derniers passages, un titre viral plus faible permettait tout de même le développement de la maladie. Ce point mériterait une investigation plus poussée basée notamment sur la DL_{50} pour les variants recueillis à chaque passage.

✓ La différence de poids entre les sujets au moment de l'inoculation : Nous avons travaillé exclusivement avec des femelles âgées de 8 semaines et donc de poids comparables pour cette étude afin de contrer ce biais. Dans la littérature, il a été prouvé que les performances du système immunitaire sont liées à l'âge, au sexe et au poids corporel (44, 260, 331).

✓ La fenêtre d'observation pour l'apparition des symptômes. On retrouve dans la littérature des fenêtres d'observation étalées sur 14 jours, surtout pour le calcul de la DL_{50} (335) ou sur 15 jours (37). Dans notre situation, le choix de la fenêtre de 5 jours avant autopsie n'est pas anodin et a résulté de plusieurs observations réalisées sur des virus Influenza A comparables (48, 120).

En conclusion, en associant les mesures de CO-uptake (CO^{up}) et de pléthysmographie (ici via les valeurs de PenH) nous avons pu faire la distinction pour une même souche donnée entre une souris au jour J0 d'inoculation (soit une souris saine) et une souris à J5 PI (soit une souris malade).

Section expérimentale

Etude 3

ÉVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES NON-INVASIVES

Comparaison de l'efficacité de deux traitements

EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES NON- INVASIVES : COMPARAISON DE L'EFFICACITÉ DE DEUX TRAITEMENTS

I. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 3

Au moment de cette étude l'objectif du laboratoire visait le développement d'outils d'évaluation respiratoire non-invasifs applicables à la souris de laboratoire. Le développement de la pléthysmographie en chambre double et les résultats obtenus en CO-uptake constituaient des préalables récemment obtenus et appréciables.

Ces outils complémentaires, couvraient ensemble dès lors, une large zone d'investigation du tractus respiratoire superficiel et profond. Il semblait logique de s'interroger sur le fait que deux « images », échelonnées dans le temps, obtenues grâce à ces outils pourraient permettre d'évaluer l'évolution d'une affection respiratoire et des lésions qui en découlaient.

De même, il serait alors théoriquement possible d'évaluer selon le même principe, une « guérison » ou une « aggravation » par exemple d'une affection respiratoire expérimentalement induite sur base de la comparaison de ces deux « images ».

En intégrant deux traitements à nos essais et si ces traitements différaient dans leur efficacité il serait dès lors possible d'apprécier à un moment commun les deux maladies développées. Leur comparaison rendrait donc possible, une estimation quant à l'efficacité relative de ces deux traitements choisis. Concrètement, nous avons tenté de répondre à la question suivante :

Q 5 — Les techniques d'investigation fonctionnelles respiratoires non-invasives chez la souris peuvent-elles discriminer des efficacités différentes de traitements dans un modèle d'infection respiratoire par un virus influenza A très virulent ?

Anticipativement à cette question, nous avons dû répondre à plusieurs sous-questions nous permettant de développer les bases nécessaires à une telle comparaison. Les questions techniques auxquelles répondre nous ont paru nombreuses (ex : le type de pathologies virales à envisager ; les moyens techniques de mesures ; etc.). Aussi, afin de restreindre nos choix, nous avons puisé dans les techniques et les aspects déjà maîtrisés au sein du laboratoire afin de formuler un modèle d'infection virale inductible et reproductible ainsi qu'un traitement potentiellement compatible avec la pathologie envisagée. Les questions auxquelles nous avons eu à faire face peuvent donc se détailler comme suit.

Q5.a — Peut-on établir une « paire clinique » : pathologie respiratoire et traitement compatible dans notre modèle ?

Q5.b — Peut-on établir un modèle de pathologie respiratoire profonde répétable chez la souris ?

Q5.c — Peut-on objectiver la sévérité de cette pathologie dans notre modèle à l'aide de paramètres mesurables et indépendants ?

Q5 d — Peut-on démontrer le caractère potentiellement protecteur d'un traitement compatible avec cette pathologie dans notre modèle ?

Q5 e — Peut-on démontrer l'apport des techniques d'investigations fonctionnelles respiratoires non-invasives dans l'évaluation de notre traitement ?

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

La souche de souris CD-1 (CrI:CD1Icr), fournie par Charles Rivers Laboratories, a été retenue pour cette expérience. Le choix de la souche CD-1 pour notre expérience est discuté dans la discussion générale à la rubrique 3.1. « Choix de la souche de souris CD-1 ».

Pour nos mesures, toutes les souris CD-1 étaient des femelles âgées de 8 semaines au début des manipulations (233). Les conditions de l'expérience et les conditions d'hébergement des animaux étaient conformes à l'agrément préalable du Comité d'Éthique Animale (Dossiers N°1411-ULG et N°1604-ULG).

Enfin, 20 souris de souche FVB (FVB/NCrI) fournies par Charles River Laboratories ont été sélectionnées pour leur sensibilité au virus Influenza (102), afin de produire le stock viral, nécessaire à notre étude.

2.1. HÉBERGEMENT DES SOURIS

Les animaux ont été hébergés dans un local spécialement adapté, répondant aux normes fixées par le Comité d'Éthique Animale. Au sein de l'animalerie, les souris ont été placées dès réception en cages jetables filtrées aux dimensions réglementaires.

Un transport unique et unidirectionnel a été organisé entre la zone dite «saine» et la zone dite «infectée» de l'animalerie. Après l'inoculation, les souris sont restées strictement confinées dans la seconde section de l'animalerie. Durant les deux phases, les souris n'ont pas quitté les unités jetables et filtrées de confinement. La durée de séjour totale au sein de l'animalerie n'aura jamais excédé 15 jours dans chaque zone de l'animalerie. Lors des manipulations nécessaires, l'ouverture des unités jetables et filtrées de confinement a été précédée des mesures de protection personnelles adéquates prévues à cet effet et effectuées sous EMS.

L'environnement des cages a été enrichi selon les modalités réglementaires. Les conditions d'éclairage, d'aération et de température ont été monitorées selon les normes compatibles avec le comportement connu des souris.

CD-1



Growth Curve

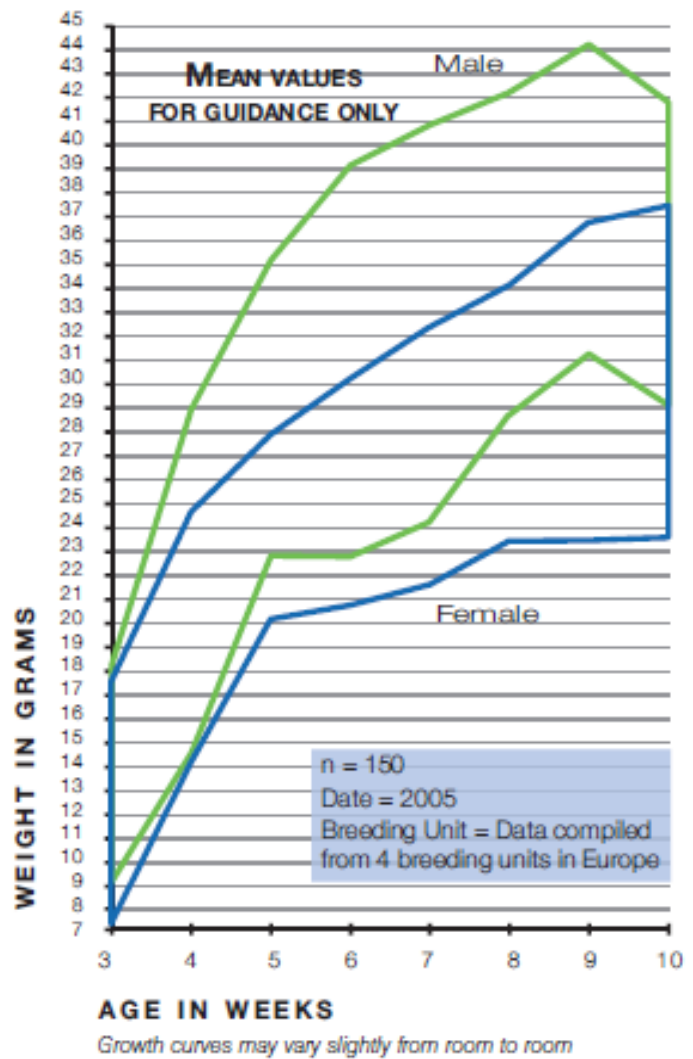


Figure 30 : Souche de souris CD-1 et caractéristiques de croissance. Source Charles Rivers Laboratories®.

2.2. IDENTIFICATION DES SOURIS

Les souris réunies pour notre expérience ont été identifiées à l'aide des deux méthodes décrites ci-après. Une première méthode consistait en la mise en place d'une boucle auriculaire en laiton, placée de manière définitive et munie d'un numéro d'identification unique. La seconde méthode a consisté en l'application à l'aide d'une seringue hypodermique de calibre approprié d'un transpondeur (microchip) en zone sous-cutanée. Il était identifié par un numéro unique.

La procédure d'implantation du transpondeur a fait l'objet pour chaque animal à identifier d'une désinfection locale (éthanol 100%) préalable et d'une implantation systématique dans la même région de l'espace sous cutané supra thoracique, dans l'espace interscapulaire, le tout sous anesthésie générale gazeuse de courte durée (isoflurane en bolus).

Le choix de cette double identification des souris a été fait afin d'assurer ainsi une solution de secours en cas de perte de boucle auriculaire ou de non-fonctionnement du transpondeur (situation rencontrée au cours d'expériences similaires antérieures). Les deux procédures d'identification ont été réalisées au minimum 72 heures avant le début de l'expérience afin d'éviter toute interférence selon la littérature et les recommandations du fabricant (47). Le transpondeur IPTT-300 (Firme BMDS ®) selon les documents du fabricant possède encore la particularité de pouvoir être relevé à distance par le lecteur approprié et de rapporter la température corporelle au moment de la lecture (187). A la lecture des documents du fabricant, la température désignée semblait être la température centrale de l'animal. Nous avons voulu vérifier cette affirmation.

2.3. GENÈSE DE 3 IMMUNOGLOBULINES (IgG) ANTI-HÉMAGGLUTININE (H5)

Réponse à la question Q 5a ci-après

2.3.1 CONCEPTION ET PRODUCTION DE L'ANTIGÈNE RECOMBINANT

L'antigène primordial choisi est supposé contenir tous les segments évolutivement stables constitutifs de la sous-unité HA2 des hémagglutinines de type H5. Ces segments ont été identifiés grâce à l'alignement de centaines de séquences H5 disponibles dans les banques de données internationales. Selon la littérature scientifique, HA2 est en effet i) évolutivement beaucoup plus conservée que la sous-unité HA1 et ii) spécifique à chacune des 18 hémagglutinines (303, 309, 358). Conformément à cette prédiction fondée sur la littérature, plusieurs travaux réalisés au sein du Département de Morphologie et Pathologie ont pu confirmer que l'alignement des séquences de la sous-unité HA2 de plusieurs centaines de H5 révélait bien qu'il existait des segments «universels», partagés par un grand nombre

de souches H5 répertoriées depuis cinquante ans. La figure ci-dessous (Fig. 31) illustre ce phénomène en donnant l'exemple pour une dizaine de souches, la dernière ligne (« Cons », pour consensus) mettant en évidence les segments consensus et donc communs, à vocation universelle.

Les techniques de biologie moléculaire classiques ont ensuite été mobilisées pour amplifier le segment génomique viral en codant la sous-unité HA2 du virus A/chicken/Belgium/150/99 (H5N2). La région Open Reading Frame (ORF) d'intérêt a été clonée dans un plasmide d'expression (pET28a) et la protéine recombinante a été produite en *E. coli*. Après purification, un stock de HA2 recombinantes contenant 500 µg/ml a été produit (299) avec 99% de pureté annoncée par le prestataire de production.

Ces anticorps ayant été produits par une firme spécialisée (SYnabs, Gosselies, Belgique) à l'occasion d'un précédent projet, abandonné par la suite, les autres informations précises concernant cet anticorps ont été perdues.

2.3.2 HYPERIMMUNISATION ET DETECTION DES HYBRIDOMES D'INTERET

Cinq souris ont été hyperimmunisées par quatre injections successives de 100 µL de la solution de protéines recombinantes, à 15 jours d'intervalle, par voie intrapéritonéale. Plusieurs centaines d'hybridomes ont ensuite été produits par la technologie conventionnelle (Fig. 32) et leurs surnageants respectifs ont été testés pour leur faculté à lier un virus du sous-type H5 dans un format de type ELISA (393). Trois hybridomes ont été identifiés comme produisant un anticorps monoclonal capable de lier les virus H5 enchâssés sur le fond des puits (validation *in vitro*). Les mAbs correspondants ont été dénommés BF7, ED8 et MD1(148). Aucun adjuvant n'a été utilisé.

2.4. IMMUNISATION PASSIVE DES SOURIS

Les essais préalablement réalisés au sein du laboratoire sur un autre projet orienté vers le diagnostic clinique ont permis de sélectionner pour nos essais *in vivo*, trois types d'anticorps développés sur souris propices à notre étude, soit trois candidats monoclonaux potentiellement compatibles : mAb MD1 (H5-MD1-ED4-ED3), mAb ED8 (H5-ED8-ED12) et mAb BF7 (H5-BF7 BF2-EF10). Un anticorps monoclonal développé sur souris, reconnu sans conséquences chez celle-ci et non pertinent face à des antigènes issus des virus Influenza A, a également été sélectionné. Il s'agissait d'un anticorps dirigé contre le virus Bovine Herpes virus 4, soit mAb BoHV-4 (76). Tous les anticorps ont été préconditionnés en solutions injectables titrant 1mg/ml. L'administration des anticorps monoclonaux a été réalisée en injection intrapéritonéale aux souris, ceci 24 heures avant l'inoculation virale. Aucun adjuvant n'a été utilisé.

```

1 . . . . . 110
H5N9 glfgaiagfieggwqgmvdgwygyhhsneqgsgyaadkestqkaidgitnkvnssiidkmtqfeavgkefnlerrrienlnkkaedgfldvotynaellvmenertldf
H5N8 glfgamagfieggwqgmvdgwygyhhsneqgsgyaadkestqkaidgitnkvnssiidkmtqfeavgkefnlerrrienlnkiledgfldvotynaellvmenertldf
H5N2 glfgaiagfieggwqgmvdgwygyhhinqgsgyaadkkstqkaidgitnkvnssiidkmtqfeavgkefnlerrrienlnknledgi-dvotynaellvmenertldl
H5N2 glfgaiagfieggwqgmvdgwygyhhsneqgsgyaadkestqkaidgitnkvnssiidkmtqfeavgkefnlerrrienlnkkaedgfldvotynaellvmenertldf
H5N1 glfgaiagfieggwqgmvdgwygyhhsneqgsgyaadkestqkaidgitnkvnssiidkmtqfeavgkefnlerrrienlnkkaedgfldvotynaellvmenertldf
H5N3 glfgaiagfieggwqgmvdgwygyhhsneqgsgyaadkestqkaidgitnkvnssiidkmtqfeavgkefnlerrrienlnkkaedgfldvotynaellvmenertldf
H5N8 glfgaiagfieggwqgmvdgwygyhhsneqgsgyaadkestqkaidgitnkvnssiidkmtqfeavgkefnlerrrienlnkiledgfldvotynaellvmenertldf
H5N2 glfgaiagfieggwqgmvdgwygyhhsneqgsgyaadkestqkaidgitnkvnssiidkmtqfeavgkefnlerrrienlnkkaedgfldvotynaellvmenertldf
H5N2 glfgaiagfieggwqgmvdgwygyhhsneqgsgyaadkestqkaidgitnkvnssiidkmtqfeavgkefnlerrrienlnkkaedgfldvotynaellvmenertldf
H5N2 glfgaiagfieggwqgmvdgwygyhhsneqgsgyaadkestqkaidgitnkvnssiidkmtqfeavgkefnlerrrienlnkkaedgfldvotynaellvmenertldf
H5 glfgaiagfieggwqgmidgwygyhhsneqgsgyaadkestqkaidgitnkvnssiidkmtqfeavgkefnlerrrienlnkkaedgfldvotynaellvmenertldf
Cons GLFGA-AGFIEGGWQGM-DGWYGYHHSNEQSGYAADK-STQKAIDGITNKVNSIIDKMTQFEAVGKEFNLERRIENLNK--EDG--DVUTYNAELLVLMENERTLD-

111 . . . . . 200 . . . . . 232
hdsvknlydkvr_lqlr_dnake_lgngcf-fyhkcdnecmesvrngtydypqyseesrlnreeidgvklesmgtyqilsiystvasslalaimvaglsfwmcsngslqcrici
hdsvknlydkvr_lqlr_dnake_lgngcfefyhkcdnecmeslrngtynypqyseearlnreeisgiklesmgiyqilsiystvasslalaimiaglsfwmcsngslqcrici
hdsvknlydkvr_lqlr_dna-ewngcfefyhkcdnecmesvrngtynypqyseesklkrkeidgikwesmgtyqilsiystvasslalaimvaglsfwmcsngslqcrici
hdsvknlydkvr_lqlr_dnake_lgngcfefyhkcdnecmesvrngtydypqyseearlnreeisgiklesmgtyqilsiystvasslalaimvaglsfwmcsngslqcrici
hdsvknlydkvr_lqlr_dnake_lgngcfefyhkcdnecmesvkngtynypqyseearlnreeisgiklesmgtyqilsiystvasslalaimiaglsfwmcsngslqcrici
heanvkslydkvr_lqlr_dnake_lgngcfefyhkcdnecmesirngtynypqyseearlnreeisgiklesmgiyqilsiystvasslalaimiaglsfwmcsngslqcrici
hdsvknlydkvr_lqlr_dnake_lgngcfefyhkcdnecmesvrngtydypqyseearlnreeisgiklesmgtyqilsiystvasslalaimvaglsfwmcsngslqcrici
hdsvknlydkvr_lqlr_dnake_lgngcfefyhkcdnecmesvrngtydypqyseearlnreeisgiklesmgtyqilsiystvasslalaimvaglsfwmcsngslqcrici
hdsvknlydkvr_lqlr_dnake_lgngcfefyhkcdnecmesvrngtydypqyseearlnreeisgiklesmgtyqilsiystvasslalaimvaglsfwmcsngslqcrici
hdsvknlydkvr_lqlr_dnake_lgngcfefyhkcdnecmesvrngtydypqyseearlnreeisgiklesmgtyqilsiystvasslalaimvaglsfwmcsngslqcrici
hdsvknlydkvr_lqlr_dnake_lgngcfefyhkcdnecmesvrngtydypqyseearlnreeisgiklesmgtyqilsiystvasslalaimvaglsfwmcsngslqcrici
Cons H--NVK-LYDKVRLQL-DNA-ELNGCF-FYHKCDNECMES--NGTY-YP-YSEE--L-R-EI-G-K-ESMG-YQILSIYSTVASSLALAIM-AGLSFWMCSNGSLQCRICI

```

Figure 31: Exemple d’alignements des séquences des fragments HA2 de 10 virus du sous-type H5 sélectionnés aléatoirement dans les banques de données (50 ans de données). En rouge, les acides aminés strictement conservés. Ceci illustre la procédure utilisée dans la détermination de la séquence consensus.

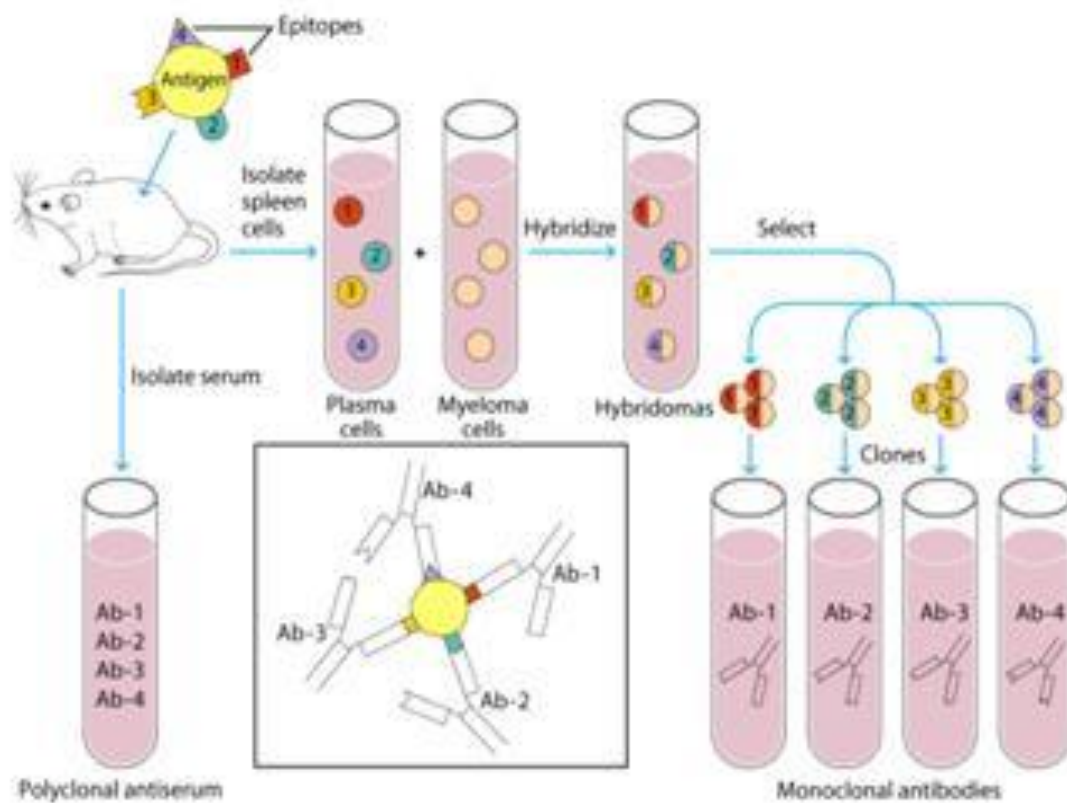


Figure 32: Elaboration et isolement des anticorps monoclonaux au départ des hybridomes d'intérêt. Source : Les anticorps monoclonaux et protéines de fusion thérapeutiques (242).

2.5. VIRUS INFLUENZA A

Un virus Influenza A d'origine aviaire, faiblement pathogène H5N2 (A/chicken/Belgium/150/99) a préalablement été adapté à la souris par inoculations intrapulmonaires successives. Le passage de souris en souris a été poursuivi jusqu'à obtention d'une perte significative du poids des individus mesurés après cinq jours d'infection.

Le choix d'un virus de type H5 est justifié par le choix des mAb réalisés pour cette étude ayant été sélectionnés pour leur spécificité orientée vers la partie HA2 de l'hémagglutinine H5. Un virus présentant une hémagglutinine de type H5 tel que le virus H5N2 murinisé nous a paru être un choix judicieux.

Afin d'adapter la souche virale H5N2 (A/chicken/Belgium/150/99), une souche d'origine aviaire faiblement pathogène a été sélectionnée. Cinq souris ont été infectées par voie intranasale avec 50µl de l'isolat du virus. Le virus a pu se répliquer dans les poumons des souris et celles-ci ont été sacrifiées au jour 5 post-infection, c'est-à-dire au pic théorique (on ne peut savoir *a priori* pour le virus en cours de murinisation) de la réplication virale (297). À ce moment, les poumons des souris ont été disséqués, collectés, broyés et centrifugés afin d'en récolter le surnageant.

Le surnageant, à son tour, a été utilisé pour inoculer de nouvelles souris lors d'un deuxième passage, avec cinq souris. Cette opération a été répétée jusqu'à ce que le virus ait fait un total de quatorze passages. L'infection se révélant de plus en plus sévère pour la souris à chaque nouveau passage, le processus a été poursuivi au sein de la même souche, jusqu'à observation d'une perte significative de poids vif chez les souris infectées mesurées à cinq jours post-infection.

Dans le but d'assurer le développement du processus infectieux, la souris n'étant pas un hôte naturel du virus Influenza, surtout durant les premiers passages, nous avons développé un protocole faisant appel à plusieurs souches de souris connues pour leurs sensibilités décroissantes face à une infection expérimentale par le virus Influenza A (102). Aussi nous avons successivement procédé à cinq passages au sein de la souche 129/Sv, suivis de quatre passages chez la souche BALB/c et enfin, quatre passages chez la souche C57Bl/6J. Il est à noter qu'un passage supplémentaire a été nécessaire afin de disposer d'une quantité suffisante de virus et ainsi d'un stock homogène de travail.

Pour produire le stock viral de travail, vingt souris femelles de 8 semaines de souche FVB/NCrl (connue pour sa sensibilité de type intermédiaire) ont été inoculées par instillation intranasale de 50µl de suspension virale. Les souris infectées ont été observées durant quatre jours post-infection afin de

s'assurer du développement de la maladie. Au jour 5 post-inoculation, les souris ont été euthanasiées et les poumons prélevés. Ces derniers ont été homogénéisés dans 1ml de PBS par poumon. Les homogénats ainsi obtenus ont été regroupés en un lot commun, ensuite centrifugés à 3500g pendant 15 minutes, en aliquotes, par unité de 300µl et immédiatement congelés à -80°C. Ultérieurement, quelques aliquotes ont été prélevés afin de déterminer le titre viral du stock. La technique dite de plaque assay a permis de calculer la valeur titre de $3,25.10^5$ PFU/ml.

2.6. PROCÉDURE D'INOCULATION

Les procédures réalisées ont été menées dans les conditions de biosécurité de niveau L2.

L'administration de l'inoculum a été réalisée par instillation intranasale de 50µl répartis dans chaque narine. L'opération a été réalisée sous anesthésie générale afin d'assurer une inoculation intranasale optimale et le moins de stress possible (97).

L'inoculation intranasale a été effectuée avec la souris en position verticale, à l'aide d'une micropipette. Lorsque le volume de 50µl a été instillé pour moitié dans chaque narine, la souris a été maintenue encore dans cette position durant 30 secondes afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de reflux ou d'écoulements (29, 249).

2.7. CALCUL DE LA DL₅₀

Trente souris CD-1 ont été utilisées pour établir la dose létale 50 (DL₅₀). Les animaux ont été divisés en cinq groupes de cinq souris. Chaque groupe a été inoculé selon la procédure décrite ci-dessus à l'aide de 50µl de dilutions sériées du virus Influenza A H5N2 adapté en souris (H5N2 murinisé) ; dilution 1/320 ; 1/660 ; 1/3260 ; 1/6500 ; 1/32500. Un 6^{ème} groupe n'a reçu que le vecteur sans virus et a constitué le groupe témoin. Le poids corporel et l'état général de chaque souris ont été suivis quotidiennement en tant qu'indicateurs de la maladie. Lorsque la souris a montré une perte de poids proche de 15% de son poids vif initial, considéré comme point limite pour le critère poids, celle-ci a été retirée de l'expérience et euthanasiée. Elle a dès lors été considérée comme n'ayant pas survécu pour cette expérience. C'est sur cette base qu'a été calculé le pourcentage de survie. Les souris ont été suivies quotidiennement pendant 14 jours et la DL₅₀ a été calculée en utilisant la méthode Reed-Muench (288).

2.8. EVALUATIONS DES PARAMÈTRES FONCTIONNELS

Plusieurs mesures ont été réalisées et les résultats ont été analysés. Les méthodes de chaque mesure sont décrites ci-après.

2.8.1. SUIVI QUOTIDIEN DU POIDS VIF

Toutes les souris ont été pesées tous les jours et leur poids individuels ont été rapportés. A l'occasion de cet examen, les souris ayant atteint le point limite convenu selon le critère poids (perte de 15% du poids initial ou plus) ont été écartées de l'expérience (11, 246) et considérées comme « mortes ».

2.8.2. MESURE DE LA TEMPERATURE

Un transpondeur IPTT-300 (transpondeur implantable, Firme BMDS) a été inséré en zone sous-cutanée chez chaque animal suivi. La procédure d'implantation du transpondeur a fait l'objet, pour chaque animal, d'une désinfection préalable, d'une anesthésie gazeuse de courte durée (Bolus d'exposition à un mélange via le mitigeur *ad hoc* de 5% isoflurane et air) permettant ainsi d'implanter ce système dans le même espace sous-cutané, interscapulaire chez toutes les souris.

Conformément aux recommandations du fabricant, un délai de 72 heures a été respecté afin d'assurer un début de cicatrisation à la lésion ainsi qu'à la réaction inflammatoire légère autour de la coque du transpondeur, permettant de ce fait son immobilisation sous-cutanée et une gêne minimale. A l'aide d'un lecteur spécifique, passé à proximité de la souris, il a été possible de lire sur cet appareillage l'identification unique de l'animal suivie de la température mesurée par le dispositif. Le transpondeur a été interrogé quotidiennement à l'aide du lecteur *ad hoc* et la température journalière de chaque souris rapportée.

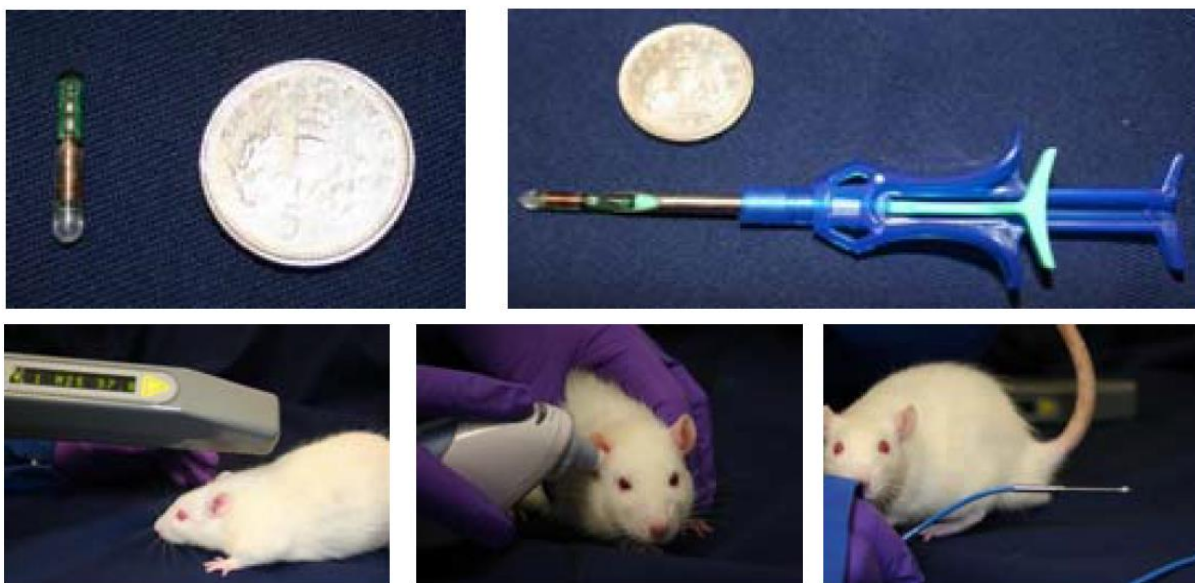


Figure 33: Système de transpondeur IPTT 300, lancette d'injection sous cutanée et lecteur spécifique. Cette illustration fournie par le fabricant montre la procédure sur rat, mais la technique est selon ce dernier également validée sur souris. Source: Publications internes d'Astra Zeneca®.

2.8.3. SUIVI DU PATRON RESPIRATOIRE

Appréciation visuelle

Au cours de l'expérience, une attention particulière a été portée sur la respiration des souris. Une appréciation visuelle basée sur trois critères : la fréquence respiratoire rapide (soit >200 BPM) ou lente (< 100 BPM) ; le type de respiration thoracique ou costo-abdominale et la présence de bruits respiratoires audibles. L'appréciation visuelle n'a pas fait l'objet d'une mesure en soi, son appréciation subjective par l'opérateur nous a simplement permis de nous assurer que les animaux potentiellement infectés poursuivaient normalement le développement de la maladie habituellement observée au sein du laboratoire. La présence de tels signes au cours de l'expérience a été considérée comme indicatrice d'un développement sous-jacent de la maladie.

2.9. SUIVI DU COMPORTEMENT EXPLORATOIRE

Un premier suivi a été effectué dès le réveil post-anesthésique des souris. Par la suite les animaux ont été examinés visuellement à l'occasion de la pesée et de la prise de température quotidienne.

2.10. EVALUATION MORPHOLOGIQUE

2.10.1. AUTOPSIE

Lorsque la décision d'euthanasie a été prise, les souris ont été sacrifiées selon la procédure précédemment décrite. Le sang a été prélevé et le sérum conservé à -80°C. Une autopsie a été réalisée pour chaque animal afin de déceler toute lésion pulmonaire en relation avec l'infection virale.

Selon les besoins de l'expérience, aux pas des temps prévus (jours 4, 5, 6, 7 8, 9 et 10 post-infection), des prélèvements ont été effectués au sein des groupes (cinq souris au maximum par temps de prélèvement et par groupe). Un tel prélèvement systématique et régulier a permis un suivi séquentiel de l'évolution de la maladie expérimentalement induite.

Durant l'autopsie, les poumons ont pu être précisément pesés et le poumon gauche a été immergé dans une solution de PAF. Le poumon droit a été conservé à -80°C, en vue d'un examen virologique ultérieur.

2.10.2. EXAMENS HISTOPATHOLOGIQUES

Les poumons gauches, issus des souris sacrifiées ont été collectés aux pas de temps choisis, insufflés avec 300µl de solution PAF et immergés dans cette même solution pour fixation. Les poumons ont été prélevés autant dans le groupe test (souris immunisées, AcMix) que dans le groupe contrôle.

Après fixation et inclusion à la paraffine pour l'évaluation histopathologique, des coupes sériées ont été réalisées et traitées avec une coloration à l'hématoxyline-éosine (HE). Ces lames histologiques ont été évaluées à l'aide d'un système de score.

Une immunohistochimie (IHC) a été réalisée sur des lames histopathologiques comparables car issues des mêmes blocs de paraffine. Tout d'abord, les tissus enrobés de paraffine ont été déparaffinés et placés dans de l'eau distillée. Les sites de liaisons aspécifiques ont été bloqués avec le Protein Block® (Dako, Danemark). Un antisérum polyclonal de lapin développé en interne contre la nucléoprotéine recombinante (NP) du virus Influenza A (H1N1) a été utilisé comme anticorps primaire. Cet anticorps a été purifié en utilisant le kit Melon Gel IgG Spin Purification® (Pierce, Rockford, Illinois) suivant les recommandations du fabricant. Un anticorps réalisé sur chèvre, anti-IgGs de lapin (Alexia 488, Thermo Fisher Scientific) conjugué à un fluorochrome a été utilisé pour révéler les anticorps primaires liés (120). Du fait de la possibilité de réaliser des coupes sériées (anatomiquement identiques) pour chaque coupe à analyser, une coupe similaire a été faite, ceci sans l'usage de l'anticorps (anti-NP), constituant ainsi une sorte de contrôle négatif pour l'analyse. Cette coupe contrôle a permis de discriminer les observations douteuses liées à des artéfacts dans la lame IHC.

2.11. TECHNIQUES VIROLOGIQUES

Soixante souris provenant des deux groupes de souris (immunisées et contrôles) ont été impliquées dans l'expérience principale. Aux jours 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 post-infection, un maximum de cinq souris dans chaque groupe ont été euthanasiées et leurs poumons droits prélevés et homogénéisés dans 1 ml de PBS. Après une centrifugation de 15 minutes à 3500 g, le surnageant a été recueilli dans des cryotubes et congelé à -80 ° C. La quantification virale a été réalisée au moyen d'un kit de détection d'antigène *Influenza A ID Screen® Influenza A Antigen capture* (ID-Vet, Montpellier), suivant le protocole fourni par le fabricant. A l'aide de ce kit, un étalonnage a pu être réalisé en comparaison avec un autre virus Influenza H1N1 murinisé (origine porcine) faisant partie de la collection du service de pathologie. Une mise en comparaison des deux échelles a permis d'établir un équivalent comparable au titre viral. Les résultats ont été rapportés en unités « picogrammes par gramme de poumon ».

La séroconversion spécifique liée au contact avec le virus Influenza A été testée sur base du sérum collecté sur les souris survivantes à J10 post-infection (n=3). Le taux d'anticorps a été évalué à l'aide du kit de détection d'anticorps *Influenza A ID Screen® Influenza A Antibody competition* (ID-Vet, Montpellier). Suivant le protocole fourni par le fabricant, les valeurs inférieures à 50% ont été considérées comme positives et présentent donc un taux significatif d'anticorps spécifiques.

2.12. QUANTIFICATION DES CYTOKINES PULMONAIRES

Les cytokines ont été mesurées à partir des homogénats de poumons prélevés sur les souris infectées et les souris témoins. La préparation des échantillons a été réalisée grâce au kit Bio-Plex Mouse Cytokine 11-Plex (Bio-Rad Laboratories®). Cinquante microlitres d'homogénat ont été prélevés pour chaque échantillon et l'analyse réalisée grâce à la cytométrie en flux du Luminex (Bio-rad Luminex 100®).

Le principe de fonctionnement du Bio-Plex Mouse Cytokine 11 est similaire à la technique du « sandwich » ELISA. Un anticorps de capture dirigé contre la cytokine d'intérêt est hybridé de manière covalente sur des microbilles. Ce système permet la détection et la quantification de plusieurs marqueurs simultanément (11 cytokines dans le cas de notre expérience).

Ce couple billes-anticorps réagit avec le biomarqueur d'intérêt présent dans l'échantillon. Après une série de lavages destinés à retirer les protéines non-liées, un anticorps de détection à base de biotine est ajouté au « complexe sandwich ».

Les échantillons ont été préparés sur plaque 96 puits prévus par le kit et la détection ainsi que la quantification ont été faites à l'aide d'un cymomètre de flux (Bio-rad Luminex 100) après l'ajout du complexe streptavidine-phycoérythrine qui a servi de révélateur.

Les cytokines ciblées dans notre étude, sont les cytokines impliquées dans l'inflammation du poumon, c'est-à-dire : KC, IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, MCP1, MIP1a, MIP2, TNF α . Ce kit est adapté à l'utilisation sur homogénats de poumons issus de souris (131, 208).

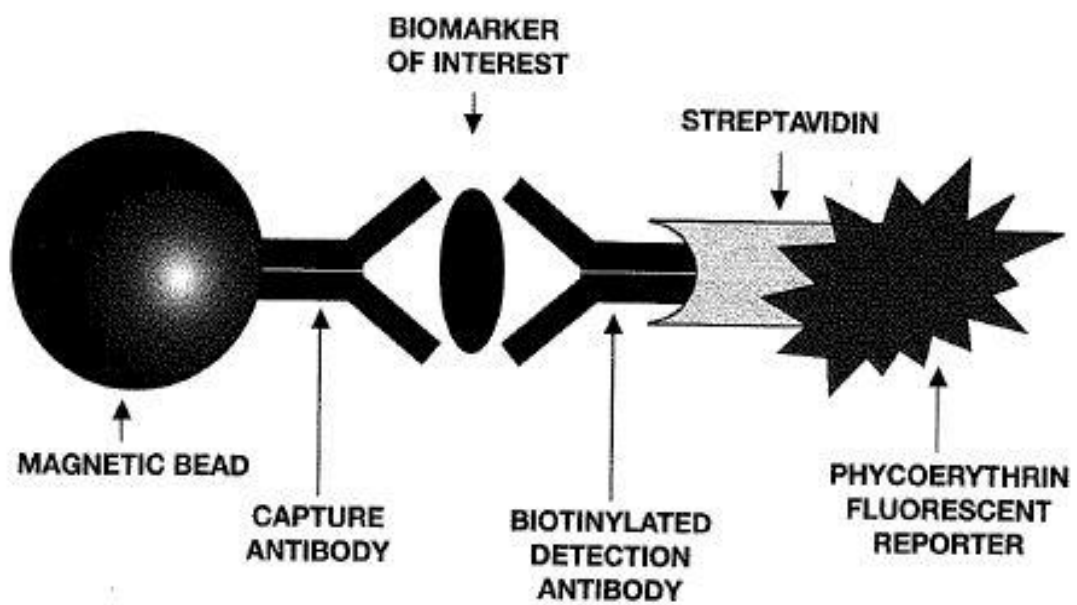


Figure 34 : Principe de marquage « sandwich » de la cytokine d'intérêt dans le kit Bio-Rad. Source : archives Bio-Rad®.

III. STATISTIQUES

Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée via les paramètres d'analyses : température corporelle, poids corporel, lésions pulmonaires, les taux de chaque cytokine pulmonaire et charge virale pulmonaire.

Au sein de chaque critère, une comparaison de données pairées (type t de Student) a été faite en prenant la mesure réalisée pour chaque souris et en la comparant à la valeur témoin correspondante. La méthode statistique choisie pour comparer la valeur des poids et des températures à un moment précis après l'inoculation a consisté en un test t pour données non pairées.

La méthode statistique choisie pour comparer les intervalles de temps écoulés entre inoculation et franchissement d'un ou de plusieurs des points limites tels que définis, a consisté en une analyse dite de Kaplan-Meier.

IV. RÉSULTATS

4.1. CALCUL DE LA DL₅₀

Afin de pouvoir procéder à des inoculations contrôlées des souris de l'expérience, une donnée préalable était nécessaire, nous avons donc procédé au calcul de la DL₅₀ pour le virus H5N2 murinisé au sein de la souche de souris CD-1 (Tab. 28).

Tableau 28 : Courbe dose-réponse des souris CD-1 (H5N2 murinisé).

DILUTION INOCULUM	N= 30	Morts	Survivants	Mortalité (%)
1/320	n=5	4	1	80
1/660	n=5	4	1	80
1/3260	n=5	5	0	100
1/6500	n=5	4	1	80
1/32500	n=5	1	4	20
CONTRÔLE	n=5	0	5	0

Courbe dose-réponse des souris CD-1 soumises à des dilutions sériées de l'inoculum H5N2 murinisé. Le critère survie évalué sur base du dépassement des points limites est mesuré après un délai de 14 jours post-infection. Se basant sur le procédé de calcul de Reed et Munch (288).

La valeur de DL₅₀ calculée sur base du titre initial de l'inoculum avant dilution, correspond à 9,28 plages formant lyse (PFU) par souris.

4.2. EXPÉRIENCES D'ORIENTATION

Réponse à la question Q 5b ci-après

4.2.1. EXPERIENCE D'ORIENTATION 1

Matériel

Des souris de la souche CD-1 ont été choisies et obtenues auprès de Charles Rivers Laboratories. Dans notre étude, toutes les souris CD-1 étaient toutes des femelles sélectionnées pour atteindre l'âge de 8 semaines au début de l'expérience.

Vingt-quatre souris sélectionnées pour cette étude ont été identifiées à l'aide de boucles auriculaires. La procédure d'identification a été réalisée 72 heures avant le début de l'expérience.

Les animaux ont été logés dans une installation adaptée et placées avec un maximum de quatre souris par cage.

L'inoculation a été réalisée à l'aide de 50µl du virus Influenza A d'origine aviaire (H5N2) murinisé à raison de 10 fois l'équivalent de la DL₅₀ (soit 9,28 PFU/souris).

Pour cette étude les anticorps monoclonaux mAb MD1; mAb BF7 et mAb ED8 ont été sélectionnés. A raison de 400 µg de mAb par souris, ils ont été administrés par voie intrapéritonéale (IP) à chaque souris. Cette administration a été réalisée 24 heures avant le challenge viral. Le groupe contrôle (n = 6) a reçu une injection intrapéritonéale de 400 µg d'anticorps dirigés contre le Bovine Herpès Virus-4 (mAb BoHV-4).

Méthodes

Une fenêtre d'observation d'une durée de 14 jours a été appliquée pour nos mesures. Durant cette période, toutes les souris ont été pesées tous les jours. Lors de cet examen quotidien, les souris ayant atteint un ou plusieurs des points limites tels que précédemment convenus dans le protocole expérimental ont été exclues de l'expérience.

Lors de l'euthanasie, le sérum prélevé a été conservé à -80°C. Pour chaque combinaison mAb/dose/timing. La mortalité a été notée chaque jour, ceci en distinguant les animaux prélevés des souris écartées car ayant atteint au moins un des points limites.

Résultats

TABLE A	J 0	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	J 6	J 7	J 8	J 9	J 10	J 11	J 12	J 13	J 14
N=24	CONTRÔLE														
POIDS	26,1	28,8	26,4	24,2	22,7	22,2	21,3	21,0							
±SD	1,8	1,5	1,3	1,3	1,6	9,1	1,3	9,4							
PLC					1		2	6							
	MD1														
POIDS	26,0	28,7	27,4	25,5	24,0	23,0	22,3	21,7	20,8	21,9	23,0	24,5	26,0	27,5	27,6
±SD	1,0	0,7	0,6	0,7	0,8	0,7	12,2	12,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PLC						3	4	5							
	BF7														
POIDS	26,2	28,4	27,4	25,6	25,2	24,4	23,3	22,1	22,0	21,3	22,7	22,9	23,2	23,4	23,3
±SD	1,3	0,8	1,0	1,5	1,4	1,6	9,6	1,4	12,1	2,6	13,3	3,8	4,8	5,7	6,0
PLC						1		3		4					
	ED8														
POIDS	26,3	28,4	26,7	24,5	23,5	22,7	21,8	20,8	20,2	19,9	18,6	17,7	17,0	16,8	
±SD	0,8	1,4	1,3	1,4	1,7	1,9	9,0	1,6	9,2	10,1	10,8	0,5	12,0	0,0	
PLC						1		2	3	4		5		6	

J est le nombre de jours post-infection ; N le nombre d'animaux de l'expérience : PLC nombre de prélèvements réalisés pour atteinte d'au moins un des points limites et SD représente la déviation standard.

4.2.2. EXPERIENCE D'ORIENTATION 2

Matériel

Dans notre étude, toutes les souris CD-1 étaient toutes des femelles, âgées de 8 semaines au début de l'expérience.

Trente souris ont été identifiées à l'aide de boucles auriculaires. Les animaux ont été logés dans une installation adaptée et placés par groupe de cinq souris par cage.

L'inoculation a été réalisée à l'aide de 50µl du virus Influenza A d'origine aviaire (H5N2) préalablement murinisé à raison de 10 fois l'équivalent de la DL₅₀.

Pour cette étude les anticorps mAb MD1; mAb BF7 et mAb ED8 ont été sélectionnés. A raison de 400 µg de mAb administrés en IP, 24 heures avant le challenge viral.

Méthodes

Une fenêtre d'observation d'une durée de 9 jours a été appliquée pour nos mesures. Durant cette période, toutes les souris ont été pesées tous les jours.

Résultats

TABLE B	J 0	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	J 6	J 7	J 8	J 9
N=30	MD1									
POIDS	29,9	28,4	26,9	25,4	24,1	23,1	22,3	21,4	20,8	20,3
±SD	0,9	0,8	0,8	0,8	1,0	7,4	9,9	10,5	9,3	11,7
PLC					1	3	5	6	8	9
	ED8									
POIDS	31,4	29,7	28,0	26,2	24,7	23,5	22,4	21,8	21,4	
±SD	1,2	1,1	1,0	1,0	1,0	10,9	8,0	10,6	1,0	
PLC					2	3	8		10	
	BF7									
POIDS	30,1	28,7	27,2	25,7	24,2	23,5	22,2	22,0	21,1	21,1
±SD	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	9,9	11,6	12,0	12,2	14,9
PLC					2	5	7	8	9	10

J est le nombre de jours post-infection ; N le nombre d'animaux de l'expérience : PLC nombre de prélèvements réalisés pour atteinte d'au moins un des points limites et SD représente la déviation standard.

4.2.3. EXPERIENCE D'ORIENTATION 3

Matériel

Toutes les souris CD-1 étaient des femelles âgées de 8 semaines au début de l'expérience.

Les 29 souris ont été identifiées à l'aide de boucles auriculaires et d'une microchip IPTT 300 telle que décrite précédemment, le tout, 72 heures avant le début de l'expérience. Les animaux ont été placés par groupe de maximum cinq souris par cage.

L'inoculation a été réalisée à l'aide de 50µl du virus Influenza A d'origine aviaire (H5N2) murinisé à raison de 10 fois l'équivalent de la dose létale. Un traitement préalable de toutes les souris a été réalisé par une administration d'Enrofloxacin (Baytril®) solution buvable à raison de 22mg/Kg/jour durant sept jours (le choix du Baytril est expliqué dans la section 4.2.5 « Discussion des expériences d'orientation »).

Les anticorps mAb MD1; mAb BF7 et mAb ED8 ont été sélectionnés pour cette étude. Ils ont été administrés à raison de 300 µg de mAb en IP. Cette administration a été réalisée 24 heures avant le challenge viral. Le groupe contrôle (n = 10) a reçu une injection intrapéritonéale de 300 µg d'anticorps mAb BoHV-4.

Méthodes

Une fenêtre d'observation d'une durée de 7 jours a été appliquée. Durant cette période, toutes les souris ont été pesées tous les jours. Les souris ayant atteint un ou plusieurs des points limites ont été écartées de l'expérience.

La micro-puce IPTT-300 a été scannée quotidiennement en utilisant le lecteur approprié et la température affichée a été enregistrée.

Résultats

TABLE C	J 0	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	J 6	J 7	
N=29	MD1								
POIDS	26,5	24,4	23,9	24,4	23,9	22,5	22,0	21,5	
±SD	1,3	2,2	2,8	2,2	2,8	2,9	2,8	3,1	
PLC						1	2	3	
T°	38,1	35,4	36,9	35,4	36,6	35,3	33,9	33,6	
±SD	0,5	0,9	1,2	0,9	0,9	13,3	13,9	1,3	
PLC						1	2	3	
	ED8								
POIDS	26,7	24,3	23,4	24,3	23,4	21,7	21,0	20,8	
±SD	1,5	1,6	1,7	1,6	1,7	1,6	1,7	1,8	
PLC							1	4	
T°	37,9	34,8	35,5	34,8	35,5	34,6	32,7	30,9	
±SD	0,7	1,5	0,9	1,5	0,9	0,4	14,7	17,8	
PLC							1	4	
	BF7								
POIDS	26,6	24,3	23,3	24,3	23,3	21,8	21,0	20,4	
±SD	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,6	1,5	1,7	
PLC							1	6	
T°	37,8	33,9	36,4	33,9	36,4	35,0	33,3	31,2	
±SD	0,7	1,0	0,4	1,0	0,4	0,6	12,6	12,8	
PLC							1	6	
	Contrôle								
POIDS	26,8	24,5	24,1	24,5	24,1	22,5	21,8	22,1	
±SD	2,0	1,9	2,6	1,9	2,6	2,6	2,6	2,8	
PLC							1	4	
T°	37,8	35,5	36,3	35,5	36,3	35,1	33,1	31,8	
±SD	0,7	1,0	0,7	1,0	0,7	0,7	13,6	17,4	
PLC							1	4	

J est le nombre de jours post-infection ; N le nombre d'animaux de l'expérience : PLC nombre de prélèvements réalisés pour atteinte d'au moins un des points limites ; SD représente la déviation standard et T° la température quotidienne mesurée. **EXPERIENCE D'ORIENTATION 4**

Matériel

Toutes les souris CD-1 étaient des femelles âgées de 8 semaines au début de l'expérience.

Vingt souris sélectionnées pour cette étude ont été identifiées à l'aide de boucles auriculaires et à l'aide de la micro-puce IPTT 300.

Les animaux ont été placés par groupe de maximum cinq souris par cage. L'inoculation a été réalisée à l'aide de 50µl du virus H5N2 murinisé à raison de 2 fois l'équivalent de la DL₅₀.

Un traitement préalable de toutes les souris a été réalisé par administration d'Enrofloxacin à raison de 22mg/Kg/jour durant sept jours dans l'eau de boisson.

Lors de cette étude les anticorps mAb MD1 et mAb BF7 ont été sélectionnés et administrés à raison de 300 µg de mAb en IP. Un groupe a reçu un mélange (300µg MD1 et 300µg BF7) d'anticorps. Toutes les injections ont été réalisées 24 heures avant le challenge viral. Le groupe contrôle (n = 5) a reçu une injection IP de 300 µg de mAb BoHV-4.

Méthodes

Une fenêtre d'observation d'une durée de 14 jours a été appliquée. Durant cette période, toutes les souris ont été pesées tous les jours.

La micro-puce IPTT-300 a été scannée quotidiennement. Lors de l'euthanasie, le sang a été recueilli, centrifugé (3500 g, 15 min) et le sérum conservé à -80 ° C.

Résultats

TABLE D	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
N=20	CONTRÔLE														
Poids	28,6	28,2	26,8	25,4	22,8	21,8	21,0	20,3	20,4	18,1					
±SD	1,6	1,5	1,2	1,2	1,1	1,4	1,4	1,4	2,5	0,0					
AP															
PLC								3	4	5					
T°	37,2	37,5	35,4	34,6	33,4	33,8	32,0	26,6	26,2						
±SD	0,3	0,2	0,6	0,1	0,7	0,5	0,9	0,6	0,0						
AP															
PLC								3	4	5					
	MD1 + BF7														
Poids	26,9	26,6	26,6	26,4	26,2	26,1	25,1	23,0	24,0	24,9	26,0	26,1	27,1	26,1	23,7
±SD	0,4	0,6	0,4	0,6	1,2	1,4	1,0	0,8	2,1	1,8	1,2	1,2	1,3	1,2	1,0
AP															5
PLC															0
T°	37,3	36,8	37,0	37,0	37,0	37,0	35,8	36,3	37,0	37,0	36,6	37,3	38,0	33,7	35,1
±SD	0,2	0,6	0,5	0,4	0,9	0,7	0,7	0,3	0,5	0,7	1,0	0,5	0,4	0,7	0,5
AP															5
PLC															0
	BF7														
Poids	27,6	27,4	27,2	26,4	24,9	24,3	23,0	21,5	20,5	20,3	20,6	20,6	21,2	21,3	21,6
±SD	0,6	0,8	0,9	1,4	2,3	2,7	2,3	1,8	1,5	1,8	3,8	4,3	5,6	5,5	5,3
AP															3
PLC									1	2					
T°	37,0	37,0	36,6	36,1	35,4	35,6	34,1	33,7	33,6	34,4	33,6	34,9	36,2	35,8	36,0
±SD	0,3	0,6	0,9	1,2	1,7	1,5	1,5	1,8	1,4	1,9	2,2	1,8	1,4	2,1	1,6
AP															3
PLC									1	2					
	MD1														
Poids	28,2	28,3	28,3	27,7	26,6	26,1	25,2	23,2	22,8	22,8	23,9	23,5	25,8	25,9	26,2
±SD	0,7	0,7	0,8	0,9	1,2	1,4	1,1	5,1	1,2	1,8	2,0	1,8	2,0	2,0	2,0
AP															4
PLC													1		
T°	36,7	36,9	36,8	36,6	36,2	36,3	36,3	35,5	35,3	35,5	34,7	35,7	37,7	37,4	37,5
±SD	0,5	0,8	0,4	0,9	1,6	1,3	1,5	0,9	1,4	1,4	1,6	1,8	1,3	0,7	0,6
AP															4
PLC													1		

J est le nombre de jours post-infection ; N le nombre d'animaux de l'expérience ; PLC nombre de prélèvements réalisés pour atteinte d'au moins un des points limites ; SD représente la déviation standard ; T° la température quotidienne mesurée et AP le nombre d'animaux prélevés pour examen histopathologique

4.2.5. EXPERIENCES D'ORIENTATION (TABLES A à D) : CONCLUSIONS

Des campagnes de mesures ont été réalisées dans le cadre de nos expériences d'orientation. L'analyse minutieuse des résultats (tant positifs que négatifs) nous a permis de tirer les enseignements nécessaires pour établir les conditions optimales pour notre expérimentation principale, ceci afin d'assurer la meilleure répétabilité possible de nos mesures. Ces expériences préliminaires ont donc permis d'orienter nos investigations afin de formuler les conditions à réunir permettant à notre expérience principale de s'effectuer dans les conditions optimales.

Nous avons donc retenu les conditions suivantes :

- ✓ La fenêtre de suivi dans le temps des sujets a été limitée à dix jours post-infection maximum.
- ✓ La dose infectieuse équivalente à deux fois la DL_{50} déterminée pour le virus H5N2 au sein de la souche CD-1 a été retenue.
- ✓ Une couverture antibiotique (Enrofloxacin, 22mg/Kg/jour) a été choisie, trois jours avant infection et poursuivie quatre jours post-infection, soit un traitement durant sept jours.
- ✓ Une dose maximale de 400 μ g/souris a été déterminée pour la charge en anticorps monoclonaux.

La fenêtre d'observation pour l'apparition des symptômes est un point crucial précédemment discuté pour l'expérience. On retrouve dans la littérature des fenêtres d'observation étalées sur 14 jours voire 15 jours (37). Il était important pour nous que cette fenêtre ne s'avère ni trop longue et contraignante pour les observations, ni trop courte (ex : Table A) et que celle-ci couvre bien toutes les mortalités observables dans les groupes. Ceci n'a pas été le cas dans toutes nos expériences d'orientation (ex : Tables C, B et D).

Une dose létale équivalente à dix fois la DL_{50} (Tables A, B) nous est apparue un challenge trop contraignant pour les souris et est sans doute à l'origine de mortalités trop rapidement apparues, ne laissant aucune place aux mécanismes que nous souhaitons étudier pour se mettre en place. La dose mortelle correspondant à deux fois la DL_{50} nous a semblé un compromis acceptable (Tables C, D).

L'objectif visé par un prétraitement des souris à l'aide d'Enrofloxacin était de réduire un potentiel risque de pneumonie bactérienne secondaire à l'infection respiratoire virale. Ce risque documenté chez l'homme (8, 191, 215, 374) n'est pas suffisamment étayé chez la souris.

Au sein du laboratoire, la pneumonie bactérienne secondaire à une infection respiratoire virale a fait l'objet de suspicions basées sur les observations cliniques. En effet nous avons observé lors de

précédentes sessions d'infection de souris à l'aide de différents virus Influenza des mortalités inexplicables ou des détériorations de l'état général des souris. Lors de coupes histologiques une surinfection bactérienne a parfois été observée sans qu'elle puisse être considérée comme cause de la mort (ex : mortalité rapides et inexplicables dans les Tables A et B). Des essais de prétraitements avant infection virale ont été testés dans la littérature (41, 328).

Nous étions toutefois soumis à plusieurs contraintes : l'antibiotique à utiliser devait être un antibiotique déjà en usage dans l'espèce souris ; le dosage thérapeutique se devait d'être connu ; le choix de l'antibiotique se portait d'emblée sur un spectre large et son interférence sur l'inoculation à Influenza virus devait s'avérer minime. Pour ce dernier point, dans la mesure où nous avons veillé à travailler avec une charge virale importante (dose équivalente à deux fois la DL_{50}) il nous importait surtout que la maladie développée s'avère mortelle pour au moins une partie des souris inoculées (voir Tables C et D).

Le choix de l'Enrofloxacin (cf. note RCP de Baytril exotics) nous a paru la meilleure option, compte tenu de ces contraintes. De plus, par sa possibilité d'administration orale via l'eau de boisson, ceci nous a permis une distribution aux animaux répartie sur plusieurs jours avant et au début de la période de challenge.

- ✓ L'association de deux anticorps anti-HA a été choisie afin d'assurer l'immunisation passive des souris (groupe AcMix).
- ✓ Un anticorps monoclonal orienté contre le virus BoHV-4 a été utilisé au titre d'anticorps non pertinent pour le groupe de souris contrôles.

Les risques de neutralisations croisées ont été rapidement testés à l'aide d'un petit groupe (non représentatif) de souris lors d'une précédente étude (aussi, on observe de la mortalité dans la table C). A ce titre nous avons simplement vérifié que le challenge viral restait mortel pour une partie de la population de souris (ces résultats ne sont donc pas repris ici).

Nos expériences d'orientation ont permis d'exclure un candidat mAb (Table A, B, C) : mAb ED8 (H5-ED8-ED12) dans un premier temps et d'identifier deux candidats potentiels (Tables B, C, D) ayant chacun une protection partielle contre le virus murinisé H5N2 dans un second temps : mAb MD1 (H5-MD1-ED4-ED3) et mAb BF7 (H5-BF7 BF2-EF10). Nous avons observé que l'association de ces deux anticorps augmentait cette protection. Ces deux anticorps sélectionnés étaient tous deux dirigés contre deux régions différentes de la tige hémagglutinine (HA) H2. Leur action synergique semblait donc plausible.

Le choix a été arbitrairement réalisé de ne pas dépasser 400µg d'anticorps par souris, ceci afin de s'aligner avec les doses administrées et rencontrées dans la littérature (76, 291) et de ne pas stimuler l'apparition de pathologies connues liées à des doses trop importantes (252, 390). Ceci, sans investigation plus importante pourrait être une explication partielle des mortalités observées dans les Tables A et B.

Ces conditions concertées ont été respectées durant notre expérience principale.

Les résultats concernant la cytokine IL-4 obtenus à l'aide du Kit BioRad (l'IL-4 figure parmi les cytokines mesurables à l'aide du kit BioRad) nous ont parus inconstants et peu fiables, nous avons dès lors opté pour la non-sélection de ces derniers parmi les résultats traités dans notre étude.

4.3. EXPÉRIENCE PRINCIPALE

4.3.1. MATERIEL

Dans notre étude, soixante souris de souche CD-1, femelles, ont été sélectionnées pour atteindre l'âge de huit semaines au début de l'expérience. La procédure d'identification a été réalisée 72 heures avant le début de l'expérience.

Les animaux ont été logés dans une installation adaptée et les souris ont été placées par groupe de maximum cinq souris par cage. L'inoculation a été réalisée à l'aide du virus Influenza A H5N2 murinisé à raison de deux fois l'équivalent de la DL₅₀.

Un traitement préalable a été administré à toutes les souris, de trois jours avant infection jusqu'à quatre jours post infection, soit une administration de sept jours d'enrofloxacin (22mg/Kg).

Un mélange d'anticorps (200 µg de mAb MD1 et 200 µg de mAb BF7, soit un total de 400 µg/souris) a été administré par voie IP à chaque souris du groupe immunisé (AcMix) 24 heures avant le challenge viral. Le groupe contrôle a reçu une injection intrapéritonéale de 400 µg d'anticorps mAb BoHV-4.

4.3.2. METHODES

Les observations ont été réalisées dans une fenêtre de dix jours, durant cette période, toutes les souris ont été pesées quotidiennement.

La micro-puce IPTT-300 a été scannée quotidiennement et la température affichée a été enregistrée. Lors des euthanasies, le sérum a été recueilli et conservé à -80° C.

Pour chaque combinaison mAb/dose/timing, cinq souris ont été suivies pendant quatorze jours. La mortalité a été notée chaque jour. Selon les besoins de l'expérience, sur des points temporels choisis, des échantillons ont été prélevés dans tous les groupes. Les animaux prélevés n'ont pas été comptabilisés pour le calcul de la survie.

Lors des autopsies, les souris ont suivi le même protocole afin d'influer au minimum sur la congestion pulmonaire. Les poumons ont été prélevés et disséqués avec soin afin d'isoler les poumons des tissus adjacents (œsophage, cœur, etc.). La pesée des poumons (humides, c'est-à-dire frais juste après autopsie) qui s'en est suivie a permis la comparaison des organes et de structures anatomiques comparables, chez tous les individus examinés.

Après ligature de la bronche principale droite, le poumon gauche a été insufflé avec 300 µl de solution de PAF et immergé dans la même solution en attente de l'examen histologique. Le poumon droit a été détaché des voies respiratoires, immergé dans une solution de PBS (volume identique de 1 ml pour tous les poumons) et conservé à -80°C, en attente de l'analyse virologique.

4.3.3. RESULTATS

Réponse à la question Q 5c ci-après

Tableau 29 : Poids moyens quotidiens et conditions de mesures

J PI	J-0	J-1	J-2	J-3	J-4	J-5	J-6	J-7	J-8	J-9	J-10
N=60						AcMix					
POIDS (g)	31,1 a	31,3 a	30,3 a	28,1 a	27,1 a	26,2 a	24,5 a	24,2 a	24 a	22,4 a	20,9 a
±SD	±2,5	±2,5	±2,4	±2,4	±2,5	±2,3	±2,1	±2,1	±2	±1,1	±1,8
PRÉLEVÉS						5	5	5	5	5	5
RÉSERVÉ AU SUIVI MORTALITÉ	10								8		4
POINTS LIMITES									2		4
						Contrôle					
POIDS (g)	30,3 a	29,6 a	28,7 a	26,8 a	25,9 a	25,1 a	22,9 a	22 b	21,3 b	19,8 b	
±SD	±2,4	±1,9	±1,9	±1,9	±2	±2,4	±1,7	±1,5	±1,5	±0,9	
PRÉLEVÉS						5	5	5	5	10	
RÉSERVÉ AU SUIVI MORTALITÉ	10							8	1	0	
POINTS LIMITES								2	7	10	

PI : Post-infection, désigne le délai après inoculation virale. Prélèvements : cette dénomination regroupe toutes les souris retirées de l'expérience et sacrifiées afin d'effectuer les prélèvements prévus. Points limites : ce terme désigne les souris retirées de l'expérience, euthanasiées au jour donné car celles-ci ont dépassé un ou plusieurs des points limites prévus. NB : Pour l'évaluation du point limite (point limite lié à la perte de 15% du poids vif), chaque souris a été comparée à son poids individuel initial et non à la moyenne du groupe. Les mesures affichant une lettre (a, b, etc.) différente sont considérées comme statistiquement différentes au seuil significatif P ($P < 0,05$). Le traitement statistique et les paramètres considérés sont décrits au point III Statistiques.

Tableau 30 : Températures moyennes quotidiennes et conditions de mesures

J PI	J-0	J-1	J-2	J-3	J-4	J-5	J-6	J-7	J-8	J-9	J-10
N=60	AcMix										
TEMP (°C) ±SD	37,4 a ±0,7	37,4 a ±0,6	37,3 a ±0,5	36,9 a ±0,6	36,8 a ±0,7	36,2 a ±0,9	35 a ±0,8	33,3 a ±1,3	33,6 a ±1,1	32,5 a ±0,7	32,9 a *
PRÉLEVÉS						5	5	5	5	5	5
POINTS LIMITES									2		4
	Contrôle										
TEMP (°C) ±SD	37,5 a ±0,5	37,3 a ±0,6	37 a ±0,6	36,4 a ±0,9	36,2 a ±1,1	34,9 b ±1,3	32,8 b ±2	33,8 b ±0,8 *			
PRÉLEVÉS						5	5	5	5	10	
POINTS LIMITES								2	7	10	

* Valeurs ne tenant pas compte des souris écartées pour avoir atteint le point limite pour le critère température (température sous cutanée mesurée par le dispositif < à 32°C). Les mesures affichant une lettre (a, b, etc.) différente sont considérées comme statistiquement différentes au seuil significatif P (P<0,05). Le traitement statistique et les paramètres considérés sont décrits au point III Statistiques.

Réponse à la question Q 5d ci-après

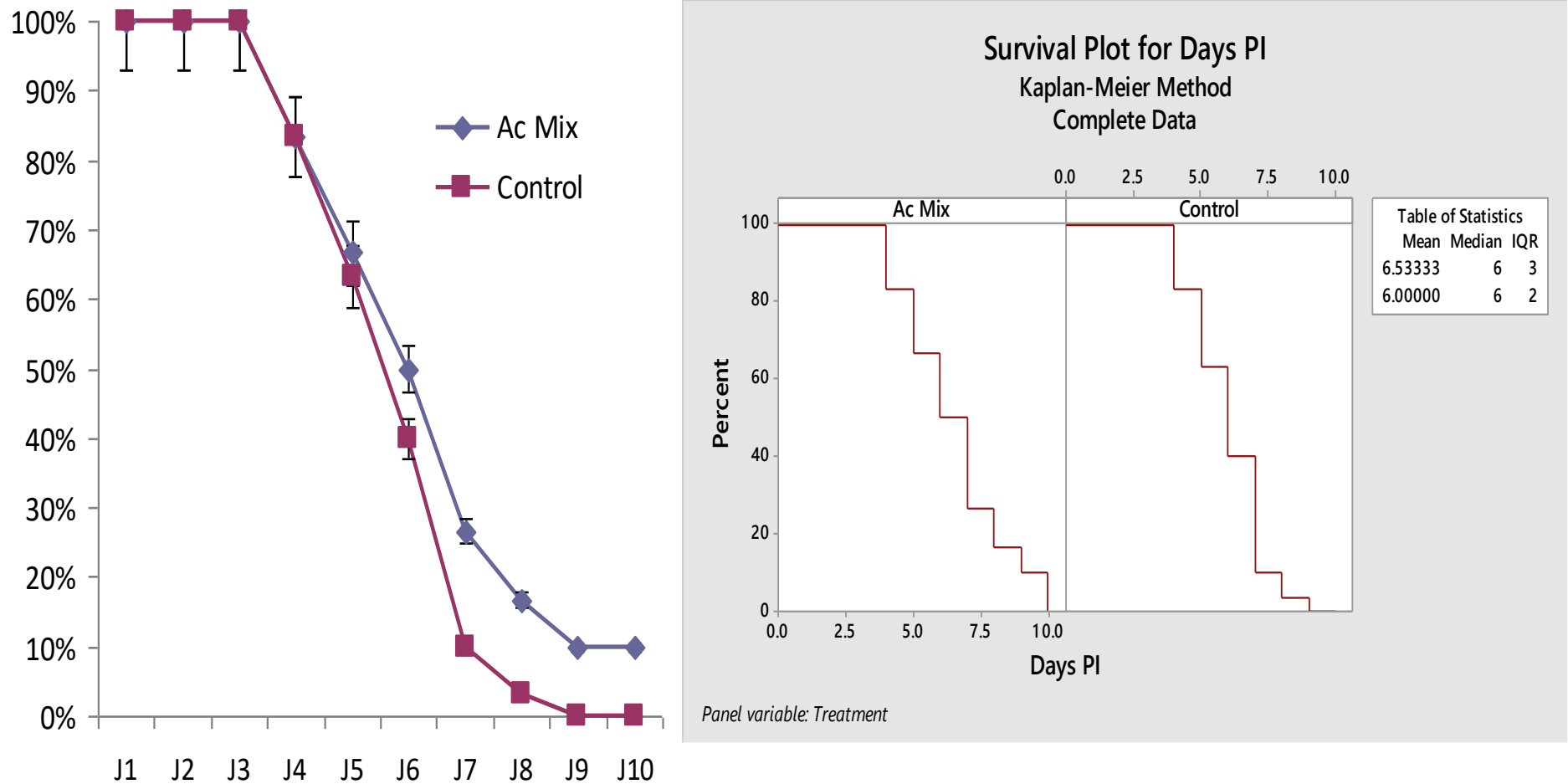


Figure 35 : Analyse de Kaplan et Mayer et courbe de survie des groupes AcMix et souris contrôles. L'évaluation de la survie a été basée sur le principe suivant : sont considérées comme mortes les souris ayant dépassé au moins un des critères désignés comme points limites pour cette expérience. Dans chaque groupe n=30 souris (10 identifiées et réservées au suivi de la mortalité, courbe générée à l'aide de Minitab software). Le traitement statistique et les paramètres considérés sont décrits au point III Statistiques.

Evaluation morphologique

Autopsie

Les poids moyens des poumons prélevés sur les souris ont été mesurés et regroupés dans la (Fig. 36) ci-après :

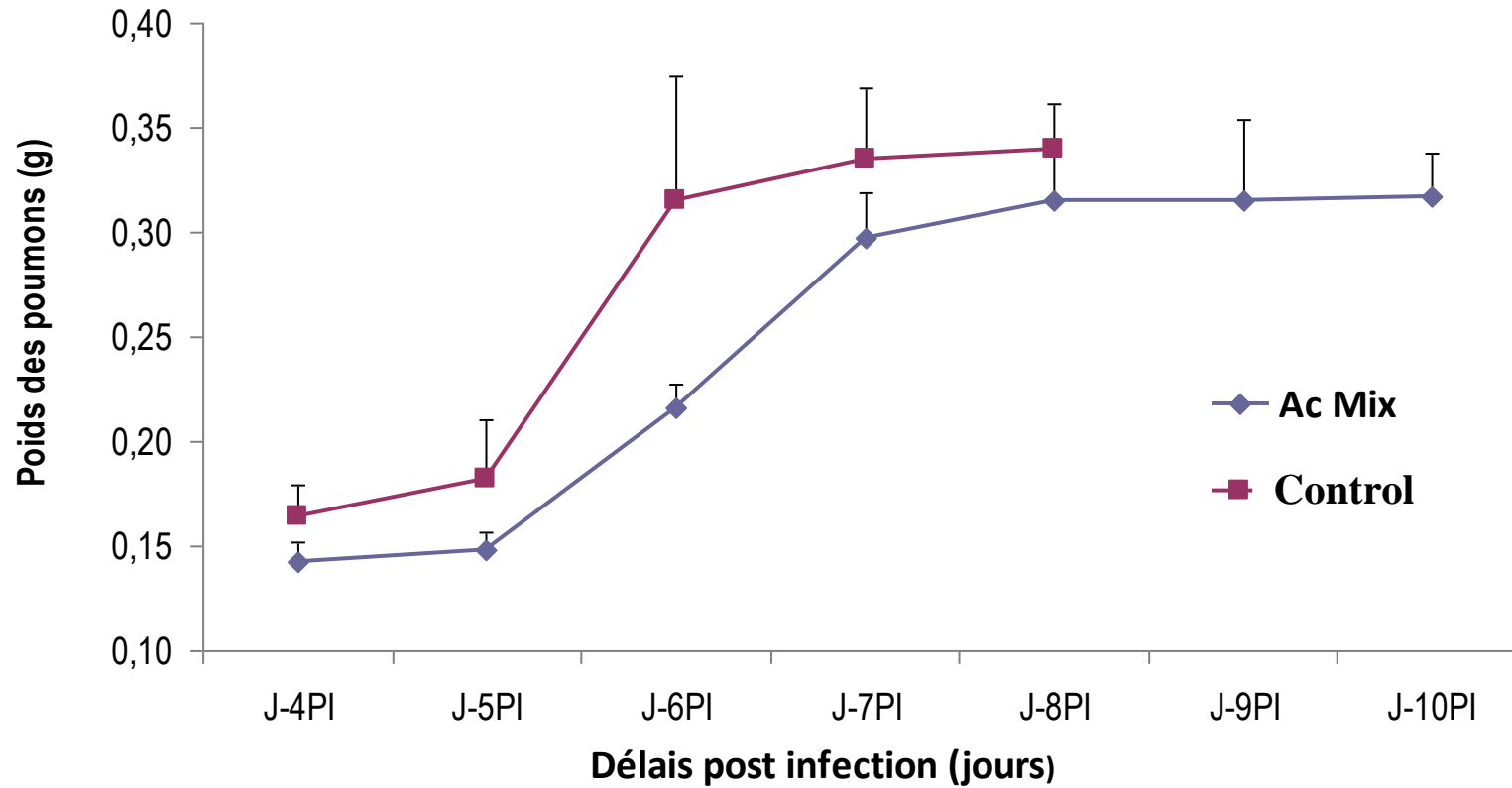


Figure 36 : Evolution des poids moyens des poumons selon le jour de prélèvement. Les barres verticales indiquent la déviation standard

CONTRÔLE

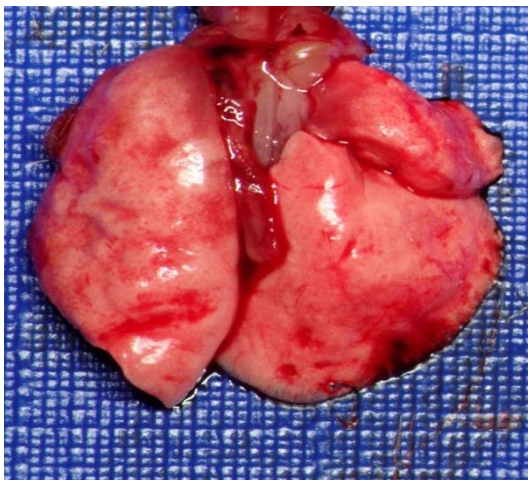
J-4 PI



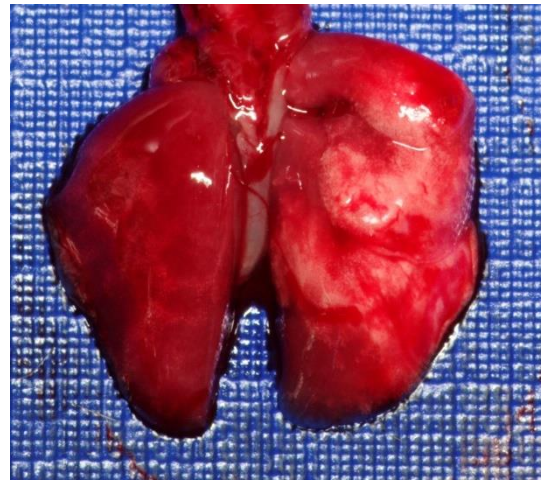
J-8 PI



J-4 PI



J-10 PI



ACMIX

Figure 37 : Aspects représentatifs des poumons prélevés. Les conditions expérimentales (niveau de biosécurité BSL2) n'ont pas permis de disposer du matériel de prises de vues de manière permanente durant toute la durée de l'expérience (suivi durant 10 jours PI). Aussi, seules les étapes marquantes ont été illustrées ici.

Histopathologie

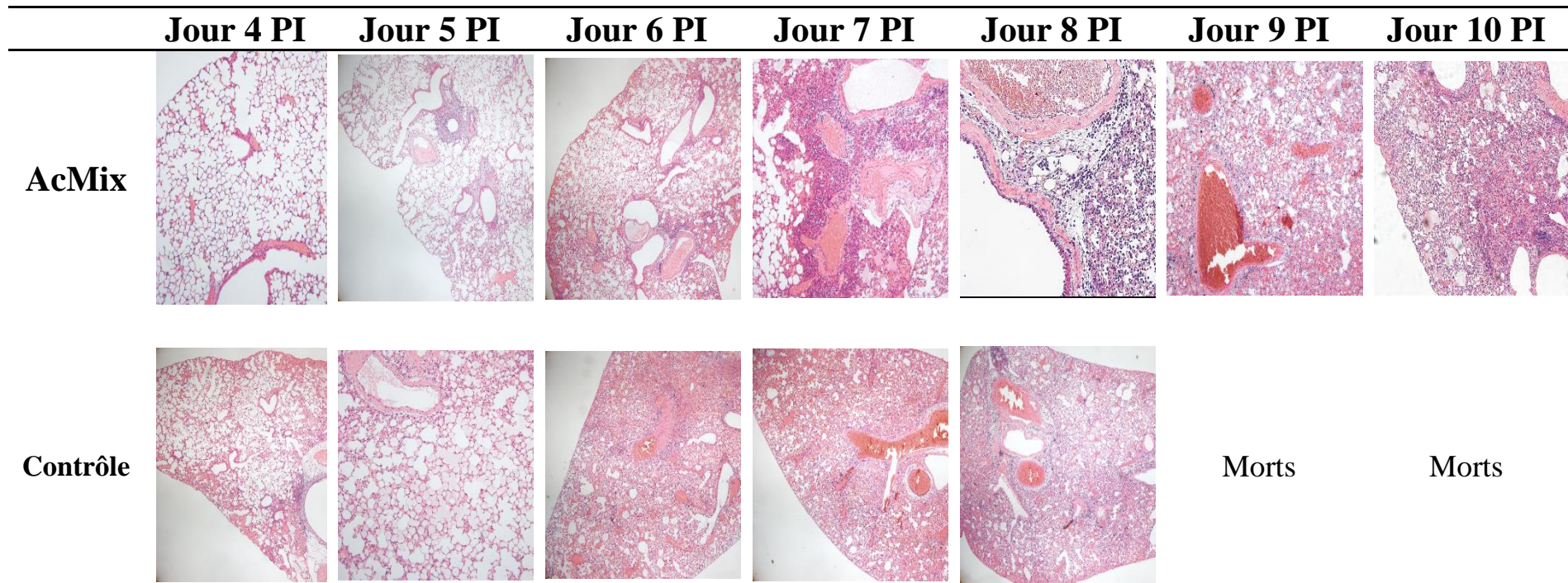


Figure 38 : Examen histopathologique. Les poumons gauches, issus des souris sacrifiées aux temps de prélèvements 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 jours post infection sont prélevés, insufflés avec 300µl de solution PAF et immergés pour fixation. Les poumons sont prélevés à la fois dans le groupe test (souris immunisées, AcMix) et dans le groupe témoin. Après fixation et inclusion dans la paraffine, des coupes sériées ont été réalisées et traitées avec une coloration à l'hématoxyline-éosine (HE). Ces lames histologiques ont été évaluées à l'aide d'un système de score.

Immunohistochimie (localisation du virus)

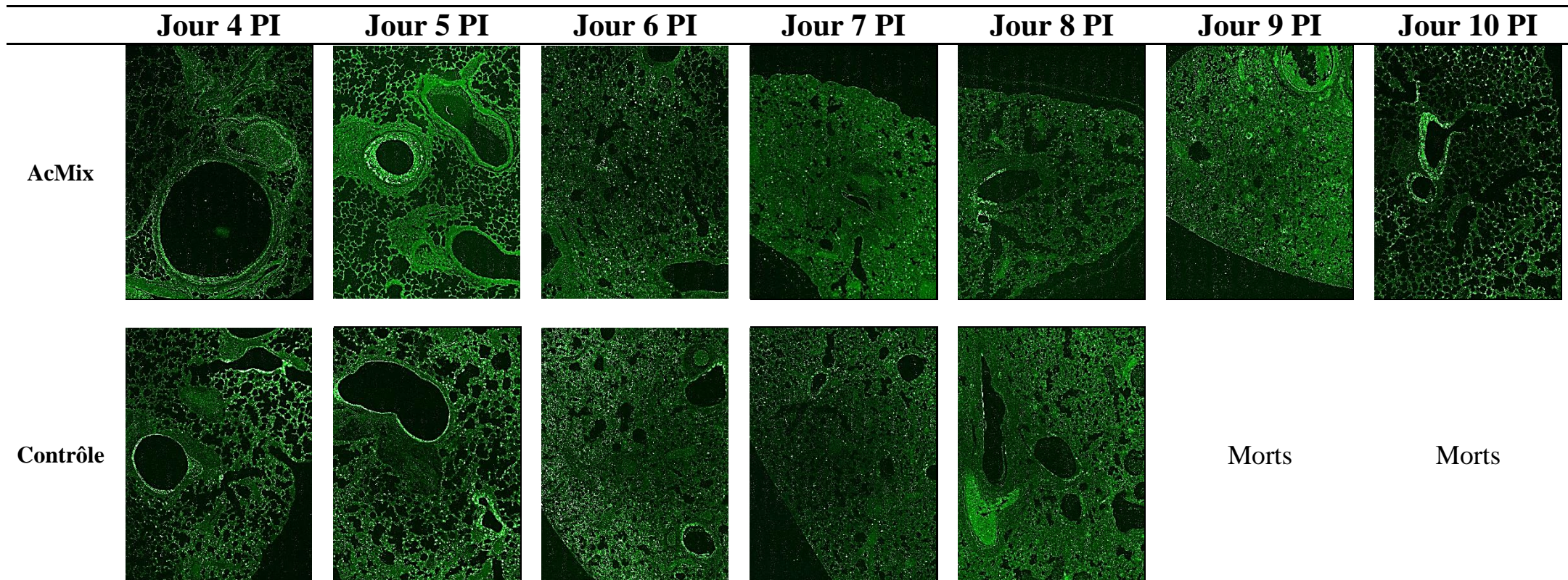


Figure 39 : Immunohistochimie (IHC). L'évaluation IHC a été réalisée sur des lames équivalentes à celles utilisées pour l'évaluation histopathologique car issues des mêmes blocs de paraffine et donc anatomiquement équivalentes. Les tissus enrobés de paraffine ont été déparaffinés, les sites de liaisons aspécifiques ont été bloqués. Un antisérum contre la nucléoprotéine recombinante a été utilisé comme anticorps primaire. Un anticorps conjugué à un fluochrome a été utilisé pour révéler les anticorps primaires liés.

Discussion sur les coupes histopathologiques et immunohistochimiques

Histopathologie

Jour 4 Post-Infection : La pneumonie interstitielle subaiguë disséminée est déjà observable chez les souris contrôles, tandis que les cellules inflammatoires (principalement les lymphocytes et les macrophages en minorité) apparaissent plus tard chez les souris hyperimmunisées (AcMix). **Jour 5 PI** : les manchons péribronchiques sont légèrement marqués chez les souris contrôles lorsque les phénomènes inflammatoires (pneumonie subaiguë à localisation péri-bronchique) sont nettement plus prononcés chez les souris AcMix. **Jour 6 PI** : une pneumonie interstitielle subaiguë s'étend sur tout le poumon chez les souris contrôles, une localisation multifocale et périvasculaire est observable chez les souris AcMix. **Jour 7 PI** : les cellules inflammatoires s'étendent sur toutes les zones observables chez les souris contrôles. Les cellules inflammatoires ont aussi tendance à se disséminer dans le groupe AcMix. Cependant, les zones plus prononcées montrent des lésions multifocales de pneumonie de type subaiguë à granulomateuse et même des zones de nécrose. **Jour 8 PI** : les poumons des souris contrôles ont très peu de zones fonctionnelles, toutes les zones observables présentent une pneumonie inflammatoire subaiguë à granulomateuse généralisée. Chez les souris AcMix, les lésions s'étendent, mais une localisation multifocale plus marquée reste observable à faible grossissement. À fort grossissement, nous pouvons distinguer principalement les macrophages et les lymphocytes. En périphérie de ces zones marquées, il y a encore des espaces alvéolaires intacts et toujours fonctionnels. **Jours 9 et 10 PI** : les poumons chez les souris AcMix présentent un aspect fortement comparable aux poumons des souris contrôles comme observé aux jours 6 et 7 PI. La pneumonie interstitielle subaiguë est maintenant disséminée dans certaines zones d'accumulation intense de cellules inflammatoires, la plupart du temps des localisations péri-bronchiques ou périvasculaires.

Immunohistochimie

Jour 4 Post-Infection : le marquage des particules virales apparaît comme un foyer fluorescent dans le groupe de souris contrôles. Aucun signal n'a été observé chez les souris AcMix. **Jour 5 PI** : des points fluorescents disséminés ont été observés chez les souris contrôles. Un marquage fluorescent est parfois identifiable autour des espaces bronchiques et est comparable dans les deux groupes. **Jour 6 et 7 PI** : les virus semblent se propager dans l'ensemble des poumons des deux groupes. Très légèrement, des zones de regroupement du signal fluorescent attestant des foyers viraux sont observées dans les poumons des souris AcMix. **Jour 8 PI** : l'étiquetage du virus est disséminé et moins intense chez les souris contrôles. Chez les souris AcMix, il existe un signal disséminé, moins intense que chez les souris

contrôles, mais certaines zones sont fortement marquées par le fluorochrome. Ces zones sont fréquemment localisées à la périphérie des vaisseaux ou des voies respiratoires. **Jour 9 et 10 PI** : le signal disséminé est presque imperceptible, seuls quelques foyers semblent entourer des zones de structures respiratoires ou vasculaires.

Techniques virologiques

Résultats

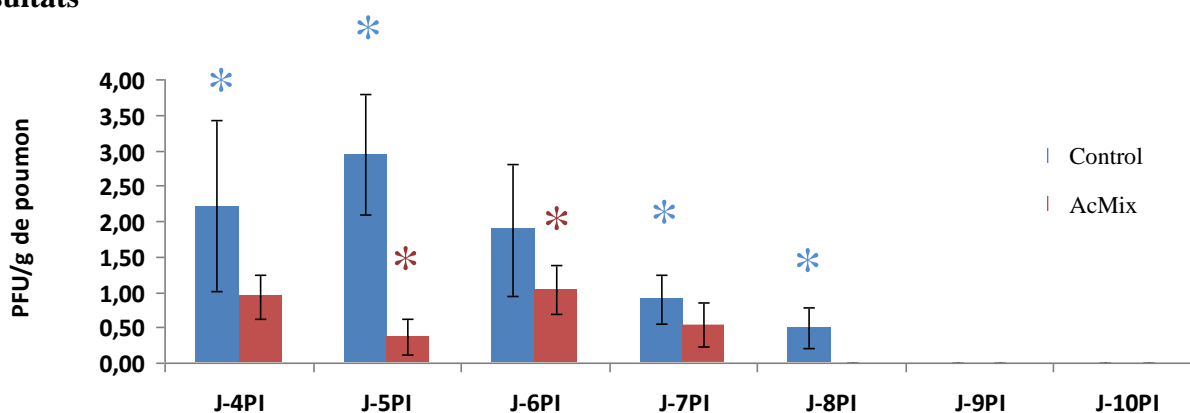
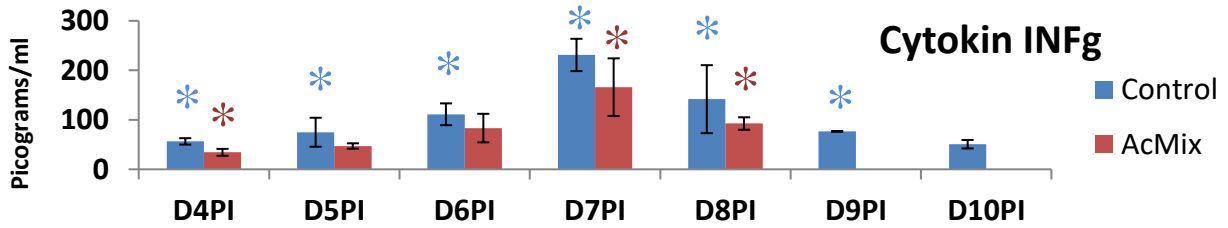


Figure 40 : Représentation des titres viraux pulmonaires mesurés chez les souris en fonction du jour de prélèvement. Le taux d'anticorps spécifiques anti-protéine NP Influenza a été mesuré à l'aide du kit ID Screen® Influenza A Antigen capture. Aux jours 9 et 10 post-infection les valeurs sont soit nulles (groupe AcMix), soit indisponibles (Contrôle, sans survivants à cette date). Les barres verticales représentent les déviations standards des valeurs (SD) et les (*) indiquent une différence statistique significative au seuil P ($P < 0,05$).

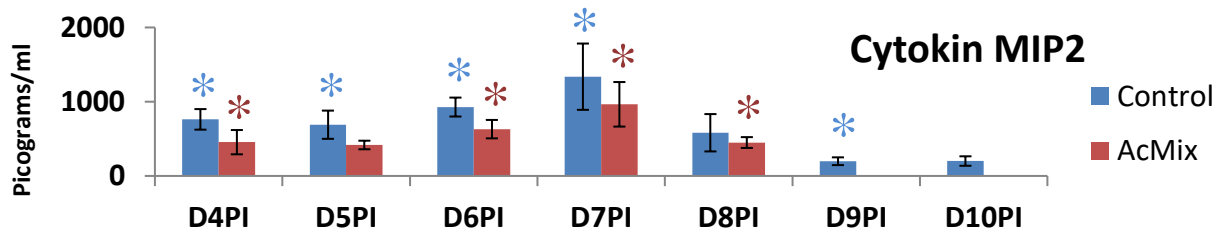
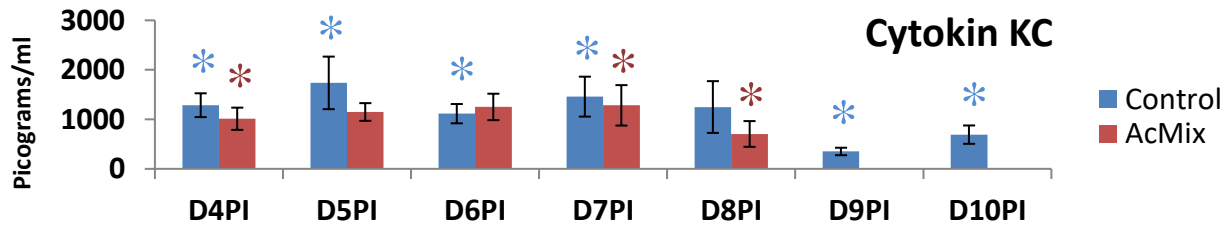
Quantification des cytokines pulmonaires

Résultats

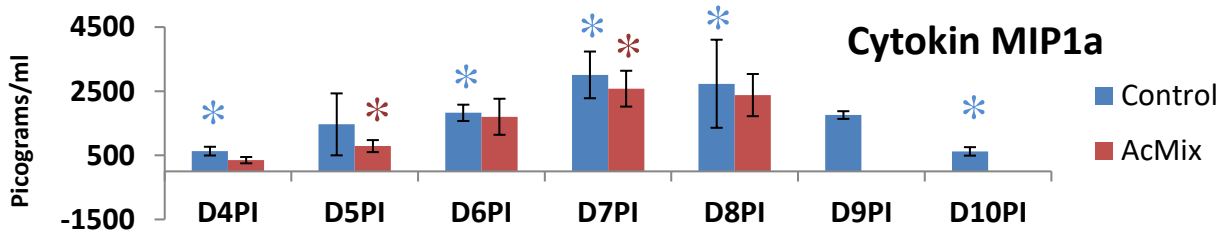
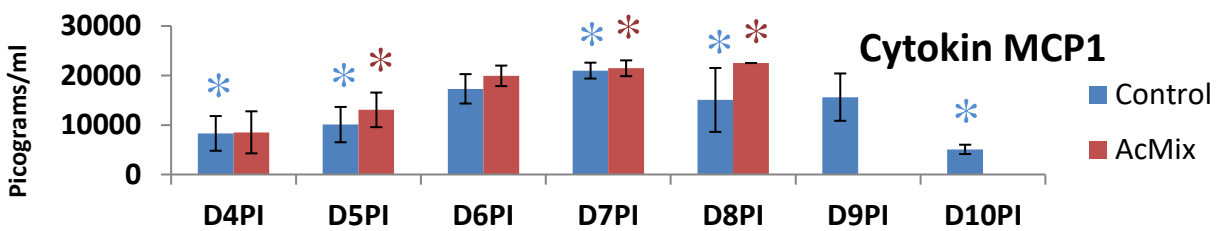
A. Cytokines Interférons de type I



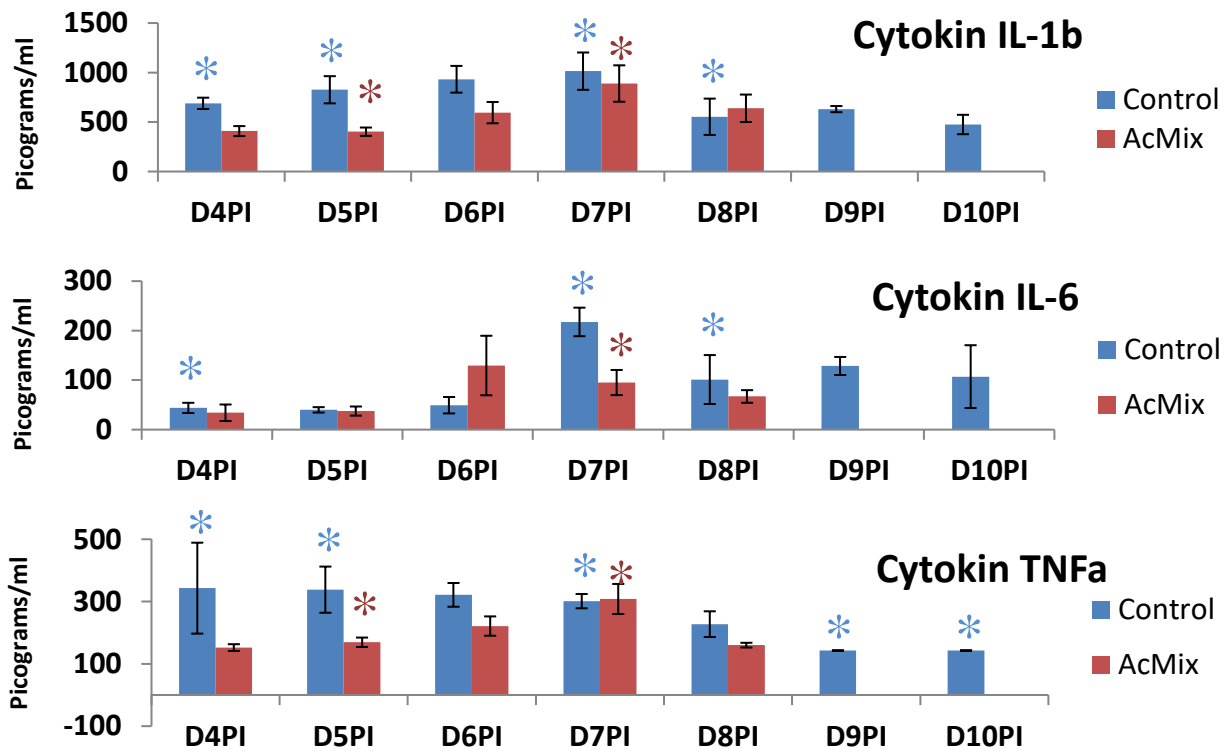
B. Cytokines attractives pour les neutrophiles



C. Cytokines attractives pour les leucocytes mononucléaires



D. Cytokines pro-inflammatoires



E. Cytokines anti-inflammatoires

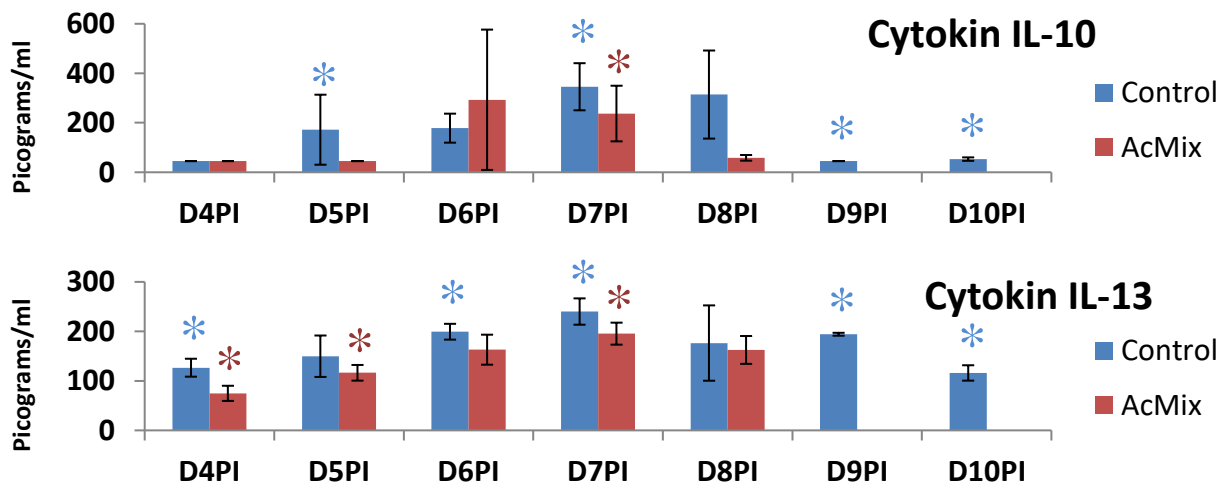


Figure 41 : La figure 41 est sectionnée en 5 catégories de A à E : l'ensemble des mesures représente les cytokines pulmonaires selon les jours de sacrifices (en jour post-infection) et regroupés par catégorie de cytokines. Les barres verticales représentent les déviations standards des valeurs (SD) et les (*) indiquent une différence statistique significative au seuil P ($P < 0,05$).

Tableau 31 : Résultats des cytokines mesurées dans les extraits pulmonaires

VARIABLE	Groupe	Moyenne	Minimum	Médiane	Maximum
INFg (34)	Contrôles	118,7a	7,4	76,6	334,5
	AcMix	94,8a	19,1	71,2	460,9
KC (57)	Contrôles	1248a	41	1003	3516
	AcMix	1149a	331	1003	2838
MIP2 (27)	Contrôles	800a	7	719	2689
	AcMix	648b	107	539,4	2066,3
MCP1 (51)	Contrôles	13897a	0	13550	22519
	AcMix	17600b	1621	22519	22519
MIP1a (77)	Contrôles	1809a	27	1335	5519
	AcMix	1655b	135	1186	4402
IL-1b (19)	Contrôles	789,2a	180,9	734,8	1687,6
	AcMix	624,3b	304,4	510,8	1555,4
IL-6 (38)	Contrôles	102,4a	1,3	60,4	321,2
	AcMix	81,7b	8,5	57,3	325,1
TNFa (21)	Contrôles	250,7a	0	259,1	856,6
	AcMix	183b	0	195,1	463,2
IL-10 (56)	Contrôles	163,7a	0	34,6	718
	AcMix	147,7a	0	22,9	1683,9
IL-13 (37)	Contrôles	177,5a	7,5	178	302,9
	AcMix	150,2b	40,3	152,8	260,6

Valeurs des cytokines mesurées (valeur moyenne, minimum, maximum et valeur médiane) regroupées par catégorie de cytokine et selon le groupe de souris. Les valeurs avec des lettres différentes sont considérées comme statistiquement différentes au seuil significatif P ($P < 0,05$)

Discussion sur la quantification des cytokines pulmonaires

Fig. 41 A : la cytokine INFg indique des valeurs supérieures chez les souris contrôles comparées aux souris immunisées (AcMix) durant toute la fenêtre d'observation. Les valeurs sont croissantes jusqu'à J7 post-infection où elles atteignent leur valeur pic. Après Jour 7 PI elles décroissent progressivement jusque J10 PI. Aux jours 9PI et 10 PI, les valeurs de cytokines atteignent des valeurs indétectables pour les souris immunisées.

Fig. 41 B : les cytokines KC et MIP2 mesurées suivent une évolution très proche durant toute la fenêtre de mesures : celles-ci débutent avec une valeur moyenne à J4PI et s'accroissent légèrement jusque J 7PI où elles atteignent leur valeur pic. Elles décroissent ensuite jusque jour 10PI. Les valeurs pour les souris contrôles sont supérieures aux valeurs des souris AcMix (sauf J6PI pour KC) et atteignent toutes deux des valeurs non détectables aux J9 et 10PI.

Fig. 41 C : les cytokines MCP1 et MIP1a marquent un très fort accroissement durant la fenêtre d'observation, plus précisément de J4PI à J7-8PI. Les valeurs de MCP1 sont légèrement plus marquées chez les souris immunisées comparativement aux souris contrôles, ces valeurs sont inférieures aux

valeurs détectables au-delà de cette période. Les valeurs de MIP1a sont légèrement plus marquées chez les souris contrôles comparativement aux souris immunisées.

Fig. 41 D : les cytokines IL-1b, IL-6 et TNFa ont été mesurées. L'évolution des résultats collectés est globalement similaire pour les trois cytokines. On observe un accroissement jusque J7PI et un décroissement après ce stade. Les trois cytokines sont plus élevées pour le groupe des souris contrôles, où elles restent mesurables jusqu'à J10PI. Chez les souris immunisées, les valeurs sont plus faibles et atteignent un seuil indétectable dès J9PI. On note deux exceptions majeures : les valeurs de TNFa sont décroissantes de J4PI à J7PI et la valeur d'IL-6 à J6PI est supérieure chez les souris immunisées comparativement aux souris contrôles.

Fig. 4 E : les cytokines IL-10 et IL-13 ont été mesurées. Les taux globaux sont faibles, quoique plus marqués pour la cytokine IL-13 que pour la cytokine IL-10. Elles ont globalement la même évolution dans la fenêtre d'observation : elles s'accroissent jusque J7PI et décroissent par la suite, dans une majorité des situations rencontrées, les valeurs des souris contrôles se sont avérées plus importantes que pour les souris immunisées. On note toutefois une exception pour la cytokine IL-10 à J 6PI.

En se basant sur les valeurs moyennes recueillies (Tab. 31), on constate que les cytokines mesurées IL-1b ; IL-6 ; IL-13 ; MIP1a ; TNFa et MIP2 sont supérieures de manière significative et systématique pour les souris contrôles comparées aux souris immunisées. Les mesures sont quasi équivalentes dans les deux groupes pour les cytokines KC ; IL-10 ; INFg. Enfin elles présentent des valeurs supérieures dans le groupe des animaux immunisées pour la cytokine MCP1.

De manière inexplicée, notre mode de mesure n'a pas permis de mettre en évidence la cytokine IL-4 chez tous les sujets dans toutes nos mesures. Nous avons considéré cette situation comme un artefact erroné qui nous a poussés à ne pas tenir compte des résultats pour cette cytokine.

V. ÉTUDE 3 : DISCUSSION

Afin de construire un modèle de challenge viral compétitif, un virus Influenza A (A/chicken/Belgium/150/99;H5N2) d'origine aviaire a subi plusieurs passages intrapulmonaires *in vivo*, visant à atteindre l'adaptation chez la souris. Ceci a conduit à un variant pneumovirulent et létal, hautement pathogène pour la souris. Nous l'avons dénommé H5N2 murinisé (titre viral $3,25 \cdot 10^5$ PFU/ml). Ce modèle développé et amplifié dans le laboratoire sur base d'une précédente expérience similaire avec un virus H1N1 d'origine porcine (120) nous a paru un candidat approprié pour notre expérience (16, 69, 119).

En adaptant les doses (18 UFP/souris, soit deux fois la DL_{50}), on observe qu'une fenêtre de suivi est donc possible et s'étend entre sept et huit jours après l'infection. Parmi nos résultats, nos essais avec l'équivalent de dix fois la DL_{50} n'ont pas satisfait à nos exigences (cf. Table C). Afin de faire toutes les observations possibles, nous avons considéré que dix jours maximum après l'infection suffiraient à effectuer toutes nos observations.

Nos investigations et les résultats des expériences d'orientation, nous ont permis d'identifier deux candidats conférant chacun une protection partielle contre le virus murinisé H5N2: mAb MD1 et mAb BF7. Nous avons observé que l'association de ces deux anticorps augmentait cette protection. Ces deux anticorps monoclonaux sélectionnés étaient tous deux dirigés contre deux régions différentes de la tige de l'hémagglutinine (HA) H2. Leur action synergique était donc envisageable. Ils reconnaissaient des épitopes conformationnels très constants au milieu de la région de la tige de l'hémagglutinine (HA) H2 des virus Influenza de type H5.

Grâce à cette étude, nous souhaitons démontrer leurs effets neutralisants *in vivo* contre un virus Influenza A de type H5 comme notre virus H5N2 murinisé.

L'administration intrapéritonéale de la combinaison de deux anticorps monoclonaux (200 μ g de mAb MD1 et 200 μ g de mAb BF7 par souris) 24 heures avant le challenge viral a significativement diminué le taux de mortalité chez les souris hyperimmunisées (en moyenne deux jours de survie supplémentaires). De plus, cette efficacité est objectivée par la mesure des différents paramètres indépendants. Ces données suggèrent que la région tige de l'HA pourrait être une cible potentielle pour la prévention de l'infection par le virus H5N2 murinisé (167).

Les signes cliniques se développent généralement deux à trois jours après l'infection et varient considérablement, selon notre expérience avec la souche CD-1 sélectionnée et la dose choisie ($2 \times DL_{50}$), les symptômes sont marqués trois à quatre jours après l'infection. Les symptômes se développent progressivement : de la léthargie, de l'anorexie, une perte de poids, les poils hirsutes, une dyspnée respiratoire et enfin la mort. D'autres symptômes semblables à la maladie développée chez l'homme avec des virus similaires comme la toux, l'écoulement nasal, les troubles digestifs et la fièvre n'ont pas été observés. La première dégradation de l'état général conduisant au dépassement des points limites est observée au cinquième jour après l'infection. Un seul individu survit le jour 10 après l'infection. Ces résultats répondent à nos prévisions et justifient une fenêtre d'observation limitée à dix jours maximum après l'infection.

La surveillance quotidienne du poids corporel, plus particulièrement la perte de poids est le signe clinique le plus facilement mesurable et le plus précis pour suivre l'évolution d'une infection ou la protection induite dans une expérience visant l'étude de l'efficacité vaccinale (198).

La technique adoptée pour la surveillance quotidienne de la température (microchip implantable) semble présenter plusieurs avantages : un faible aspect invasif, la sonde étant placée par injection sous la peau et n'étant plus manipulée. Lorsque l'expérience est en cours, les données restent disponibles à tout moment ; la contrainte est minimisée pendant les mesures et son impact est réduit sur les mesures de température corporelle.

Nous observons une légère hypothermie entre deux et trois jours après l'infection, conformément aux descriptions de la littérature, ceci s'explique par le fait que les petits animaux sont incapables de contrôler leur métabolisme dans les conditions d'infection et de stress (86).

Après analyse de nos résultats, on peut conclure que la mesure rapportée par la sonde à microchip ne reflète pas strictement la température centrale de la souris. Cependant, il apparaît que la température mesurée (reflétant la température sous cutanée à proximité immédiate de la sonde) est corrélée avec la santé de la souris. Cette température parfois anormalement basse peut s'expliquer par un phénomène de vascularisation périphérique perturbée observée dans les infections virales sévères. Une température plus basse est observée sous la peau en comparaison avec la température centrale du corps. Ceci concorde avec les observations pratiques rencontrées lors de la manipulation des souris dans cette étude : les souris en situation de maladie virale respiratoire sont apparues souvent «froides» au toucher (212).

D'un point de vue technique, nous avons observé des incohérences dans les températures relevées lors de nos tests préliminaires. Dès lors, il est légitime de s'interroger sur la relation entre la température sous-cutanée dans la zone où se trouve la microchip et la température centrale du corps, lors d'une affection sévère telle que décrite dans ce travail. Les réponses dans la littérature confirment que, bien que de telles différences puissent être observées, ces variations à petite échelle n'affectent pas significativement les statistiques de l'étude (187).

Tous les paramètres que nous avons identifiés et analysés dans cette étude (l'examen morphologique pulmonaire, les charges virales pulmonaires et la quantification des cytokines pulmonaires) convergent vers la même conclusion. Les souris du groupe hyperimmunisé (AcMix) semblent développer des lésions pulmonaires (macroscopiques et microscopiques) plus tardivement que dans notre groupe contrôle. Les charges virales pulmonaires semblaient être plus faibles en comparant un même temps d'échantillonnage. Enfin, les cytokines pulmonaires connues pour leur intervention dans les phénomènes inflammatoires ou infectieux sont faibles dans le groupe AcMix par rapport à notre groupe contrôle.

En conclusion, les souris hyperimmunisées bénéficient donc d'une protection accrue contre le virus Influenza A murinisé. Ces résultats ont confirmé notre hypothèse de travail : l'association d'anticorps monoclonaux telle que conçue et administrée au cours de notre étude a fourni un caractère protecteur (préventif) contre l'infection due à l'Influenza A (H5N2) murinisé.

De nombreuses études ont rapporté l'utilisation de moyens d'immunisation passive universelle contre les virus Influenza A. Ces anticorps (dont certains étaient des anticorps monoclonaux) avaient en commun d'être dirigés contre des peptides hautement conservés des virus Influenza A : contre la protéine M2e (181), contre le radical HA2 (398), contre la protéine NP ou la protéine virale M1 (77).

En général, ces traitements ont montré une immunogénicité relativement faible. Deux exceptions ont été observées, i) les traitements expérimentaux basés sur le domaine de la tige HA2, ils ont été décrits comme capables d'induire un complexe d'anticorps neutralisants (67), ii) plus préférablement, certains anticorps monoclonaux se liant au domaine de la tige HA2 ont été capables d'effectuer des neutralisations croisées dans plusieurs types d'hémagglutinines (H1, H2)(228). Lipatov et al (209) ont pu démontrer l'aspect préventif et curatif de l'administration d'anticorps monoclonaux dans un modèle d'infection létale avec des virus grippaux chez la souris.

Les résultats très encourageants obtenus suggèrent que la région de la tige de la protéine HA2 est une cible intéressante dans la protection contre le virus Influenza A. Notre étude rencontre les résultats de la

littérature (182). Comme observé, le ciblage spécifique de la région de la tige de l'hémagglutinine HA2 semble conférer une protection comparable à celle observée dans notre expérience. Notre mélange d'anticorps a prouvé son efficacité dans la protection des souris CD-1 contre un défi mortel avec un virus Influenza A (H5N2) murinisé. Ceci a été réalisé en administrant les anticorps monoclonaux par voie intrapéritonéale (mAb MD1 et mAb BF7) un jour avant le challenge viral à une dose plus faible (un total de 400 µg/souris). Nous avons démontré une protection efficace contre les lésions pulmonaires ; une diminution du taux de mortalité et une réduction significative de la perte de poids corporel. Ces données suggèrent que la région de la tige de l'hémagglutinine reconnue par notre combinaison de deux anticorps pourrait être un candidat potentiel pour la prévention de l'infection par le virus Influenza A.

Réponse à la question Q5e ci-après

Nous n'avons pas été en mesure de répondre à la question Q5e intitulée comme suit :

Q5e — Peut-on démontrer l'apport des techniques d'investigations fonctionnelles respiratoires non-invasives dans l'évaluation de notre traitement ?

Pour répondre correctement à la question posée, nous avons planifié une série d'opérations, celles-ci visant à mettre en comparaison notre association d'outils d'investigations non-invasives (pléthysmographie et CO-uptake) et les critères d'évaluation indépendants (histopathologie, IHC, techniques virologiques et mesures des cytokines) mesurant le degré d'intensité de la maladie expérimentalement induite (voir « Etude 3 : Discussion »).

Concrètement, plusieurs mesures seraient à réaliser aussi bien avec notre équipement de pléthysmographie qu'avec notre équipement de CO-uptake. Notre hypothèse de travail à savoir la complémentarité de ces deux outils, comportait plusieurs points à vérifier.

Il aurait été nécessaire :

- ✓ de réaliser plusieurs mesures (exemple J5 ; J7 et J10 PI), afin de retenir ou d'exclure une éventuelle valeur prédictive de notre combinaison d'outils dans l'issue attendue du challenge viral testé.
- ✓ de réaliser plusieurs mesures à J0 afin d'assurer les valeurs de base nécessaires à l'interprétation de nos résultats.

Une série de modifications a été adressée au constructeur Columbus Instruments, notamment :

- ✓ La mise en place de filtres sur l'équipement de mesure, susceptibles de parer à la diffusion du virus, ceci particulièrement sur les sorties d'air afin de permettre une la ventilation permanente (condition de mesures de longue durée).
- ✓ La modification du mode d'ouverture des chambres. La mise en place de fermetures de type « bocal à clapet ». Cette modification permet le chargement et la sortie rapide des souris, elle évite aussi de leur faire subir plusieurs rotations (situation de stress) afin de visser le bocal actuellement en place.
- ✓ La modification d'une partie des tubes internes de l'appareillage (autre matériau que le polyéthylène) afin d'assurer une meilleure étanchéité. Les situations de fuites constatées ont nécessité un temps important dans la mise en place des mesures.
- ✓ Une modification de certains des connecteurs du circuit gazeux (autres que des connecteurs rapides à insertion). Une mesure visant également à garantir l'étanchéité du circuit.

A la suite de nos sollicitations, seules quelques-unes de nos demandes ont été satisfaites par le constructeur.

Malgré le fait que les points précédemment cités constituaient des obstacles importants, mais surmontables, la progression de notre travail a rencontré une objection majeure dans le fait de l'annonce transmise par Columbus quant à la non poursuite planifiée de leur modèle Columbus *CO uptake monitor*®. Cette annonce (détaillée dans la rubrique « considérations importantes ») nous a donc mis face à une situation qui ne justifiait plus la validation d'un outil (et évidemment la justification ultérieure dans nos prochains essais, voire son utilisation en diagnostic de routine) dont le déclassement s'avérait imminent.

Cet outil, le *CO uptake monitor*®, bien qu'encore présent dans le laboratoire, ne bénéficierait plus que de manière limitée d'un entretien adéquat ; des pièces de rechanges requises (surtout les joints) et d'un logiciel de fonctionnement mis à jour. Il était dès lors impossible d'envisager les modifications sollicitées en vue d'accroître l'étanchéité (nécessaire aux mesures) et la sécurité de l'appareillage.

Toutes ces considérations nous ont poussés à mettre en suspens cette partie des expériences programmées, dans l'attente d'une revue des outils adéquats pouvant palier à cette absence et d'éventuelles validations et publications supplémentaires nécessaires.

A l'issue de cette section expérimentale, nous sommes donc parvenus à répondre aux questions posées dans les objectifs visés de ce travail, ceci excepté pour la question Q5e.

Discussion générale

PARTIE III DISCUSSION GÉNÉRALE

I. ETUDE 1 EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES NON-INVASIVES : ETUDE EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

1.1 EXPÉRIENCES D'ORIENTATION

Les résultats issus des expériences d'orientation permettent de tirer des conclusions applicables à l'expérience principale. En examinant les résultats de l'expérience visant à déterminer un intervalle de mesures successives et une accoutumance à court terme, cf. (Tab.17) : Reproductibilité de mesures successives, on observe que les valeurs de CO^{up} et sCO^{up} relevés chutent sensiblement au cours des mesures (51% entre la valeur à T0 et 60 min).

On peut déduire ainsi qu'une seconde mesure effectuée sur un individu endéans les 60 minutes, sera anormalement influencée par la première mesure. Ces résultats sont compatibles avec les données de la littérature (63). Nous déduisons donc qu'un intervalle pour deux mesures successives doit obligatoirement être supérieur à 60 minutes. Comme le temps de demi-vie de la carboxyhémoglobine est de quatre heures (63), on peut raisonnablement supposer que cette molécule restera présente (sans considération des processus d'élimination) au moins quatre à cinq temps de demi-vie (soit 16 heures). Nous avons opté pour un délai minimal entre deux mesures de 24 heures.

Même si nos résultats à l'issue des expériences n'ont pu déterminer une accoutumance à long terme (Tab. 18), nous constatons sur base des résultats de « Reproductibilité des mesures quotidiennes », que ceux-ci présentent des valeurs statistiquement significatives notamment pour le CO^{up} ou le sCO^{up} . On peut donc en conclure que deux mesures réalisées dans un intervalle de deux à douze jours peuvent être considérées comme indépendantes.

Dans l'expérience visant à déterminer s'il existe une influence liée à un rythme circadien existant (Tab. 19: « Effet du rythme circadien »), l'effet n'est pas observé et les mesures effectuées permettent *a priori* d'exclure ce type d'influence dans les limites fixées pour nos mesures.

La durée d'exposition des sujets a été arbitrairement fixée à 60 secondes (le choix du constructeur), ce laps de temps est suffisant pour éviter les variations de passage du CO de la barrière alvéolo-capillaire ou la saturation des sites de liaisons si l'on s'en réfère à la littérature (74).

1.2 EFFET DE LA SOUCHE

La comparaison des valeurs de CO^{up} ou de sCO^{up} au sein de chaque souche (Tab. 20) indique qu'il existe une différence inhérente à l'une ou l'autre souche. On constate que la souche avec le poids vif le plus important de l'expérience est la souche BALB/c (vs la moins lourde C57BL). On constate que la répartition des valeurs de CO^{up} ne suit donc pas les poids vifs moyens des souches.

Ceci nous est confirmé par l'examen des valeurs de sCO^{up} et sCO^{Met} . Il existe bien une différence marquée entre individus appartenant à des souches de souris différentes. Ce résultat nous paraît cohérent avec des constatations similaires faites avec la technique de pléthysmographie (101, 332, 347).

La souche DBA/2 occupe le premier rang de nos mesures, suivent ensuite la souche C57BL/6J, la souche 129/Sv, la souche BALB/c, la souche SJL et enfin la souche C3H. En conclusion, les résultats obtenus des mesures du sCO^{up} nous permettent donc de conclure ici que l'effet souche observé diffère d'un éventuel effet poids. Il est donc important de fixer la souche de souris à considérer lors de campagnes de mesures.

1.3 EFFET DE LA CROISSANCE SOMATIQUE

La croissance somatique des individus est ici mesurée en termes de semaines d'âge. Le suivi des valeurs de CO^{up} au cours du temps présente des valeurs statistiquement différentes d'une semaine à l'autre. Dans les résultats obtenus (Tab. 21) : « Moyenne des valeurs de CO^{up} , sCO^{up} et sCO^{Met} regroupées par semaine d'âge », aucune orientation particulière ne semble marquée. On note toutefois des « phases » de plateau qui suggèrent qu'un phénomène de maturation pulmonaire est à noter dans nos mesures. Il est donc important de fixer l'âge des souris dans la constitution des lots, lors de campagnes de mesures.

1.4 EFFET DU GENRE

Les mesures, notamment de CO^{up} nous indiquent que globalement les mâles extraient plus de CO au terme de la mesure, mais un examen plus détaillé des valeurs (notamment sCO^{up} et sCO^{Met}) nous permettent d'en déduire que les femelles sont plus efficaces à poids équivalent. Il existe donc une différence dans la capacité d'extraction du CO liée au genre de la souris. Ce point est également à mentionner lors de nos mesures. Il est donc important de fixer le genre (ou de s'assurer de considérer les deux dans les mêmes proportions) des souris à considérer lors de campagnes de mesures.

1.5 REPRODUCTIBILITÉ

Une relation linéaire a pu être établie entre le prélèvement de monoxyde de carbone et le poids du sujet. Cette relation a pu être vérifiée en médecine vétérinaire chez le rat, le hamster et le lapin (208, 415).

Dans le cadre de ce travail une relation de type linéaire a pu être observée (Fig. 19). Les souris ont été suivies durant huit semaines. Six souches différentes tant sur le point de vue de leur physiologie respiratoire que sur leur croissance ont été étudiées.

Les résultats obtenus à l'issue de l'expérience de confirmation (Tab. 25), nous indiquent que notre modèle de mesure de la capacité d'extraction chez la souris saine (CO^{up}) dans les conditions que nous nous sommes imposées est fidèle à la réalité des observations. Les valeurs attendues et les mesures réalisées sont identiques en considérant un intervalle de confiance ($p=0,1\%$).

1.6 COMPARAISON AVEC D'AUTRES RÉSULTATS DE LA LITTÉRATURE

En médecine humaine, il est d'usage de recourir au calcul de la capacité d'extraction du monoxyde de carbone (CO^{up}) afin d'apprécier le transfert de ce dernier au travers de la membrane alvéolo-capillaire. Il se définit comme suit :

$$CO^{up} = \frac{V_{CO}}{P_{A_{CO}} - P_{a_{CO}}}$$

Où CO^{up} : la capacité d'extraction du monoxyde de carbone

V_{CO} : le volume de monoxyde de carbone

$P_{A_{CO}}$: la pression partielle alvéolaire du CO

$P_{a_{CO}}$: pression partielle sanguine du CO

Cette relation peut s'appliquer à la souris, ceci moyennant certaines conditions :

- La souris doit être en bonne santé car toute atteinte pulmonaire peut avoir des conséquences difficiles à évaluer tant sur V_{CO} que sur $P_{A_{CO}}$ et $P_{a_{CO}}$.
- La production métabolique de CO est considérée comme faible et $P_{a_{CO}}$ est proche de 0.
- $P_{A_{CO}}$ ne présente pas de différences significatives avec l'air inspiré.

On peut alors écrire :

$$CO_{up} = \frac{V_{CO}}{P_{A_{CO}}}$$

Afin d'éviter toute altération liée au poids du sujet on peut aussi calculer la capacité de diffusion spécifique du monoxyde de carbone (sCO^{up}) qui correspond à la CO^{up} rapportée par unité de poids (en g) et la diffusion spécifique du monoxyde de carbone (sCO^{Met}) qui correspond à la CO^{up} rapportée par unité de poids métabolique.

CO^{up} moyen	$34,9 \cdot 10^{-3} \pm 7,4 \mu\text{l}/\text{min}.\text{mmHg}$
sCO^{up} moyen	$1,55 \pm 0,3 \mu\text{l}/\text{min}.\text{mmHg}.\text{g}$
sCO^{Met} moyen	$3,68 \pm 0,7 \mu\text{l}/\text{min}.\text{mmHg}.\text{g}$

Si nous comparons ces résultats avec ceux parus dans de précédentes publications, nous réalisons que la valeur de sCO^{up} que nous obtenons est nettement supérieure au résultat de Depledge et collaborateurs (1981)(74) qui est de $0,9 \mu\text{l}/\text{min}.\text{mmHg}.\text{g}$. Plusieurs causes sont évoquées :

- ✓ Les valeurs recueillies de CO^{up} et sCO^{up} sont en moyenne supérieures à celles de Depledge et collaborateurs (1981).
- ✓ Les valeurs de calcul utilisées pour la pression ($P_{A_{CO}}$) dans le *CO uptake monitor*® sont des moyennes entre la pression introduite dans la machine et la pression atmosphérique.

Contrairement à Depledge et collaborateurs (1981) si nous comparons nos résultats avec ceux de Hugonnaud et collaborateurs (155), nous constatons que le résultat de CO^{up} est largement supérieur à la mesure équivalente réalisée pour l'oxygène ($1\mu\text{l}/\text{min}.\text{mmHg}.\text{g}$ en tenant compte des différences interspécifiques). Ceci correspond bien plus à nos attentes étant donné que le CO manifeste une très forte affinité pour l'hémoglobine.

En conclusion, nos résultats sont cohérents avec les résultats recueillis dans la littérature et les faibles divergences observées peuvent être expliquées par des différences de souche, d'âge ou par la procédure choisie (nous avons travaillé sur animaux vivants, non restreints et non sédatisés).

II. ETUDE 2: EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES NON- INVASIVES : ETUDE EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES

2.1. CHOIX DE LA MESURE DU CO-UPTAKE

Le choix de la mesure réalisée par CO-uptake a été motivé notamment par le parti pris préalablement à cette expérience de privilégier les techniques d'investigations respiratoires non-invasives. Ceci correspondait non seulement à la volonté de pouvoir réutiliser les animaux d'expérience, mais aussi à la volonté de pouvoir à l'avenir mener des études de longues durées ou des études répétées. On ne doit pas oublier également la règle générale prônant le respect des 3R de rigueur en expérimentation animale.

L'utilisation du CO-uptake constituait (sur le plan théorique du moins) un complément idéal d'investigation, dans la mesure où ce dernier était présenté comme un outil capable de quantifier les échanges respiratoires réalisés au niveau alvéolaire. Cette méthode s'avérait donc un complément approprié aux mesures effectuées par pléthysmographie barométrique en chambre double récemment validée au sein du laboratoire. Ces équipements venaient parfaitement compléter plusieurs investissements destinés à l'investigation respiratoire sur souris acquis récemment (locaux et matériel d'élevage ; portoir ventilé par exemple).

Les caractéristiques définies sur ces deux outils de pléthysmographie (102) et CO-uptake monitor (11, 93) étaient telles qu'il était vraisemblable de les considérer comme complémentaires, ceci dans le cadre l'exploration envisagée. Les résultats obtenus à l'aide du modèle à Respirovirus Murin (Tab.26) et à l'aide des passages du Virus Influenza murinisé (Tab.27) confirment notre hypothèse de travail et confirment la complémentarité supposée de ces deux outils.

2.2. CHOIX DES FACTEURS D'INFLUENCE

Le choix et la désignation des facteurs d'influence examinés au cours de cette étude ont été motivés par les résultats obtenus et l'expérience acquise sur les mesures de pléthysmographie au sein du laboratoire. Il nous a semblé opportun de vérifier si ces paramètres apparus comme majeurs en pléthysmographie (102) (Faisca, Habyarimana et Desmecht, poster présenté à la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, SFPT, à Paris, 2011), exerçaient une même influence dominante sur les mesures de CO-uptake. Des facteurs tels que le temps, les intervalles de mesures, la période de la journée et l'âge des animaux étaient des exemples utiles de paramètres susceptibles d'être contrôlés en laboratoire, dans la mesure de leurs influences respectives. Enfin, ces considérations (intervalles entre deux ou plusieurs

mesures, moment de la journée pour la mesure) constituaient les points pratiques et prioritaires qu'il nous importait de connaître afin de pouvoir à l'avenir garantir la répétabilité de nos mesures, leurs comparaisons éventuelles entre expériences et leur valeur diagnostique future.

Concernant les souris elles-mêmes, la connaissance de la souche utilisée, de la croissance somatique, indicatrice de la maturité pulmonaire et du genre, en relation avec de nombreux autres facteurs (poids ; influence hormonale ; activité etc.) étaient des points déjà relevés dans plusieurs travaux comparables du laboratoire (120, 124). De nombreux paramètres étaient à considérer, nous avons dû faire des choix et nous avons donc mis en priorité les facteurs dont nos expériences passées avaient déjà indiqué l'importance dans des expériences similaires.

2.3. CHOIX DU MODÈLE MURIN

Comme déjà signalé, le choix du modèle murin constituait un parti pris avant les expériences. De nombreux investissements avaient déjà été réalisés en ce sens. Ce modèle, particulièrement pratique dans la recherche, nous a semblé prometteur quant aux utilisations ultérieures à prévoir pour notre modèle. Ce choix s'accordait avec les compétences acquises dans le laboratoire et présentait de nombreux avantages tels que la petite taille, la facilité de manipulation et la disponibilité de nombreux outils de diagnostic adaptés à la souris disponibles sur le marché.

2.4. CHOIX DU RESPIROVIRUS MURIN (RM)

Le RM en tant qu'agent viral de maladie respiratoire murine connue, disponible sur le plan commercial (virus en vente dans la banque ATCC, Chicago, USA) a logiquement constitué un axe de recherche du laboratoire. Il a semblé tout naturel de se servir des acquis ainsi développés et de la maîtrise issue des expériences réalisées pour tester notre modèle.

2.5. CHOIX DU VIRUS INFLUENZA A (H5N2)

Le virus Influenza (Influenza A exclusivement) en seconde étape a constitué un agent viral d'infection respiratoire d'intérêt, ceci notamment après acquisition au sein du laboratoire de la technique permettant sa murinisation. Une première approche, réalisée avec succès sur virus Influenza H1N1 d'origine porcine, nous a incité à reproduire la tentative avec un virus de type H5N2, ceci en rapport avec la suite

à long terme prévue pour le projet. Un virus de type H5N2 s'avérait stratégiquement un bon choix en termes de risques de biosécurité, car accessible au sein de nos locaux classés en BSL2.

2.6. RÉSULTATS DE PLÉTHYSMOGRAPHIE ET DU CO-UPTAKE

La mesure des valeurs de pléthysmographie ainsi que des valeurs de CO-uptake ont permis chacune séparément une évaluation spécifique du système respiratoire. Sur le plan méthodologique, la priorité était de parvenir à un niveau de standardisation des mesures qui permettrait en fin de compte de discriminer entre un phénotype sensible et un phénotype résistant à l'infection expérimentalement induite à l'aide du virus Influenza ou à l'aide du Respirivirus murin.

Ceci permettait, du moins en théorie, de désigner une souche «résistante» et une souche « sensible » à l'issue de l'expérience. Notre modèle d'infection à RM a permis : i) l'usage d'une souche bien caractérisée de virus pathogène pour la souris (94), ii) l'instillation et l'inoculation standardisées, uniformes chez tous les individus suivant notre procédure, iii) la collecte de valeurs de paramètres fonctionnels rapportés qui n'avaient pas été affectés par les changements liés au genre et à la croissance somatique, iv) le protocole d'expérimentation dans son ensemble a généré un modèle infectieux ni trop bénin (qui aurait réduit la sensibilité de l'expérience) ni trop sévère (qui aurait été contraire à la spécificité de l'expérience et aurait entravé l'analyse statistique des résultats) et v) chacune des méthodes utilisées pour suivre la maladie expérimentalement induite et ce notamment par pléthysmographie et par la mesure du CO-uptake ont généré des catégories objectives permettant la classification allant de «légère» à «sévère» pour qualifier la maladie développée dans chacune des souches étudiées.

La combinaison de ces données fonctionnelles (résultats partiels dans le Tab. 26), morphologiques (exemple Fig. 29) et virologiques ont conduit à une classification des souches en termes de résistance à la maladie induite par SeV, soit : BALB/c > DBA/2 > 129/Sv. Indirectement, cette démonstration a bien prouvé que notre mode d'investigation permettait la discrimination selon la sévérité de la pathologie induite.

III. ETUDE 3 : EVALUATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES NON- INVASIVES : COMPARAISON DE L'EFFICACITÉ DE DEUX TRAITEMENTS

3.1. CHOIX DE LA SOUCHE DE SOURIS CD-1

Les souris CD-1 sont des souris non consanguines (Outbred). En effet, les croisements sont assurés afin de faire intervenir de larges populations suffisamment séparées géographiquement et appartenant à la même souche de souris. Aucun profil génétique n'est strictement identique au sein du groupe. Les colonies non consanguines montrent donc une légère diversité génétique entre individus (50).

De ce fait, l'étude de l'expression liée à un gène particulier de résistance ou de sensibilité (une des hypothèses de ce travail) avec une souche non consanguine, donne plus de chance à l'émergence d'une large variété de réponses phénotypiques possibles (363). Dans le cadre de notre étude 3, ceci accroissait les chances de voir émerger des réponses différentes quant à la sensibilité au virus influenza et quant à la résistance liée au processus d'immunisation passive étudié. Parmi les souches non consanguines de souris disponibles sur le marché, la souche CD-1 nous a paru un bon choix pour un budget abordable (413).

3.2. CHOIX DES ANTICORPS

Le choix des anticorps utilisés durant ce travail a été influencé par un précédent projet entamé par le laboratoire. Au cours de ce projet, différents anticorps spécifiquement conçus et élaborés pour ce dernier ont été jugés éligibles pour la détection de virus Influenza A à hémagglutinine de type H5. Ce projet à finalité de diagnostic clinique *in vitro* n'a pu être mené à terme. Toutefois, sur base des informations disponibles, il nous a été impossible de préjuger de l'efficacité de ces mêmes anticorps *in vivo*. Ces anticorps dirigés contre la section tige H2 de l'hémagglutinine H5 nous ont paru d'un apport majeur au sein de nos expériences.

Le choix de ces anticorps nous a également paru en parfaite adéquation avec notre choix de la souche virale H5N2 murinisée (Fig. 42).

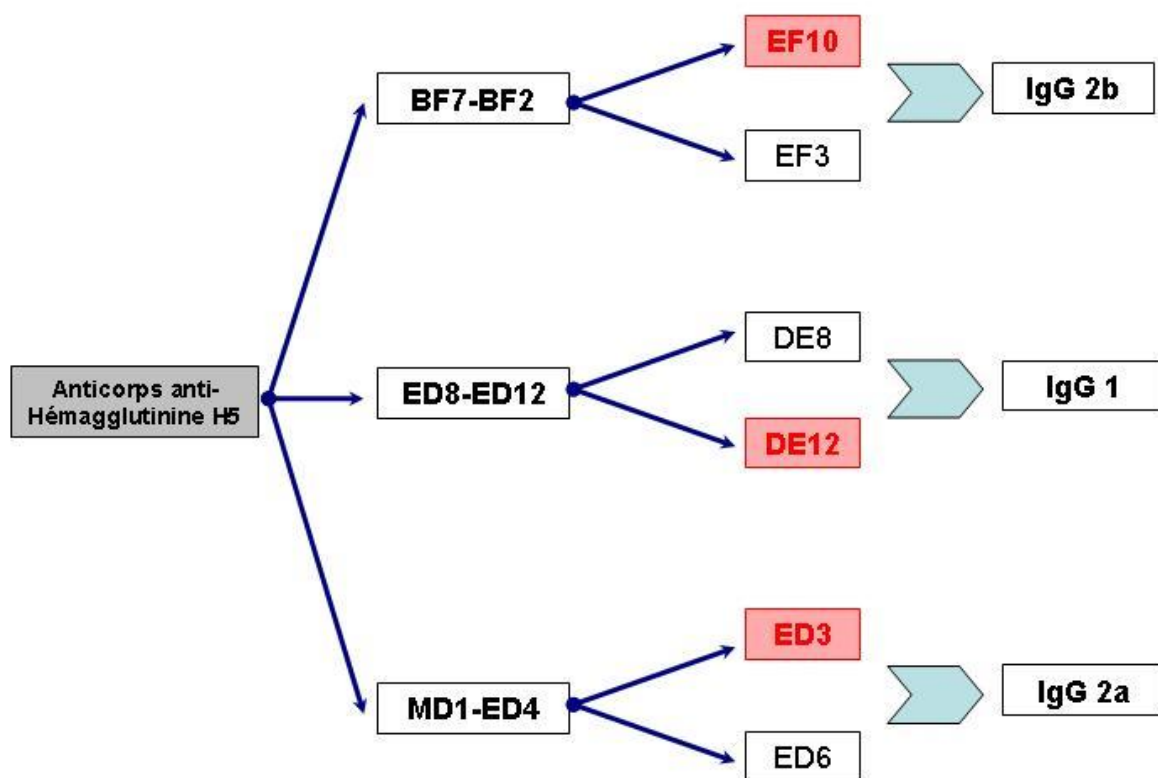


Figure 42 : Choix réalisés au sein des différents anticorps anti-hémagglutinine H5 tels que prévus dans le plan de recherche visant la recherche d'anticorps ayant une efficacité en diagnostic. En rouge les anticorps élus pour nos essais *in vivo*.

Nous avons donc retenu trois types d'anticorps monoclonaux, dont à terme deux nous ont parus dignes de recherches plus approfondies au cours de nos essais (Tables A à D) : mAb MD1 (H5-MD1-ED4-ED3) et mAb BF7 (H5-BF7 BF2-EF10). Nous avons donc soupçonné que les actions des deux anticorps (usage simultané, Cf. Tables C et D) pouvaient s'avérer synergiques, ceci dans la mesure où ces deux anticorps visaient des zones distinctes sur la zone tige H2 de l'hémagglutinine H5 du virus. Les résultats de notre étude d'orientation ont donné des indications confortant cette hypothèse (Table D). Ceci explique le choix de cette association d'anticorps pour notre expérience principale (Tab.29).

Dans notre expérience principale, l'administration IP de deux anticorps mAb (200µg mAb MD1 et 200µg mAb BF7) 24 heures avant le challenge viral a diminué la mortalité chez les souris immunisés (taux de survie de 10% vs 0% à jour 10 post infection). Ces résultats sont soutenus par la mesure de différents paramètres : la symptomatologie observée ; la survie des animaux (Fig. 35) ; les titres viraux pulmonaires mesurés (Fig. 40) ; les lésions histopathologiques observées (Fig. 38) et la détection virale *in situ* par immunofluorescence (Fig. 39).

Ces données suggèrent que la région tige de HA pourrait être une cible potentielle pour la prévention des effets létaux d'une infection par le virus H5N2 et éventuellement par tous les virus de type H5 des virus Influenza A.

Dans les différents cas de figures testés, réunis dans la section « Expériences d'orientation : Table de A à C », nous avons constaté qu'en adaptant les doses administrées lors de l'inoculation (adaptation à deux fois l'équivalent de la DL_{50}), un délai de maximum 10 jours s'avérait suffisant pour réaliser toutes les observations et mesures souhaitées.

3.3. PARAMÈTRES ÉVALUÉS

Les paramètres fonctionnels respiratoires sélectionnés et mesurés ici ont été motivés en premier lieu par les travaux réalisés et validés sur les appareillages au sein du laboratoire (11, 94, 102). Ainsi la mise en évidence des facteurs clés est issue des mesures en pléthysmographie (Cf. Tab. 4) et des mesures de la capacité d'extraction du CO (CO^{up} et les valeurs calculées sCO^{up} et sCO^{Met}) (Tab. 17). Ces valeurs confortées par la littérature (150, 223, 240) ont été comparées aux paramètres usuellement utilisés pour évaluer l'absence de lésions ou l'évolution de celles-ci chez des souris expérimentalement infectées (11, 49, 125). Ces paramètres sont : les signes cliniques, l'évolution de la mortalité et l'évolution du poids vif. A la fin de l'expérience, une autopsie a systématiquement été faite afin de réaliser un examen visuel des lésions éventuelles et également pour procéder à des examens histopathologiques (Fig. 29) et immunohistochimiques (Fig. 39) complémentaires.

Nos conclusions nous indiquent que la combinaison de la méthode de pléthysmographie et de la mesure du CO-uptake telle que décrite dans ce manuscrit apporte suffisamment d'arguments permettant i) la caractérisation de la fonction respiratoire chez la souris saine (discussion de l'Etude 1), ii) la caractérisation d'une situation d'infection respiratoire superficielle en regard de l'anatomie du tractus respiratoire (discussion de l'Etude 2, partie 1) et iii) la caractérisation d'une situation d'infection respiratoire profonde (discussion de l'Etude 2, partie 2). Ceci avec les avantages de son aspect non-invasif et des possibilités de mesures répétées.

Enfin, nous aurions souhaité apporter les preuves de l'aptitude de ces méthodes à discriminer deux maladies d'origine virales respiratoires d'évolutions différentes à la suite de deux traitements différents (discussion de l'Etude 3).

Les paramètres d'intérêt considérés dans ce travail (effet, de la souche, de la croissance, du genre ; comparaison mesures jour-nuit ; souris saine vs infection respiratoire virale) ont été inspirés des paramètres connus en pléthysmographie (150, 223, 240), de ceux connus influant sur la mesure du CO-uptake (74) et sur la ventilation pulmonaire chez la souris.

L'expérience acquise au sein du service de pathologie, liée au développement des modèles infectieux respiratoires expérimentalement induits à Respirovirus murin (93) et aux Influenza A (H5N2) murinisés (48, 69) ont conduit à considérer également les paramètres additionnels suivants : l'aspect des poumons à l'autopsie ; le titre viral pulmonaire et la quantification des cytokines pulmonaires.

3.4. MESURE CO-UPTAKE ET PLÉTHYSMOGRAPHIE DANS L'ÉTUDE 3

Bien qu'initialement prévues, la mesure du CO-uptake ainsi que la pléthysmographie n'ont pas pu être réalisées dans le cas particulier de cette 3^{ème} étude. Ceci est dû à des contraintes techniques relatives à la décision d'arrêt du *CO uptake monitor*® par Columbus Ins (Cf. ; à la section « Conclusions, considérations importantes »). Toutefois, si on considère les résultats obtenus dans la situation de validation de ces équipements (Etude 1) et dans les résultats obtenus en situation pathologique (Etude 2, parties 1 et 2), on peut raisonnablement émettre des hypothèses quant à l'apport éventuel que pourrait permettre l'usage de techniques non-invasives dans l'évaluation de la fonction respiratoire chez la souris dans le cadre d'une comparaison de l'efficacité de deux traitements.

Nous formulons ces hypothèses comme suit :

- Les mesures de pléthysmographie et de CO-uptake, bien que nécessitant une préparation, une acclimatation des animaux et une mise en place particulière, ont prouvé leur facilité d'utilisation et leur caractère non-invasif (Tab. 11).
- Les mesures par pléthysmographie et de CO-uptake, en utilisation dans des conditions standardisées sont capables de caractériser l'état fonctionnel respiratoire chez la souris de laboratoire (situation de la souris saine, Etude 1).
- Bien que nécessitant encore des travaux complémentaires (difficiles à mettre en place dorénavant pour le CO-uptake), les techniques d'investigations fonctionnelles respiratoires dans ce travail, utilisées de manière combinée, sont en mesure de discriminer plusieurs états pathologiques de la fonction respiratoire (Etude 2) chez la souris.
- L'utilisation de techniques non-invasives telles que présentées, permet l'usage répété des animaux durant le protocole expérimental et ainsi, la consolidation et la confirmation des résultats. Il faut

considérer également l'impact non négligeable dans le respect de la règle des 3R (« R » pour réduction du nombre).

- Une altération fonctionnelle respiratoire étant systématiquement observée avant la mort des animaux de l'expérience, on peut déduire logiquement qu'une fois la technique éprouvée il serait éventuellement envisageable de ne pas poursuivre l'expérience jusqu'à la mort systématique des animaux (gain sur la détermination des points limites).

Tous ces éléments nous poussent à croire que l'apport des techniques d'investigations fonctionnelles respiratoires non-invasives ne peut être que bénéfique dans le cadre d'une étude de comparaison de l'efficacité de deux traitements telle que formulée. Hélas, cette étude n'a pas pu être poursuivie, dans ce travail. Une investigation et une démonstration expérimentales semblent encore opportunes et restent donc à tenter après une recherche actualisée du matériel le plus adéquat et sa validation préalable.

3.5. ANTICORPS ET IMMUNOTHÉRAPIE

De nombreuses études signalant l'usage d'anticorps anti-influenza dits « universels » dirigés contre des peptides ou des protéines hautement conservés des virus Influenza A (M2e, domaine de tige HA2, NP, M1) ont été rapportées et ceci dans différents modèles animaux (283).

Nos résultats s'alignent avec ceux de la littérature, ceci s'explique par le fait que le ciblage spécifique de la région de la tige de l'hémagglutinine HA2 semble bien conférer la protection constatée dans notre expérience (167). Il est légitime d'envisager également l'éventualité de réactions de type neutralisation, croisées avec d'autres Influenza A comportant aussi une hémagglutinine de type H5.

Les aspects préventifs et curatifs de l'usage d'anticorps monoclonaux, face à une infection due à un virus Influenza chez la souris ont déjà été démontrés (209). Les résultats obtenus dans ce travail suggèrent que la tige de la protéine HA2 est une cible d'intérêt à investiguer dans la protection contre certains virus Influenza A. Par exemple, plus d'études seraient à envisager en ce qui concerne les doses nécessaires pour assurer une protection, les doses suggérées dans la littérature restent très élevées (jusqu'à 1000 µg/souris) ainsi que sur les délais d'administration à des fins curatives ou préventives (399, 402).

Dans notre étude, notre association d'anticorps a prouvé son efficacité dans la protection des souris CD-1 contre une épreuve mortelle avec un virus de l'Influenza A (H5N2) préalablement murinisé, ceci en administrant des anticorps monoclonaux par voie intrapéritonéale (mélange des mAb MD1 et BF7) un jour avant le challenge viral, soit au total 400 µg/souris. Comme décrit dans la littérature, nous avons

constaté une protection effective dans les lésions pulmonaires, objectivée par nos constatations en histopathologie et en immunohistopathologie.

Retamal et collaborateurs (291) ont démontré la protection conférée par l'administration *in vivo* d'anticorps monoclonaux d'origine humaine contre une affection létale d'Influenza A.

Au terme de cette étude, nous fournissons un faisceau de preuves concordantes de la protection conférée par notre mélange d'anticorps après une dose unique administrée 24 heures avant infection par le virus H5N2. Nous avons, à ce titre, observé une réduction de la mortalité chez les souris infectées par la souche virale testée et une réduction significative de la perte de poids corporel (Tab. 29).

Conclusions et perspectives

CONSIDÉRATIONS IMPORTANTES

Dans un contexte où les recherches du département de pathologie spéciale investissait dans l'examen respiratoire chez la souris (Plusieurs études menées sur le respirovirus murin, le pneumovirus murin et les influenza murinisés), le développement de techniques d'investigation respiratoires adaptées et complémentaires a toujours semblé couler de source. Les résultats obtenus par les mesures en pléthysmographie, appliquées à la souris, permettaient dès lors d'anticiper l'évolution de la maladie expérimentalement induite chez celle-ci et étaient complémentaires de la mesure de la capacité d'extraction du monoxyde de carbone telle que fournies par le *CO uptake monitor*®, construit par Columbus Instruments (Ohio, USA).

Comme le démontrent les résultats réunis au sein de ce travail, ce type de mesure s'avère fiable et est un bon indicateur de l'état sain (absence de pathologie décelable) ou pathologique de la souris soumise à une infection virale respiratoire induite. Au cours de nos essais, il a été démontré que cette technique, comme toutes celles destinées aux petits animaux de laboratoire, nécessite un haut degré de précision et une importante capacité de discrimination, les valeurs impliquées s'avérant faibles et variant dans un intervalle d'amplitude relativement étroit. Des conditions précises de travail et un calibrage rigoureux étaient donc nécessaires.

Le *CO uptake monitor*® de Columbus Instrument (Ohio, USA) est un appareillage construit à la demande spécifique de The Jackson Laboratory (producteur de souris de laboratoire). Ce dernier, fortement impliqué dans la recherche respiratoire chez la souris, exigeait un équipement spécifique pour poursuivre ses recherches en cours.

En 2002, les recherches discrètes de The Jackson Laboratory (une publication réalisée sur le sujet et conservée en interne chez Columbus) ont été arrêtées. La dizaine de machines vendues de dans le monde ont été les seules disponibles car Columbus cessait la production de cet appareil (Fig. 43). Malgré le fait qu'à ce moment-là, plusieurs appareils dont celui du laboratoire de pathologie spéciale, étaient encore en utilisation et ne présentaient aucun mauvais fonctionnement signalé à la firme, Columbus cessait progressivement le suivi, la production de pièces de rechanges et la mise à jour du logiciel de fonctionnement. Cette décision était prise en 2005, de manière quasi définitive, ceci d'autant plus que Columbus développait alors depuis quelques années le *Micro-Oxymax respirometer*® qui était un système comparable, mais permettant l'analyse de six gaz différents (O₂ ; CO₂ ; Méthane ; H₂S ; H₂ en

plus du CO). Ces choix, motivés par des enjeux économiques (perte de leur gros client The Jackson) et par le marché (éviter la concurrence entre deux produits phares équivalents), ont largement empiété sur la poursuite du développement de l'appareillage *CO uptake monitor*®.

Les conséquences directes ont été le manque de suivi par la firme-mère, des pannes techniques (fuites éventuelles), un retard dans les demandes d'adaptations adressées par les utilisateurs, des retards dans les mises à jour logicielles et le remplacement des pièces mécaniques. Il en a découlé que le prix d'un entretien ou d'une révision comprenant le déplacement d'un technicien en provenance directe d'Ohio (USA) ou l'expédition de l'appareil vers les Etats Unis, s'avéraient dorénavant extrêmement onéreux.

Malgré nos résultats encourageants enregistrés avec le *CO uptake monitor*® et suite à la déclaration de Columbus, il était dès lors difficile, dans le cadre de notre expérimentation, d'envisager une poursuite dans le futur avec un appareillage dont le déclassement semblait attendu sous peu.

Au cours de ce travail, nous avons rapporté les résultats encourageants enregistrés au cours de nos expériences, nous avons apporté une critique objective, constructive et indépendante sur l'ensemble de nos observations. Malgré cela, on peut comprendre que face aux enjeux économiques exposés ici, nos résultats ne puissent suffire aux yeux de la firme. Contrairement à ce qui avait pu être planifié dans les premières étapes de ce travail, nous ne pouvions plus promouvoir l'utilisation du *CO uptake monitor*® en tant qu'outil de diagnostic ou en tant qu'outil de discrimination, entre des souris soumises à une infection expérimentale, ceci du fait des incertitudes liées dès lors à cet appareillage et à sa disponibilité en parfait état de fonctionnement dans les laboratoires.



Lung Function Computer CO Uptake Monitor DISCONTINUED



[Request Information](#)

[Request Support](#)

– General Information

The Carbon Monoxide Uptake Monitor system has been discontinued. While we still support the systems presently in the field, we no longer build new systems.

– Ordering Information

Discontinued

Figure 43 : Annonce officielle publiée sur le site internet de Columbus Instruments® concernant leur produit *CO uptake monitor*®. Source : Site internet Columbus Ins®.

PARTIE IV CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Tout au long de ce travail nous nous sommes efforcés d'apporter les éléments objectifs pouvant permettre une évaluation de l'apport diagnostique des équipements d'investigation fonctionnelle respiratoire non-invasive chez la souris. Plus particulièrement nous nous sommes intéressés à deux appareils que sont le pléthysmographe en chambre double, un appareillage de mesure respiratoire chez la souris, déjà dument validé au sein du Département de Morphologie et pathologie, et le *CO-uptake monitor*® un nouvel appareil alors récemment mis à disposition par la société Columbus Instruments®. Nous avons formulé l'hypothèse compte tenu des caractéristiques connues de ces deux équipements, que ceux-ci pouvaient apporter des informations complémentaires et qu'ainsi, la mesure du CO-uptake serait un complément idéal à la mesure de pléthysmographie barométrique en chambre double dans l'appréciation de la fonction respiratoire chez la souris.

Nous avons donc envisagé trois situations expérimentales extrêmes destinées à éprouver nos équipements dans les conditions qui nous semblaient dignes d'intérêt pour une évaluation respiratoire fonctionnelle.

- Des conditions dites « physiologiques », soit la souris saine en conditions normales et sans pathologie connue.
- Des conditions dites « pathologiques », soit la souris soumise à une infection expérimentalement induite. Pour cela nous avons envisagé deux modèles bien connus du laboratoire car causant des maladies différentes chez la souris et des lésions localisées différemment au regard de l'anatomie du tractus respiratoire.
- Des conditions permettant une comparaison de l'efficacité de deux traitements, soit deux groupes de souris soumis à deux traitements différents à la suite d'une infection expérimentale attendue létale pour celles-ci.

Nous avons dessiné et réalisé trois études.

ETUDE 1:

Notre première étude a permis d'établir les conditions optimales à réunir avec le *CO-uptake monitor* pour assurer la répétabilité des mesures à réaliser par la suite, notamment : le délai idéal entre deux mesures successives (minimum 24 heures); la durée de la mesure (60 secondes en présence du CO) et

l'absence d'influence d'un éventuel rythme circadien préexistant sur nos mesures. Les principaux facteurs d'influence : la souche murine choisie, l'âge des souris et le genre des souris ont été testés et évalués. Il importe donc d'en tenir compte lors de nos mesures à visée diagnostique.

Il ressort de cette première étude que la mesure des paramètres respiratoires issus de la technique du CO₂-uptake (CO^{up} et valeurs calculées sCO^{up} et sCO^{Met}) permettent de définir des profils spécifiques liés aux caractéristiques de la souris saine testée et permettent *in fine* de caractériser un individu et d'objectiver sa situation respiratoire au moment du test.

Nous avons donc bien rencontré un premier objectif visé, car nos résultats ont indiqué que les mesures réalisées étaient fiables, répétables et suffisamment sensibles pour l'application souhaitée.

ETUDE 2:

Notre deuxième étude a tenté d'établir l'apport spécifique de techniques d'évaluation fonctionnelle respiratoire non-invasive (CO-uptake et pléthysmographie) dans deux situations pathologiques distinctes : i) une maladie à la suite d'une infection expérimentalement induite, à l'aide du Respirivirus Murin et ii) une maladie à la suite d'une infection expérimentalement induite, à l'aide de plusieurs virus Influenza A H5N2 présentant différentes étapes dans leur processus de murinisation.

Dans cette étude, les mesures réalisées par pléthysmographie barométrique en chambre double ont permis sur le plan lésionnel la mise en évidence et la caractérisation fonctionnelle objective des conséquences de lésions localisées plutôt dans les voies respiratoires profondes. Leur association avec la mesure du CO^{up} a permis précisément dans cette situation de donner des indications de dysfonction pathologique (par une chute brutale des valeurs), précédemment à la mort des souris testées. Notre combinaison d'équipements a prouvé sa contribution dans l'investigation fonctionnelle dans le cadre de la caractérisation d'un état pathologique respiratoire, tout en bénéficiant de sa caractéristique primordiale, notamment le caractère non-invasif.

Notre étude a démontré que l'association de deux outils de mesures respiratoires chez la souris permettaient la discrimination entre une maladie superficielle (restreinte aux voies respiratoires majoritairement) et une maladie profonde (étendue lésionnelle atteignant les alvéoles respiratoires) ; ou la distinction entre l'absence de maladie (souris à J0 PI) et la maladie en phase aiguë (souris à J 5 PI).

Nous avons atteint notre deuxième objectif , soit de démontrer que l'association des deux techniques à savoir la mesure de pléthysmographie barométrique en chambre double et la mesure du CO-uptake chez la souris étaient complémentaires et apportaient une plus-value diagnostique dans l'évaluation fonctionnelle respiratoire chez la souris en situation pathologique.

ETUDE 3:

Notre troisième étude a considéré l'apport spécifique des techniques d'évaluation fonctionnelle respiratoire non-invasive dans le cadre d'une comparaison thérapeutique établie entre deux groupes de souris soumis à une infection expérimentale létale respiratoire due à Influenza A H5N2 murinisé.

Pour réunir les conditions préalables à cette étude, nous avons dû mettre au point les modèles à étudier et choisir les conditions expérimentales.

Afin de mettre au point les deux situations thérapeutiques à comparer de notre étude, nous avons dû préalablement :

- Choisir avec soin le challenge viral à soumettre et le virus propice à notre étude
- Choisir les doses (charge virales et dosage des traitements) à administrer
- Choisir une fenêtre d'observation compatibles avec notre équipement et la pathogénie envisagée
- Choisir un couple de traitements, l'un pertinent et efficace, l'autre non pertinent pour cette étude.

Au terme de nos expériences d'orientation (Tables A à D), le virus Influenza A (H5N2) murinisé titrant $3,25 \cdot 10^5$ PFU/ml, a été utilisé à une dose équivalente à deux fois la dose létale ($2 \times DL_{50}$). Deux anticorps monoclonaux reconnaissant un épitope conformationnel hautement constant, au milieu de la tige de l'hémagglutinine H2 (mAb MD1 et mAb BF7) ont été sélectionnés. Nous avons choisi la souche CD-1 de souris pour nos expériences.

Nous avons donc conçu notre « paire clinique » expérimentale à savoir : une infection à influenza A, H5N2 murinisé et un traitement à l'aide d'une associations de deux anticorps monoclonaux, anti section H2 de l'hémagglutinine H5 (mAb MD1 et mAb BF7). En faisant appel à un placebo (mAb BoHV-4), nous pouvions dès lors imaginer une infection virale respiratoire induite chez la souris et son traitement supposé efficace ainsi que la corolaire de cette situation avec un traitement inefficace.

Nous avons pu prouver la bonne conception et le bon déroulement de notre modèle car en administrant les anticorps monoclonaux mAb MD1 et mAb BF7 par voie intrapéritonéale en dose unique, cela 24 heures avant une infection attendue létale par voie intranasale du virus Influenza A H5N2 murinisé, nous avons pu observer une réduction de la mortalité, une réduction significative de la perte de poids, une

réduction des lésions pulmonaires constatées par histopathologie, une diminution de la charge virale pulmonaire (titre viral et immunohistopathologie) et une diminution dans la production des cytokines inflammatoires chez les souris traitées.

Notre étude a fourni des preuves concordantes, permettant de suggérer que la tige de l'hémagglutinine était une cible potentielle pour la prévention des effets létaux d'une infection par H5N2 murinisé et que notre association d'anticorps monoclonaux mAb MD1 et mAb BF7 constituait un agent préventif efficace *in vivo*.

Selon nos attentes, les souris ont développé des maladies dont la sévérité différait dans les deux groupes. Cette sévérité a été ensuite évaluée en prenant en compte d'abord séparément et ensuite globalement les observations faites sur les poumons, siège suspecté des lésions. Les mesures qui ont été réalisées ont été : un suivi de la mortalité (suivi de l'atteinte des points limites), un examen anatomopathologique, un examen histopathologique, une détection par immunohistochimie, la mesure de la charge virale pulmonaire et une quantification des cytokines des tissus pulmonaires.

Pour des raisons techniques expliquées précédemment dans ce manuscrit (notamment l'annonce de Columbus sur l'équipement du CO-uptake monitor®) les mesures de pléthysmographie et de CO-uptake n'ont pu être réalisées durant cette 3^{ème} étude.

A l'analyse des résultats déjà obtenus lors de la validation des équipements de pléthysmographie barométrique en chambre double (102, 223, 273), lors de notre validation de la technique de CO-uptake (74, 406) (Etude 1) et les résultats obtenus en situation pathologique (Etude 2, parties 1 et 2, notamment Tab 26 et 27), nous avons raisonnablement pu émettre des hypothèses sur les attendus de l'association de la pléthysmographie et de la mesure du CO-uptake dans un contexte de comparaison thérapeutique de deux traitements tel que formulé dans notre étude 3.

Nous avons résumé ces hypothèses ainsi :

- Les mesures de pléthysmographie et de CO-uptake, bien qu'ayant nécessité une préparation, une acclimatation des animaux et leur mise en place, celles-ci ont prouvé leur facilité d'utilisation (Tab. 11).
- Les mesures par pléthysmographie et par CO-uptake, réalisées dans des conditions standardisées ont été en mesure de caractériser l'état fonctionnel respiratoire chez la souris (Etude 1, notamment le tableau 20).
- Bien que nécessitant encore des travaux complémentaires (difficiles à mettre en place dorénavant pour le CO-uptake), les techniques d'investigations fonctionnelles respiratoires dans ce travail, utilisées

de manière combinée ont été en mesure de discriminer plusieurs états pathologiques de la fonction respiratoire chez la souris (Etude 2, notamment les tableaux 26 et 27).

- L'utilisation de techniques non-invasives telles que présentées, permettrait de pouvoir répéter les mesures sur les mêmes animaux au sein du même protocole. L'accumulation ainsi de données permettrait, la consolidation et la confirmation des résultats sans utiliser plus d'animaux (Tab. 10).
- Une altération fonctionnelle respiratoire ayant été systématiquement observée avant la mort des animaux de l'expérience (Etude 2 partie 1, Tab. 26), on pourrait déduire que lorsque la technique serait éprouvée, il serait envisageable de déterminer des points limites ne nécessitant pas la mort des souris.

Tous ces éléments nous ont poussé à croire que l'apport des techniques d'investigations fonctionnelles respiratoires ne pouvait être que bénéfique dans le cadre d'une étude de comparaison de l'efficacité de deux traitements telle que formulée ici. Cette situation, bien qu'ayant bénéficié de plusieurs indications favorables dans l'ensemble de ce travail, n'a pu être réalisée et nécessite encore d'être confirmée.

Dans les limites de notre hypothèse, notre association d'équipements aurait été en mesure de rencontrer les objectifs attendus, à savoir permettre une discrimination entre le groupe d'animaux traités (immunisation passive) et le groupe témoin, soumis tous deux à un challenge viral létal tel que décrit. De tels résultats nous ont paru accessibles en associant les techniques de pléthysmographie et de mesure du CO-uptake, constituant ainsi une évaluation de l'efficacité du traitement envisagé.

En outre, le raffinement potentiellement apporté, notamment l'aspect non-invasif, la capacité de comparaison des souris, la rapidité d'évaluation diagnostique, la réduction du recours à des points limites extrêmes sont autant d'atouts supplémentaires qui auraient permis d'évaluer rapidement et de manière non-invasive l'efficacité d'un traitement.

En conclusion, nos expériences fournissent un faisceau de preuves concordantes et suffisantes prouvant une plus-value diagnostique apportée par l'usage de la technique de CO-uptake en complément de la technique de pléthysmographie barométrique en chambre double chez la souris de laboratoire. Malgré que nos expériences ont encore besoin d'ajustements et d'expériences complémentaires pour conforter nos hypothèses, elles apportent une réelle évolution dans l'exploration et l'analyse de la fonction respiratoire chez la souris.

PERSPECTIVES

Au terme de ce travail plusieurs pistes d'amélioration peuvent être envisagées :

- Il serait bénéfique de tester notre association d'équipements (pléthysmographie et CO-uptake) dans un contexte de comparaison de traitements , ceci afin de confronter et étayer nos hypothèses. Cette situation, bien que bénéficiant de plusieurs indications favorables au cours de ce travail, n'a pu être clairement expérimentée et nécessite encore d'être confirmée.
- Le raffinement que potentiellement peut apporter cette association d'équipements serait à investiguer plus largement. Ainsi, il serait possible de réduire le recours à des points limites extrêmes.
- Il serait possible également de réduire la durée des challenges viraux à une période de quelques jours post-infection ou éventuellement de réduire l'âge des souris en mesure d'être évaluées.
- Exploiter les caractéristiques de cette association d'outils, telles que l'aspect non-invasif, la capacité de comparaison des souris, la rapidité d'évaluation diagnostic et sa facilité relative d'utilisation. Ce sont autant d'atouts susceptibles de faciliter l'évaluation respiratoire chez la souris.

Des travaux complémentaires à ce travail permettraient d'affiner les conditions de réalisations des mesures, de décrire plus précisément un protocole standardisé optimal pour utiliser l'association d'équipements décrite dans ce travail.

Aujourd'hui une telle démarche, compte tenu de l'annonce de Columbus, nécessiterait préalablement la validation d'un nouvel appareillage susceptible de mesurer le CO-uptake chez la souris. Une revue actualisée de la littérature serait alors indispensable afin de rassembler les caractéristiques techniques nécessaires

Par exemple, un appareillage tel que le *Micro-Oxymax respirometer*® de Columbus Ins® (Fig. 44) pourrait s'avérer un bon candidat d'essai. Un équipement de ce type ou équivalent serait dès lors à tester et à valider, ainsi que son éventuelle combinaison avec le pléthysmographe barométrique en chambre double comme suggéré dans notre étude, avant de procéder à de nouvelles recherches.



Figure 44 : *Micro-Oxymax respirometer*® développé par Columbus Instruments®, candidat potentiel de remplacement du *CO uptake monitor*®. Le système *Micro-Oxymax*® de Columbus Instruments® est décrit comme un « respiromètre » en circuit fermé. Le système mesure en permanence la concentration des gaz contenus dans un espace fermé dans lequel l'animal éveillé respire. La détection périodique de la concentration de chaque gaz (plusieurs gaz sont possibles), associée à une mesure du volume de cet espace, permet de calculer les valeurs incrémentielles et accumulées liées à la consommation ou la production de ces gaz. Le système peut être configuré pour 6 gaz (l'oxygène, le dioxyde de carbone, le méthane, le monoxyde de carbone, le sulfure d'hydrogène et l'hydrogène) et surveiller jusqu'à 80 chambres séparément. Source: Site interne de Columbus Ins®.

ARTICLE PUBLIÉ

A critical appraisal of monoxide uptake measurements for the follow-up of experimental respiratory diseases in the laboratory mouse.

<i>Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2009 Vol. 36 No 3, p229-240</i>
--

A Critical Appraisal of Carbon Monoxide Uptake Measurements for the Follow-up of Experimental Respiratory Diseases in the Laboratory Mouse

by Jean-Belt Habyarimana^{1,2}, Thierry Flandre¹, Pedro Faisca, Nicolas Antoine-Moussiaux & Daniel Desmecht

Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium

Summary

Adaptation of double-chamber plethysmography to the laboratory mouse was recently proven to yield stable and reliable pulmonary function values. This approach to investigation of the respiratory function in mice owes its success to its decisive advantages in terms of non-invasiveness, practical implementation and generation of quantitative flow/volume measurements and undisputed airway resistance calculation. When implemented to screen the resistance/susceptibility patterns to pathogens displayed by a panel of mouse inbred strains, the resistance value obtained was indeed able to detect tracheobronchic inflammation and to quantify its severity. However, extension of the pathological process to the most distal parts of the respiratory system did not result in further alteration of resistance, suggesting that its value reflects constraints acting on airflow in the airways rather than pathologic processes located in the more distal parts of the lungs. In this context, we hypothesized that a more exhaustive functional picture could be obtained, still non-invasively, by combining double-chamber plethysmography with carbon monoxide (CO) uptake measurements. The feasibility of CO-uptake measurements in mice was demonstrated and the conditions under which reproducibility can be maximized were defined. Differences linked to strain, somatic growth, and sex were examined and discussed, and reference values in growing male and female conscious and healthy BALB/cBy, SJL/J, C57BL/6, C3H/HeN, DBA/2 and 129/Sv mice were given. Finally, double-chamber plethysmography and CO-uptake values were proven to be exquisitely complementary in assessing and dissecting the functional impact of Sendai virus pneumonia in the laboratory mouse.

Introduction

Mice have become a permanent part of biomedical research laboratories (Malakoff, 2000). They owe this success to the low costs incurred, the existence of thousands of inbred strains and the fact that the mouse is the species with the greatest density of known genetic markers which facilitates the tracing of the alleles partly or wholly responsible for

complex phenotypes (Malo & Skamene, 1994). In this respect, numerous recent examples in both pulmonary toxicology (Kleeberger et al, 1997) and physiology (Tankersley et al, 1998) or in the field of asthma (De Sanctis et al, 1999) and infectious diseases (Fortier et al, 2005) clearly demonstrate that in the future there will be a constantly increasing need for practical and fast respiratory function investigative techniques yielding accurate results independent of external factors. In this area, there is the classical physiological approach based on the analysis of transpulmonary pressure and nasal flow. This gold standard provides values relating to ventilatory mechanics (compliance and resistance) that are invaluable in terms of understanding and quantifying the phenomena involved. Unfortunately, the

*Correspondence: Pr. Daniel Desmecht
Dept. of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Liège, Sart-Tilman B43, B-4000 Liège,
Belgium
Tel. +32 4 366 4075
Fax +32 4 366 4565
E-mail daniel.desmecht@ulg.ac.be

¹Both authors contributed equally to the study.

use of this approach implies anaesthesia, intubation, pleural catheterisation and artificial ventilation, all of which are procedures that generate significant artefacts (Chong *et al*, 1998 ; Glaab *et al*, 2001). Moreover, it is clearly not possible to consider screening a large number of animals in this way, and this approach provides single-point measurements which do not allow follow-up studies.

A second option is to use the low-frequency forced oscillation technique (LFOT), which has been recently validated in mice (Gomes *et al*, 2000 ; Petak *et al*, 2001). It provides direct, separate and high-grade assessment of airway and tissue mechanics but, unfortunately, also implies the use of an anaesthetised, intubated and artificially ventilated mouse preparation.

The third option is to use single-chamber barometric plethysmography, whereby the respiratory function is assessed on the basis of the characteristics of the pressure wave generated by respiration in a chamber in which the animal can move around (Mortola & Frappell, 1998). This approach to investigation of the respiratory function in mice owes its success to its decisive advantages in terms of practical implementation (quick and easy) and its specific features (no artefacts linked to anaesthetic and invasive manipulations). In addition, it enables prolonged and/or repeated measurements over time and provides a bronchoconstriction index (known as *enhanced pause* or *Penh*). However, this technique has a number of defects : the variability between respiratory cycles is high (Hamelmann *et al*, 1997), the current volumes measured cannot be quantitatively compared (Enhorning *et al*, 1998) and the interpretation of *Penh* as a measure of airway resistance to airflow is the subject of intensive debate (Gelfand & Irvin, 1998; Mitzner & Tankersley, 1998).

Recently, adaptation of double-chamber plethysmography (DCP) to the laboratory mouse was proven to yield stable and reliable pulmonary function values (Flandre *et al*, 2003). This technique combines the advantages of single-chamber plethysmography with true quantitative flow/volume measurements and a calculated resistance the interpretation of which in

terms of bronchoconstriction is not disputed. We have successfully implemented DCP to screen the resistance/susceptibility patterns to Sendai virus and to respiratory syncytial virus displayed by a panel of mouse inbred strains (Faisca *et al*, 2005 ; Bui Tran Anh *et al*, 2006). The structure/function correlations that were established in both studies have shown that the calculated resistance was indeed able to detect tracheobronchic inflammation and to quantify its severity. Conversely, extension of the pathological process to the most distal parts of the respiratory system did not result in further alteration of resistance, which suggests that the calculated resistance mostly reflects the constraints acting on airflow in the large airways. In other words, the resistance value yielded by DCP can be quantitatively similar in mice with tracheobronchitis and in mice with both tracheobronchitis and diffuse pneumonitis. In this context, we hypothesized that a more exhaustive functional picture could be obtained non-invasively by combining DCP with carbon monoxide (CO) uptake measurements. The purpose of this work was to assess the feasibility of CO uptake measurements in mice, in particular by defining conditions under which reproducibility can be maximized. Differences linked to strain, somatic growth, and sex were then examined, yielding reference values in growing male and female conscious and healthy BALB/cBy, SJL/J, C57BL/6, C3H/HeN, DBA/2 and 129/Sv mice. Finally, DCP and CO-uptake measurements were proven to be exquisitely complementary in assessing the functional impact of Sendai virus pneumonia in the laboratory mouse.

Materials and Methods

Animals

Twenty specific pathogen free ~6-wk old male and female (1:1) mice from each of six different inbred strains (BALB/cBy, DBA/2, 129Sv, SJL, C3H/HeN and C57BL/6) were obtained from Charles River Laboratories. These strains had been chosen deliberately because they originated from different lineages, as deduced from genealogical and phylogenetic data (Atchley and Fitch, 1991). The animals

were kept under standard housing conditions (22°C, light/dark cycle 12/12 hours), fed a commercial diet, and given water *ad libitum*. In order to enable them to gradually become accustomed to the experimental environment, the mice were placed in the equipment described below for 15 minutes every day starting 3 days before the first measurement. After the final measurement had been taken when the mice were 13-wk old, BALB/cBy, DBA/2 and 129Sv mice were enrolled in the Sendai virus (SeV) study and the other mice were euthanized by an intraperitoneal overdose of sodium pentobarbital. All the serological analyses carried out at post mortem proved negative for the most common murine pathogenic agents. Housing, data collection and euthanasia procedures complied with the NIH guidelines and the experimental protocol had been approved by the Bioethics Committee of the University.

Design

The study consisted in three steps. First, within- and between-day reproducibilities of CO-uptake measurements were assessed in 10 healthy BALB/c female mice. Within-day reproducibilities consisted in either 7 consecutive measurements over a 1 hour interval (short-term) or 2 measurements twelve hours apart (long-term). Between-day reproducibility was assessed by comparing values measured daily for 8 consecutive days. Secondly, the effect of somatic growth, strain and sex was investigated by measuring CO-uptake in twenty healthy 6- to 13-wk old mice of each of the 6 aforementioned inbred strains for eight consecutive weeks. Finally, twenty mice from each of SeV-resistant (BALB/cBy), -susceptible (DBA/2) and -highly susceptible (129Sv) strains were inoculated with the virus (Faisca *et al*, 2005), and their survival rate, respiratory function and histology was followed for 15 days.

Carbon monoxide uptake

The single chamber Carbon Monoxide Uptake Monitor (Columbus Instruments, model #9811, Columbus, OH) and associated infra-red gas analyzer (CO sensor, model #04062-R2, Columbus Instru-

ments, OH) and dedicated software (CO-uptake and breathing, v1.0, Columbus Instruments, Columbus, OH) non-invasively measures diffusive function of the lung epithelium, by measuring rate of carbon monoxide uptake and respiration rate (Fig. 1B). The principle of measurement is based on the contribution of *Depledge et al* (1981) where the CO level is measured in the animal chamber after exposing the animal for a short period of time (60 sec.) to a gas mixture (78% nitrogen and 20.7% oxygen) with a low level of carbon monoxide (0.28%).

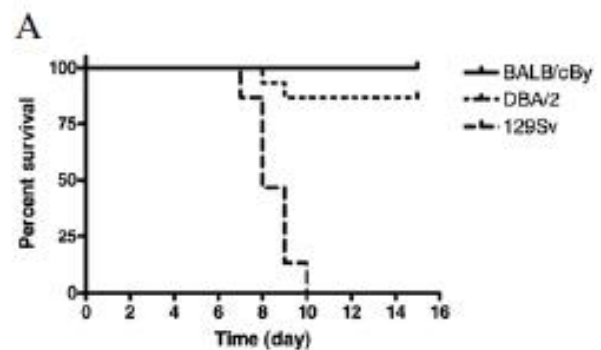


Figure 1. A. Survival of BALB/cBy, DBA/2 and 129Sv mice after Sendai virus challenge. The inoculation procedure consisted of slowly instilling 50 μ l of a viral suspension containing \sim 103 PFUs into the nostrils of the anesthetized mouse.



Figure 1. B. Overview of the equipment, with 2 mice being measured.

Respiratory pattern/mechanics values and lung histology

Besides daily measurement of CO-uptake, respiratory pattern/mechanics values were measured with

the two-chambered, whole body plethysmograph devised by Buxco (model no. PLY-3351), using the practical procedures, quality controls, raw data processing, and respiratory flow curve analysis that were validated previously (Flandre *et al*, 2003). Seven days post-inoculation (pi), five mice per strain were overdosed with pentobarbital sodium and were exsanguinated by cutting the renal artery. Their lungs were inflated with with 4% formalin under a pressure of ~3 kPa for 24 h and then processed, along with pieces of nasal turbinates/trachea, as for routine histopathological examination.

Statistical analysis

Assessment of reproducibility provided three sets of data measured in BALB/c mice over a period of 8 days. One-way ANOVA corrected for repeated measurements was used to refute/establish reproducibility between trials. The 120 mice enrolled in the studies dedicated to the effect of somatic growth, strain and sex provided 8 sets of data measured at one-week intervals when the mice were between 6 and 13 weeks old. Three-way ANOVA corrected for repeated measurements was used to establish the statistical significance of differences in terms of age, sex and strain groups. If significant differences among trials/groups were obtained by using the ANOVA, Student's *t* tests on least square means were used to differentiate the differences between groups. Within each infected strain, consecutive means of functional values were analyzed by performing the general linear model procedure. Between-days comparisons were then made by using Dunnett's *post hoc* test. Comparisons that yielded *P* values of <0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed with SAS-STAT (SAS Inst. Corp., 1989).

Results

Healthy mice

By repeating all the stages of the investigative procedure (capture, insertion in the chamber, closing of the chamber, injection of the CO bolus and 1-min measurement), the mice were able to gradually

grow accustomed to the conditions of the experiment. The number and intensity of the excitation phases fell sharply from the second session onward. At the same time, the regularity of the respiratory rate gradually improved. From the third session onward, all signs of discomfort and anxiety had disappeared. Repeating CO-uptake measurements at short-term intervals resulted in a steep decrease of the values obtained (Table 1).

Table 1. Effect of successive measurements on CO-uptake values in the healthy mouse (BALB/c females)

Time	CO ^{sp} (µl/min)	sCO ^{sp} (µl/min.g)
T0	32,5 ± 5,6 ^a	1,8 ± 0,3 ^a
T0 + 7 min.	14,2 ± 3,9 ^{bd}	0,8 ± 0,2 ^{bd}
T0 + 15 min.	10,9 ± 1,4 ^{bc}	0,6 ± 0,1 ^{bc}
T0 + 20 min.	8,8 ± 0,8 ^c	0,5 ± 0,1 ^c
T0 + 30 min.	9,6 ± 2,1 ^c	0,5 ± 0,1 ^c
T0 + 45 min.	14,7 ± 2,0 ^d	0,8 ± 0,1 ^d
T0 + 60 min.	15,6 ± 1,3 ^d	0,9 ± 0,1 ^d

CO^{sp} and sCO^{sp}, CO-uptake and specific CO-uptake. Values are means ± SD. Means with different letters are significantly different (*P* < 0,05).

Table 2. Intra-day reproducibility of CO-uptake values in the healthy mouse (BALB/c females)

Time	CO ^{sp} (µl/min)	sCO ^{sp} (µl/min.g)
9:00, am	32,7 ± 5,4 ^a	1,8 ± 0,3 ^a
9:00, pm	30,4 ± 4,1 ^a	1,7 ± 0,2 ^a

CO^{sp} and sCO^{sp}, CO-uptake and specific CO-uptake. Values are means ± SD. Means were not significantly different (*P* > 0.05).

Conversely, successive measurements made at 12- (Table 2) or 24-hour (Table 3) intervals were not significantly different, thus excluding any circadian rhythmicity and validating the procedure for experi-

Table 3. Between-day reproducibility of CO-uptake values in the healthy mouse (BALB/c females)

Day	CO ^{up} ($\mu\text{l}/\text{min}$)	sCO ^{up} ($\mu\text{l}/\text{min.g}$)
I	29,1 \pm 8,2 ^a	1,3 \pm 0,8 ^a
I + 1	29,6 \pm 6,0 ^a	1,8 \pm 0,4 ^a
I + 2	30,7 \pm 4,7 ^a	1,8 \pm 0,3 ^a
I + 3	28,1 \pm 3,6 ^a	1,7 \pm 0,2 ^a
I + 6	28,6 \pm 6,1 ^a	1,7 \pm 0,3 ^a
I + 8	28,1 \pm 4,7 ^a	1,6 \pm 0,3 ^a
I + 9	29,3 \pm 6,6 ^a	1,7 \pm 0,4 ^a
I + 10	31,8 \pm 5,6 ^a	1,8 \pm 0,3 ^a

CO^{up} and sCO^{up}, CO-uptake and specific CO-uptake. Values are means \pm SD. Means were not significantly different ($P > 0,05$).

mental designs in which daily measurements are needed. Generally speaking, the statistical analyses demonstrated that somatic growth, sex, and strain had a significant effect on the CO uptake of healthy mice. Males extracted more CO than females, but these latter had significantly better extraction capacities per unit of body weight (Table 6).

Table 4. Strain-specific CO-uptake values among six inbred laboratory mouse lines

Strain	CO ^{up} ($\mu\text{l}/\text{min}$)	sCO ^{up} ($\mu\text{l}/\text{min.g}$)
129Sv	38,2 \pm 8,5 ^d	1,6 \pm 0,3 ^b
BALB/cBy	35,8 \pm 6,6 ^c	1,5 \pm 0,3 ^b
C3H/HeN	31,6 \pm 5,0 ^{ab}	1,4 \pm 0,2 ^a
C57BL/6J	33,2 \pm 6,6 ^b	1,6 \pm 0,3 ^{bc}
DBA/2	35,9 \pm 6,0 ^c	1,7 \pm 0,3 ^c
SJL/J	30,2 \pm 7,5 ^a	1,4 \pm 0,3 ^a

CO^{up} and sCO^{up}, CO-uptake and specific CO-uptake. Values are strain-specific least square means \pm SD. Means with different letters are significantly different ($P < 0,05$).

The age distribution profile of the CO-uptake absolute values obtained from growing mice displayed

a quasi-unimodal shape centered on 9 weeks, whereas relative values (per g body weight) showed a quasi-linear decrease between 6 and 13-wk old mice (Table 5). Absolute CO-uptake values were very variable among strains, but three categories were clearly delineated when relative values were

Table 5. Effect of somatic growth on CO-uptake values in the laboratory mouse

Age	CO ^{up} ($\mu\text{l}/\text{min}$)	sCO ^{up} ($\mu\text{l}/\text{min.g}$)
6 weeks	32,5 \pm 6,7 ^a	1,6 \pm 0,3 ^a
7 weeks	34,6 \pm 7,8 ^{ab}	1,6 \pm 0,4 ^a
8 weeks	34,8 \pm 8,1 ^{ab}	1,6 \pm 0,3 ^a
9 weeks	35,8 \pm 7,7 ^b	1,5 \pm 0,3 ^{ab}
10 weeks	33,7 \pm 7,5 ^{ab}	1,4 \pm 0,3 ^{abc}
11 weeks	34,4 \pm 7,0 ^{ab}	1,5 \pm 0,3 ^{ab}
12 weeks	34,6 \pm 6,8 ^{ab}	1,5 \pm 0,3 ^{abc}
13 weeks	32,8 \pm 6,4 ^a	1,4 \pm 0,2 ^c

CO^{up} and sCO^{up}, CO-uptake and specific CO-uptake. Values are age-specific least square means \pm SD. Means with different letters are significantly different ($P < 0,05$).

Table 6. Effect of gender on CO-uptake values in the laboratory mouse

Sex	CO ^{up} ($\mu\text{l}/\text{min}$)	sCO ^{up} ($\mu\text{l}/\text{min.g}$)
Female	31,4 \pm 5,6 ^a	1,6 \pm 0,3 ^a
Male	36,8 \pm 7,7 ^b	1,4 \pm 0,3 ^b

CO^{up} and sCO^{up}, CO-uptake and specific CO-uptake. Values are sex-specific least square means \pm SD. Means with different letters are significantly different ($P < 0,05$).

calculated, with low (SJL, C3H/HeN), medium (BALB/c, 129Sv, C57BL/6) and high (DBA/2) CO extractors (Table 4).

Diseased mice

Percent survival (Fig. 1A), double chamber plethys-

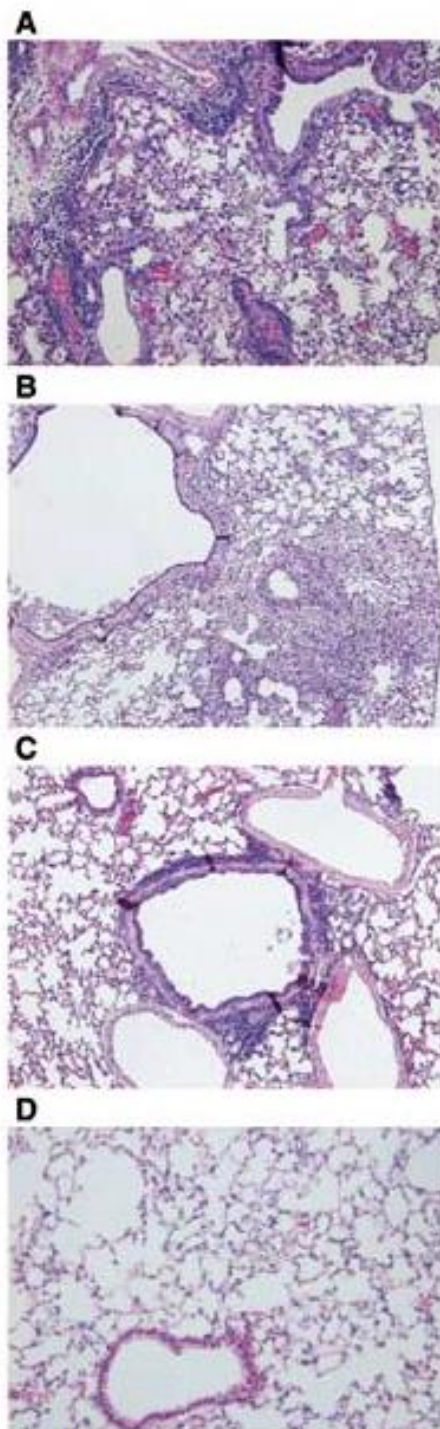


Figure 2. Effect of the mouse strain on the lung histology. H&E-stained sections of the lung from a BALB/cBy (A), a DBA/2 (B) and a 129Sv (C) mouse showing typical histological alterations observed on day 7 after infection (original magnification 40x). A noninfected control lung is shown (D). See text for detailed description.

mographic and CO-uptake values (means \pm SD) during SeV-associated disease are presented (Table 7) along with day 7 pi typical lung photomicrographs of each strain (Fig. 2). None of the BALB/c, two of the DBA/2 (on days 8 and 9 pi) and all 129Sv (on days 7, 8 and 9 pi) inoculated mice died spontaneously during the experiment. As far as the BW (body weight) was concerned, two trends were distinguishable. The first (129Sv and DBA/2) was a gradual decrease in BW from day 2 pi (DBA/2) or day 4 pi (129Sv), which peaked in 129Sv on day 7 pi with a weight loss of 20%. The second (BALB/c) was stable BW with a slight decrease of around 5% at day 7. Regarding the respiratory pattern, each strain reacted in a specific manner to infection. In 129Sv, the MV (minute volume) remained stable throughout the experiment, but breathing was faster and shallower on and after day 3 pi. In DBA/2, MV evolution was bell-shaped: increase from day 4 to day 6, and return to normal on day 7 pi. The MV increase was achieved through faster and shallower breathing, and the decrease through lowering of RR (respiratory rate) without restoration of the initial TV (tidal volume). In BALB/c, the MV level remained stable throughout the experiment, via a stable RR/TV combination. As far as respiratory mechanics were concerned, and in particular Sraw (specific airway resistance), two categories became apparent. In 129Sv and DBA/2, Sraw increased on day 3 pi and then stabilised at approximately 175-200% of its initial value. In BALB/c, there was no detectable change in the Sraw. CO-uptake values also revealed two distinct groups: DBA/2 and BALB/c on the one hand, in which CO-extraction remained constant throughout the experiment, and 129Sv on the other, in which it significantly dropped on day 7 pi ($P < 0.05$).

Nasal turbinates and tracheae displayed very subtle changes, consisting of degeneration of individual epithelial cells and infiltration of some neutrophils in the *lamina propria*. Three strain-specific histological profiles of the lungs were clearly identified on the basis of quantitative and qualitative criteria. There was little difference between the first histo-

Table 7. Effect of the mouse strain on respiratory functional values after Sendai virus infection.

Value	Strain	Time							
		Day 1		Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
		bi	pi	pi	pi	pi	pi	pi	pi
RR	BALB/cBy	253±2 ^a	246±32 ^a	262±22 ^a	261±18 ^b	287±18 ^c	271±22 ^c	282±57 ^c	277±62 ^c
	DBA/2	224±18 ^a	219±13 ^a	221±15 ^a	368±61 ^b	410±44 ^c	394±31 ^c	375±27 ^{bc}	353±41 ^b
	129Sv	221±22 ^a	205±13 ^a	217±10 ^a	280±27 ^b	335±32 ^c	328±37 ^c	348±36 ^c	338±54 ^c
MV	BALB/cBy	50±7 ^a	46±8 ^a	45±5 ^a	47±4 ^a	52±9 ^a	51±8 ^a	51±8 ^a	51±10 ^a
	DBA/2	53±9 ^a	48±3 ^a	47±7 ^a	59±17 ^a	68±10 ^b	64±6 ^b	68±12 ^b	55±9 ^a
	129Sv	58±8 ^a	49±7 ^a	53±6 ^a	62±3 ^a	61±9 ^a	63±6 ^a	58±8 ^a	59±16 ^a
sRaw	BALB/cBy	1.18±0.4 ^a	1.13±0.4 ^a	0.97±0.3 ^a	1.22±0.4 ^a	1.30±0.4 ^a	1.40±0.3 ^a	1.12±0.3 ^a	1.19±0.3 ^a
	DBA/2	1.08±0.3 ^a	0.92±0.2 ^a	0.98±0.3 ^a	1.80±0.7 ^b	2.14±0.6 ^{bc}	2.25±0.6 ^c	1.68±0.4 ^b	1.63±0.4 ^b
	129Sv	1.09±0.6 ^a	1.00±0.3 ^a	1.18±0.3 ^a	1.38±0.3 ^{ab}	1.54±0.3 ^b	1.49±0.4 ^b	1.48±0.4 ^b	1.70±0.3 ^b
CO-uptake	BALB/cBy	29.9±7.1 ^a	31.3±4.2 ^a	34.3±4.9 ^a	31.1±5.5 ^a	30.9±6.7 ^a	29.8±2.6 ^a	31.5±3.3 ^a	31.3±5.5 ^a
	DBA/2	32.1±4.7 ^a	34.6±7.7 ^a	34.2±3.5 ^a	29.7±4.8 ^a	30.4±5.0 ^a	29.2±7.6 ^a	29.9±4.7 ^a	31.4±5.1 ^a
	129Sv	30.8±6.5 ^a	29.9±4.3 ^a	31.4±5.1 ^a	30.1±4.1 ^a	29.6±5.3 ^a	27.7±3.3 ^a	29.5±4.5 ^a	26.8±5.2 ^b

Values are means ± SD for female mice. Units are breath/min (RR), ml/min (MV), cmH₂O/s (sRaw) and µl/min (CO-uptake). RR, respiratory rate; MV, minute volume; sRaw, specific airway resistance; bi, before inoculation; pi, post-inoculation. Within each strain, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

logical profile (BALB/cBy) and the normal morphology of murine lungs. The airways almost never contained exudate, their epithelium appeared generally intact, with the exception of a few isolated losses of ciliation and a few areas of epithelial hyperplasia, slight but definite. The *lamina propria* only contained a few non-coalescent foci of infiltration by mononucleated cells. All alveolar spaces were empty, with the exception of a few macrophages, the density of which was comparable to that observable in a healthy lung. In the interstitium, cell density appeared slightly elevated, multifocally. The histopathological diagnosis most compatible with these observations was *slight mononuclear broncho-bronchiolitis*.

The second histological lung profile was that displayed by DBA/2 mice. Airway lumina and alveolar spaces systematically contained a similar exudate. This was a mixture of cell debris, epithelial cells, pleiomorphic lymphoid cells, neutrophils and morphologically altered macrophages (cytoplasmic vacuolation, pycnosis, caryorhexis). The epithelial

lining always exhibited large areas of deciliation alternating with degeneration, necrosis, desquamation and marked hyperplasia with uneven thicknesses and cell arrangements. The *lamina propria* was infiltrated by numerous monocytoïd or lymphoid cells with round nuclei, which generated so-called "peribronchial/olar and perivascular cuffing" images. Most of the alveolar spaces were optically empty, but groups of alveoli were systematically observed which contained the exudate described above. In general, these alveolar clusters were adjacent to an airway and tended to merge, giving the impression of invading the more peripheral spaces gradually. Overall, the number of alveoli concerned filled more than one-third of any lung section area. The lung interstitium, when examined away from the areas of alveolitis, was diffusely infiltrated by cells with round nuclei of the monocytoïd or lymphoid type. The density of the alveolar macrophages was elevated. The histopathological diagnoses most compatible with these observations were *severe necrotising and purulent broncho-bronchiolitis* and

multifocal granulocytic alveolar pneumonia.

The third histological lung profile concerned strain 129Sv. Its specificity mainly related to the extent (diffuse) and type (mononuclear) of distal lesions. The alveolar spaces never contained the exudate described above, and therefore no neutrophils, but contained an extremely high number of macrophages, of which a fraction exhibited regressive alterations (cytoplasmic vacuolation, pycnosis, caryorhexis). Certain areas were noteworthy for the presence of groups of alveoli completely filled with closely packed macrophages. Moreover, the interstitium was very severely infiltrated by cells with round nuclei in a diffuse manner. The histopathological diagnoses most compatible with these observations were *severe bronchioalveolar epithelial hyperplasia* and *diffuse monocytoid interstitial pneumonia*.

Discussion

Judging from the calm and indifference of the animals on the one hand and the stability of the respiratory rate on the other, we concluded that the standardized protocol used for the acclimatization of the mice made it possible to keep the impact of the psychological constraints linked to the manual handling and the discovery of a new environment to a minimum. Obviously, successive measurements of CO-uptake over short periods of time yielded progressively lower values. This phenomenon is compatible with the slow washout kinetics of carboxyhaemoglobin which resulted in a progressive saturation of haemoglobin (Bruce & Bruce, 2006). When the interval between two consecutive measurements was increased to 12 hours, the CO-uptake values became reproducible, even if the second values often tended to be lower than the first. Daily measurements yielded highly reproducible values.

Effect of body weight

As body weight values are strongly dependent on sex, strain, and somatic growth in mice, wrong interpretations could be made if absolute CO-uptake values were considered to detect body weight-independent effects. However, as the relationship be-

tween the mouse body weight and CO-uptake was proven to be linear (Depledge *et al*, 1981; Franko & Sharplin, 1993), a body weight-independent CO-uptake value can be obtained in any mouse by simply dividing the absolute value measured by the corresponding body weight.

Effect of sex

As regards the CO-uptake values, to our knowledge, no significant differences between sexes have ever been reported. We found that female mice extract more CO than males per unit of BW. This difference could theoretically result from better alveolar ventilation and/or perfusion, more diffusion-prone alveolo-capillary membrane or higher blood haemoglobin content. Indeed, weight-specific total lung capacity is larger in the female mouse (Reinhard *et al*, 2002) and rat (Pinkerton *et al*, 1982) and the specific capillary volume as well (Pinkerton *et al*, 1982). Moreover, the female rat possesses larger specific alveolar (1.9 vs. 1.3 mm²/g) and capillary (1.8 vs. 1.3 mm²/g) surface areas than males and the alveolo-capillary interface is thicker in the latter (Pinkerton *et al*, 1982). Finally, in the vast majority of mouse strains that have contributed to the mouse phenome database (<http://phenome.jax.org/>), males were shown to have lower haematocrit and total haemoglobin values.

Effect of strain

Very few mouse CO-uptake values are available in the literature: 1.48 µl/min.g (Depledge *et al*, 1982) and 1.69 µl/min.g (Franko & Sharplin, 1993) in CBA and 1.54 µl/min.g in C57BL/6 animals (Franko & Sharplin, 1993). The C57BL/6-specific least square mean obtained here amounts to 1.57 µl/min.g which is very close to the published value. The ranking of strains in decreasing order of CO-uptake capacity we have obtained (DBA/2 > BALB/c, 129Sv and C57BL/6 > SJL and C3H/HeN) obviously does not parallel that based on blood haemoglobin content (BALB/c > C57BL/6, 129Sv and C3H/HeN > DBA/2 and SJL) (<http://phenome.jax.org/>) which excludes a causal role. Comparative measurements

of the alveolo-capillary interface thickness between strains are not available, but between-strain specific total lung capacities were recently published: C3H/HeN > BALB/c > C57BL/6 > 129Sv (Reinhard *et al*, 2002). The strain C3H/HeN thus seems to combine the larger lungs and the worst CO-extraction ability which is, at first sight, contradictory. However, C3H-derived substrains were proven to have fewer alveoli and much larger alveolar spaces relative to the C57BL/6J animals (Soutiere *et al*, 2004), which could be interpreted as being consistent with the increased lung volumes previously described, the rationale being that larger alveoli are linked to increased lung distensibility, and, thus, indirectly to lung volumes (Haber *et al*, 1983). Although we can only speculate on the impact of this structural factor on C3H/HeN lung function, it is compatible with a reduced alveolar surface area in C3H/HeN compared to other strains, which would explain their lower CO-uptake capacity.

Effect of somatic growth

To our knowledge, the effect of somatic growth on CO-uptake values has not been reported before. We found that the young mouse extracts more CO than the older mouse, per unit of BW. Again, this result is compatible with a series of data previously reported. First, the mouse blood haemoglobin content decreases with age (<http://phenome.jax.org/>). Second, studies conducted in rats have shown that total lung capacity relative to body weight is always greater in the younger than in the older animals, thus indicating disproportionately larger lung volumes in younger animals (Johanson & Pierce, 1973; Mauderly, 1982; Sahebajami, 1991). Finally, somatic growth is accompanied by a progressive thickening of the alveolo-capillary interface in BALB/c animals (Kawakami *et al*, 1984).

Benefits for disease assessment

Specific access to respiratory system function was achieved by monitoring plethysmographic and CO-uptake values. The breathing pattern (RR, TV, MV), respiratory mechanics (sRaw) and CO-uptake values

of BALB/c mice in response to inoculation of SeV remained unchanged throughout the experiment, which shows that the respiratory disease remained totally asymptomatic. DBA/2 and 129Sv differed from BALB/c in that they developed compensatory hyperpnoea via faster breathing and hyperpnoea. Specific airway resistance (sRaw) increased in a parallel fashion in both strains, which points to a diminished cross-section area of the airways (Pennock *et al*, 1979; Flandre *et al*, 2003).

To the best of our knowledge, the partitioning of sRaw between the different segments of the mouse respiratory tree is not available yet, which renders reliable interpretation in terms of location of the source of the problem very speculative. However, it was recently shown that nasal obstruction alone can substantially increase sRaw in mice (Martin *et al*, 1988; Mitzner *et al*, 2001). Because (i) turbinate histology did not differ between BALB/c, DBA/2 and 129Sv, (ii) tracheal and bronchial histological alterations were clearly discriminant between BALB/c on the one hand and the two other strains on the other and (iii) the mouse breathing pattern response typical of nasal irritation (braking of the beginning of expiration) or narrowing was never observed (Gomes *et al*, 2000, Seifert & Mortola, 2002), it is tempting to conclude that the increased sRaw in DBA/2 and 129Sv, results from tracheo-bronchial alterations rather than from superior nasal congestion and/or thickening of the mucosa. Despite roughly similar alterations in respiratory ventilation and mechanics values, DBA/2 and 129Sv animals dramatically differed with respect to CO-uptake, with a significant drop in the latter, which suggests that additional dysfunctions occurred among 129Sv mice, probably a combination of ventilation/perfusion mismatch, intrapulmonary blood shunting and/or impairment of gas diffusion. This specific impairment of CO extraction was paralleled by the development of a diffuse interstitial-type of pneumonia in 129Sv, in which the alveolo-capillary interface was dramatically thickened throughout the lungs, thus impairing diffusion of gases. Moreover, the drop in CO-uptake occurred 1-2 days before

mass mortality was recorded among 129/Sv mice. Conversely, among DBA/2 mice, SeV inoculation caused an alveolar-type of pneumonia, multifocal rather than diffuse, in which the interstitium was not so prominently infiltrated and which caused only marginal mortality.

Taken together, the data therefore suggest that combining double-chamber plethysmography with CO-uptake measurements provide a more exhaustive way to investigate the physiopathology and the evolution of respiratory diseases in the laboratory mouse. In particular, severe plethysmographic profiles like those shared by DBA/2 and 129Sv could be subdivided further into possibly-recovering (DBA/2) and life-threatening (129Sv) categories. Moreover, the data clearly suggest that an experimental pneumonia in the laboratory mouse will be fatal in the next 24-48 hours whenever a drop in CO extraction occurs. This criterion could therefore be used to objectively define the point at which euthanasia is appropriate.

In conclusion, the results presented here lead us to suggest that, when applied to the laboratory mouse, CO-uptake measurement yields a stable and reliable pulmonary function value which gives an early and specific indication of the development of gas exchange- and life-threatening lung damage. This technology is totally non-invasive and the procedure is quick and easy, which makes it possible to examine a large number of animals at the same time or the same animals at several consecutive times, provided a 12-hour interval between successive measurements is allowed. The study also suggests that, whenever this technology is implemented, it is important to use strain-, sex- and age-matched animals. CO-uptake data also provide an objective criterion to define the point at which an experimental disease fatality becomes predictable and euthanasia should therefore be decided.

Acknowledgements

The authors are grateful for the scientific expertise provided by Dominique Cassart, Dao Bui Tran Anh and Benjamin Bondue. Many thanks are also due

to Michaël Sarlet for excellent technical skills and enthusiasm.

References

- Atchley WR, WM Fitch*: Gene trees and the origins of inbred strains of mice. *Science*, 1991, 254, 554-558.
- Bruce MC, EN Bruce*: Analysis of factors that influence rates of carbon monoxide uptake, distribution, and washout from blood and extravascular tissues using a multicompartiment model. *J. Appl. Physiol.*, 2006, 100, 1171-1180.
- Bui Tran Anh DB, P Faisca, D Desmecht*: Differential resistance/susceptibility patterns to pneumovirus infection among inbred mouse strains. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2006, 291, L426-L435.
- Chong BTY, DK Agrawal, FA Romero, RG Townley*: Measurement of bronchoconstriction using whole-body plethysmograph: comparison of freely moving versus restrained guinea pigs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 1998, 39, 163-168.
- De Sanctis GT, A Jiao, YH Lee, TC Haynes, ES Lander, DR Beier, JM Drazen*: Quantitative trait locus mapping of airway responsiveness to chromosomes 6 and 7 in inbred mice. *Am. J. Physiol.*, 1999, 277, L1118-L1123.
- Depledge MH, CH Collis, A Barrett*: A technique for measuring carbon monoxide uptake in mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1981, 7, 485-489.
- Enhorning G, S van Schaik, C Lundgren, I Vargas*: Whole-body plethysmography, does it measure tidal volume of small animals? *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1998, 76, 945-951.
- Faisca P, D Bui Tran Anh, D Desmecht*: Sendai virus-induced alterations in lung structure/function correlate with viral loads and reveal a wide resistance/susceptibility spectrum among mouse strains. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2005, 289, L777-L787.
- Flandre T, P Leroy, D Desmecht*: Effect of somatic growth, strain, and sex on double-chamber

- plethysmographic respiratory function values in healthy mice. *J. Appl. Physiol.*, 2003, *94*, 1129-1136.
- Fortier A, G Min-Oo, J Forbes, S Lam-Yuk-Tseung, P Gros*: Single gene effects in mouse models of host: pathogen interactions. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, *77*, 868-877.
- Franko AJ, J Sharplin*: Assessment of radiation-induced lung injury in mice using carbon monoxide uptake: correlation with histologically visible damage. *Radiat. Res.*, 1993, *133*, 245-251.
- Frith CH, RL Suber, R Umholtz*: Hematologic and clinical chemistry findings in control BALB/c and C57BL/6 mice. *Lab. Anim. Sci.*, 1980, *30*, 835-840.
- Gelfand EW, CG Irvin*: Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography: correspondence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998, *158*, 340-341.
- Glaab T, A Daser, A Braun, U Neuhaus-steinmetz, H Fabel, Y Alarie, H Renz*: Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2001, *280*, L565-573.
- Gomes RFM, X Shen, R Ramchandani, RS Tepper, JHT Bates*: Comparative respiratory system mechanics in rodents. *J. Appl. Physiol.*, 2000, *89*, 908-916.
- Haber PS, HJ Colebatch, CK Ng, IA Greaves*: Alveolar size as a determinant of pulmonary distensibility in mammalian lungs. *J. Appl. Physiol.*, 1983, *54*, 837-845.
- Hamelmann E, J Schwarze, K Takeda, A Oshiba, GL Larsen, CG Irvin, EW Gelfand*: Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997, *156*, 766-775.
- Johanson WG, AK Pierce*: Lung structure and function with age in normal rats and rats with papain emphysema. *J. Clin. Invest.*, 1973, *52*, 2921-2927.
- Kawakami M, JL Paul, WM Thurlbeck*: The effect of age on lung structure in male BALB/cNnia inbred mice. *Am. J. Anat.*, 1984, *170*, 1-21.
- Kleeberger SR, KJ Holroyd, RC Levitt, L Zhang, M Longphre, J Harkema, SM Eleff, DA DiSilvestre*: Linkage analysis of susceptibility to ozone-induced lung inflammation in inbred mice. *Nat. Genet.*, 1997, *17*, 475-478.
- Malakoff D*: The rise of the mouse, biomedicine's model mammal. *Science*, 2000, *288*, 248-253.
- Malo D, E Skamene*: Genetic control of host resistance to infection. *Trends Genet.*, 1994, *10*, 365-371.
- Martin TR, NR Gerard, SJ Galli, JM Drazen*: Pulmonary responses to bronchoconstrictor agonists in the mouse. *J. Appl. Physiol.*, 1988, *64*, 2318-2323.
- Mauderly JL*: The effect of age on respiratory function of Fisher-344 rats. *Exp. Aging Res.*, 1982, *8*, 31-35.
- Mitzner WA, CG Tankersley*: Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography: correspondence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998, *158*, 340-341.
- Mitzner WA, R Brown, W Lee*: In vivo measurement of lung volumes in mice. *Physiol. Genomics* 2001, *4*, 215-221.
- Mortola JP, PB Frappell*: On the barometric method for measurements of ventilation and its use in small animals. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1998, *76*, 937-944.
- Pennock BE, CP Cox, RM Rogers, WA Cain, JH Wells*: A noninvasive technique for measurement of changes in specific airway resistance. *J. Appl. Physiol.*, 1979, *46*, 399-406.
- Peták F, W Habre, YR Donati, Z Hantos, C Barazzone-Argiroffo*: Hyperoxia-induced changes in mouse lung mechanics: forced oscillations vs. barometric plethysmography. *J. Appl. Physiol.*, 2001, *90*, 2221-2230.
- Pinkerton KE, BE Barry, JJ O'Neil, JA Raub, PC Pratt, JD Crapo*: Morphologic changes in the lung during the lifespan of Fischer 344 rats. *Am. J. Anat.*, 1982, *164*, 155-174.

Reinhard C, G Eder, H Fuchs, A Ziesenis, J Heyder, H Schulz: Inbred strain variation in lung function. *Mamm. Genome*, 2002, *13*, 429-437.

Sahebjami H: Lung tissue elasticity during the lifespan of Fischer 344 rats. *Exp. Lung Res.*, 1991, *17*, 887-902.

Seifert EL, JP Mortola: The circadian pattern of breathing in conscious adult rats. *Resp. Physi-*

ol., 2002, *129*, 297-305.

Soutiere SE, CG Tankersley, W Mitzner: Differences in alveolar size in inbred mouse strains. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2004, *140*, 283-291.

Tankersley CG, DA DiSilvestre, AE Jedlicka, HM Wilkins, L Zhang: Differential inspiratory timing is genetically linked to mouse chromosome 3. *J. Appl. Physiol.*, 1998, *85*, 360-365.

Références bibliographiques

PARTIE V RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abed Y, Hardy I, Li Y, Boivin G.** Divergent evolution of hemagglutinin and neuraminidase genes in recent influenza A:H3N2 viruses isolated in Canada. *J Med Virol* 67: 589–595, 2002. doi: 10.1002/jmv.10143.
2. **Abel L, Lap VD, Oberti J, Van Thuc N, Van Cua V, Guilloud-Bataille M, Schurr E, Lagrange PH.** Complex segregation analysis of leprosy in Southern Vietnam. *Genet Epidemiol* 12: 63–82, 1995. doi: 10.1002/gepi.1370120107.
3. **Al Faress S, Cartet G, Ferraris O, Norder H, Valette M, Lina B.** Divergent genetic evolution of hemagglutinin in influenza A H1N1 and A H1N2 subtypes isolated in the south-France since the winter of 2001-2002. *J Clin Virol* 33: 230–236, 2005. doi: 10.1016/j.jcv.2004.11.016.
4. **Alarie Y, Schaper M, Nielsen GD, Abraham MH.** Structure-activity relationships of volatile organic chemicals as sensory irritants. *Arch Toxicol* 72: 125–140, 1998. doi: 10.1007/s002040050479.
5. **Alberts R, Srivastava B, Wu H, Viegas N, Geffers R, Klawonn F, Novoselova N, Zaverucha do Valle T, Panthier JJ, Schughart K.** Gene expression changes in the host response between resistant and susceptible inbred mouse strains after influenza A infection. *Microbes Infect* 12: 309–318, 2010. doi: 10.1016/j.micinf.2010.01.008.
6. **Alcaïs A, Abel L, David C, Torrez ME, Flandre P, Dedet JP.** Evidence for a major gene controlling susceptibility to tegumentary Leishmaniasis in a recently exposed Bolivian population. *Am J Hum Genet* 61: 968–979, 1997. doi: 10.1086/514882.
7. **Aldridge JR, Moseley CE, Boltz DA, Negovetich NJ, Reynolds C, Franks J, Brown SA, Doherty PC, Webster RG, Thomas PG.** TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5306–11, 2009. doi: 10.1073/pnas.0900655106.
8. **Alymova I V., Samarasinghe A, Vogel P, Green AM, Weinlich R, McCullers JA.** A Novel Cytotoxic Sequence Contributes to Influenza A Viral Protein PB1-F2 Pathogenicity and Predisposition to Secondary Bacterial Infection. *J Virol* 88: 503–515, 2014. doi: 10.1128/jvi.01373-13.
9. **Amado-Rodriguez L, Gonzalez-Lopez A, Lopez-Alonso I, Aguirre A, Astudillo A, Batalla-Solis E, Blazquez-Prieto J, Garcia-Prieto E, Albaiceta GM.** Anti-inflammatory effects of clarithromycin in ventilator-induced lung injury. *Respir Res* 14: 52, 2013. doi: 10.1186/1465-9921-14-52.
10. **Andersson RG, Grundström N.** The excitatory non-cholinergic, non-adrenergic nervous system of the guinea-pig airways. [Online]. *Eur J Respir Dis Suppl* 131: 141–57, 1983. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6581977> [10 Aug. 2020].
11. **Anh DBT, Faisca P, Desmecht DJ-M.** Differential resistance/susceptibility patterns to pneumovirus infection among inbred mouse strains. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L426-35, 2006. doi: 10.1152/ajplung.00483.2005.
12. **Appell LH, Kovatch RM, Reddecliff JM, Gerone PJ.** Pathogenesis of Sendai virus infection in mice. [Online]. *Am J Vet Res* 32: 1835–41, 1971. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4330675> [12 Aug. 2020].
13. **Area E, Martin-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortin J.** 3D structure of the influenza virus polymerase complex: Localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 308–313, 2004. doi: 10.1073/pnas.0307127101.
14. **Arikata M, Itoh Y, Shichinohe S, Nakayama M, Ishigaki H, Kinoshita T, Le MQ, Kawaoka Y, Ogasawara K, Shimizu T.** Efficacy of clarithromycin against H5N1 and H7N9 avian influenza a virus infection in cynomolgus monkeys. *Antiviral Res* 171, 2019. doi:

- 10.1016/j.antiviral.2019.104591.
15. **Atchley WR, Fitch WM.** Gene trees and the origins of inbred strains of mice. *Science* (80-) 254: 554–558, 1991. doi: 10.1126/science.1948030.
 16. **Baise E, Pire G, Leroy M, Gérardin J, Goris N, De Clercq K, Kerkhofs P, Desmecht D.** Conditional expression of type I interferon-induced bovine MX1 GTPase in a stable transgenic vero cell line interferes with replication of vesicular stomatitis virus. *J Interf Cytokine Res* 24: 513–521, 2004. doi: 10.1089/jir.2004.24.513.
 17. **Balhara J, Gounni AS.** The alveolar macrophages in asthma: A double-edged sword. *Mucosal Immunol.* 5 *Mucosal Immunol*: 605–609, 2012.
 18. **Baltimore D.** Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* 35: 235–241, 1971. doi: 10.1128/membr.35.3.235-241.1971.
 19. **Baronne R.** Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 6 [Online]. Vigot Malo. <https://www.vigotmaloine.com/anatomie-comparee-des-mammiferes-domestiques-tome-6.html> [7 Aug. 2020].
 20. **Barthold SW, Griffey SM, Percy DH,** editors. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits, Fourth Edition. John Wiley & Sons, Inc.
 21. **Bastacky J, Goerke J.** Pores of Kohn are filled in normal lungs: Low-temperature scanning electron microscopy. *J Appl Physiol* 73: 88–95, 1992. doi: 10.1152/jappl.1992.73.1.88.
 22. **Bates JHT.** CORP: Measurement of lung function in small animals. *J Appl Physiol* 123: 1039–1046, 2017. doi: 10.1152/japplphysiol.00243.2017.
 23. **Bates JHT, Irvin CG.** Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. *J Appl Physiol* 94: 1297–1306, 2003. doi: 10.1152/japplphysiol.00706.2002.
 24. **Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RWH.** Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J* 13: 3158–3165, 1994. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06614.x.
 25. **Baudin F, Petit I, Weissenhorn W, Ruigrok RWH.** In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology* 281: 102–108, 2001. doi: 10.1006/viro.2000.0804.
 26. **Bayer L, Fertey J, Ulbert S, Grunwald T.** Immunization with an adjuvanted low-energy electron irradiation inactivated respiratory syncytial virus vaccine shows immunoprotective activity in mice. *Vaccine* 36: 1561–1569, 2018. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.02.014.
 27. **Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF, Fisher EM.** Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* 24: 23–25, 2000. doi: 10.1038/71641.
 28. **Berli RR, Bauer M, Schmitz N, Buser RB, Gwerder M, Muntwiler S, Renner WA, Saudan P, Bachmann MF.** Prophylactic and therapeutic activity of fully human monoclonal antibodies directed against influenza A M2 protein. *Virology* 6: 224, 2009. doi: 10.1186/1743-422X-6-224.
 29. **Belser JA, Gustin KM, Katz JM, Maines TR, Tumpey TM.** Comparison of traditional intranasal and aerosol inhalation inoculation of mice with influenza A viruses. *Virology* 481: 107–12, 2015. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.041.
 30. **Belser JA, Lu X, Maines TR, Smith C, Li Y, Donis RO, Katz JM, Tumpey TM.** Pathogenesis of avian influenza (H7) virus infection in mice and ferrets: enhanced virulence of Eurasian H7N7 viruses isolated from humans. *J Virol* 81: 11139–11147, 2007. doi: 10.1128/JVI.01235-07.
 31. **Bergmann M, Garcia-Sastre A, Carnero E, Pehamberger H, Wolff K, Palese P, Muster T.** Influenza Virus NS1 Protein Counteracts PKR-Mediated Inhibition of Replication. *J Virol* 74: 6203–6206, 2000. doi: 10.1128/jvi.74.13.6203-6206.2000.
 32. **Berry CM.** Antibody immunoprophylaxis and immunotherapy for influenza virus infection: Utilization of monoclonal or polyclonal antibodies? *Hum. Vaccines Immunother.* 14 Taylor and Francis Inc.: 796–799, 2018.
 33. **Birnkrant D, Cox E.** The Emergency Use Authorization of peramivir for treatment of 2009 H1N1 influenza. *N Engl J Med* 361: 2204–2207, 2009. doi: 10.1056/NEJMp0910479.

34. **Bitzer M, Armeanu S, Lauer UM, Neubert WJ.** Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J. Gene Med.* 5 J Gene Med: 543–553, 2003.
35. **Bomsel M, Alfsen A.** Entry of viruses through the epithelial barrier: Pathogenic trickery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 Nat Rev Mol Cell Biol: 57–68, 2003.
36. **Boni MF.** Vaccination and antigenic drift in influenza [Online]. *Vaccine* 26 Suppl 3: C8-14, 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18773534>.
37. **Boon ACM, DeBeauchamp J, Hollmann A, Luke J, Kotb M, Rowe S, Finkelstein D, Neale G, Lu L, Williams RW, Webby RJ.** Host Genetic Variation Affects Resistance to Infection with a Highly Pathogenic H5N1 Influenza A Virus in Mice. *J Virol* 83: 10417–10426, 2009. doi: 10.1128/jvi.00514-09.
38. **Boon ACM, Williams RW, Sinasac DS, Webby RJ.** A novel genetic locus linked to pro-inflammatory cytokines after virulent H5N1 virus infection in mice. *BMC Genomics* 15, 2014. doi: 10.1186/1471-2164-15-1017.
39. **BRAMBELL FWR.** THE PASSIVE IMMUNITY OF THE YOUNG MAMMAL. *Biol Rev* 33: 488–531, 1958. doi: 10.1111/j.1469-185X.1958.tb01412.x.
40. **Brandenburg B, Koudstaal W, Goudsmit J, Klaren V, Tang C, Bujny M V, Korse HJ, Kwaks T, Otterstrom JJ, Juraszek J, van Oijen AM, Vogels R, Friesen RH.** Mechanisms of hemagglutinin targeted influenza virus neutralization. *PLoS One* 8: e80034, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0080034.
41. **Breslow-Deckman JM, Mattingly CM, Birket SE, Hoskins SN, Ho TN, Garvy BA, Feola DJ.** Linezolid Decreases Susceptibility to Secondary Bacterial Pneumonia Postinfluenza Infection in Mice Through its Effects on IFN- γ . *J Immunol* 191: 1792–1799, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1300180.
42. **Brownstein DG.** Genetics of natural resistance to Sendai virus infection in mice. *Infect Immun* 41: 308–312, 1983. doi: 10.1128/iai.41.1.308-312.1983.
43. **Brownstein DG.** Sendai Virus Infection, Lung, Mouse and Rat. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 195–203.
44. **Bruland T, Dai HY, Lavik LAS, Kristiansen LI, Dalen A.** Gender-related differences in susceptibility, early virus dissemination and immunosuppression in mice infected with friend murine leukaemia virus variant FIS-2. *J Gen Virol* 82: 1821–1827, 2001. doi: 10.1099/0022-1317-82-8-1821.
45. **Burke CW, Mason JN, Surman SL, Jones BG, Dalloneau E, Hurwitz JL, Russell CJ.** Illumination of parainfluenza virus infection and transmission in living animals reveals a tissue-specific dichotomy. *PLoS Pathog* 7, 2011. doi: 10.1371/journal.ppat.1002134.
46. **Carey MA, Bradbury JA, Reboloso YD, Graves JP, Zeldin DC, Germolec DR.** Pharmacologic inhibition of COX-1 and COX-2 in influenza A viral infection in mice. *PLoS One* 5: e11610, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0011610.
47. **Carvalho M, Carvalho F, Remião F, de Lourdes Pereira M, Pires-das-Neves R, de Lourdes Bastos M.** Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (‘ecstasy’) on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. *Arch Toxicol* 76: 166–72, 2002. doi: 10.1007/s00204-002-0324-z.
48. **Casanova T, Van De Paar E, Desmecht D, Garigliany MM.** Hyporeactivity of Alveolar Macrophages and Higher Respiratory Cell Permissivity Characterize DBA/2J Mice Infected by Influenza A Virus. *J Interf Cytokine Res* 35: 808–820, 2015. doi: 10.1089/jir.2014.0237.
49. **Casanova T, Van De Paar E, Desmecht D, Garigliany MM.** Hyporeactivity of Alveolar Macrophages and Higher Respiratory Cell Permissivity Characterize DBA/2J Mice Infected by Influenza A Virus. *J Interf Cytokine Res* 35: 808–820, 2015. doi: 10.1089/jir.2014.0237.
50. **Casellas J.** Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal* 5: 1–7, 2011. doi: 10.1017/S1751731110001667.
51. **Cassol E, Cassetta L, Rizzi C, Alfano M, Poli G.** M1 and M2a Polarization of Human

- Monocyte-Derived Macrophages Inhibits HIV-1 Replication by Distinct Mechanisms. *J Immunol* 182: 6237–6246, 2009. doi: 10.4049/jimmunol.0803447.
52. **Castillo R, Holland LE, Boltz DA.** Peramivir and its use in H1N1 influenza. *Drugs Today (Barc)* 46: 399–408, 2010. doi: 10.1358/dot.2010.46.6.1459659.
 53. **Chambers R, Takimoto T.** Host specificity of the anti-interferon and anti-apoptosis activities of parainfluenza virus P/C gene products. *J Gen Virol* 90: 1906–1915, 2009. doi: 10.1099/vir.0.011700-0.
 54. **Chan-Tack KM, Murray JS, Birnkrant DB.** Use of ribavirin to treat influenza. *N Engl J Med* 361: 1713–1714, 2009. doi: 10.1056/NEJMc0905290.
 55. **Chen Z, Li Y, Krug RM.** Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J* 18: 2273–2283, 1999. doi: 10.1093/emboj/18.8.2273.
 56. **Cheung CY, Poon LLM, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y, Peiris JSM.** Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: A mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* 360: 1831–1837, 2002. doi: 10.1016/S0140-6736(02)11772-7.
 57. **Chiang-Ni C, Zheng PX, Wang S, Tsai PJ, Kuo CF, Chuang WJ, Lin YS, Liu CC, Wu JJ.** Invasive hypermucoid variant of group A Streptococcus is defective in growth and susceptible to DNA-damaging treatments. *Pathog Dis* 70: 194–201, 2014. doi: 10.1111/2049-632X.12114.
 58. **Chiba Y, Yanagisawa R, Sagai M.** Strain and route differences in airway responsiveness to acetylcholine in mice. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 90: 169–172, 1995.
 59. **Chong BTY, Agrawal DK, Romero FA, Townley RG.** Measurement of bronchoconstriction using whole-body plethysmograph: Comparison of freely moving versus restrained guinea pigs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 39: 163–168, 1998. doi: 10.1016/S1056-8719(98)00021-5.
 60. **Clementi N, Criscuolo E, Castelli M, Clementi M.** Broad-range neutralizing anti-influenza A human monoclonal antibodies: new perspectives in therapy and prophylaxis [Online]. *New Microbiol* 35: 399–406, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109007>.
 61. **Cloots RHE, Sankaranarayanan S, Poynter ME, Terwindt E, van Dijk P, Lamers WH, Eleonore Köhler S.** Arginase 1 deletion in myeloid cells affects the inflammatory response in allergic asthma, but not lung mechanics, in female mice. *BMC Pulm Med* 17, 2017. doi: 10.1186/s12890-017-0490-7.
 62. **Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC.** Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205: 17–23, 1994. doi: 10.1006/viro.1994.1615.
 63. **Cotes JE, Dabbs JM, Hall AM, Heywood C, Laurence KM.** Sitting height, fat-free mass and body fat as reference variables for lung function in healthy British children: comparison with stature [Online]. *Ann Hum Biol* 6: 307–314, 1979. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/575278>.
 64. **Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG.** Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity [Online]. *Virus Res* 29: 155–165, 1993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8212857>.
 65. **Couper KN, Blount DG, Riley EM.** IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol* 180: 5771–5777, 2008. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5771.
 66. **Crapo RO, Jensen RL, Wanger JS.** Single-breath carbon monoxide diffusing capacity. *Clin Chest Med* 22: 637–649, 2001. doi: 10.1016/S0272-5231(05)70057-5.
 67. **Dai J, Pei D, Wang B, Kuang Y, Ren L, Cao K, Zuo B, Shao J, Li S, Jiang Z, Li H, Li M.** A novel DNA vaccine expressing the Ag85A-HA2 fusion protein provides protection against influenza A virus and Staphylococcus aureus. *Virol J* 10, 2013. doi: 10.1186/1743-422X-10-40.
 68. **Daly JM, Yates RJ, Browse G, Swann Z, Newton JR, Jessett D, Davis-Poynter N, Mumford JA.** Comparison of hamster and pony challenge models for evaluation of effect of antigenic drift

- on cross protection afforded by equine influenza vaccines [Online]. *Equine Vet J* 35: 458–462, 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875323>.
69. **Dam Van P, Desmecht D, Garigliany MM, Bui Tran Anh D, Van Laere AS.** Anti-Influenza A Virus Activities of Type I/III Interferons-Induced Mx1 GTPases from Different Mammalian Species. *J Interf Cytokine Res* 39: 274–282, 2019. doi: 10.1089/jir.2018.0157.
 70. **De Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJD, Chau TNB, Hoang DM, Chau NVV, Khanh TH, Dong VC, Qui PT, Cam B Van, Ha DQ, Guan Y, Peiris JSM, Chinh NT, Hien TT, Farrar J.** Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 12: 1203–1207, 2006. doi: 10.1038/nm1477.
 71. **De Jong RM, Stockhofe-Zurwieden N, Verheij ES, De Boer-Luijtz EA, Ruiters SJ, De Leeuw OS, Cornelissen LA.** Rapid emergence of a virulent PB2 E627K variant during adaptation of highly pathogenic avian influenza H7N7 virus to mice. *Virol J* 10, 2013. doi: 10.1186/1743-422X-10-276.
 72. **de la Luna S, Fortes P, Beloso A, Ortín J.** Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol* 69: 2427–2433, 1995. doi: 10.1128/jvi.69.4.2427-2433.1995.
 73. **Depledge MH.** Respiration and lung function in the mouse, *Mus musculus* (with a note on mass exponents and respiratory variables). *Respir Physiol* 60: 83–94, 1985. doi: 10.1016/0034-5687(85)90041-6.
 74. **Depledge MH, Collis CH, Barrett A.** A technique for measuring carbon monoxide uptake in mice [Online]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7: 485–489, 1981. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7251418>.
 75. **Desplechain C, Foliguet B, Barrat E, Grignon G, Touati F.** [The pores of Kohn in pulmonary alveoli]. [Online]. *Bull Eur Physiopathol Respir* 19: 59–68, [date unknown]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6850150> [19 Aug. 2020].
 76. **Dewals B, Gillet L, Gerdes T, Taracha ELN, Thiry E, Vanderplasschen A.** Antibodies against bovine herpesvirus 4 are highly prevalent in wild African buffaloes throughout eastern and southern Africa. *Vet Microbiol* 110: 209–220, 2005. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.08.006.
 77. **Di Mario G, Sciaraffia E, Facchini M, Gubinelli F, Soprana E, Panigada M, Bernasconi V, Garulli B, Siccardi A, Donatelli I, Castrucci MR.** Protective immunity against influenza in HLA-A2 transgenic mice by modified vaccinia virus Ankara vectored vaccines containing internal influenza proteins. *Pathog Glob Health* 111: 76–82, 2017. doi: 10.1080/20477724.2016.1275465.
 78. **Dienz O, Rud JG, Eaton SM, Lanthier PA, Burg E, Drew A, Bunn J, Suratt BT, Haynes L, Rincon M.** Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. *Mucosal Immunol* 5: 258–266, 2012. doi: 10.1038/mi.2012.2.
 79. **DiLillo DJ, Palese P, Wilson PC, Ravetch J V.** Broadly neutralizing anti-influenza antibodies require Fc receptor engagement for in vivo protection. *J. Clin. Invest.* 126 American Society for Clinical Investigation: 605–610, 2016.
 80. **DiLillo DJ, Tan GS, Palese P, Ravetch J V.** Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus in vivo. *Nat Med* 20: 143–51, 2014. doi: 10.1038/nm.3443.
 81. **Dimitrov DS.** Virus entry: Molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 109–122, 2004.
 82. **Divangahi M, King IL, Pernet E.** Alveolar macrophages and type I IFN in airway homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 36 Elsevier Ltd: 307–314, 2015.
 83. **Doshi P.** Neuraminidase inhibitors—the story behind the Cochrane review. *BMJ* 339, 2009. doi: 10.1136/bmj.b5164.
 84. **Drazen JM, Finn PW, De Sanctis GT.** Mouse models of airway responsiveness: Physiological basis of observed outcomes and analysis of selected examples using these outcome indicators.

Annu Rev Physiol.

85. **DUGUID JB, LAMBERT MW.** The pathogenesis of coal miner's pneumoconiosis. [Online]. *J Pathol Bacteriol* 88: 389–403, 1964. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14226413> [7 Aug. 2020].
86. **Dybing JK, Schultz-Cherry S, Swayne DE, Suarez DL, Perdue ML.** Distinct Pathogenesis of Hong Kong-Origin H5N1 Viruses in Mice Compared to That of Other Highly Pathogenic H5 Avian Influenza Viruses. *J Virol* 74: 1443–1450, 2000. doi: 10.1128/jvi.74.3.1443-1450.2000.
87. **Eichelberger MC.** The cotton rat as a model to study influenza pathogenesis and immunity. *Viral Immunol* 20: 243–249, 2007. doi: 10.1089/vim.2007.0017.
88. **Elderfield R, Barclay W.** Influenza pandemics. *Adv Exp Med Biol* 719: 81–103, 2011. doi: 10.1007/978-1-4614-0204-6_8.
89. **Ellis JL, Udem BJ.** Antigen-induced enhancement of noncholinergic contractile responses to vagus nerve and electrical field stimulation in guinea pig isolated trachea. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 646–653, 1992.
90. **Enami K, Sato TA, Nakada S, Enami M.** Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol* 68: 1432–1437, 1994. doi: 10.1128/jvi.68.3.1432-1437.1994.
91. **Escuret V, Frobert E, Lina B.** Grippe et antiviraux. *Réanimation* 20: 169–177, 2011. doi: 10.1007/s13546-011-0250-2.
92. **Ewart S, Levitt R, Mitzner W.** Respiratory system mechanics in mice measured by end-inflation occlusion. *J Appl Physiol* 79: 560–566, 1995. doi: 10.1152/jappl.1995.79.2.560.
93. **Faisca P, Anh DBT, Desmecht DJ-M.** Sendai virus-induced alterations in lung structure/function correlate with viral loads and reveal a wide resistance/susceptibility spectrum among mouse strains. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L777-87, 2005. doi: 10.1152/ajplung.00240.2005.
94. **Faisca P, Desmecht D.** Sendai virus, the mouse parainfluenza type 1: a longstanding pathogen that remains up-to-date. *Res Vet Sci* 82: 115–125, 2007. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.03.009.
95. **Faisca P, Desmecht D, Faisca P, Desmecht D.** Sendai virus, the mouse parainfluenza type 1: a longstanding pathogen that remains up-to-date. *Res Vet Sci* 82: 115–125, 2007. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.03.009.
96. **Faisca P, Tran Anh DB, Thomas A, Desmecht D.** Suppression of pattern-recognition receptor TLR4 sensing does not alter lung responses to pneumovirus infection. *Microbes Infect* 8: 621–627, 2006. doi: 10.1016/j.micinf.2005.08.010.
97. **Faisca RPB.** Experimental infection of inbred mice (*Mus musculus*) strains by Sendai virus reveals a wide spectrum of innate resistance/susceptibility patterns. .
98. **Fallica J, Das S, Horton M, Mitzner W.** Application of carbon monoxide diffusing capacity in the mouse lung. *J Appl Physiol* 110: 1455–1459, 2011. doi: 10.1152/jappphysiol.01347.2010.
99. **Fauci AS.** Pandemic influenza threat and preparedness. *Emerg Infect Dis* 12: 73–77, 2006. doi: 10.3201/eid1201.050983.
100. **Festing MF.** Inbred mice in research. *Nature* 221: 716, 1969. doi: 10.1038/221716a0.
101. **Flandre P, Descamps D, Joly V, Meiffredy V, Tamalet C, Izopet J, Aboulker JP, Brun-Vezinet F.** Predictive factors and selection of thymidine analogue mutations by nucleoside reverse transcriptase inhibitors according to initial regimen received [Online]. *Antivir Ther* 8: 65–72, 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12713066>.
102. **Flandre TD, Leroy PL, Desmecht DJM.** Effect of somatic growth, strain, and sex on double-chamber plethysmographic respiratory function values in healthy mice. *J Appl Physiol* 94: 1129–1136, 2003. doi: 10.1152/jappphysiol.00561.2002.
103. **Fogelmark B, Sjöstrand M, Rylander R.** Pulmonary inflammation induced by repeated inhalations of beta(1,3)-D-glucan and endotoxin. [Online]. *Int J Exp Pathol* 75: 85–90, 1994. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8199009> [17 Aug. 2020].
104. **Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan**

- GF, Olsen B, Osterhaus AD.** Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79: 2814–2822, 2005. doi: 10.1128/JVI.79.5.2814-2822.2005.
105. **Fraaij PL, Schutten M, Javouhey E, Burleigh L, Outlaw R, Kumar D, Boucher CA.** Viral shedding and susceptibility to oseltamivir in hospitalized immunocompromised patients with influenza in the Influenza Resistance Information Study (IRIS). *Antivir Ther* 20: 633–642, 2015. doi: 10.3851/IMP2957.
106. **Franco NH.** Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Anim* 3: 238–273, 2013. doi: 10.3390/ani3010238.
107. **Franko AJ, Sharplin J.** Assessment of radiation-induced lung injury in mice using carbon monoxide uptake: correlation with histologically visible damage. *Radiat Res* 133: 245–251, 1993. doi: 10.2307/3578362.
108. **Fujimoto Y, Ozaki K, Maeda M, Nishijima K, Takakuwa H, Otsuki K, Kida H, Ono E.** Resistance to influenza A virus infection in transformed cell lines expressing an anti-PB2 monoclonal antibody. *Vet J* 198: 487–493, 2013. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.09.019.
109. **Fujimura T, Esteban R.** Cap-snatching mechanism in yeast L-A double-stranded RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 17667–17671, 2011. doi: 10.1073/pnas.1111900108.
110. **Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M.** Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Japan Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 348–362, 2009. doi: 10.2183/pjab.85.348.
111. **da Cunha Moraes G, Vitoretto LB, de Brito AA, Alves CE, de Oliveira NCR, Dos Santos Dias A, Matos YST, Oliveira-Junior MC, Oliveira LVF, da Palma RK, Candeo LC, Lino-Dos-Santos-Franco A, Horliana ACRT, Gimenes Júnior JA, Aimbire F, Vieira RP, Ligeiro-de-Oliveira AP.** Low-Level Laser Therapy Reduces Lung Inflammation in an Experimental Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Involving P2X7 Receptor. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Mar 4;2018:6798238. doi: 10.1155/2018/6798238. PMID: 29686745; PMCID: PMC5857317.
112. **Gamblin SJ, Skehel JJ.** Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 285: 28403–28409, 2010. doi: 10.1074/jbc.R110.129809.
113. **Gao P, Watanabe S, Ito T, Goto H, Wells K, McGregor M, Cooley AJ, Kawaoka Y.** Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong [Online]. *J Virol* 73: 3184–3189, 1999. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10074171>.
114. **García-Sastre A, Biron CA.** Type 1 interferons and the virus-host relationship: A lesson in détente. *Science (80-.)*. 312 Science: 879–882, 2006.
115. **García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, Palese P, Muster T.** Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon- deficient systems. *Virology* 252: 324–330, 1998. doi: 10.1006/viro.1998.9508.
116. **Garcia A, Abel L, Cot M, Richard P, Ranque S, Feingold J, Demenais F, Boussinesq M, Chippaux JP.** Genetic epidemiology of host predisposition microfilaraemia in human loiasis. *Trop Med Int Heal* 4: 565–574, 1999. doi: 10.1046/j.1365-3156.1999.00442.x.
117. **Garcia GL, Valenzuela A, Manzoni T, Vaughan AE, López CB.** Distinct Chronic Post-Viral Lung Diseases upon Infection with Influenza or Parainfluenza Viruses Differentially Impact Superinfection Outcome. *Am J Pathol* 190: 543–553, 2020. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.11.003.
118. **Garcin D, Curran J, Itoh M, Kolakofsky D.** Longer and Shorter Forms of Sendai Virus C Proteins Play Different Roles in Modulating the Cellular Antiviral Response. *J Virol* 75: 6800–6807, 2001. doi: 10.1128/jvi.75.15.6800-6807.2001.
119. **Garigliany MM, Cornet A, Desmecht D.** Human/bovine chimeric MxA-like gtpases reveal a contribution of n-terminal domains to the magnitude of anti-influenza A activity. *J Interf Cytokine*

Res 32: 326–331, 2012. doi: 10.1089/jir.2011.0106.

120. **Garigliany MM, Habyarimana A, Lambrecht B, Van de Paar E, Cornet A, van den Berg T, Desmecht D.** Influenza A strain-dependent pathogenesis in fatal H1N1 and H5N1 subtype infections of mice. *Emerg Infect Dis* 16: 595–603, 2010. doi: 10.3201/eid1604.091061.
121. **Giordano D, Draves KE, Young LB, Roe K, Bryan MA, Dresch C, Richner JM, Diamond MS, Gale M, Clark EA.** Protection of mice deficient in mature B cells from West Nile virus infection by passive and active immunization. *PLOS Pathog* 13: e1006743, 2017. doi: 10.1371/journal.ppat.1006743.
122. **Glaab T, Daser A, Braun A, Neuhaus-Steinmetz U, Fabel H, Alarie Y, Renz H.** Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 280, 2001. doi: 10.1152/ajplung.2001.280.3.1565.
123. **Glaab T, Taube C, Braun A, Mitzner W.** Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. *Respir. Res.* 8 Respir Res: 2007.
124. **Glineur S, Antoine-Moussiaux N, Michaux C, Desmecht D.** Immune depression of the SJL/J mouse, a radioresistant and immunologically atypical inbred strain. *Immunobiology* 216: 213–7, 2011. doi: 10.1016/j.imbio.2010.04.005.
125. **Glineur S, Tran Anh DB, Sarlet M, Michaux C, Desmecht D.** Characterization of the Resistance of SJL/J Mice to Pneumonia Virus of Mice, a Model for Infantile Bronchiolitis Due to a Respiratory Syncytial Virus. *PLoS One* 7, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0044581.
126. **Gomes RFM, Shen X, Ramchandani R, Tepper RS, Bates JHT.** Comparative respiratory system mechanics in rodents. *J Appl Physiol* 89: 908–916, 2000. doi: 10.1152/jappl.2000.89.3.908.
127. **Haller O.** A tribute to Jean Lindenmann, co-discoverer of interferon (1924-2015). *Cytokine* 76 Academic Press: 113–115, 2015.
128. **Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW.** Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 766–775, 1997. doi: 10.1164/ajrccm.156.3.9606031.
129. **Hamer W.** Further Considerations Regarding the Characteristic Features of Influenza Waves: (Section of Epidemiology and State Medicine) [Online]. *Proc R Soc Med* 27: 5–17, 1933. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19989554>.
130. **Hamzehei M, Ledinko N.** Inhibition of influenza A virus replication by rifampicin and selenocystamine [Online]. *J Med Virol* 6: 169–174, 1980. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7241092>.
131. **Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, Odden AR, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK.** Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 202: 761–769, 2005. doi: 10.1084/jem.20050193.
132. **Harding R.** The Lung: Scientific Foundations. .
133. **Hatada E, Saito S, Fukuda R.** Mutant Influenza Viruses with a Defective NS1 Protein Cannot Block the Activation of PKR in Infected Cells. *J Virol* 73: 2425–2433, 1999. doi: 10.1128/jvi.73.3.2425-2433.1999.
134. **Hatta M, Hatta Y, Kim JH, Watanabe S, Shinya K, Nguyen T, Lien PS, Le QM, Kawaoka Y.** Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog* 3: 1374–1379, 2007. doi: 10.1371/journal.ppat.0030133.
135. **Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, Wang D, Nelson EA, Li F.** Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: Proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio* 5, 2014. doi: 10.1128/mBio.00031-14.
136. **Hayden FG, de Jong MD.** Emerging influenza antiviral resistance threats. *J Infect Dis* 203: 6–10, 2011. doi: 10.1093/infdis/jiq012.
137. **Hayden FG, Fritz RS, Lobo MC, Alvord WG, Strober W, Straus SE.** Local and systemic

cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense. *J Clin Invest* 101: 643–649, 1998. doi: 10.1172/JCI1355.

138. **Hedrich H.** The Laboratory Mouse. 2012.
139. **Held HD, Boettcher S, Hamann L, Uhlig S.** Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor- κ B and is blocked by steroids. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 711–716, 2001. doi: 10.1164/ajrccm.163.3.2003001.
140. **Held HD, Martin C, Uhlig S.** Characterization of airway and vascular responses in murine lungs. *Br J Pharmacol* 126: 1191–1199, 1999. doi: 10.1038/sj.bjp.0702394.
141. **Held HD, Uhlig S.** Mechanisms of endotoxin-induced airway and pulmonary vascular hyperreactivity in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1547–52, 2000. doi: 10.1164/ajrccm.162.4.9912079.
142. **Heneghan CJ, Onakpoya I, Thompson M, Spencer EA, Jones M, Jefferson T, Jones M, Doshi P, Spencer EA, Onakpoya I, Heneghan CJ, Onakpoya I, Thompson M, Spencer EA, Jones M, Jefferson T, Jones M, Doshi P, Spencer EA, Onakpoya I, Heneghan CJ.** Oseltamivir for influenza in adults and children: systematic review of clinical study reports and summary of regulatory comments. *BMJ* 348: g2547, 2014. doi: 10.1136/bmj.g2547.
143. **Henry LJ, Walker J, Margules DL.** Opposite effects of opiate agonists on metabolic weight loss in mice. *Neuropeptides* 5: 327–330, 1985. doi: 10.1016/0143-4179(85)90019-8.
144. **Higashi F, Kubo H, Yasuda H, Nukiwa T, Yamaya M.** Additional treatment with clarithromycin reduces fever duration in patients with influenza. *Respir Investig* 52: 302–309, 2014. doi: 10.1016/j.resinv.2014.05.001.
145. **Hirai T, Hosokawa M, Kawakami K, Takubo Y, Sakai N, Oku Y, Chin K, Ohi M, Higuchi K, Kuno K, Mishima M.** Age-related changes in the static and dynamic mechanical properties of mouse lungs. *Respir Physiol* 102: 195–203, 1995. doi: 10.1016/0034-5687(95)00068-2.
146. **Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG.** A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6108–6113, 2000. doi: 10.1073/pnas.100133697.
147. **Högner K, Wolff T, Pleschka S, Plog S, Gruber AD, Kalinke U, Walmrath HD, Bodner J, Gattenlöhner S, Lewe-Schlosser P, Matrosovich M, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S.** Macrophage-expressed IFN- β Contributes to Apoptotic Alveolar Epithelial Cell Injury in Severe Influenza Virus Pneumonia. *PLoS Pathog* 9, 2013. doi: 10.1371/journal.ppat.1003188.
148. **Horimoto T, Fukuda N, Iwatsuki-Horimoto K, Guan Y, Lim W, Peiris M, Sugii S, Odagiri T, Tashiro M, Kawaoka Y.** Antigenic differences between H5N1 human influenza viruses isolated in 1997 and 2003. *J Vet Med Sci* 66: 303–305, 2004. doi: 10.1292/jvms.66.303.
149. **Horisberger MA, Staehell P, Haller O.** Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 1910–1914, 1983. doi: 10.1073/pnas.80.7.1910.
150. **Hoymann H-G.** New developments in lung function measurements in rodents. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 2: 5–11, 2006. doi: 10.1016/j.etp.2006.02.011.
151. **Hoymann HG.** Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. *J Pharmacol Toxicol Methods* 55: 16–26, 2007. doi: 10.1016/j.vascn.2006.04.006.
152. **Hoymann HG, Wollin L, Müller M, Korolewicz R, Krug N, Braun A, Beume R.** Effects of the phosphodiesterase type 4 inhibitor roflumilast on early and late allergic response and airway hyperresponsiveness in *Aspergillus-fumigatus*-sensitized mice. *Pharmacology* 83: 188–195, 2009. doi: 10.1159/000196814.
153. **Hsieh HP, Hsu JT.** Strategies of development of antiviral agents directed against influenza virus replication [Online]. *Curr Pharm Des* 13: 3531–3542, 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220789>.
154. **Hu Z, Jiang W, Gu L, Qiao D, Shu T, Lowrie DB, Lu SH, Fan XY.** Heterologous prime-boost vaccination against tuberculosis with recombinant Sendai virus and DNA vaccines. *J Mol Med*

- 97: 1685–1694, 2019. doi: 10.1007/s00109-019-01844-3.
155. **Hugonnaud C, Gehr P, Weibel R, Burri PH.** Adaptation of the growing lung to increased oxygen consumption. II. Morphometric analysis [Online]. *Respir Physiol* 29: 1–10, 1977. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/557828>.
 156. **Hussell T, Pennycook A, Openshaw PJM.** Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology. *Eur J Immunol* 31: 2566–2573, 2001. doi: 10.1002/1521-4141(200109)31:9<2566::AID-IMMU2566>3.0.CO;2-L.
 157. **Ibricevic A, Pekosz A, Walter MJ, Newby C, Battaile JT, Brown EG, Holtzman MJ, Brody SL.** Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. *J Virol* 80: 7469–7480, 2006. doi: 10.1128/JVI.02677-05.
 158. **Ilyinskaya G V., Mukhina E V., Soboleva A V., Matveeva O V., Chumakov PM.** Oncolytic sendai virus therapy of canine mast cell tumors (A pilot study). *Front Vet Sci* 5: 116, 2018. doi: 10.3389/fvets.2018.00116.
 159. **Imai M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Murakami J, Yasuhara A, Takada K, Ito M, Nakajima N, Takahashi K, Lopes TJS, Dutta J, Khan Z, Kriti D, van Bakel H, Tokita A, Hagiwara H, Izumida N, Kuroki H, Nishino T, Wada N, Koga M, Adachi E, Jubishi D, Hasegawa H, Kawaoka Y.** Influenza A variants with reduced susceptibility to baloxavir isolated from Japanese patients are fit and transmit through respiratory droplets. *Nat Microbiol* 5: 27–33, 2020. doi: 10.1038/s41564-019-0609-0.
 160. **Inglis SC, Barrett T, Brown CM, Almond JW.** The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 3790–3794, 1979. doi: 10.1073/pnas.76.8.3790.
 161. **Irie T, Nagata N, Igarashi T, Okamoto I, Sakaguchi T.** Conserved charged amino acids within sendai virus C protein play multiple roles in the evasion of innate immune responses. *PLoS One* 5, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0010719.
 162. **Ison MG, Hayden FG.** Therapeutic options for the management of influenza [Online]. *Curr Opin Pharmacol* 1: 482–490, 2001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11764774>.
 163. **Itoh T, Iwai H, Ueda K.** Comparative lung pathology of inbred strain of mice resistant and susceptible to Sendai virus infection. *J Vet Med Sci* 53: 275–9, 1991. doi: 10.1292/jvms.53.275.
 164. **Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y.** The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* 80: 5233–5240, 2006. doi: 10.1128/JVI.00049-06.
 165. **Jackson DC, Dopheide TA, Russell RJ, White DO, Ward CW.** Antigenic determinants of influenza virus hemagglutinin. II. Antigenic reactivity of the isolated N-terminal cyanogen bromide peptide of A/Memphis/72 hemagglutinin heavy chain [Online]. *Virology* 93: 458–465, 1979. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/88123>.
 166. **Jackson RJ, Cooper KL, Tappenden P, Rees A, Simpson EL, Read RC, Nicholson KG.** Oseltamivir, zanamivir and amantadine in the prevention of influenza: a systematic review. *J Infect* 62: 14–25, 2011. doi: 10.1016/j.jinf.2010.10.003.
 167. **Jacobsen H, Rajendran M, Choi A, Sjursen H, Brokstad KA, Cox RJ, Palese P, Krammer F, Nachbagauer R.** Influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies in human serum are a surrogate marker for in vivo protection in a serum transfer mouse challenge model. *MBio* 8, 2017. doi: 10.1128/mBio.01463-17.
 168. **Jardetzky TS, Lamb RA.** Activation of paramyxovirus membrane fusion and virus entry. *Curr. Opin. Virol.* 5 Elsevier: 24–33, 2014.
 169. **Jeffery PK.** Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am Rev Respir Dis* 128, 1983. doi: 10.1164/arrd.1983.128.2P2.S14.
 170. **Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, Liu W, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H.** A Single-Amino-Acid Substitution in the NS1 Protein Changes the Pathogenicity of H5N1 Avian Influenza Viruses in Mice. *J Virol* 82: 1146–1154, 2008. doi: 10.1128/jvi.01698-07.

171. **Johanson WG, Pierce AK.** Lung structure and function with age in normal rats and rats with papain emphysema. *J Clin Invest* 52: 2921–2927, 1973. doi: 10.1172/JCI107488.
172. **Joseph T, McAuliffe J, Lu B, Jin H, Kemble G, Subbarao K.** Evaluation of Replication and Pathogenicity of Avian Influenza A H7 Subtype Viruses in a Mouse Model. *J Virol* 81: 10558–10566, 2007. doi: 10.1128/jvi.00970-07.
173. **Josset L, Textoris J, Loriod B, Ferraris O, Moules V, Lina B, N’Guyen C, Diaz JJ, Rosa-Calatrava M.** Gene expression signature-based screening identifies new broadly effective influenza a antivirals. *PLoS One* 5, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0013169.
174. **Joyce CJ, Baker AB, Kennedy RR.** Gas uptake from an unventilated area of lung: Computer model of absorption atelectasis. *J Appl Physiol* 74: 1107–1116, 1993. doi: 10.1152/jappl.1993.74.3.1107.
175. **Kaneda Y, Saga K.** Oncolytic Sendai virus-based virotherapy for cancer: recent advances. *Oncolytic Virotherapy* 4: 141, 2015. doi: 10.2147/ov.s66419.
176. **Karlsson EA, Engel GA, Feeroz MM, San S, Rompis A, Lee BP, Shaw E, Oh G, Schillaci MA, Grant R, Heidrich J, Schultz-Cherry S, Jones-Engel L.** Influenza virus infection in nonhuman primates. *Emerg Infect Dis* 18: 1672–1675, 2012. doi: 10.3201/eid1810.120214.
177. **Kato A, Ohnishi Y, Kohase M, Saito S, Tashiro M, Nagai Y.** Y2, the Smallest of the Sendai Virus C Proteins, Is Fully Capable of both Counteracting the Antiviral Action of Interferons and Inhibiting Viral RNA Synthesis. *J Virol* 75: 3802–3810, 2001. doi: 10.1128/jvi.75.8.3802-3810.2001.
178. **Kaushansky K.** Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N. Engl. J. Med.* 354 Massachusetts Medical Society: 2034–2045, 2006.
179. **Kawakami M, Paul JL, Thurlbeck WM.** The effect of age on lung structure in male BALB/cNnia inbred mice. *Am J Anat* 170: 1–21, 1984. doi: 10.1002/aja.1001700102.
180. **Khoufache K, LeBouder F, Morello E, Laurent F, Riffault S, Andrade-Gordon P, Boullier S, Rousset P, Vergnolle N, Riteau B.** Protective Role for Protease-Activated Receptor-2 against Influenza Virus Pathogenesis via an IFN- γ -Dependent Pathway. *J Immunol* 182: 7795–7802, 2009. doi: 10.4049/jimmunol.0803743.
181. **Kim Y-J, Kim K-H, Ko E-J, Kim M-C, Lee Y-N, Jung Y-J, Lee Y-T, Kwon Y-M, Song J-M, Kang S-M.** Complement C3 Plays a Key Role in Inducing Humoral and Cellular Immune Responses to Influenza Virus Strain-Specific Hemagglutinin-Based or Cross-Protective M2 Extracellular Domain-Based Vaccination. *J Virol* 92, 2018. doi: 10.1128/jvi.00969-18.
182. **Kirkpatrick E, Qiu X, Wilson PC, Bahl J, Krammer F.** The influenza virus hemagglutinin head evolves faster than the stalk domain. *Sci Rep* 8, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-28706-1.
183. **Kiyotani K, Sakaguchi T, Kato A, Nagai Y, Yoshida T.** Paramyxovirus Sendai virus V protein counteracts innate virus clearance through IRF-3 activation, but not via interferon, in mice. *Virology* 359: 82–91, 2007. doi: 10.1016/j.virol.2006.08.053.
184. **Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, Hatta Y, Kim JH, Halfmann P, Hatta M, Feldmann F, Alimonti JB, Fernando L, Li Y, Katze MG, Feldmann H, Kawaoka Y.** Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 445: 319–323, 2007. doi: 10.1038/nature05495.
185. **Köhler G, Milstein C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495–497, 1975. doi: 10.1038/256495a0.
186. **Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL.** Biology of Hematopoietic Stem Cells and Progenitors: Implications for Clinical Application. *Annu Rev Immunol* 21: 759–806, 2003. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141007.
187. **Kort WJ, Hekking-Weijma JM, TenKate MT, Sorm V, Vanstrick R.** A microchip implant system as a method to determine body temperature of terminally ill rats and mice. *Lab Anim* 32: 260–269, 1998. doi: 10.1258/002367798780559329.

188. **Koyama K, Takahashi M, Oitate M, Nakai N, Takakusa H, Miura S, Okazaki O.** CS-8958, a prodrug of the novel neuraminidase inhibitor R-125489, demonstrates a favorable long-retention profile in the mouse respiratory tract. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 4845–4851, 2009. doi: 10.1128/AAC.00731-09.
189. **Kraft V, Meyer B.** Diagnosis of murine infections in relation to test methods employed. *Lab Anim Sci* 36: 271–276, 1986.
190. **Krarrup A, Chattopadhyay P, Bhattacharjee AK, Burge JR, Ruble GR.** Evaluation of surrogate markers of impending death in the galactosamine-sensitized murine model of bacterial endotoxemia. *Lab. Anim. Sci.* 49: 545–550, 1999.
191. **Kwon YS, Park SH, Kim MA, Kim HJ, Park JS, Lee MY, Lee CW, Dauti S, Choi W II.** Risk of mortality associated with respiratory syncytial virus and influenza infection in adults. *BMC Infect Dis* 17, 2017. doi: 10.1186/s12879-017-2897-4.
192. **Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X.** Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect* 6: 929–936, 2004. doi: 10.1016/j.micinf.2004.05.002.
193. **Lamb RA, Choppin PW.** Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4908–4912, 1979. doi: 10.1073/pnas.76.10.4908.
194. **Lamb RA, Jardetzky TS.** Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 *Curr Opin Struct Biol*: 427–436, 2007.
195. **Lamb RA, Kolakofsky D.** Paramyxoviridae: The viruses and their replication [Online]. Lippincott-Raven Press: 1996. <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/paramyxoviridae-the-viruses-and-their-replication> [11 Aug. 2020].
196. **Lambrecht BN, Hammad H.** Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol* 30: 243–70, 2012. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075021.
197. **Larsen GL, Renz H, Loader JE, Bradley KL, Gelfand EW.** Airway response to electrical field stimulation in sensitized inbred mice: Passive transfer of increased responsiveness with peribronchial lymph nodes. *J Clin Invest* 89: 747–752, 1992. doi: 10.1172/JCI115651.
198. **Lau Y-F, Santos C, Torres-Velez FJ, Subbarao K.** The Magnitude of Local Immunity in the Lungs of Mice Induced by Live Attenuated Influenza Vaccines Is Determined by Local Viral Replication and Induction of Cytokines. *J Virol* 85: 76–85, 2011. doi: 10.1128/jvi.01564-10.
199. **Laursen NS, Wilson IA.** Broadly neutralizing antibodies against influenza viruses. *Antivir Res* 98: 476–483, 2013. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.021.
200. **Laver G, Garman E.** Pandemic influenza: Its origin and control. *Microbes Infect.* 4: 1309–1316, 2002.
201. **Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KLM, Poole AR, Wakeham A, Mak TW, Khokha R.** Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 108: 817–829, 2001. doi: 10.1172/jci12067.
202. **Lee DH, Bae SW, Park JK, Kwon JH, Yuk SS, Song JM, Kang SM, Kwon YK, Kim HY, Song CS.** Virus-like particle vaccine protects against H3N2 canine influenza virus in dog. *Vaccine* 31: 3268–3273, 2013. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.023.
203. **Lee YT, Kim KH, Ko EJ, Lee YN, Kim MC, Kwon YM, Tang Y, Cho MK, Lee YJ, Kang SM.** New vaccines against influenza virus. *Clin Exp Vaccine Res* 3: 12–28, 2014. doi: 10.7774/cevr.2014.3.1.12.
204. **Leong KP, Huston DP.** Understanding the pathogenesis of allergic asthma using mouse models. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 87 American College of Allergy, Asthma and Immunology: 96–110, 2001.
205. **Li ML, Rao P, Krug RM.** The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J* 20: 2078–2086, 2001. doi: 10.1093/emboj/20.8.2078.
206. **Lim R, Zavou MJ, Milton PL, Chan ST, Tan JL, Dickinson H, Murphy S V., Jenkin G,**

- Wallace EM.** Measuring respiratory function in mice using unrestrained whole-body plethysmography. *J Vis Exp* , 2014. doi: 10.3791/51755.
207. **Lindstrom SE, Cox NJ, Klimov A.** Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: Evidence for genetic divergence and multiple reassortment events. *Virology* 328: 101–119, 2004. doi: 10.1016/j.virol.2004.06.009.
208. **Lipatov AS, Andreansky S, Webby RJ, Hulse DJ, Rehg JE, Krauss S, Perez DR, Doherty PC, Webster RG, Sangster MY.** Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J Gen Virol* 86: 1121–1130, 2005. doi: 10.1099/vir.0.80663-0.
209. **Lipatov AS, Gitelman AK, Smirnov YuA, Smirnov Yu A.** Prevention and treatment of lethal influenza A virus bronchopneumonia in mice by monoclonal antibody against haemagglutinin stem region [Online]. *Acta Virol* 41: 337–340, 1997. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607093> [18 Aug. 2020].
210. **Liu Q, Huang J, Chen Y, Chen H, Li Q, He L, Hao X, Liu J, Gu M, Hu J, Wang X, Hu S, Liu X, Liu X.** Virulence determinants in the PB2 gene of a mouse-adapted H9N2 virus. *J Virol* 89: 877–882, 2015. doi: 10.1128/JVI.01775-14.
211. **Liu Y -J, Zhang J, Lane PJJ, Chan EY-, Maclennan ICM.** Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* 21: 2951–2962, 1991. doi: 10.1002/eji.1830211209.
212. **Lohse L, Uttenthal Å, Enøe C, Nielsen J.** A study on the applicability of implantable microchip transponders for body temperature measurements in pigs. *Acta Vet Scand* 52, 2010. doi: 10.1186/1751-0147-52-29.
213. **Lowen AC, Mubareka S, Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Palese P.** The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9988–9992, 2006. doi: 10.1073/pnas.0604157103.
214. **Lu DF, Stanley C, Nunez G, Frazer D.** A mathematical description of pressures in Alveolar Pores of Kohn. *J Biomech Eng* 113: 104–107, 1991. doi: 10.1115/1.2894075.
215. **Luo H, Wang S, Yuan T, Liu J, Yao L, Pan X, Long X, Wu J, Shen F.** Clinical characteristics from co-infection with avian influenza A H7N9 and Mycoplasma pneumoniae: a case report. *J Med Case Rep* 12: 77, 2018. doi: 10.1186/s13256-018-1583-5.
216. **Luo KX, Zhou R, Liang ZS.** [Identification of HBV infection in HBsAg-negative chronic active hepatitis with polymerase chain reaction] [Online]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 30: 21-23,60, 1991. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2032490> [13 Aug. 2020].
217. **Luthi-Carter R, Apostol BL, Dunah AW, DeJohn MM, Farrell LA, Bates GP, Young AB, Standaert DG, Thompson LM, Cha JH.** Complex alteration of NMDA receptors in transgenic Huntington’s disease mouse brain: analysis of mRNA and protein expression, plasma membrane association, interacting proteins, and phosphorylation [Online]. *Neurobiol Dis* 14: 624–636, 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14678777>.
218. **Ma W, Lager KM, Vincent AL, Janke BH, Gramer MR, Richt JA.** The role of swine in the generation of novel influenza viruses. *Zoonoses Public Heal* 56: 326–337, 2009. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01217.x.
219. **Mabe K, Okuda M, Kikuchi S, Amagai K, Yoshimura R, Kato M, Sakamoto N, Asaka M.** Randomized controlled trial: PPI-based triple therapy containing metronidazole versus clarithromycin as first-line treatment for Helicobacter pylori in adolescents and young adults in Japan. *J Infect Chemother* 24: 538–543, 2018. doi: 10.1016/j.jiac.2018.02.013.
220. **Machii K, Otsuka Y, Iwai H, Ueda K.** Infection of rabbits with Sendai virus. [Online]. *Lab Anim Sci* 39: 334–7, 1989. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548035> [11 Aug. 2020].
221. **Macintyre N, Crapo RO, Viegi G, Johnson DC, van der Grinten CPM, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Enright P, Gustafsson P, Hankinson J, Jensen R, McKay R, Miller MR, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Wanger J.** Standardisation of the single-breath

- determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 26: 720–35, 2005. doi: 10.1183/09031936.05.00034905.
222. **Mähler M, Berar M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, Raspa M.** FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 48: 178–192, 2014. doi: 10.1177/0023677213516312.
 223. **Mailhot-Larouche S, Deschênes L, Lortie K, Gazzola M, Marsolais D, Brunet D, Robichaud A, Bossé Y.** Assessment of respiratory function in conscious mice by double-chamber plethysmography. *J Vis Exp* 2018, 2018. doi: 10.3791/57778.
 224. **Malakoff D.** Balancing the science budget [Online]. *Science (80-)* 287: 952–955, 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691566>.
 225. **Mancini N, Solforosi L, Clementi N, De Marco D, Clementi M, Burioni R.** A potential role for monoclonal antibodies in prophylactic and therapeutic treatment of influenza. *Antivir Res* 92: 15–26, 2011. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.07.013.
 226. **Mancuso CE, Gabay MP, Steinke LM, Vanosdol SJ.** Peramivir: an intravenous neuraminidase inhibitor for the treatment of 2009 H1N1 influenza. *Ann Pharmacother* 44: 1240–1249, 2010. doi: 10.1345/aph.1P031.
 227. **Manuguerra JC, Zientara S, Sailleau C, Rousseaux C, Gicquel B, Rijks I, Van Der Werf S.** Evidence for evolutionary stasis and genetic drift by genetic analysis of two equine influenza H3 viruses isolated in France. In: *Veterinary Microbiology*. Vet Microbiol, p. 59–70.
 228. **Marjuki H, Mishin VP, Chai N, Tan M-W, Newton EM, Tegeris J, Erlandson K, Willis M, Jones J, Davis T, Stevens J, Gubareva L V.** Human Monoclonal Antibody 81.39a Effectively Neutralizes Emerging Influenza A Viruses of Group 1 and 2 Hemagglutinins. *J Virol* 90: 10446–10458, 2016. doi: 10.1128/jvi.01284-16.
 229. **Martin TR, Gerard NP, Galli SJ, Drazen JM.** Pulmonary responses to bronchoconstrictor agonists in the mouse. *J Appl Physiol* 64: 2318–2323, 1988. doi: 10.1152/jappl.1988.64.6.2318.
 230. **Mattner J, Schindler H, Diefenbach A, Röllinghoff M, Gresser I, Bogdan C.** Induction or suppression of a B cell-specific response to self antigen in vivo is dependent upon dendritic cell activation via the TNF- α receptor at the time of antigen uptake. *Eur J Immunol* 30: 2268–2280, 2000. doi: 10.1002/1521-4141(2000)30:8<2268::AID-IMMU2268>3.0.CO;2-M.
 231. **Mauderly JL.** Effect of age on pulmonary structure and function of immature and adult animals and man. *Fed Proc* 38: 173–177, 1979.
 232. **Mauderly JL, Hahn FF.** The effects of age on lung function and structure of adult animals. [Online]. *Adv Vet Sci Comp Med* 26: 35–77, 1982. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6758542> [17 Aug. 2020].
 233. **McDonald RS, Sambol AR, Heimbuch BK, Brown TL, Hinrichs SH, Wander JD.** Proportional mouse model for aerosol infection by influenza. *J Appl Microbiol* 113: 767–778, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05402.x.
 234. **McGovern TK, Robichaud A, Fereydoonzad L, Schuessler TF, Martin JG.** Evaluation of respiratory system mechanics in mice using the forced oscillation technique. *J Vis Exp* , 2013. doi: 10.3791/50172.
 235. **Medina RA, Manicassamy B, Stertz S, Seibert CW, Hai R, Belshe RB, Frey SE, Basler CF, Palese P, Garcia-Sastre A.** Pandemic 2009 H1N1 vaccine protects against 1918 Spanish influenza virus. *Nat Commun* 1: 28, 2010. doi: 10.1038/ncomms1026.
 236. **Alvites, R.D., Caseiro, A.R., Pedrosa, S.S., Branquinho, M.E., Varejão, A.S. and Maurício, A.C.** (2018), The Nasal Cavity of the Rat and Mouse—Source of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Peripheral Nerve Injury. *Anat. Rec.*, 301: 1678-1689. <https://doi.org/10.1002/ar.23844>
 237. **Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM.** M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol* 164: 6166–6173, 2000. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166.
 238. **Mitzner W.** Ventilation: Collateral. .

239. **Mitzner W.** Mechanics of the lung in the 20th century. *Compr Physiol* 1: 2009–2027, 2011. doi: 10.1002/cphy.c100067.
240. **Mitzner W, Tankersley C.** Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 340–1, 1998. doi: 10.1164/ajrccm.158.1.let1.
241. **Mizgerd JP, Skerrett SJ.** Animal models of human pneumonia. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 294 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol: 2008.
242. **Monteiro R.** Les anticorps monoclonaux et protéines de fusion thérapeutiques - ppt télécharger [Online]. *Online*: 2020. <https://slideplayer.fr/slide/481360/> [17 Aug. 2020].
243. **Moorthy NSHN, Poongavanam V, Pratheepa V.** Viral M2 ion channel protein: a promising target for anti-influenza drug discovery. *Mini Rev Med Chem* 14: 819–30, 2014. doi: 10.2174/138955751410141020150822.
244. **Mortola JP, Frappell PB.** On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. *Can J Physiol Pharmacol* 76: 937–944, 1998. doi: 10.1139/cjpp-76-10-11-937.
245. **Mortola JP, Seifert EL.** Circadian patterns of breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 131: 91–100, 2002. doi: 10.1016/S1569-9048(02)00040-X.
246. **Morton DB.** A systematic approach for establishing humane endpoints. *ILAR J* 41: 80–6, 2000. doi: 10.1093/ilar.41.2.80.
247. **Mousel MR, Stroup WW, Nielsen MK.** Locomotor activity, core body temperature, and circadian rhythms in mice selected for high or low heat loss. *J Anim Sci* 79: 861–868, 2001. doi: 10.2527/2001.794861x.
248. **Mozdzanowska K, Maiese K, Furchner M, Gerhard W.** Treatment of influenza virus-infected SCID mice with nonneutralizing antibodies specific for the transmembrane proteins matrix 2 and neuraminidase reduces the pulmonary virus titer but fails to clear the infection. *Virology* 254: 138–146, 1999. doi: 10.1006/viro.1998.9534.
249. **Mubareka S, Lowen AC, Steel J, Coates AL, García-Sastre A, Palese P.** Transmission of influenza virus via aerosols and fomites in the guinea pig model. *J Infect Dis* 199: 858–865, 2009. doi: 10.1086/597073.
250. **Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenstrom J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan GF, Beyer WE, Schutten M, Olsen B, Osterhaus AD, Fouchier RA.** Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog* 3: e61, 2007. doi: 10.1371/journal.ppat.0030061.
251. **Munster VJ, de Wit E, van den Brand JMA, Herfst S, Schrauwen EJA, Bestebroer TM, van de Vijver D, Boucher CA, Koopmans M, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus ADME, Fouchier RAM.** Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science* 325: 481–3, 2009. doi: 10.1126/science.1177127.
252. **Murphy JT, Burey AP, Beebe AM, Gu D, Presta LG, Merghoub T, Wolchok JD.** Anaphylaxis caused by repetitive doses of a GITR agonist monoclonal antibody in mice. *Blood* 123: 2172–2180, 2014. doi: 10.1182/blood-2013-12-544742.
253. **Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, vanGinderachter JA, Vogel SN, Wynn TA.** Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41 Cell Press: 14–20, 2014.
254. **Naim HY, Roth MG.** Basis for selective incorporation of glycoproteins into the influenza virus envelope. *J Virol* 67: 4831–4841, 1993. doi: 10.1128/jvi.67.8.4831-4841.1993.
255. **Nelson MI, Holmes EC.** The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 8: 196–205, 2007. doi: 10.1038/nrg2053.
256. **Nemeroff ME, Barabino SML, Li Y, Keller W, Krug RM.** Influenza virus NS1 protein

- interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell* 1: 991–1000, 1998. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80099-4.
257. **Nemzek JA, Xiao H-Y, Minard AE, Bolgos GL, Remick DG.** Humane endpoints in shock research. *Shock* 21: 17–25, 2004. doi: 10.1097/01.shk.0000101667.49265.fd.
 258. **Ninomiya K, Fukui T, Imai T, Matsui M, Matsuoka K.** Effect of maclorides on duration and resolution of symptoms and complication of pneumonia in children with influenza [Online]. *J Nippon Med Sch* 69: 53–57, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847511>.
 259. **Nishimura K, Kim S, Zhang L, Cross TA.** The closed state of a H⁺ channel helical bundle combining precise orientational and distance restraints from solid state NMR. *Biochemistry* 41: 13170–7, 2002. doi: 10.1021/bi0262799.
 260. **Nogusa S, Ritz BW, Kassim SH, Jennings SR, Gardner EM.** Characterization of age-related changes in natural killer cells during primary influenza infection in mice. *Mech Ageing Dev* 129: 223–30, 2008. doi: 10.1016/j.mad.2008.01.003.
 261. **Noshi T, Kitano M, Taniguchi K, Yamamoto A, Omoto S, Baba K, Hashimoto T, Ishida K, Kushima Y, Hattori K, Kawai M, Yoshida R, Kobayashi M, Yoshinaga T, Sato A, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Shishido T, Naito A.** In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res* 160: 109–117, 2018. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.10.008.
 262. **Noton SL, Fearn R.** Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication. *Virology* 479–480 Academic Press Inc.: 545–554, 2015.
 263. **O'Neil JJ, Raub JA.** Pulmonary function testing in small laboratory mammals [Online]. *Env Heal Perspect* 56: 11–22, 1984. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6434299>.
 264. **Ogasawara T, Gotoh B, Suzuki H, Asaka -i J, Shimokata K, Rott R, Nagal Y.** Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *EMBO J* 11: 467–472, 1992. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05076.x.
 265. **Oku N, Nojima S, Inoue K.** Studies on the interaction of HVJ (Sendai Virus) with liposomal membranes. HVJ-induced permeability increase of liposomes containing glycoporphin. *Virology* 116: 419–27, 1982. doi: 10.1016/0042-6822(82)90136-2.
 266. **Olfert ED, Godson DL.** Humane endpoints for infectious disease animal models. *ILAR J* 41: 99–104, 2000. doi: 10.1093/ilar.41.2.99.
 267. **Ooi LSM, Ho WS, Ngai KKK, Tian L, Chan PKS, Sun SSM, Ooi VEC.** Narcissus tazetta lectin shows strong inhibitory effects against respiratory syncytial virus, influenza A (H1N1, H3N2, H5N1) and B viruses. *J Biosci* 35: 95–103, 2010. doi: 10.1007/s12038-010-0012-8.
 268. **Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G.** The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. [Online]. *J Anat* 132: 71–84, 1981. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7275793> [7 Aug. 2020].
 269. **Parker JC, Whiteman MD, Richter CB.** Susceptibility of inbred and outbred mouse strains to Sendai virus and prevalence of infection in laboratory rodents. *Infect Immun* 19: 123–130, 1978. doi: 10.1128/iai.19.1.123-130.1978.
 270. **Parra SC, Gaddy LR, Takaro T.** Ultrastructural studies of canine interalveolar pores (of Kohn). [Online]. *Lab Invest* 38: 8–13, 1978. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/340781> [7 Aug. 2020].
 271. **Paul W.** *Fundamental immunology*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
 272. **Paul WE.** Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell* 57 Cell: 521–524, 1989.
 273. **Pennock BE, Cox CP, Rogers RM, Cain WA, Wells JH.** A noninvasive technique for measurement of changes in specific airway resistance [Online]. *J Appl Physiol Respir Env Exerc Physiol* 46: 399–406, 1979. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/422457>.
 274. **Percy DH, Auger DC, Croy BA.** Signs and Lesions of Experimental Sendai Virus Infection in

- Two Genetically Distinct Strains of SCID/Beige Mice. *Vet Pathol* 31: 67–73, 1994. doi: 10.1177/030098589403100109.
275. **Percy DH, Palmer DJ.** Pathogenesis of Sendai virus infection in the Syrian hamster. [Online]. *Lab Anim Sci* 47: 132–7, 1997. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150490> [11 Aug. 2020].
276. **Perez VJ, Eatwell JC, Samorajski T.** A metabolism chamber for measuring oxygen consumption in the laboratory rat and mouse. *Physiol Behav* 24: 1185–1189, 1980. doi: 10.1016/0031-9384(80)90070-0.
277. **Pica N, Chou YY, Bouvier NM, Palese P.** Transmission of influenza B viruses in the guinea pig. *J Virol* 86: 4279–4287, 2012. doi: 10.1128/JVI.06645-11.
278. **Pica N, Iyer A, Ramos I, Bouvier NM, Fernandez-Sesma A, Garcia-Sastre A, Lowen AC, Palese P, Steel J.** The DBA.2 Mouse Is Susceptible to Disease following Infection with a Broad, but Limited, Range of Influenza A and B Viruses. *J Virol* 85: 12825–12829, 2011. doi: 10.1128/jvi.05930-11.
279. **Pinkerton KE, Barry BE, O’Neil JJ, Raub JA, Pratt PC, Crapo JD.** Morphologic changes in the lung during the lifespan of Fischer 344 rats. *Am J Anat* 164: 155–174, 1982. doi: 10.1002/aja.1001640206.
280. **Pirhonen J, Sareneva T, Kurimoto M, Julkunen I, Matikainen S.** Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. [Online]. *J Immunol* 162: 7322–9, 1999. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358182> [14 Aug. 2020].
281. **Plancoulaine S, Gessain A, Joubert M, Tortevoeye P, Jeanne I, Talarmin A, De The G, Abel L.** Detection of a major gene predisposing to human T lymphotropic virus type I infection in children among an endemic population of african origin. *J Infect Dis* 182: 405–412, 2000. doi: 10.1086/315741.
282. **Plancoulaine S, Gessain A, Van Beveren M, Tortevoeye P, Abel L.** Evidence for a recessive major gene predisposing to human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in a population in which HHV-8 is endemic. *J Infect Dis* 187: 1944–1950, 2003. doi: 10.1086/375345.
283. **Prabakaran M, Prabhu N, He F, Hongliang Q, Ho HT, Qiang J, Meng T, Goutama M, Kwang J.** Combination therapy using chimeric monoclonal antibodies protects mice from lethal H5N1 infection and prevents formation of escape mutants. *PLoS One* 4, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0005672.
284. **Rabus R, Kube M, Beck A, Widdel F, Reinhardt R.** Genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 178: 506–516, 2002. doi: 10.1007/s00203-002-0487-2.
285. **Ramirez JM, Ward CS, Neul JL.** Breathing challenges in Rett Syndrome: Lessons learned from humans and animal models. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 189: 280–287, 2013.
286. **Rappaport DS, Niewoehner DE, Kim TH, Song CW, Levitt SH.** Uptake of carbon monoxide by C3H mice following X irradiation of lung only or total-body irradiation with ⁶⁰Co. *Radiat Res* 93: 254–261, 1983. doi: 10.2307/3575981.
287. **Raux M, Fiamma MN, Similowski T, Straus C.** Contrôle de la ventilation : physiologie et exploration en réanimation Control of breathing: Physiology and fonctional testing in intensive care. 16: 511–520, 2007. doi: 10.1016/j.reaurg.2007.09.008.
288. **Reed LJ, Muench H.** A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS12. *Am J Epidemiol* 27: 493–497, 1938. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
289. **Reinhard C, Eder G, Fuchs H, Ziesenis A, Heyder J, Schulz H.** Inbred strain variation in lung function. *Mamm Genome* 13: 429–437, 2002. doi: 10.1007/s00335-002-3005-6.
290. **Renne RA, Gideon KM, Miller RA, Mellick PW, Grumbein SL.** Histologic Methods and Interspecies Variations in the Laryngeal Histology of F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *Toxicol Pathol* 20: 44–51, 1992. doi: 10.1177/019262339202000106.
291. **Retamal M, Abed Y, Rheume C, Cappelletti F, Clementi N, Mancini N, Clementi M, Burioni R, Boivin G.** Heterosubtypic protection conferred by the human monoclonal antibody

- PN-SIA28 against influenza A virus lethal infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 2647–2653, 2015. doi: 10.1128/AAC.00118-15.
292. **Reznik GK.** Comparative anatomy, physiology, and function of the upper respiratory tract. *Environ Health Perspect* 85: 171–176, 1990. doi: 10.1289/ehp.85-1568330.
293. **Richardson JC, Akkina RK.** NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol* 116: 69–80, 1991. doi: 10.1007/BF01319232.
294. **Robichaud A, Fereydoonzad L, Limjunyawong N, Rabold R, Allard B, Benedetti A, Martin JG, Mitzner W.** Automated full-range pressure-volume curves in mice and rats. *J Appl Physiol* 123: 746–756, 2017. doi: 10.1152/jappphysiol.00856.2016.
295. **Robinson TW, Cureton RJ, Heath RB.** The pathogenesis of Sendai virus infection in the mouse lung. *J Med Microbiol* 1: 89–95, 1968. doi: 10.1099/00222615-1-1-89.
296. **Rochat S, Komada H, Kolakofsky D.** Loss of V protein expression in human parainfluenza virus type 1 is not a recent event. *Virus Res* 24: 137–144, 1992. doi: 10.1016/0168-1702(92)90002-Q.
297. **Rodriguez L, Nogales A, Martínez-Sobrido L.** Influenza a virus studies in a mouse model of infection. *J Vis Exp* 2017, 2017. doi: 10.3791/55898.
298. **Rogers GN, Paulson JC.** Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127: 361–373, 1983. doi: 10.1016/0042-6822(83)90150-2.
299. **Rohweder B, Semmelmann F, Endres C, Sterner R.** Standardized cloning vectors for protein production and generation of large gene libraries in Escherichia Coli. *Biotechniques* 64: 24–26, 2018. doi: 10.2144/000114628.
300. **Rossignol JF, La Frazia S, Chiappa L, Ciucci A, Santoro MG.** Thiazolidines, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. *J Biol Chem* 284: 29798–29808, 2009. doi: 10.1074/jbc.M109.029470.
301. **Rossman JS, Leser GP, Lamb RA.** Filamentous Influenza Virus Enters Cells via Macropinocytosis. *J Virol* 86: 10950–10960, 2012. doi: 10.1128/jvi.05992-11.
302. **Ruigrok RWH, Barge A, Durrer P, Brunner J, Ma K, Whittaker GR.** Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology* 267: 289–298, 2000. doi: 10.1006/viro.1999.0134.
303. **Russ G, Poláková K, Kostolanský F, Styk B, Vancíková M.** Monoclonal antibodies to glycopolypeptides HA1 and HA2 of influenza virus haemagglutinin. [Online]. *Acta Virol* 31: 374–86, 1987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2891276> [17 Aug. 2020].
304. **Russell CJ, Hurwitz JL.** Sendai virus as a backbone for vaccines against RSV and other human paramyxoviruses. *Expert Rev. Vaccines* 15 Taylor and Francis Ltd: 189–200, 2016.
305. **Ryu W-S.** Other Negative-Strand RNA Viruses. In: *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. Elsevier, p. 213–224.
306. **Sagartz JW, Madarasz AJ, Forsell MA, Burger GT, Ayres PH, Coggins CR e.** Histological Sectioning of the Rodent Larynx for Inhalation Toxicity Testing. *Toxicol Pathol* 20: 118–121, 1992. doi: 10.1177/019262339202000115.
307. **Sahebjami H.** Lung tissue elasticity during the lifespan of fischer 344 rats. *Exp Lung Res* 17: 887–902, 1991. doi: 10.3109/01902149109064324.
308. **Salvatore M, Basler CF, Parisien J-P, Horvath CM, Bourmakina S, Zheng H, Muster T, Palese P, García-Sastre A.** Effects of Influenza A Virus NS1 Protein on Protein Expression: the NS1 Protein Enhances Translation and Is Not Required for Shutoff of Host Protein Synthesis. *J Virol* 76: 1206–1212, 2002. doi: 10.1128/jvi.76.3.1206-1212.2002.
309. **Sánchez-Fauquier A, Villanueva N, Melero JA.** Isolation of cross-reactive, subtype-specific monoclonal antibodies against influenza virus HA1 and HA2 hemagglutinin subunits. *Arch Virol* 97: 251–265, 1987. doi: 10.1007/BF01314425.
310. **Sangster M, Suzette Smith F, Coleclough C, Hurwitz JL.** Human parainfluenza virus type 1 immunization of infant mice protects from subsequent Sendai virus infection. *Virology* 212: 13–19, 1995. doi: 10.1006/viro.1995.1448.

311. **Schmidt AC, Couch RB, Galasso GJ, Hayden FG, Mills J, Murphy BR, Chanock RM.** Current research on respiratory viral infections: Third International Symposium. In: *Antiviral Research*. 2001, p. 157–196.
312. **Schmitz N, Kurrer M, Bachmann MF, Kopf M.** Interleukin-1 Is Responsible for Acute Lung Immunopathology but Increases Survival of Respiratory Influenza Virus Infection. *J Virol* 79: 6441–6448, 2005. doi: 10.1128/jvi.79.10.6441-6448.2005.
313. **Schuessler TF, Bates JHT.** A Computer-Controlled Research Ventilator for Small Animals: Design and Evaluation. *IEEE Trans Biomed Eng* 42: 860–866, 1995. doi: 10.1109/10.412653.
314. **SCHULMAN JL, KILBOURNE ED.** Induction of specific heterotypic immunity in mice by a single infection with influenza A virus. *J Bacteriol* 89: 170–4, 1965. doi: 10.1128/JB.89.1.170-174.1965.
315. **Schulz H, Johner C, Eder G, Ziesenis A, Reitmeier P, Heyder J, Balling R.** Respiratory mechanics in mice: Strain and sex specific differences. *Acta Physiol Scand* 174: 367–375, 2002. doi: 10.1046/j.1365-201x.2002.00955.x.
316. **Schwarte LA, Zuurbier CJ, Ince C.** Mechanical ventilation of mice. In: *Basic Research in Cardiology*. Basic Res Cardiol, p. 510–520.
317. **Sedova ES, Scherbinin DN, Lysenko AA, Alekseeva S V., Artemova EA, Shmarov MM.** Non-neutralizing antibodies directed at conservative influenza antigens. *Acta Naturae* 11 Acta Naturae: 22–32, 2019.
318. **Seifert EL, Knowles J, Mortola JP.** Continuous circadian measurements of ventilation in behaving adult rats. *Respir Physiol* 120: 179–183, 2000. doi: 10.1016/S0034-5687(00)00108-0.
319. **Seifert EL, Mortola JP.** The circadian pattern of breathing in conscious adult rats. *Respir Physiol* 129: 297–305, 2002. doi: 10.1016/S0034-5687(01)00316-4.
320. **Seo SU, Kwon HJ, Ko HJ, Byun YH, Seong BL, Uematsu S, Akira S, Kweon MN.** Type I interferon signaling regulates Ly6Chi monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. *PLoS Pathog* 7, 2011. doi: 10.1371/journal.ppat.1001304.
321. **Shaw MA, Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Collins A.** Human genetic susceptibility and infection with *Leishmania peruviana*. *Am J Hum Genet* 57: 1159–1168, 1995.
322. **Shearn-Bochsler V, Ip HS, Ballmann A, Hall JS, Allison AB, Ballard J, Ellis JC, Cook R, Gibbs SEJ, Dwyer C.** Experimental infection of common eider ducklings with wellfleet bay virus, a newly characterized orthomyxovirus. *Emerg Infect Dis* 23: 1974–1981, 2017. doi: 10.3201/eid2312.160366.
323. **Shi L, Xiong H, He J, Deng H, Li Q, Zhong Q, Hou W, Cheng L, Xiao H, Yang Z.** Antiviral activity of arbidol against influenza A virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, coxsackie virus and adenovirus in vitro and in vivo. *Arch Virol* 152: 1447–1455, 2007. doi: 10.1007/s00705-007-0974-5.
324. **Shinya K, Watanabe S, Ito T, Kasai N, Kawaoka Y.** Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice. *J Gen Virol* 88: 547–553, 2007. doi: 10.1099/vir.0.82411-0.
325. **Shirey KA, Lai W, Pletneva LM, Karp CL, Divanovic S, Blanco JCG, Vogel SN.** Role of the lipoxygenase pathway in RSV-induced alternatively activated macrophages leading to resolution of lung pathology. *Mucosal Immunol* 7: 549–557, 2014. doi: 10.1038/mi.2013.71.
326. **Shortman K, Liu YJ.** Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2 Nat Rev Immunol: 151–161, 2002.
327. **Simon AY, Moritoh K, Torigoe D, Asano A, Sasaki N, Agui T.** Multigenic control of resistance to Sendai virus infection in mice. *Infect Genet Evol* 9: 1253–1259, 2009. doi: 10.1016/j.meegid.2009.08.011.
328. **Slate AR, Bandyopadhyay S, Francis KP, Papich MG, Karolewski B, Hod EA, Prestia KA.** Efficacy of enrofloxacin in a mouse model of sepsis. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 53: 381–386, 2014.
329. **Smee DF, Hurst BL, Wong MH, Bailey KW, Tarbet EB, Morrey JD, Furuta Y.** Effects of

- the combination of favipiravir (T-705) and oseltamivir on influenza A virus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 126–133, 2010. doi: 10.1128/AAC.00933-09.
330. **Smietanka K, Minta Z, Wyrostek K, Jozwiak M, Olszewska M, Domanska-Blicharz AK, Reichert AM, Pikula A, Habyarimana A, van den Berg T.** Susceptibility of pigeons to clade 1 and 2.2 high pathogenicity avian influenza H5N1 virus. *Avian Dis* 55: 106–112, 2011. doi: 10.1637/9514-090110-ResNote.1.
 331. **Smith AG, Sheridan PA, Harp JB, Beck MA.** Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. *J Nutr* 137: 1236–1243, 2007. doi: 10.1093/jn/137.5.1236.
 332. **Snyder EM, Johnson BD, Beck KC.** An open-circuit method for determining lung diffusing capacity during exercise: comparison to rebreath. *J Appl Physiol* 99: 1985–91, 2005. doi: 10.1152/jappphysiol.00348.2005.
 333. **Soothill JS, Morton DB, Ahmad A.** The HID50 (hypothermia-inducing dose 50): an alternative to the LD50 for measurement of bacterial virulence. [Online]. *Int J Exp Pathol* 73: 95–8, 1992. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1576081> [17 Aug. 2020].
 334. **Soutiere SE, Tankersley CG, Mitzner W.** Differences in alveolar size in inbred mouse strains. *Respir Physiol Neurobiol* 140: 283–291, 2004. doi: 10.1016/j.resp.2004.02.003.
 335. **Srivastava B, Blazejewska P, Heßmann M, Bruder D, Geffers R, Manuel S, Gruber AD, Schughart K.** Host genetic background strongly influences the response to influenza a virus infections. *PLoS One* 4, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0004857.
 336. **Stetson DB, Medzhitov R.** Type I interferons in host defense. *Immunity* 25: 373–81, 2006. doi: 10.1016/j.immuni.2006.08.007.
 337. **Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA.** Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science (80-)* 312: 404–410, 2006. doi: 10.1126/science.1124513.
 338. **Stiles BG, Campbell YG, Castle RM, Grove SA.** Correlation of temperature and toxicity in murine studies of staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin 1. *Infect Immun* 67: 1521–1525, 1999. doi: 10.1128/iai.67.3.1521-1525.1999.
 339. **Stone AES, Giguere S, Castleman WL.** IL-12 reduces the severity of Sendai virus-induced bronchiolar inflammation and remodeling. *Cytokine* 24: 103–13, 2003. doi: 10.1016/j.cyto.2003.07.005.
 340. **Streeter DG, Witkowski JT, Khare GP, Sidwell RW, Bauer RJ, Robins RK, Simon LN.** Mechanism of action of 1-*D*-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent [Online]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 1174–1178, 1973. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4197928>.
 341. **Subbarao EK, London W, Murphy BR.** A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range [Online]. *J Virol* 67: 1761–1764, 1993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8445709>.
 342. **Sugiyama H, Okada C, Bewtra AK, Hopp RJ, Townley RG.** The effect of formoterol on the late asthmatic phenomena in guinea pigs. *J Allergy Clin Immunol* 89: 858–866, 1992. doi: 10.1016/0091-6749(92)90442-5.
 343. **Sun J, Kudahl UJ, Simon C, Cao Z, Reinherz EL, Brusic V.** Large-scale analysis of B-cell epitopes on influenza virus hemagglutinin - implications for cross-reactivity of neutralizing antibodies. *Front Immunol* 5: 38, 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00038.
 344. **Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ.** Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med* 15: 277–284, 2009. doi: 10.1038/nm.1929.
 345. **Swayne DE, Suarez DL.** Highly pathogenic avian influenza. *OIE Rev Sci Tech* 19: 463–482, 2000. doi: 10.20506/rst.19.2.1230.
 346. **Swayne DE, Suarez DL, Schultz-Cherry S, Tumpey TM, King DJ, Nakaya T, Palese P,**

- Garcia-Sastre A.** Recombinant paramyxovirus type 1-avian influenza-H7 virus as a vaccine for protection of chickens against influenza and Newcastle disease. *Avian Dis* 47: 1047–1050, 2003. doi: 10.1637/0005-2086-47.s3.1047.
347. **Szretter KJ, Gangappa S, Lu X, Smith C, Shieh W-J, Zaki SR, Sambhara S, Tumpey TM, Katz JM.** Role of Host Cytokine Responses in the Pathogenesis of Avian H5N1 Influenza Viruses in Mice. *J Virol* 81: 2736–2744, 2007. doi: 10.1128/jvi.02336-06.
348. **Takano R, Nidom CA, Kiso M, Muramoto Y, Yamada S, Shinya K, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y.** A comparison of the pathogenicity of avian and swine H5N1 influenza viruses in Indonesia. *Arch Virol* 154: 677–681, 2009. doi: 10.1007/s00705-009-0353-5.
349. **Tankersley CG, Rabold R, Mitzner W.** Differential lung mechanics are genetically determined in inbred murine strains. *J Appl Physiol* 86: 1764–1769, 1999. doi: 10.1152/jappl.1999.86.6.1764.
350. **Tashiro M. M.** Determinants of organ tropism of Sendai virus. *Front Biosci* 4: d642, 1999. doi: 10.2741/tashiro.
351. **Tashiro M. M.** Determinants of organ tropism of Sendai virus. *Front Biosci* 4: d642, 1999. doi: 10.2741/tashiro.
352. **Tashiro M, Seto JT, Choosakul S, Yamakawa M, Klenk HD, Rott R.** Budding site of sendai virus in polarized epithelial cells is one of the determinants for tropism and pathogenicity in mice. *Virology* 187: 413–422, 1992. doi: 10.1016/0042-6822(92)90443-S.
353. **Tashiro M, Yokogoshi Y, Tobita K, Seto JT, Rott R, Kido H.** Trypsin Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity. *J Virol* 66: 7211–7216, 1992. doi: 10.1128/jvi.66.12.7211-7216.1992.
354. **Terry PB, Traystman RJ.** The Clinical Significance of Collateral Ventilation. *Ann Am Thorac Soc* 13: 2251–2257, 2016. doi: 10.1513/AnnalsATS.201606-448FR.
355. **Thangavel RR, Bouvier NM.** Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology. *J Immunol Methods* 410: 60–79, 2014. doi: 10.1016/j.jim.2014.03.023.
356. **Thomas PG, Brown SA, Yue W, So J, Webby RJ, Doherty PC.** An unexpected antibody response to an engineered influenza virus modifies CD8+ T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2764–2769, 2006. doi: 10.1073/pnas.0511185103.
357. **Tobin GJ, Trujillo JD, Bushnell R V, Lin G, Chaudhuri AR, Long J, Barrera J, Pena L, Grubman MJ, Nara PL.** Deceptive imprinting and immune refocusing in vaccine design. *Vaccine* 26: 6189–6199, 2008. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.080.
358. **Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO.** New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 9: e1003657, 2013. doi: 10.1371/journal.ppat.1003657.
359. **Trammell RA, Toth LA.** Markers for predicting death as an outcome for mice used in infectious disease research. *Comp Med* 61: 492–498, 2011.
360. **Triana-Baltzer GB, Gubareva L V, Nicholls JM, Pearce MB, Mishin VP, Belser JA, Chen LM, Chan RW, Chan MC, Hedlund M, Larson JL, Moss RB, Katz JM, Tumpey TM, Fang F.** Novel pandemic influenza A(H1N1) viruses are potently inhibited by DAS181, a sialidase fusion protein. *PLoS One* 4: e7788, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0007788.
361. **Tsunoda K, Lee XP, Watanabe S, Doge K, Akiya Y, Watanabe T.** Sex differences in respiratory and cardiovascular effects of beta-endorphin. [Online]. *Nihon Hoigaku Zasshi* 47: 193–201, 1993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8345681> [17 Aug. 2020].
362. **Tuna N, Karabay O, Yahyaoglu M.** Comparison of efficacy and safety of oseltamivir and zanamivir in pandemic influenza treatment. *Indian J Pharmacol* 44: 780–3, 2012. doi: 10.4103/0253-7613.103301.
363. **Tuttle AH, Philip VM, Chesler EJ, Mogil JS.** Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nat. Methods* 15 Nature Publishing Group: 994–996, 2018.

364. **Van Heeckeren AM, Tscheikuna J, Walenga RW, Konstan MW, Davis PB, Erokwu B, Haxhiu MA, Ferkol TW.** Effect of *Pseudomonas* infection on weight loss, lung mechanics, and cytokines in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 271–279, 2000. doi: 10.1164/ajrccm.161.1.9903019.
365. **Van Reeth K.** Cytokines in the pathogenesis of influenza. In: *Veterinary Microbiology*. 2000, p. 109–116.
366. **Varin A, Mukhopadhyay S, Herbein G, Gordon S.** Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood* 115: 353–362, 2010. doi: 10.1182/blood-2009-08-236711.
367. **Vasin A V., Temkina OA, Egorov V V., Klotchenko SA, Plotnikova MA, Kiselev OI.** Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins. *Virus Res.* 185 Elsevier: 53–63, 2014.
368. **Velkov T, Ong C, Baker MA, Kim H, Li J, Nation RL, Huang JX, Cooper MA, Rockman S.** The antigenic architecture of the hemagglutinin of influenza H5N1 viruses. *Mol Immunol* 56: 705–719, 2013. doi: 10.1016/j.molimm.2013.07.010.
369. **Vijayaraghavan R, Schaper M, Thompson R, Stock MF, Alarie Y.** Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract. *Arch Toxicol* 67: 478–490, 1993. doi: 10.1007/BF01969919.
370. **Vlach KD, Boles JW, Stiles BG.** Telemetric evaluation of body temperature and physical activity as predictors of mortality in a murine model of staphylococcal enterotoxigenic shock. *Comp Med* 50: 160–166, 2000.
371. **von Itzstein M.** The war against influenza: Discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 6: 967–974, 2007. doi: 10.1038/nrd2400.
372. **Wakefield LM, Roberts AB.** TGF- β signaling: Positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 Elsevier Ltd: 22–29, 2002.
373. **Walker LM, Huber M, Doores KJ, Falkowska E, Pejchal R, Julien JP, Wang SK, Ramos A, Chan-Hui PY, Moyle M, Mitcham JL, Hammond PW, Olsen OA, Phung P, Fling S, Wong CH, Phogat S, Wrin T, Simek MD, Protocol GPI, Koff WC, Wilson IA, Burton DR, Poignard P.** Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477: 466–470, 2011. doi: 10.1038/nature10373.
374. **Wang C, Armstrong SM, Sugiyama MG, Tabuchi A, Krauszman A, Kuebler WM, Mullen B, Advani S, Advani A, Lee WL.** Influenza-Induced Priming and Leak of Human Lung Microvascular Endothelium upon Exposure to *Staphylococcus aureus*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 53: 459–70, 2015. doi: 10.1165/rcmb.2014-0373OC.
375. **Wang C, Takeuchi K, Pinto LH, Lamb RA.** Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block [Online]. *J Virol* 67: 5585–5594, 1993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7688826>.
376. **Wang S, Mata-Fink J, Kriegsman B, Hanson M, Irvine DJ, Eisen HN, Burton DR, Wittrup KD, Kardar M, Chakraborty AK.** Manipulating the selection forces during affinity maturation to generate cross-reactive HIV antibodies. *Cell* 160: 785–797, 2015. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.027.
377. **Wang TT, Palese P.** Universal epitopes of influenza virus hemagglutinins? *Nat Struct Mol Biol* 16: 233–234, 2009. doi: 10.1038/nsmb.1574.
378. **Wang X, Li M, Zheng H, Muster T, Palese P, Beg AA, García-Sastre A.** Influenza A Virus NS1 Protein Prevents Activation of NF- κ B and Induction of Alpha/Beta Interferon. *J Virol* 74: 11566–11573, 2000. doi: 10.1128/jvi.74.24.11566-11573.2000.
379. **Ward AC.** Virulence of influenza A virus for mouse lung. *Virus Genes* 14: 187–194, 1997.
380. **Ward CW, Dopheide TA.** Influenza virus haemagglutinin. Structural predictions suggest that the fibrillar appearance is due to the presence of a coiled-coil [Online]. *Aust J Biol Sci* 33: 441–447, 1980. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7447789>.

381. **Ward JM.** Naturally occurring Sendai virus disease of mice. [Online]. *Lab Anim Sci* 24: 938–42, 1974. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4374603> [12 Aug. 2020].
382. **Warn PA, Brampton MW, Sharp A, Morrissey G, Steel N, Denning DW, Priest T.** Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in experimental fungal infections. *Lab Anim* 37: 126–131, 2003. doi: 10.1258/00236770360563769.
383. **Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y.** Evolution and ecology of influenza A viruses [Online]. *Microbiol Rev* 56: 152–179, 1992. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1579108>.
384. **Wegmann M.** Animal models of chronic experimental asthma - Strategies for the identification of new therapeutic targets. In: *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. BioMed Central, p. S4.
385. **Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC.** Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333: 426–431, 1988. doi: 10.1038/333426a0.
386. **White CL, Janakiraman MN, Laver GW, Philippon C, Vasella A, Air GM, Luo M.** A Sialic Acid-derived Phosphonate Analog Inhibits Different Strains of Influenza Virus Neuraminidase with Different Efficiencies. *J Mol Biol* 245: 623–634, 1995. doi: 10.1006/jmbi.1994.0051.
387. **Whittaker GR, Helenius A.** Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* 246: 1–23, 1998. doi: 10.1006/viro.1998.9165.
388. **WHO.** Global alert and Response (GAR) Antiviral drugs for pandemic (H1N1) 2009: definitions and use [Online]. http://www.who.int/csr/disease/swineflu/frequently_asked_questions/antivirals/definitions_use/en/.
389. **Wiley DC, Wilson IA, Skehel JJ.** Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation [Online]. *Nature* 289: 373–378, 1981. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6162101>.
390. **Wofsy D, Ledbetter JA, Hendler PL, Seaman WE.** Treatment of murine lupus with monoclonal anti-T cell antibody. *J Immunol* 134: 852–857, 1985.
391. **Wright PF.** Does oseltamivir work against influenza B? *Clin Infect Dis* 44: 203, 2007. doi: 10.1086/509933.
392. **Wrigley NG, Laver WG, Downie JC.** Binding of antibodies to isolated haemagglutinin and neuraminidase molecules of influenza virus observed in the electron microscope [Online]. *J Mol Biol* 109: 405–421, 1977. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/64612>.
393. **Xiong F, Xia L, Wang J, Wu B, Wang D, Yuan L, Cheng Y, Zhu H, Che X, Zhang Q, Zhao G, Wang Y.** A high-affinity CDR-grafted antibody against influenza A H5N1 viruses recognizes a conserved epitope of H5 hemagglutinin. *PLoS One* 9, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0088777.
394. **Xu L, Bao L, Deng W, Zhu H, Chen T, Lv Q, Li F, Yuan J, Xiang Z, Gao K, Xu Y, Huang L, Li Y, Liu J, Yao Y, Yu P, Yong W, Wei Q, Zhang L, Qin C.** The mouse and ferret models for studying the novel avian-origin human influenza A (H7N9) virus. *Virol J* 10: 253, 2013. doi: 10.1186/1743-422X-10-253.
395. **Yamaguchi M, Kitagawa Y, Zhou M, Itoh M, Gotoh B.** An anti-interferon activity shared by paramyxovirus C proteins: Inhibition of Toll-like receptor 7/9-dependent alpha interferon induction. *FEBS Lett* 588: 28–34, 2014. doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.015.
396. **Yamashita M.** [Function of neuraminidase of influenza virus and anti influenza compounds by its inhibition] [Online]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 54: 1284–1291, 2009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19663256>.
397. **Yamaya M, Shinya K, Hatachi Y, Kubo H, Asada M, Yasuda H, Nishimura H, Nagatomi R.** Clarithromycin inhibits type a seasonal influenza virus infection in human airway epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 333: 81–90, 2010. doi: 10.1124/jpet.109.162149.
398. **Yamayoshi S, Ito M, Uraki R, Sasaki T, Ikuta K, Kawaoka Y.** Human protective monoclonal

- antibodies against the HA stem of group 2 HAs derived from an H3N2 virus-infected human. *J Infect* 76: 177–185, 2018. doi: 10.1016/j.jinf.2017.12.004.
399. **Yamazaki T, Chiba J, Akashi-Takamura S.** Neutralizing anti-hemagglutinin monoclonal antibodies induced by gene-based transfer have prophylactic and therapeutic effects on influenza virus infection. *Vaccines* 6 MDPI AG: 2018.
 400. **Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, Ishihama A.** Molecular assembly of influenza virus: Association of the ns2 protein with virion matrix. *Virology* 196: 249–255, 1993. doi: 10.1006/viro.1993.1473.
 401. **Yewdell JW, Gerhard W.** Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. *Annu Rev Microbiol* 35: 185–206, 1981. doi: 10.1146/annurev.mi.35.100181.001153.
 402. **Zanin M, Keck Z-Y, Rainey GJ, Lam C-YK, Boon ACM, Rubrum A, Darnell D, Wong S-S, Griffin Y, Xia J, Webster RG, Webby R, Johnson S, Fong S.** An Anti-H5N1 Influenza Virus FcDART Antibody Is a Highly Efficacious Therapeutic Agent and Prophylactic against H5N1 Influenza Virus Infection. *J Virol* 89: 4549–4561, 2015. doi: 10.1128/jvi.00078-15.
 403. **Zenilman JM, Fuchs EJ, Hendrix CW, Radebaugh C, Jurao R, Nayak SU, Hamilton RG, McLeod Griffiss J.** Phase 1 clinical trials of DAS181, an inhaled sialidase, in healthy adults. *Antiviral Res* 123: 114–119, 2015. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.09.008.
 404. The Anatomy of the Laboratory Mouse [Online]. [date unknown]. <http://www.informatics.jax.org/cookbook/> [7 Aug. 2020].
 405. MGI-Mouse Genome Informatics-The international database resource for the laboratory mouse [Online]. [date unknown]. <http://www.informatics.jax.org/> [7 Aug. 2020].
 406. A Critical Appraisal of Carbon Monoxide Uptake Measurements for the Follow-up of Experimental Respiratory Diseases in the Laboratory Mouse | Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences [Online]. [date unknown]. <http://sjlas.org/index.php/SJLAS/article/view/188> [10 Aug. 2020].
 407. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents - 1st Edition [Online]. [date unknown]. <https://www.elsevier.com/books/the-laboratory-rabbit-guinea-pig-hamster-and-other-rodents/suckow/978-0-12-380920-9> [12 Aug. 2020].
 408. Dictionnaire des Sciences Animales [Online]. [date unknown]. <http://dico-sciences-animales.cirad.fr/> [12 Aug. 2020].
 409. Mumps and Measles [Online]. [date unknown]. <https://www.microbiologybook.org/mhunt/mump-meas.htm> [13 Aug. 2020].
 410. Communiqués de presse par sujet : Approbation de la FDA (Food and Drug Administration) - Le Lézard [Online]. [date unknown]. <https://www.lelezard.com/sujet134-approbation-de-la-fda-food-and-drug-administration/page2> [14 Aug. 2020].
 411. Immunité | De Boeck Supérieur [Online]. [date unknown]. <https://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782804159573-immunite> [14 Aug. 2020].
 412. Research Models and Services | Charles River [Online]. [date unknown]. <https://www.criver.com/products-services/research-models-services> [14 Aug. 2020].
 413. The unexpected advantages of outbred mice in research | Diverse mouse strains at The Jackson Laboratory [Online]. [date unknown]. <https://www.jax.org/news-and-insights/2018/december/the-advantages-of-outbred-mice-in-research#> [23 Aug. 2020].
 414. Influenza in Glasgow [Online]. *Br Med J* 1: 278, 1933. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20777371>.
 415. American Thoracic Society. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor). Recommendations for a standard technique--1995 update. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 2185–2198, 1995. doi: 10.1164/ajrccm.152.6.8520796.



Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2022/0480/17

ISBN 978-2-87543-201-8



**Presses de la Faculté de Médecine
vétérinaire de l'Université de Liège
4000 Liège (Belgique)**

**D/2022/0480/17
ISBN 978-2-87543-201-8**

