

Université de Lille
Ecole Doctorale Biologie Santé



THÈSE

Pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Laura MATARAZZO

Le 17 décembre 2019

Etude des propriétés anti-infectieuses des agonistes de Toll-like receptors en association avec des antibiotiques dans le traitement des infections respiratoires

Devant le jury composé de :

M. le Professeur Benoit FOLIGNE	Président du Jury
Mme le Docteur Catherine WERTS	Rapporteur
M. le Docteur Antoine GUILLON	Rapporteur
Mme le Docteur Florence NIEDERGANG	Examineur
M. le Docteur Christophe CARNOY	Co-directeur de thèse
M. le Docteur Jean-Claude SIRARD	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie le professeur Benoit FOLIGNE de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Merci aux docteurs Catherine WERTS, Antoine GUILLON et Florence NIEDERGANG d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi individuel de thèse, les docteurs Alain BAULARD et Christophe PAGET.

Un grand merci à mes directeurs de thèse, les docteurs Christophe CARNOY et Jean-Claude SIRARD, pour leur encadrement durant ces trois années et pour m'avoir fait partager leur vision de la recherche et leurs connaissances.

Merci au docteur François TROTTEIN de m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Je tiens également à remercier mes collègues, actuels et anciens, du groupe SIRARD, les docteurs Christelle FAVEEUW, Laurye VAN MAELE et Fiordilgie CASILAG, ainsi que Delphine CAYET, Mélanie MONDEME, Claire DEVOS et tous les autres pour leur soutien et leurs contributions techniques et scientifiques respectives au cours de ma thèse. Je remercie particulièrement le docteur Rémi PORTE pour ses encouragements et ses précieux conseils.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe 12 pour leur accueil et leur bienveillance.

Enfin, merci à ma famille et à mes proches pour leur soutien indéfectible.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	5
GLOSSAIRE	7
INTRODUCTION	9
I) <i>Détection des pathogènes par le système immunitaire inné</i>	9
II) <i>Immunité des muqueuses : le poumon</i>	23
III) <i>Infections respiratoires basses et traitement</i>	44
IV) <i>Nouvelles approches anti-infectieuses</i>	63
OBJECTIFS DE LA THESE	73
RESULTATS	75
ARTICLE I: SYNERGIE ENTRE ANTIBIOTIQUES ET AGONISTE DU RECEPTEUR TLR5 DANS LE TRAITEMENT DES PNEUMONIES BACTERIENNES SENSIBLES OU RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES	75
INTRODUCTION	77
MATERIELS ET METHODES	79
I) <i>Infections bactériennes et virales</i>	79
II) <i>Administration des traitements</i>	81
III) <i>Test de synergie</i>	82
IV) <i>Cytométrie en flux</i>	82
V) <i>Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR en temps réel</i>	84
VI) <i>Dosage des protéines dans le LBA, le poumon et le sérum</i>	86
VII) <i>Analyses statistiques</i>	86
RESULTATS	87
I) <i>Mise en évidence de la synergie de l'association antibiotique – flagelline contre l'infection respiratoire à pneumocoque de sérotype 1 chez la souris</i>	87
II) <i>Synergie de l'association amoxicilline – flagelline contre l'infection pulmonaire à pneumocoque résistant aux antibiotiques en contexte de surinfection post-grippale</i>	93
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES	101
DISCUSSION / PERSPECTIVES DE L'ARTICLE I	103
ETUDE II: CONTRIBUTION DES NEUTROPHILES A LA PROTECTION CONTRE LES PNEUMONIES INDUITE PAR UNE THERAPIE COMBINEE ANTIBIOTIQUE – FLAGELLINE	109
INTRODUCTION	111
MATERIELS ET METHODES	113
I) <i>Infection bactérienne et traitement</i>	113

II) Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR en temps réel	113
III) Analyse cellulaire par cytométrie en flux	114
IV) Analyse transcriptomique par microarrays.....	115
V) Analyse protéomique	116
VI) Modèle de déplétion et souris chimères	117
VII) Tests bactériologiques in-vitro.....	117
RESULTATS.....	119
I) Impact de la flagelline sur la dynamique de clairance bactérienne	119
II) Etude cinétique de la réponse immunitaire induite par la flagelline en association avec l'amoxicilline au cours de l'infection par <i>S. pneumoniae</i>	121
III) Implication des neutrophiles dans l'effet anti-infectieux du traitement combiné AMX + <i>FliC</i> _{Δ174-400} 134	
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES	141
DISCUSSION / PERSPECTIVES DE L'ETUDE II.....	147
DISCUSSION GENERALE	153
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	159
ANNEXES.....	179
ANNEXE I : ARTICLE I AU FORMAT PUBLICATION.....	179
ANNEXE II : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	195

GLOSSAIRE

AEC : *alveolar epithelial cells*
ALR : *AIM2-like receptor*
AMP : *antimicrobial peptides*
ASC : *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
BCR : *B-cell receptor*
BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive
BLSE : β -lactamases à spectre étendu
CAMP : *cathelin-related antimicrobial peptide*
CARD : *caspase recruitment and activation domain*
CCL : *CC-chemokine ligand*
CCR : *CC-chemokine receptor*
cDC : *conventional dendritic cell*
CFU : *colony-forming unit*
CLR : *C-type lectin receptor*
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CXCL : *CXC-chemokine ligand*
CXCR : *CXC-chemokine receptor*
DAMP : *damage-associated molecular pattern*
DIP : déficit immunitaire primaire
fMLP : formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
FRP1 : *formyl peptide receptor 1*
GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*
HA : hémagglutinine
HSP : *heat shock protein*
HSV : *herpes simplex virus*
HMGB1 : *high-mobility group box-1*
IAV : *influenza A virus*
ICAM : *intercellular adhesion molecule*
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IKK : *I κ B kinase*
IL : interleukine
ILC : *innate lymphoid cells*
iNOS : *inducible nitric oxide synthase*
IRAK : *interaction with IL-1 receptor-associated kinase*
IRF : *interferon-regulatory factor*
IRG : *interferon-related genes*
LBA : lavage bronchoalvéolaire

LPS : lipopolysaccharide
LRR : *leucine-rich repeat*
MAMP : *microbe-associated molecular pattern*
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*
MARCO : *macrophage receptor with collagenous structure*
MD-2 : *myeloid differentiations factor 2*
MMP : *matrix metalloproteinase*
MPO : *myéloperoxidase*
moDC : *monocyte-derived dendritic cell*
MyD88 : *myeloid differentiation primary response 88*
NA : *neuraminidase*
NF- κ B : *nuclear factor κ B*
NGP : *neutrophilic granule protein*
NK : *natural killer cells*
NLR : *nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing receptor*
NOD : *nucleotide-binding domain*
PAFR : *Platelet-activating factor receptor* :
PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*
pDC : *plasmacytoïd dendritic cell*
PK : *protein kinase*
PRR : *Pattern recognition receptor*
RIG-I : *retinoic acid inducible gene-1*
RLR : *retinoic acid-inducible gene-1-like receptor*
ROS : *reactive oxygen species*
SARM : *Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline*
SCID : *severe combined immunodeficiency*
SP : *surfactant protein*
STING : *stimulator of IFN genes*
TCR : *T-cell receptor*
TGF- β : *transforming growth factor- β*
TIR : *Toll/interleukine 1 receptor homology domain*
TIRAP : *TIR-containing adaptor protein*
TLR : *Toll-like receptors*
TRAM : *TRIF-related adaptor molecule*
TRAF : *TNF receptor-associated factor*
TREM : *triggering receptor expressed on myeloid cells*
TRIF : *TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β*

INTRODUCTION

I) Détection des pathogènes par le système immunitaire inné

1. Immunité anti-infectieuse : généralités

La coexistence et l'évolution parallèle des micro-organismes et des vertébrés ont façonné la complexité de leurs interactions dans leur environnement. Les organismes vertébrés ont ainsi développé des mécanismes de défenses de plus en plus spécialisés et diversifiés pour se protéger contre les pathogènes microbiens. Ces mécanismes, regroupés sous le nom de système immunitaire, reposent sur la capacité à discriminer les éléments du « soi » et du « non-soi ».

Lors d'une invasion par un microorganisme pathogène, la réponse du système immunitaire s'articule autour de deux composantes majeures : la réponse innée et la réponse adaptative. Ces deux composantes diffèrent à la fois par leurs modalités de reconnaissance des microbes, les mécanismes de défenses mis en place suite à leur détection, et la cinétique de cette réponse (1,2).

a) Immunité innée

L'immunité innée, constituant la première ligne de défense contre les microorganismes pathogènes, repose sur la détection des pathogènes par les récepteurs de l'immunité innée ou *pattern recognition receptors* (PRR). Ces derniers, d'origine germinale, sont apparus très tôt dans l'évolution des espèces eucaryotes pluricellulaires, comme le démontre la forte analogie des PRR et de leurs voies de signalisation chez les plantes et les animaux invertébrés et vertébrés, dont l'homme (3,4). Les PRR reconnaissent des éléments structuraux évolutionnairement conservés chez les microbes et spécifiques à ces derniers, appelés d'une manière générique *microbe-associated molecular patterns* (MAMP), ou *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) dans le cas des microorganismes pathogènes. L'interaction PRR/MAMP entraîne la mise en place de nombreux mécanismes de défense innés à large spectre d'activité antimicrobienne, incluant la production de peptides antimicrobiens (*antimicrobial peptides*, AMP), le recrutement et l'activation de cellules immunitaires effectrices (neutrophiles, macrophages, monocytes, cellules

dendritiques et cellules lymphoïdes innées) ou l'activation du système du complément (2,5).

La réponse innée est rapide (de l'ordre de quelques minutes à quelques heures) et cruciale pour le contrôle de l'infection. Cependant, elle n'est pas toujours suffisante pour éradiquer le pathogène et est susceptible, en cas d'activation trop prolongée, d'entraîner des dommages tissulaires inflammatoires importants.

b) Immunité adaptative

Le système immunitaire adaptatif, reposant sur des cellules spécifiques appelées lymphocytes T et B, est apparu plus tard au cours de l'évolution, chez les vertébrés à mâchoires ou gnathostomes (bien qu'une ébauche de ce système soit retrouvée chez les agnastes) et est absent chez les invertébrés et végétaux (6).

Chez les mammifères, la réponse immunitaire adaptative se met en place plus tardivement par rapport à la réponse immunitaire innée (de l'ordre de quelques jours). L'activation des lymphocytes T nécessite une étape de présentation antigénique des micro-organismes par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I ou II. Les principales CPA sont les cellules dendritiques résidentes des tissus, qui, après avoir phagocyté le pathogène, migrent du site de l'infection jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires via la circulation lymphatique ou le sang. Ainsi, les cellules dendritiques présentent aux lymphocytes naïfs les antigènes du pathogène et stimulent la différenciation et la prolifération en cellules effectrices. Cependant, d'autres types cellulaires tels que les macrophages, monocytes et les lymphocytes B peuvent également jouer le rôle de CPA.

Les récepteurs antigéniques exprimés par les lymphocytes B et T (*T-cell receptors*, TCR, et *B-cell receptors*, BCR, respectivement), sont issus d'une recombinaison somatique ou réarrangement des segments de gènes d'immunoglobuline (Ig) *variable* (V), *diversity* (D) et *joins* (J), sous le contrôle des *recombination activating genes* (RAG). Ce mécanisme de recombinaison aléatoire génère un large répertoire de clones lymphocytaires présentant chacun une spécificité pour un antigène donné. Inévitablement, des clones reconnaissant des antigènes du « soi » sont aussi générés, mais sont rapidement éliminés après leur formation dans le thymus (pour

les lymphocytes T) ou la moelle osseuse (pour les lymphocytes B) par une étape de sélection négative. Les clones lymphocytaires restant migrent alors vers les organes lymphoïdes secondaires en attendant leur activation ou « sélection clonale » par les CPA. Les clones lymphocytaires sélectionnés vont alors rapidement se multiplier et se différencier en lymphocytes effecteurs : lymphocytes T auxiliaires (*T helper*, Th) (CD4⁺) ou cytotoxiques (CD8⁺), et en plasmocytes producteurs d'anticorps pour les lymphocytes B. Les lymphocytes T cytotoxiques sont spécialisés dans l'élimination des cellules infectées par des pathogènes intracellulaires, tandis que les anticorps neutralisants ou opsonisants produits par les lymphocytes B vont se fixer à la surface des pathogènes et toxines extracellulaires, facilitant ainsi leur élimination par phagocytose. Les lymphocytes T CD4⁺ sont d'importants producteurs de cytokines et participent à la communication intercellulaire, l'orientation, l'amplification et le contrôle de la réponse immunitaire. Des lymphocytes T et B dits « mémoires » sont également générés suite à cette sélection clonale. Ils permettent le déclenchement d'une réponse secondaire rapide et de forte amplitude lors d'une rencontre ultérieure avec le même antigène, empêchant ainsi les réinfections, et sont à la base du principe de vaccination. Enfin, il existe une dernière classe de lymphocytes dits « régulateurs » (Treg), formés naturellement dans le thymus (Treg naturels), ou induits en périphérie, via la différenciation des lymphocytes CD4⁺ (Treg inductibles). Ils participent à la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi ou non dangereux en inhibant la réponse des lymphocytes effecteurs ou des CPA, par l'intermédiaire de la production de cytokines régulatrices comme le *transforming growth-factor* β (TGF- β), l'interleukine (IL)-35 ou l'IL-10. (1).

Il existe une forte coopération et interdépendance entre les mécanismes immunitaires innés et adaptatifs. Outre son rôle dans le déclenchement et l'amplification de l'immunité adaptative, l'immunité innée a également un rôle, via la production de cytokines particulières, dans l'orientation de la réponse adaptative en fonction du type d'infection. Il existe ainsi trois types de réponse immunitaire : la réponse de type Th1 contre les pathogènes intracellulaires, la réponse Th17 contre les bactéries extracellulaires et la réponse Th2 contre les infections parasitaires. Ces réponses sont caractérisées par la production de cytokines différentes par les lymphocytes Th CD4⁺ : interféron gamma (IFN- γ) activant les macrophages pour les lymphocytes Th1, IL-17 activant les neutrophiles pour les Th17 et IL-4, IL-5 et IL-13

pour les Th2, activant les mastocytes, éosinophiles et basophiles. Ces différentes cytokines influencent également la classe d'anticorps produits par les lymphocytes B (1).

2. Les récepteurs de l'immunité innée : *pattern recognition receptors*

Les PRR présentent plusieurs caractéristiques essentielles expliquant leur rôle central dans la détection des pathogènes par l'hôte : i) leur expression par un grand nombre de types cellulaires, à la fois immunitaires et structuraux, ii) leur capacité à reconnaître une variété de molécules structurales ou physiologiques essentielles aux microorganismes et donc très conservées du point de vue évolutif, iii) leur rapidité d'activation et de réponse et la redondance des voies de signalisation et iv) le large spectre des mécanismes immunitaires mis en jeu (5).

Il existe 5 classes de PRR chez l'homme, regroupés en fonction de critères structuraux : les *Toll-like receptors* (TLR), les *C-type lectin receptors* (CLR), les *nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat (LRR)-containing receptors* (NLR), les *retinoïc acid-inducible genes-1-like receptors* (RLR), et enfin les détecteurs cytosoliques de l'ADN, également appelé *AIM2-like receptors* (ALR). Ces récepteurs peuvent être transmembranaires, localisés au niveau des membranes plasmiques ou endosomales (TLR et CLR), ou intracytoplasmiques (NLR, RLR et ALR).

L'activation des PRR est nécessaire à l'induction des réponses immunitaires innées et adaptatives, via l'activation de gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires et interférons. Cependant, leur activation peut également être associée, en fonction du type cellulaire, à l'induction directe de processus cellulaires non transcriptionnels comme la phagocytose, la dégranulation ou l'autophagie (7).

Par ailleurs, si les PRR ont initialement été décrits comme étant à la base de la reconnaissance du « non soi » par le système immunitaire, il a par la suite été montré que diverses molécules d'origine endogène étaient capables d'induire des mécanismes de défense innés comme le recrutement et l'activation de leucocytes via ces récepteurs (8–10). Ces molécules sont de natures très variées (peptides antimicrobiens comme les bêta-défensines, protéines S100A8/S100A9 et cathelicidines, *heat shock proteins* (HSP), *high-mobility group box-1* (HMGB1), ATP, acide urique, ...) et ont été regroupées sous le terme d'alarmines ou encore de

damage-associated molecular patterns (DAMP). Les DAMPs sont libérés lors de dommages cellulaires ou tissulaires associés à une inflammation stérile ou d'origine infectieuse, et leur rôle initial est de renforcer les défenses immunitaires anti-infectieuses de l'hôte. Cependant, leur libération en excès est susceptible de causer des dommages tissulaires en raison d'un emballement des mécanismes inflammatoires (8,11).

a) Les TLR

Les TLR sont la première classe de PRR identifiés et ont été nommés d'après le gène *Toll* chez la drosophile. Initialement décrit comme impliqué dans le développement embryonnaire de la polarité dorso-ventrale chez l'insecte, Lemaitre *et al.* ont mis en évidence en 1996 le rôle de *Toll* dans la protection contre les pathogènes fongiques (5,12). L'homologie du domaine intracytoplasmique de la protéine Toll chez la drosophile et du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) humain a été mis en évidence dès 1991 par Gay et Keith, puis Medzhitov *et al.* ont identifié en 1997 un orthologue de Toll chez l'homme possédant un rôle dans l'activation de la réponse immunitaire, initialement désigné hToll et plus tard associé au TLR4 (13–15). A ce jour, 13 TLR différents ont été identifiés, 10 chez l'homme et 12 chez la souris. Ils sont exprimés par les cellules immunitaires, dont les macrophages, monocytes, cellules dendritiques, neutrophiles, lymphocytes B et certains lymphocytes T, et par des cellules structurales, en particulier les cellules épithéliales des muqueuses ou les fibroblastes (5).

i. Ligands des TLR

Les TLR reconnaissent une grande variété de microorganismes bactériens, viraux et fongiques. Les MAMP reconnus par les TLR peuvent être de nature protéique, lipidique, lipoprotéique, ou des acides nucléiques (ARN ou ADN viraux ou bactériens).

Les TLR localisés au niveau de la membrane cellulaire (TLR1, 2, 4, 5, 6) détectent majoritairement des composants externes des pathogènes extracellulaires, comme les bactéries et champignons. Par exemple, TLR4 reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) de la paroi des bactéries à Gram négatif, mais également la protéine de fusion

du virus respiratoire syncytial, le taxol (un agent antitumoral d'origine végétale), la protéine hSP60 de *Chlamydia pneumoniae*, et un grand nombre de ligands endogènes (hyaluronane, bêta-défensines, fibronectine, *surfactant protein A*) (7,10,16–21). TLR2 s'associe à TLR1 ou TLR6 pour reconnaître des ligands de nature lipopeptidique, naturels (tels que les acides lipotéichoïques des bactéries Gram positif ou le lipoarabinomannane des mycobactéries) ou synthétiques (Pam2CSK4 et Pam3CSK4 dérivés de *Escherichia coli*) (22). TLR2/TLR1 reconnaît également des virus, comme le *cytomegalovirus* et *herpes simplex virus* (HSV) (23,24). Les hétérodimères de TLR2 détectent également des ligands endogènes (11). TLR5 en revanche n'a qu'un seul ligand naturel connu, la flagelline, protéine du flagelle des bactéries flagellées à Gram positif et négatif (25,26).

Les TLR présents au niveau des endosomes comme TLR3, 7, 8 et 9 sont spécialisés dans la détection des acides nucléiques bactériens et viraux, libérés par l'activité hydrolytique du contenu de la vésicule endolysosomale. TLR3 et TLR7 détectent ainsi les ARN double brin et simple brin respectivement (27,28), tandis que TLR9 reconnaît des motifs CpG non méthylés d'ADN, très fréquents dans le génome bactérien. Les motifs CpG présents sur l'ADN des mammifères, hautement méthylés, sont en revanche incapables d'activer les cellules immunitaires des mammifères (5).

ii. Structure des TLR

Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires de type I constituées de trois domaines : un domaine extracellulaire impliqué dans la détection du ligand, un domaine intracellulaire impliqué dans la transduction du signal et une hélice transmembranaire unique reliant les deux (15).

Le domaine extracellulaire contient un nombre variable de motifs LRR (entre 16 et 28) disposés en tandem. Ces motifs LRR, d'une longueur de 20 à 30 acides aminés chacun, sont constitués d'un domaine conservé LxxLxLxxN et d'une partie variable, qui forment un feuillet β associé à une hélice α (15). Des études cristallographiques, réalisées d'abord sur le TLR3 humain puis sur les autres TLR, ont permis de mettre en évidence la conformation externe du récepteur et les modes d'interaction avec le ligand (29–31). Les études ont démontré une structure en fer à cheval du domaine extracellulaire des TLR. Les feuillets β des motifs LRR, disposés parallèlement,

forment ainsi la face concave interne, tandis que les hélices α forment la surface convexe. Les sites d'interaction avec le ligand diffèrent cependant suivant les TLR (29). Par exemple, TLR4 forme un complexe avec la protéine *myeloid differentiation factor 2* (MD-2), qui forme une large poche hydrophobe à l'intérieur de la structure en fer à cheval de TLR4 dans lequel le LPS bactérien vient se fixer par l'intermédiaire des chaînes lipidiques du Lipide A. Cela entraîne la dimérisation des complexes TLR4/MD-2/LPS et la transduction intracellulaire du signal (32). Pour TLR3, l'ARN double brin se lie au niveau des sites N-terminaux et C-terminaux de la surface convexe du récepteur par des liaisons ioniques et hydrogènes, entraînant l'homodimérisation de TLR3 (15,33). TLR5 forme également un homodimère, et la flagelline se fixe sur la surface latérale du récepteur (34). Suite à la liaison de leur ligand, la plupart des TLR forment des homodimères, sauf TLR2, qui forme des hétérodimères avec TLR1 ou TLR6. Cette dimérisation est nécessaire à la transduction intracellulaire du signal d'activation.

La dimérisation des domaines extracellulaires des TLR entraîne un changement conformationnel des domaines intracellulaires *Toll/interleukin 1 receptor homology domain* (TIR), point de départ de la cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation de gènes de la réponse innée.

iii. Transduction du signal TLR-dépendant

La dimérisation des TLR et de leurs domaines TIR entraîne au niveau intracellulaire le recrutement de protéines adaptatrices, nécessaire à la transduction du signal. Ces protéines possèdent également des domaines TIR, qui se lient aux domaines TIR des récepteurs (7). Deux types de protéines adaptatrices peuvent être recrutées par les TLR : la protéine *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) associée ou non à *TIR-containing adaptor protein* (TIRAP) pour tous les TLR sauf TLR3, et la protéine *TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β* (TRIF) associée ou non à *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) pour TLR3 et TLR4. Ces voies de signalisation sont appelées voie MyD88-dépendante et voie MyD88-indépendante. Elles conduisent à la transcription de médiateurs immunitaires différents, classiquement la production de cytokines pro-inflammatoires pour la voie MyD88-dépendante et d'IFN de type I pour la voie MyD88-indépendante. TLR4 a la particularité de pouvoir recruter les deux types d'adaptateurs, en fonction de sa

localisation, extracellulaire ou endosomale : MyD88/TIRAP au niveau de la membrane cellulaire, initiant des réponses contre les pathogènes extracellulaires, et TRIF/TRAM au niveau endosomal, déclenchant des mécanismes efficaces contre les pathogènes intracellulaires ou phagocytés (7,35,36). La localisation du TLR et le type de protéines adaptatrices recrutées orientent donc la réponse immunitaire qui en découle.

- *Voie MyD88-dépendante*

Après son recrutement par le domaine TIR, MyD88 s'associe à un certain nombre de protéines de la famille des *IL-1 receptor-associated kinase* (IRAK) pour former un complexe appelé le myddosome. IRAK 4 est la première recrutée et permet l'activation, via son activité Sérine/Thréonine kinase, des molécules IRAK 1 et IRAK 2 qui interagissent avec le *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6). TRAF6 permet ensuite l'assemblage d'un complexe kinase formé de la *TGF-β associated kinase* (TAK-1) et des *TAK-1-binding proteins* (TAB) 1, 2 et 3. Ce complexe contrôle l'activation des *IkB kinases* (IKK) et de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), qui activent par phosphorylation les facteurs de transcription *nuclear factor κB* (NF-κB) et AP-1, respectivement. NF-κB et AP-1 vont alors transloquer dans le noyau et activer la transcription de gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires et chimiokines impliquées dans la réponse innée (**figure 1**) (7).

Les TLR7, 8 et 9 endosomaux sont également capables d'activer, via la voie MyD88-dépendante, l'*interferon-regulatory factor 7* (IRF7), aboutissant à la production d'interféron (IFN) de type I et d'*interferon-related genes* (IRG). Cette activation d'IRF7 passe par le complexe adaptateur AP-3 (7,37,38) (**figure 1**). Le type de protéine IRAK recrutée par MyD88 pour former le myddosome semble jouer un rôle dans l'orientation de la réponse, des études ayant démontré que IRAK1 (mais pas IRAK2) était nécessaire pour l'activation de IRF7, tandis que IRAK2 est nécessaire pour l'activation de NF-κB (39,40).

Par ailleurs, les TLR localisés au niveau endosomal comme TLR3, 7 et 9 nécessitent une étape de clivage par des protéases du contenu endolysosomal, comme l'asparagine endopeptidase ou des cathepsines pour être actifs. Cette étape d'activation dépendante du contenu endolysosomal permet d'éviter l'activation de

ces récepteurs par des acides nucléiques de l'hôte dans le milieu extracellulaire (41,42).

- Voie MyD88-indépendante

Seuls TLR4 (lorsqu'il est localisé au niveau endosomal) et TLR3 signalent par cette voie. La transduction du signal nécessite les protéines adaptatrices TRIF et TRAM pour TLR4, tandis que le domaine TIR de TLR3 se lie directement à celui de TRIF et ne requiert pas le recrutement de TRAM. L'engagement de TRIF conduit à l'activation du facteur de transcription IRF3 induisant à la production d'IFN. Ceci se fait par l'intermédiaire du recrutement de TRAF3, qui interagit avec la *TRAF family member-associated NF-κB activator* (TANK) pour recruter le complexe TBK1/IKKε qui active IRF3 par phosphorylation. D'autre part, la voie TRIF-dépendante conduit également à une vague tardive de production de cytokines pro-inflammatoires via l'activation de NF-κB par la *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIPK1) (43,44) (**figure 1**).

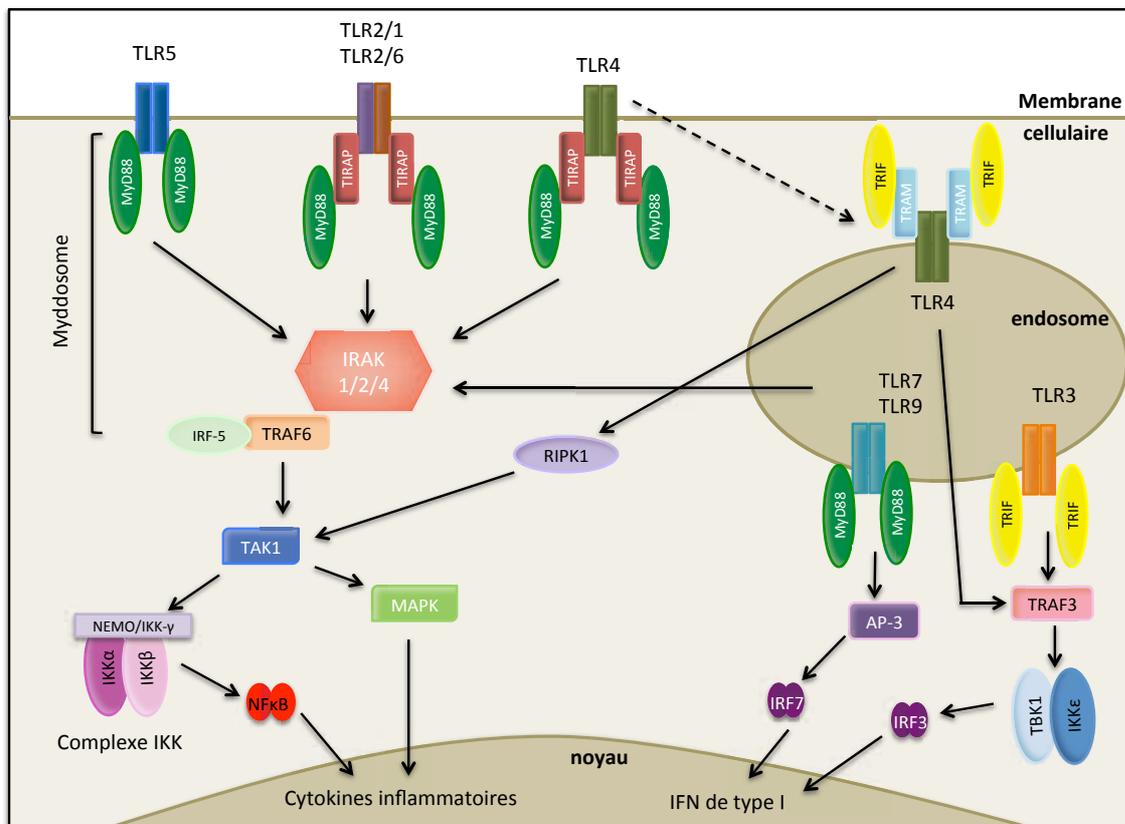


Figure 1 : Voies de signalisation intracellulaire associées à l'activation des TLR au niveau de la membrane plasmatique et de l'endosome. D'après (45–48).

b) Les autres classes de PRR

i. Les CLR

Les CLR constituent une large famille de récepteurs solubles ou transmembranaires caractérisés par la présence d'un *C-type lectin-like domain* (CTLD) impliqué dans la reconnaissance du ligand. Ils sont répartis en 17 groupes, dont certains ont essentiellement un rôle d'opsonisation. Les CLR possédant une fonction de signalisation intracellulaire sont caractérisés par un domaine intracellulaire activateur *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) (dectin 1, dectin 2, Mincle, ou CLEC5A) ou inhibiteur *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) (MICAL ou DCIR). Ce dernier a un rôle dans la régulation des voies d'activation des autres CLR. Certains CLR n'ont cependant pas de domaine ITAM ou ITIM clairement identifié, comme MR, DEC-205 ou DC-SIGN (49). Les CLR détectent une grande variété de motifs microbiens, préférentiellement des carbohydrates comme les β -glucanes (dectin 1) et mannanes (dectin 2) présents à la surface de nombreuses espèces fongiques et de mycobactéries. La transduction du signal intracellulaire passe par le recrutement via le domaine ITAM d'une protéine adaptatrice *spleen-associated tyrosine kinase* (Syk) qui coordonne la formation d'un complexe formé de CARD9, *B cell lymphoma10* (Bcl10) et *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1* (Malt1) et l'activation de la *Protein kinase C- δ* (PKC δ). Cette voie Syk-dépendante aboutie à l'activation de réponses pro-inflammatoires via NF- κ B et MAPK, mais participe également à certaines fonctions cellulaires comme la phagocytose, la libération d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS), le chimiotactisme et l'internalisation et l'apprêtement de l'antigène par les cellules dendritiques pour la présentation aux lymphocytes T (7,49). Les CLR sont particulièrement impliqués dans la défense contre les pathogènes fongiques, notamment des genres *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* et *Coccidioïdes* et les mycobactéries (49,50).

ii. Les NLR

Les NLR, localisés au niveau cytoplasmique, sont constitués d'un domaine NH₂-terminal d'interaction protéine-protéine, un domaine central NOD ou NACHT et un domaine COOH-terminal contenant des motifs LRR. Ils sont classés en quatre sous-

familles, NLRA, B, C et P, en fonction de la nature du domaine NH₂-terminal : *caspase recruitment and activation domain* (CARD dans NLRC), *baculovirus inhibitor of apoptosis protein domain* (dans NAIP ou NLRB), *pyrin domain* (PYD dans NLRP), ou *acidic transactivation domain* (TA dans NLRA) (51). Les NLR sont impliqués dans la détection des bactéries dans le compartiment intracellulaire. Par exemple, NOD1 et NOD2 reconnaissent des constituants du peptidoglycane de la paroi de certaines bactéries à gram positif ou négatif (l'acide g-D-glutamyl-meso-diaminopimelic et le muramyl dipeptide, respectivement). L'activation du récepteur entraîne alors le recrutement de la protéine kinase RIPK2 via l'interaction avec CARD et conduit à l'activation de NF- κ B et de la MAPK. NOD1 et NOD2 peuvent également déclencher les processus d'autophagie par l'intermédiaire de la protéine ATG16L1 pour éliminer les pathogènes intracellulaires. D'autre part, les récepteurs NAIP5 (sous-famille NLRB) et NLRC4 s'associent pour détecter la flagelline (de *Legionella pneumophilla* et *Salmonella enterica* notamment) au niveau cytoplasmique. Cette activation entraîne la formation de l'inflammasome, constitué de la protéine adaptatrice *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) et de la caspase 1, qui permet le clivage de la pro-IL-1- β et pro-IL-18 en IL-1 β et IL-18 matures (5,7,52,53).

iii. Les RLR

La famille des RLR comporte trois membres : *retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I), *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) et *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2), d'expression ubiquitaire et impliqués dans la détection cytoplasmique des virus. Ils sont essentiels à la défense contre les virus à ARN, par la reconnaissance de séquences spécifiques du génome viral comme la région poly-uridine de l'ARN du virus de l'hépatite C, ou des intermédiaires de réplication comme l'ARN 5' triphosphate ou l'ARN long double brin, mais jouent également un rôle dans la protection contre les virus à ADN et certaines bactéries (7). Les RLR sont constitués d'un domaine central *RNA helicase* permettant la reconnaissance des ligands, un domaine répresseur *zinc-binding C-terminal domain* (CDT) et deux domaines CARD en N-terminal pour RIG-I et MDA5. La liaison avec le ligand entraîne la libération des domaines CARD (réprimés à l'état de repos), qui vont se lier avec la protéine adaptatrice *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS)

située au niveau de la membrane externe mitochondriale ou peroxisomale ou au niveau du domaine spécialisé *mitochondria associated membrane* (MAM) du réticulum endoplasmique. MAVS va se polymériser et recruter les ubiquitines ligases TRAF-2, -5 et -6 nécessaires pour l'activation du complexe TBK1-IKK. Cela aboutit à la translocation et l'activation des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- κ B activant la transcription de gènes des IFN de type I et -III et de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires participant à la défense contre les virus pathogènes. LGP2, qui ne possède pas de domaines CARD, à un rôle dans la régulation de la signalisation par RIG-I et MDA5. Un autre processus mis en place par les RLR pour contrôler la prolifération virale est l'induction de la mort cellulaire, selon un processus MAVS-dépendant (7,54,55).

iv. Les senseurs cytosoliques de l'ADN

Les ALR sont des récepteurs cytosoliques possédant un domaine de liaison à l'ADN HIN-200 et un domaine *pyrin* d'interaction protéine-protéine. Par exemple, l'activation d'AIM2 par l'ADN cytosolique entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice ASC et la formation de l'inflammasome, contribuant à la réponse pro-inflammatoire via la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-18 et l'induction de la mort cellulaire par pyroptose (7). Le *stimulator of IFN genes* (STING) est un récepteur transmembranaire localisé au niveau du réticulum endoplasmique à l'état de repos et impliqué dans la détection de l'ADN et la régulation des réponses antimicrobiennes IFN-dépendantes. L'activation de STING conduit à son transport au niveau de vésicules via l'appareil de Golgi. Contrairement aux autres PRR, STING fonctionne à la fois comme un récepteur et un adaptateur : il lie directement les dinucléotides cycliques, produits par les bactéries comme messagers secondaires ou bien par les mammifères (cGAMP, produit par l'enzyme cGAS), induisant la production d'IFN par l'intermédiaire de TBK1 et IRF3, mais peut également servir d'adaptateur pour d'autres récepteurs comme *interferon- γ -inducible 16* (IFI16). IFI16 détecte l'ADN viral au niveau cytoplasmique, conduisant également à la production d'IFN-I, selon un processus dépendant de STING ou de l'inflammasome (7).

3. Pathologies associées aux anomalies des PRR

Les déficits immunitaires primaires (DIP) regroupent une multitude d'affections liées à des mutations monogéniques au niveau de gènes impliqués dans les fonctions immunitaires (près de 350 décrits à ce jour). Ils sont fréquemment associés à une augmentation de la sensibilité à certains types d'infections, mais aussi à des désordres immunopathologiques (allergie, auto-immunité, inflammation, ou lymphoprolifération) (56–59). Les DIP les plus graves sont ceux affectant l'immunité adaptative cellulaire et humorale, comme les déficits immunitaires combinés sévères (*severe combined immunodeficiency*, SCID), caractérisé par une diminution marquée du nombre de lymphocytes T circulants associée ou non à une diminution des lymphocytes B et cellules NK. Les causes les plus fréquentes de SCID sont les mutations au niveau de la chaîne γ du récepteur à l'IL-2 ou de l'adénosine désaminase. Certaines formes de SCID sont de plus associées à d'autres anomalies congénitales, comme des malformations cardiaques et faciales et retard intellectuels. Plus d'une trentaine de DIP affectant spécifiquement la production d'anticorps ont été également décrits, associées à une sensibilité accrue aux infections bactériennes avec des niveaux de sévérité très variables.

Enfin, il existe une grande variété de mutations affectant l'immunité innée, comme les fonctions des phagocytes (causant une hypersensibilité aux infections bactériennes sévères et des désordres auto-inflammatoires), la cascade du complément (sensibilité accrue aux germes encapsulés, notamment du genre *Neisseria*) et les voies de signalisations moléculaires impliquées dans l'activation et/ou la régulation de la réponse innée (57). Dans cette dernière catégorie, les DIP associés aux PRR et leurs voies de signalisation se distinguent par des phénotypes de sensibilité aux infections relativement moins sévères, avec une pénétrance généralement incomplète, limités dans le temps ou restreints à certains tissus ou pathogènes (ex : le déficit en TLR3 entraîne une susceptibilité accrue aux encéphalites à hSV1 chez le jeune enfant, mais pas chez l'adulte). Ces différences soulignent la robustesse et la redondance des voies de signalisation associées à la détection des pathogènes et au déclenchement de la réponse innée (59).

De façon intéressante, si la plupart des mutations touchant les gènes de l'immunité adaptatives sont associée à une hypersensibilité aux infections, la plupart des mutations associées aux gènes de l'immunité innée, notamment les voies de

signalisation des PRR (NLR, RLR et senseurs de l'ADN principalement), sont davantage associée à des désordres immunopathologiques. Par exemple, des mutations au niveau du domaine LRR de *NOD2* ont été associées à des formes familiales de maladie de Crohn, tandis que des mutations de *NLRP3* sont responsables de divers syndromes auto-inflammatoires (56).

Cependant, à l'inverse des autres PRR, les déficits des voies des TLR sont plus fréquemment associés à une sensibilité accrue aux infections (59,60). Par exemple, deux mutation du gène *TLR4* humain (Asp2999Gly et Thr3999Ile) ont été associées à un défaut de réponse au LPS et une sensibilité plus importante aux infections à bactéries Gram négatif (5,61). Le polymorphisme Arg753Gln du gène *TLR2* humain, retrouvé à l'état hétérozygote chez 6 à 9% de la population caucasienne, est quant à lui responsable d'une augmentation du risque de choc septique après une infection à bactéries Gram positif, notamment à Staphylocoques (5,62).

Concernant TLR5, une étude de 2003 a mis en évidence une augmentation du risque de pneumonies causées par la bactérie flagellée *Legionella pneumophila* (maladie des légionnaires) chez les individus porteurs d'une mutation dominante introduisant un codon stop au niveau du domaine de liaison à la flagelline (*TLR5*_{392STOP}). Cette mutation, présente chez 5 à 10% de la population, a été par ailleurs associée à un risque plus faible de lupus érythémateux systémique et maladie de Crohn (5,63). De la même façon, un déficit en Dectin-1 lié à l'apparition d'un codon stop dans le gène est retrouvé chez 8% des européens à l'état hétérozygote et a été décrit comme augmentant le risque de colonisation à *Candida* et d'infections fongiques invasives. Ces polymorphismes sont en réalité davantage considérés comme des facteurs de risques d'infections plutôt que comme des causes de syndromes d'immunodéficience avérés (56).

Des DIP affectant les voies de signalisations en aval de la reconnaissance par le PRR ont également été décrites, comme les déficits en protéines composant le myddosome MyD88 et IRAK4. Le myddosome est en effet essentiel à la signalisation par tous les TLR sauf TLR3, ainsi que par les récepteurs à l'IL-1 et IL-18, qui possèdent également un domaine intracellulaire TIR. Ces déficits ont été associés à des infections bactériennes locales ou invasives (méningites, septicémies) récurrentes, notamment à *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*, principalement chez l'enfant (56,64).

II) Immunité des muqueuses : le poumon

1. Anatomie du poumon et des voies respiratoires

Les poumons sont localisés dans la cage thoracique au-dessus du diaphragme, une cloison musculo-tendineuse séparant les cavités thoracique et abdominale. Ils sont entourés par une enveloppe séreuse remplie de liquide, la plèvre, qui est reliée à la cage thoracique par son feuillet pariétal et assure le maintien d'une pression négative dans les poumons. Le poumon droit est divisé en trois lobes et le poumon gauche en deux lobes chez l'homme.

L'activité de contraction et dilatation du diaphragme assure les mouvements inspiratoires et expiratoires de la cage thoracique, et donc la ventilation pulmonaire. L'air inspiré au niveau des cavités nasales est acheminé jusqu'aux poumons par le pharynx et le larynx puis la trachée. En entrant dans le parenchyme pulmonaire, la trachée se divise successivement en deux bronches primaires droites et gauches puis en bronches secondaires ou lobaires au niveau de chaque lobe, et enfin en bronchioles qui débouchent sur les sacs alvéolaires ou acini, richement vascularisés par un réseau de capillaires sanguins. C'est au niveau des alvéoles, qui représentent une surface totale de 90 m² environ, que se produisent les échanges gazeux avec la circulation sanguine par diffusion à travers la membrane alvéolo-capillaire. Ce phénomène permet d'une part, l'enrichissement du sang en oxygène qui sera redistribué aux cellules des différents organes du corps via la circulation artérielle ; et d'autre part, l'élimination des déchets sous forme de dioxyde de carbone, transporté depuis les organes vers les poumons par le système veineux aboutissant à l'artère pulmonaire (65) **(figure 2)**.

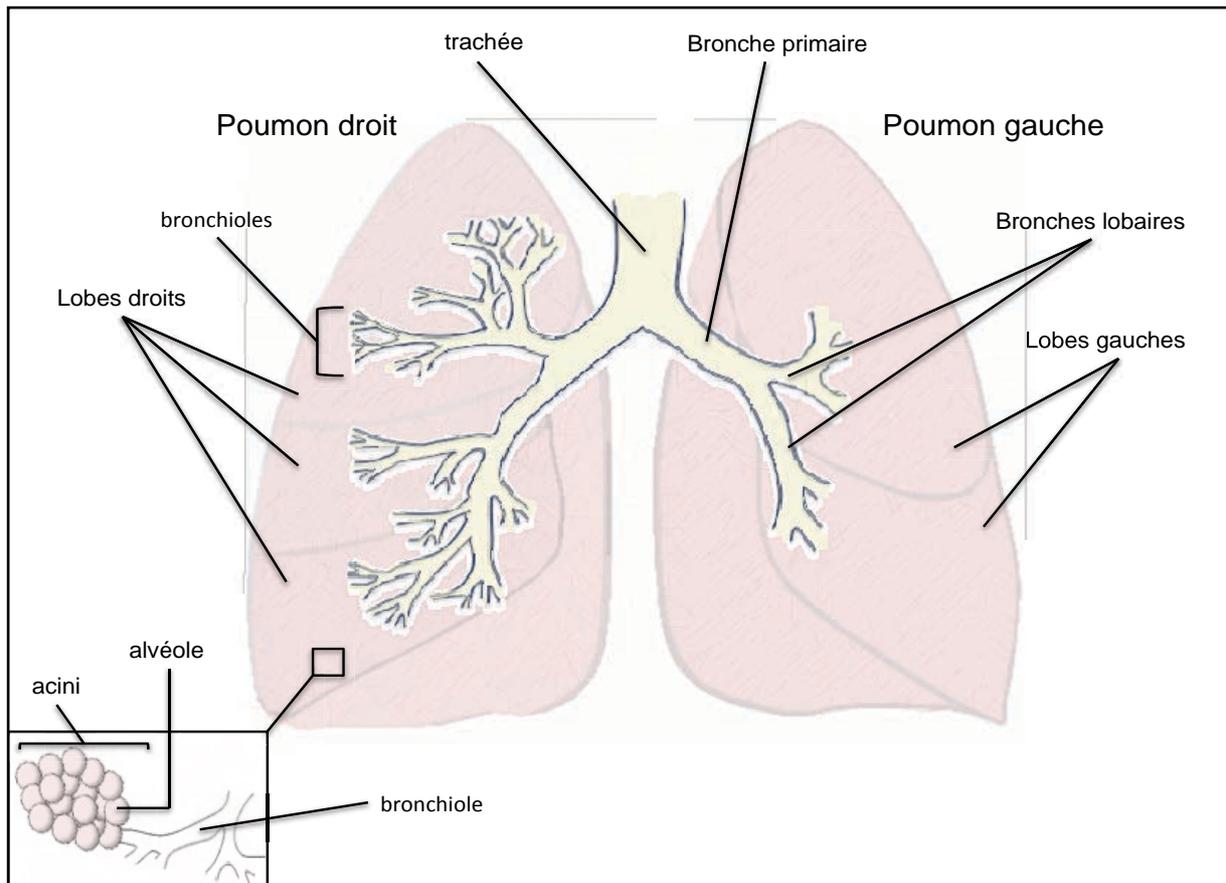


Figure 2 : Anatomie du poumon et des voies respiratoires basses.

De par leur fonction, les poumons sont particulièrement exposés aux pollens, particules toxiques et polluantes, ainsi qu'à une grande variété de pathogènes transportés par l'air. L'épithélium muqueux, qui tapisse les voies respiratoires depuis les cavités nasales jusqu'aux alvéoles, constitue une barrière à la fois physique et immunologique contre les pathogènes et autres particules inhalées, empêchant leur entrée dans les alvéoles et leur passage systémique (53,66–68). Il est composé de cellules polarisées (pluristratifiées des cavités nasales jusqu'aux bronches larges, en monocouche dans les bronchioles et alvéoles) reposant sur une membrane basale et dont l'intégrité structurale est assurée par des jonctions serrées protéiques médiées par des claudines, connexines, paranexines et occludines en lien avec le cytosquelette (66). Cet épithélium est composé de différents types de cellules spécialisées. Les cellules ciliées, présentes tout le long des voies respiratoires jusqu'aux bronchioles terminales, sont les plus abondantes chez l'homme (contrairement aux rongeurs comme la souris où les cellules sécrétrices sont les plus abondantes). Différentes classes de cellules sécrétrices composent également

l'épithélium : les cellules caliciformes, spécialisées dans la production des mucines composant le mucus, sont présentes au niveau de la trachée et des bronches larges ainsi que des glandes sous-muqueuses, mais absentes des bronchioles terminales et alvéoles ; Les cellules séreuses, club et neuroendocrines produisent différents composés antimicrobiens et messagers chimiques impliqués dans les défenses immunitaires. Elles sont particulièrement abondantes au niveau des bronchioles terminales et quasiment absentes au niveau de la trachée. Enfin les cellules basales, situées sous l'épithélium, jouent le rôle de cellules souches et sont capables de proliférer et de se différencier en cellules ciliées ou cellules sécrétrices pour renouveler l'épithélium. Les glandes sous-muqueuses contiennent également des cellules ciliées, sécrétrices et basales, ainsi que des cellules myoépithéliales (66,68) **(figure 3)**.

Contrairement aux voies respiratoires, l'épithélium alvéolaire est composé de deux types cellulaires uniquement : les cellules épithéliales alvéolaires (*alveolar epithelial cell*, AEC) de type I (AEC I) qui sont des cellules plates très étalées recouvrant plus de 90% de la surface alvéolaire, et les AEC II, plus petites et cuboïdes, riches en corps lamellaires, produisant les lipides et protéines du surfactant (*surfactant protein*, SP) **(figure 3)**. Les AEC II sont capables d'auto-renouvellement et sont également des précurseurs des AEC I (65,66). Le surfactant est un film hydrophobe continue recouvrant toute la surface alvéolaire et constitue une barrière biophysique essentielle. Il est composé à 90% de lipides, principalement des phospholipides, mais également de protéines qui participent à sa stabilité. Il est nécessaire au maintien de la structure des alvéoles en réduisant la tension de surface à l'interface air-liquide. Le surfactant contient également des structures appelées myélines tubulaires qui sont des agrégats de protéines issus des corps lamellaires des AEC II (65).

Par ailleurs, bien que les voies respiratoires basses aient été longtemps considérées comme stériles, plusieurs études récentes font état de l'existence d'un microbiote pulmonaire dont la composition montre des similarités avec celle de l'oropharynx, mais dont l'abondance est relativement faible en comparaison des autres niches chez l'homme. Des variations de composition, ou dysbioses, sont retrouvées dans certaines pathologies pulmonaires telles que l'asthme ou la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (69–71).

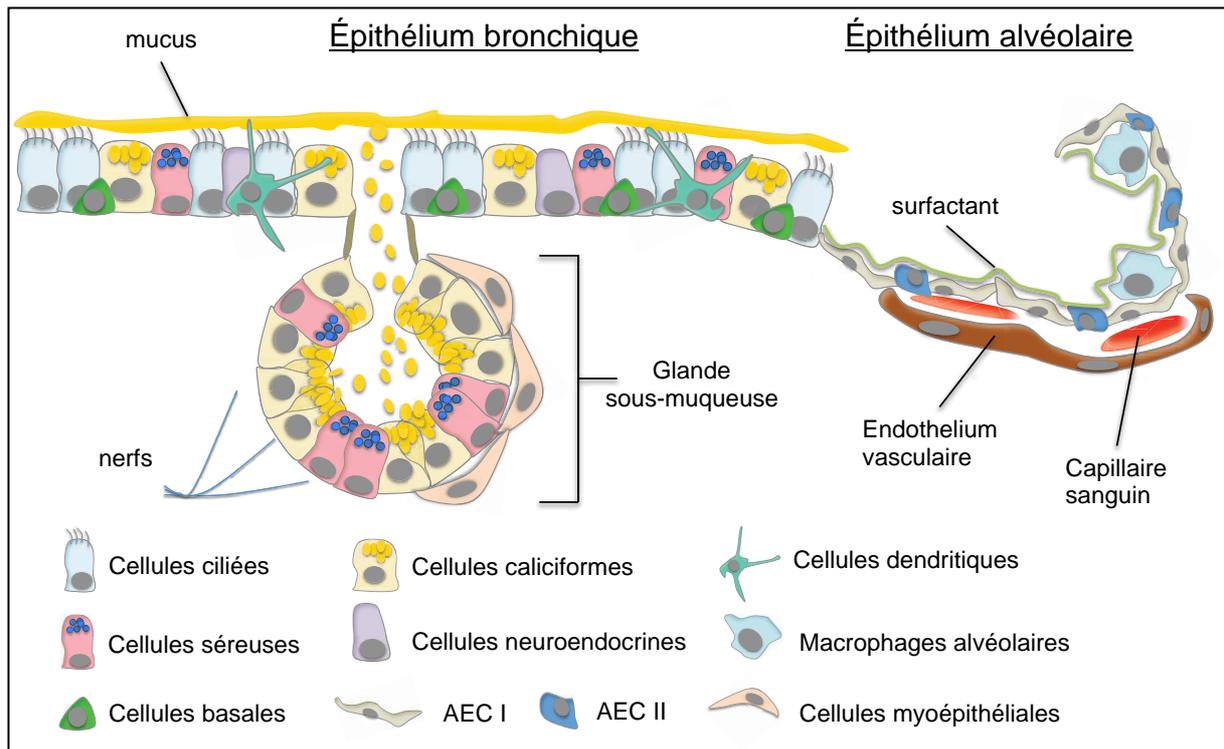


Figure 3 : organisation de l'épithélium bronchique et alvéolaire. D'après (65–67)

2. Mécanismes de défense physiques

La structure branchée des voies respiratoires constitue en elle-même un mécanisme de défense. En effet, le diamètre de ces voies décroît progressivement depuis la trachée jusqu'aux bronchioles terminales, jouant le rôle de filtre vis-à-vis des particules de trop gros diamètre. Ainsi, les particules vont se déposer le long de l'arbre bronchique en fonction de leur taille : les particules de diamètre supérieur à 5 μm seront arrêtées au niveau des cavités nasales, tandis que celles de 1 à 5 μm vont se déposer au niveau de la trachée, des bronches et bronchioles supérieures, par sédimentation ou impaction liée à leur inertie. Seules les particules de diamètre entre 1 et 3 μm peuvent atteindre les alvéoles. Les particules de diamètre inférieur à 1 μm restent généralement en suspension en raison de leur faible inertie et sont exhalées (72). Les particules toxiques et pathogènes déposés dans l'arbre respiratoire vont alors être éliminés par un mécanisme épithélial actif appelé « clairance mucociliaire ».

La clairance mucociliaire est un mécanisme essentiel à l'élimination des particules et microorganismes inhalés au niveau des voies respiratoires supérieures, de la trachée et des bronches larges. Elle repose sur deux types cellulaires : les cellules

ciliées et les cellules caliciformes. Les mucines produites par les cellules caliciformes sont des glycoprotéines de grande taille qui peuvent être sécrétées ou liées à la membrane des cellules. Le mucus forme un gel muqueux hydraté constitué à 97% d'eau dans lequel les mucines sécrétées (MUC5B, MUC5AC et MUC2) représentent 30% des constituants solubles et forment des polymères permettant de stabiliser le mucus et de piéger les particules et microorganismes. Les particules et microorganismes sédimentés ou emprisonnés dans le mucus seront alors transportés, grâce aux mouvements vibratoires des cellules ciliées, vers le nasopharynx, où ils seront éliminés par la toux et la déglutition. Le mucus visqueux est cependant séparé de la surface cellulaire par une couche liquide péri-ciliaire de faible viscosité qui permet aux cils de battre rapidement et empêche les glycoprotéines du mucus d'adhérer au glycocalyx des cellules. Les mucines liées à la membranes (MUC1, MUC4 et MUC16) contribuent également à faciliter le transport mucociliaire (53,66,73). La coordination de l'activité ciliaire au sein de l'épithélium est sous le contrôle des connexines et influencée par les signaux inflammatoires via l'activation de mécanismes intracellulaires calcium-dépendants (74).

De nombreuses pathologies sont associées à un défaut de la clairance mucociliaire (soit liées à une anomalie de la composition du mucus, soit à un défaut des mouvements des cellules ciliées, ou dykinésies ciliaires), soulignant l'importance de ce mécanisme. La mucoviscidose, une maladie génétique liée à une mutation du gène codant pour le *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) et causant une anomalie de la composition du mucus est associée à des infections chroniques et récurrentes chez les sujets atteints (75). Les diskinésies ciliaires primaires ou secondaires sont également associées à des troubles respiratoires (toux, dyspnée) et infections sinusiennes et pulmonaires à répétition (73,76). La production de mucus varie au cours du développement et peut être augmentée en réponse à des agressions microbiennes ou l'inhalation importante de particules toxiques ou irritantes. Cette hyperproduction de mucus est également une caractéristique des pathologies respiratoires chroniques liées à un état inflammatoire prolongé des voies respiratoires, comme la BPCO) et l'asthme, et associée à une augmentation de la sensibilité aux infections (66).

3. Défenses moléculaires

Les cellules épithéliales ont un rôle central dans le déclenchement et la coordination de la réponse immunitaire locale. Leur position stratégique et la variété de PRR qu'elles expriment en font en effet les principales sentinelles (avec les cellules dendritiques attenantes à l'épithélium et les macrophages alvéolaires) impliquées dans la détection des pathogènes. Parmi les composés produits par les différentes cellules sécrétrices, on retrouve des molécules possédant des propriétés antimicrobiennes intrinsèques, appelées peptides antimicrobiens (*antimicrobial peptides*, AMP), des chimiokines ayant un effet attractant sur les cellules innées effectrices comme les neutrophiles, et des cytokines jouant le rôle de messagers pour « alerter » et activer les cellules résidentes (*innate lymphoid cells* (ILC), cellules *natural killer* (NK), macrophages, cellules dendritiques) ou recrutées (neutrophiles, monocytes inflammatoires, lymphocytes) (66,68).

L'activation des PRR exprimés par les cellules épithéliales entraîne la production d'AMP divers. La cathélicidine et les β -défensines sont généralement synthétisées sous forme de pré-pro-peptides, clivées avant leur sécrétion pour donner une protéine active chargée positivement, qui entraîne une désorganisation électrostatique des membranes microbiennes de charge négative. Elles ont également un rôle chimioattractant vis-à-vis des neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes. Le lysozyme exerce son activité antimicrobienne par l'hydrolyse du peptidoglycane des parois bactériennes, tandis que la lactoferrine, et la calprotectine (formée des protéines s100A8/s100A9) séquestrent le fer et le zinc, nécessaires au métabolisme des microorganismes. Les protéases ont des rôles antimicrobiens variés, tandis que les antiprotéases exercent une activité immunomodulatrice et protectrice de l'intégrité tissulaire, par exemple en inhibant la *neutrophil elastase*, la cathepsine G et la chymotrypsine produites notamment par les neutrophiles, et en inhibant les fonctions des macrophages via l'induction de la production de TGF β et d'IL-10 (53,66).

Les cellules épithéliales sont en outre capables de produire des radicaux libres oxygénés (ROS) de façon constitutive ou inductible, via les enzymes NADPH oxydase ou les dual oxydases 1 et 2. Les propriétés antimicrobiennes de ces molécules reposent sur la peroxydation lipidique des membranes des microorganismes et la destruction de l'ADN. Ils ont également un rôle dans la

signalisation inflammatoire, par exemple en favorisant au niveau intracytoplasmique l'activation de NF- κ B, ou de l'inflammasome NLRP3-dépendant dans les macrophages en réponse à une stimulation par le LPS (53,77).

Au niveau alvéolaire, le surfactant joue un rôle important dans la défense antimicrobienne. Les protéines du surfactant SP-A et SP-D, hydrophiles, sont également appelées *collagen-containing C-type lectins* (collectins) et ont une fonction d'opsonisation vis-à-vis de différents PAMP d'origine virale, bactérienne, fongique et toxines, facilitant leur élimination par les macrophages alvéolaires résidents. Ils exercent également une activité antimicrobienne directe par la formation de pores dans la membrane des microorganismes (53). Certains lipides du surfactant comme la dipalmitoylphosphatidylcholine et le phosphatidylglycérol ont également des propriétés antimicrobiennes intrinsèques. Les protéines du surfactant ont de plus un rôle de messagers, et sont capables de mobiliser et de renforcer les défenses cellulaires, notamment phagocytaires (66). Par ailleurs, les AEC I expriment des PRR, notamment de la famille des TLR, et la stimulation de ces derniers induit la production de cytokines inflammatoires (65).

Les cellules épithéliales ont également un rôle primordial dans la signalisation intercellulaire et l'organisation de la réponse immunitaire. En réponse à des signaux bactériens, elles produisent des chimiokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles, monocytes inflammatoires et cellules dendritiques (comme CXCL1/2/5, CCL2/3 et CCL20) et répondent aux cytokines IL-17 et IL-22 orientant vers une réponse de type Th17. En réponse à des signaux viraux, les cellules épithéliales produisent en grande quantité des IFN de type I et III (notamment d'INF- γ), orientant vers une réponse de type Th1 (68).

L'épithélium pulmonaire produit également divers composés capables de réguler la réponse inflammatoire locale, importants lors de la phase de résolution de l'inflammation. C'est le cas de la cathélicidine LL37 qui peut séquestrer le LPS, ou MUC1 qui inhibe la signalisation TLR-dépendante, limitant ainsi les dommages tissulaires causés par une activation disproportionnée des mécanismes inflammatoires (53,78,79).

4. Défenses cellulaires

i. Macrophages

Deux populations de macrophages résidents sont retrouvées au niveau du poumon : les macrophages alvéolaires et interstitiels.

Les macrophages alvéolaires s'établissent dans le poumon au cours de la période embryonnaire à partir de progéniteurs du sac vitellin et représentent 90 à 95% des cellules présentes dans la lumière alvéolaire à l'homéostasie (le reste est essentiellement constitué de lymphocytes innés comme les ILC, NK, T $\gamma\delta$ et de lymphocytes T mémoires résidents T_{RM}). Toutes les alvéoles ne contiennent cependant pas de macrophages, mais ces derniers ont la capacité de se déplacer à travers les alvéoles, via des structures appelées pores de Kohn (80,81). Les macrophages alvéolaires sont caractérisés par leur longue durée de vie (40% de renouvellement de la population en 1 an) et leur capacité de maintien autonome de la population par autorenouvellement. Ce renouvellement est sous le contrôle du facteur de croissance *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF). Cependant, des études ont démontré qu'en cas de forte déplétion de la population, causée par une inflammation, infection sévère ou une irradiation, les monocytes inflammatoires recrutés depuis la circulation sanguine adoptent *in situ* un phénotype de macrophage alvéolaires afin de restaurer le pool de ces cellules (82).

Contrairement aux macrophages interstitiels, les macrophages alvéolaires expriment très faiblement les molécules du CMH et molécules de co-stimulation tel que le CD86 et sont donc peu impliqués dans la présentation antigénique aux lymphocytes T. Cette faible expression de molécules de co-stimulation induit à l'inverse une anergie des lymphocytes T vis-à-vis des antigènes inoffensifs, et est importante dans le contrôle des réponses allergiques (83–85).

Le rôle principal des macrophages alvéolaires en l'absence de stimuli inflammatoires est la clairance des cellules apoptotiques, débris cellulaires et particules inhalées, et le catabolisme des lipides du surfactant, permettant le renouvellement de ce dernier. Ils participent au maintien de l'homéostasie par la production de facteurs anti-inflammatoires régulateurs tels que le *transforming growth factor- β* (TGF- β), l'IL-10 et l'expression de récepteurs comme le CD200R, *signal regulatory protein- α* (SIRP α) et *triggering receptor expressed on myeloid cells* (TREM2), inhibant l'activation des

cellules épithéliales, cellules dendritiques, lymphocytes T et des macrophages eux-mêmes. En situation infectieuse ou inflammatoire ces régulateurs sont réprimés, permettant aux macrophages de passer d'un phénotype dit « tolérogénique » à pro-inflammatoire (68,81,83).

Les nombreux PRR exprimés par les macrophages alvéolaires (TLR, CLR, RLR, NLR et détecteurs cytosoliques) en font des sentinelles importantes pour la détection des infections et leur activation conduit à la production de chimiokines (*CC-chemokine ligand* (CCL) 2/3/4/5 et CXCL1/2/8) et cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IL-23). Ils sont également une source majeure de production d'IFN-I lors d'infections virales et sont ainsi particulièrement importants pour la détection des virus et le déclenchement de la réponse immunitaire antivirale de type I. Les cytokines et chimiokines produites coordonnent et amplifient la réponse anti-infectieuse des cellules épithéliales, cellules lymphoïdes innées, neutrophiles, monocytes et lymphocytes T (68).

Les macrophages alvéolaires activés possèdent plusieurs mécanismes d'élimination des pathogènes : le plus important de ces mécanismes est la phagocytose des agents pathogènes bactériens, viraux, fongiques ou toxiques ou celle des cellules infectées. La phagocytose peut être déclenchée par la détection d'opsonines, comme les protéines du surfactant (SP-A, SP-D) et du complément (C1q) ou les anticorps, ou par la reconnaissance directe de PAMP et de sucres de surface des microbes tels que les *mannoses* (81). Le *scavenger receptor* de classe A *Macrophage receptor with collagenous structure* (MARCO) est par exemple essentiel à la clairance par phagocytose de *Streptococcus pneumoniae* dans un modèle murin de pneumonie (86). La production de ROS ou d'oxyde nitrique (par la *nitric oxide synthase* inductible, (iNOS), est également un mécanisme antimicrobien primordial. Les mécanismes de phagocytose et production de ROS seront détaillés dans le paragraphe dédié aux neutrophiles (II.4.iv).

Les macrophages alvéolaires participent largement à la résolution de l'inflammation et aux processus de réparation tissulaire après l'élimination des pathogènes. L'acquisition de ce phénotype régulateur est caractérisée notamment par une augmentation de l'expression de CD200R et TREM2, une diminution de l'expression de MARCO et de la réactivité aux agonistes des TLR, accompagné d'une augmentation de la production d'IL-10 (83). Les macrophages alvéolaires stimulent

également la prolifération des cellules épithéliales afin de restaurer l'intégrité de l'épithélium, par l'intermédiaire de la production du facteur de réparation *trefoil factor family 2* (TFF2) (87).

Des études *in-vitro* ont mis en évidence une « polarisation » des macrophages alvéolaires en fonction de leur exposition à différents stimuli, donnant lieu à une classification en macrophages pro-inflammatoires M1 (dit « classiquement activés ») et anti-inflammatoires M2, présentant des capacités fonctionnelles et de production cytokinique différentes. Classiquement, la stimulation par l'IFN- γ induit un phénotype M1, tandis que la stimulation par l'IL-4 ou l'IL-13 induit une polarisation vers un phénotype anti-inflammatoire M2. Des études de modèles tumoraux chez l'animal ont par exemple montré une polarisation M2 des macrophages par le micro-environnement tumoral, et l'induction d'une réversion de ces macrophages M2 vers un phénotype M1 résultait en une augmentation de leur capacité cytotoxique et la réduction de la tumeur (88,89). Plusieurs études ont également retrouvé cette polarisation dans des modèles infectieux ou inflammatoires aigus et chroniques (90). La pertinence physiologique de cette classification dichotomique stricte fait débat, mais elle a néanmoins contribué à mettre en lumière l'importante plasticité de ces cellules.

Les macrophages interstitiels sont localisés dans le parenchyme pulmonaire, dans les zones séparant les alvéoles adjacentes. Contrairement aux macrophages alvéolaires caractérisés par une forte expression de CD11c et Siglec F, les macrophages interstitiels expriment ces marqueurs de surfaces de façon beaucoup plus faible, mais expriment fortement le CD11b et le CMHII. Ils jouent le rôle de médiateurs de l'immunité adaptative par la présentation antigénique aux lymphocytes T interstitiels, et ont également une importante capacité de phagocytose et de burst oxydatif (81,83). Une étude chez la souris a également mis en évidence un rôle immunorégulateur de ces macrophages via la production d'IL-10 dans un modèle d'asthme (91).

ii. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques pulmonaires sont réparties tout au long de l'épithélium bronchique et alvéolaire. Localisées au niveau basolatéral de l'épithélium, elles

peuvent également émettre des protrusions riches en récepteurs servant à « sonder » la lumière des voies respiratoires et ont ainsi un rôle primordial de sentinelles pour la détection des pathogènes et l'induction de l'immunité adaptative par la présentation antigénique aux lymphocytes naïfs (81,92).

Les cellules dendritiques pulmonaires regroupent essentiellement trois populations issues de lignées de développement indépendantes : les cellules dendritiques conventionnelles (cDC), les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), et les cellules dendritiques dérivées des monocytes (moDC). Les cDC (CD11c^{hi} MHCII^{hi}) se divisent en deux sous-populations, CD103⁺ (cDC1) et CD11b⁺ (cDC2). Les moDC (également CD11c^{hi} MHCII^{hi}) expriment aussi le CD11b, et ont longtemps été confondues avec les cDC2, dont elles se différencient par l'expression de CD64. Les pDC se distinguent par l'expression du marqueur spécifique PDC-1 et du marqueur associé aux lymphocytes B B220, mais ont une expression plus faible de CD11c et MHCII. (81).

Dans la moelle osseuse, le progéniteur commun aux DC (*common DC progenitor*, CDP) donne naissance aux pré-DC qui migrent vers les organes périphériques où ils se différencient en cDC matures ; et aux pDC dont la maturation a lieu directement dans la moelle osseuse sans passer par le stade de pré-DC. Le développement et la maturation de ces deux lignées sont sous le contrôle du *Flt3 ligand* (Flt3L). Le développement et la maturation des moDC, bien qu'encore partiellement élucidés, sont en revanche indépendants de Flt3, mais dépendent de facteurs impliqués dans le développement des monocytes comme le récepteur aux chimiokines CCR2 et le récepteur au M-CSF, CSF-1R (81).

La stimulation des cellules dendritiques par les ligands des PRR induit leur activation et la phagocytose du pathogène. Il s'ensuit une digestion de ce dernier et un processus d'apprêtement intracellulaire de l'antigène qui aboutit à sa présentation à la surface de la cellule par les molécules du CMH. Cette activation s'accompagne de plus d'une augmentation d'expression en surface de CCR7, ce qui induit la migration des DC jusqu'aux vaisseaux lymphatiques en fonction du gradient de CCL21, puis leur entrée dans les ganglions lymphatiques où se trouvent les lymphocytes naïfs (93). La présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs nécessite alors la reconnaissance du complexe CMH/antigène par le TCR et la mise en place de

signaux de co-stimulation permettant l'activation des clones lymphocytaires spécifiques de l'antigène (81).

Des spécificités fonctionnelles propres à certaines sous-populations de cellules dendritiques ont été mises en évidence. Par exemple, plusieurs études ont montré un rôle préférentiel des cDC1 pour l'induction de la réponse effectrice Th1 via l'activation des lymphocytes T CD8⁺, tandis que les cDC2 sont importants pour l'induction de la réponse mémoire et des réponses antiparasitaires de type Th2 et antibactériennes Th17 (92,94). Des études ont montré un rôle des moDC dans la réactivation de la réponse Th1 lors d'infection virale, mais pas dans l'induction initiale de cette réponse. Les pDC, bien qu'étant une source importante d'IFN-I, sont quant à elles d'avantage associées à un maintien de la tolérance vis-à-vis des antigènes inoffensifs à l'homéostasie, et ont un rôle limité (voire contre-productif) dans l'induction des réponses anti-infectieuses (81).

Les cellules dendritiques activées produisent également des cytokines en grande quantité, activant notamment les ILC et cellules NK. La production d'IL-12 par les cDC1 est primordial pour l'induction de la réponse Th1, tandis que la production d'IL-6, IL-23 et TGF- β oriente vers une réponse antibactérienne Th17 (92).

iii. Cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées regroupent plusieurs populations de cellules résidentes retrouvées dans de nombreux compartiments muqueux ou non muqueux (comme le foie, la peau ou le tissu adipeux par exemple). Elles sont cependant classiquement reconnues pour leur participation à la première ligne de défense innée anti-infectieuse au niveau des muqueuses. Elles sont impliquées à la fois dans l'initiation, la régulation et la résolution de l'inflammation, mais également dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Les ILC sont activées principalement par la production locale de cytokines en réponse à la détection de pathogènes ou signaux de danger par les cellules épithéliales, macrophages et cellules dendritiques, mais également directement par des signaux activateurs présentés par les pathogènes ou cellules infectées (95).

Les ILC se caractérisent par leur absence d'expression des récepteurs antigéniques recombinants des lymphocytes (TCR et BCR) ainsi que l'absence des autres

marqueurs classiques des lignées lymphocytaires. Elles sont classées en trois familles en fonction du type de cytokines qu'elles produisent et de l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Les ILCs du groupe 1, qui regroupent les cellules cytotoxiques *Natural killer* (NK) et les ILC1 non cytotoxiques, expriment le facteur de transcription T-bet. Ce sont les homologues innés des lymphocytes conventionnels T CD8⁺ cytotoxiques et CD4⁺ Th1, respectivement. Elles sont associées aux réponses immunitaires antivirales et antitumorales. Les ILC2, contreparties innées des CD4⁺ Th2, ont un rôle dans la réponse allergique et la réponse antiparasitaire. Elles sont caractérisées par l'expression de GATA-3 et produisent de l'IL-4, IL-9, IL-5 et IL-13 ainsi que l'amphirégulline. Les ILC3, exprimant le facteur de transcription ROR γ T, sont les homologues innés des lymphocytes CD4⁺ Th17 et sont impliquées dans la défense contre les pathogènes extracellulaires bactériens et fongiques. Elles produisent de l'IL-17 ou IL-22 (95).

Les cellules NK sont les plus abondantes dans la plupart des tissus (poumon, foie, rate notamment) et dans le sang périphérique. Les ILC1 non cytotoxiques, généralement peu représentées, sont en nombre plus important dans le tractus gastrointestinal, tandis que les ILC2 sont majoritaires au niveau de la peau. Les ILC3 sont principalement représentées au niveau du tractus intestinal et des amygdales. Au niveau pulmonaire, les cellules NK sont la population d'ILC la plus abondante (95%), suivi par les ILC3 (chez l'homme) ou les ILC2 (chez la souris) (95).

D'autres populations de lymphocytes innés résidents sont retrouvées au niveau pulmonaire, comme les cellules T invariantes *natural killer* (iNKT), qui sécrètent notamment de l'IFN- γ en réponse à la stimulation par l'IL-12, ou de l'IL-22 en réponse à l'IL-23 au cours de l'infection par les virus de la grippe. Elles sont potentiellement impliquées dans la protection contre les dommages épithéliaux (68,96). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont été décrits comme une source précoce d'IL-17 lors d'infections bactériennes, mais également d'IFN- γ , en réponse à l'IL-1 et IL-12. Les *mucosal-associated invariant T cells* (MAIT) sont également capables de produire de l'IL-17 ou de l'IFN- γ en fonction du contexte. Le rôle de ces populations lymphocytaires innées semble donc dépendre étroitement du type de stimulation et de l'environnement cytokinique (68).

iv. Neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules essentiellement circulantes à l'homéostasie, qui se développent dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs de la lignée granulocytaire (comme les éosinophiles et mastocytes) sous le contrôle du *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF). Ils représentent environ 70% des leucocytes circulants chez l'homme, et 30% chez la souris, et ont une durée de vie relativement courte dans la circulation (6 à 8h environ). Ils sont donc renouvelés en permanence par la moelle osseuse, tandis que les neutrophiles sénescents sont éliminés par les macrophages spléniques (97).

Ce sont les premières cellules recrutées massivement depuis la circulation vers la périphérie en réponse à des stimuli inflammatoires ou infectieux. En retour, inflammation et infection stimulent la production médullaire de neutrophiles et la libération, sous le contrôle de CXCR4, des neutrophiles séquestrés dans la moelle osseuse vers le sang (93,97).

Le recrutement des neutrophiles depuis la circulation sanguine vers les tissus périphériques se fait selon un processus de migration transendothéliale qui se déroule en plusieurs étapes. La première étape est l'arrêt des neutrophiles dans le flux circulatoire et leur attachement à l'endothélium vasculaire grâce à des molécules d'adhésion comme les sélectines P et E et les intégrines de la famille des *intercellular adhesion molecules* (ICAM), qui sont surexprimées par les cellules endothéliales en contexte inflammatoire. Un grand nombre de molécules produites par l'environnement inflammatoire stimulent l'expression endothéliales de ces molécules d'adhésion, dont la *formylmethionyl-leucyl-phenylalanine* (fMLP), le TNF, l'IL-1 β , l'IL-17 ou encore le LPS. Les molécules d'adhésion vont reconnaître leurs ligands exprimés de façon constitutive à la surface des neutrophiles, comme *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) et la L-selectine. L'attachement induit des changements transcriptionnels du neutrophile et l'augmentation de l'expression d'intégrines β 2 comme LFA-1 et Mac-1, qui entraînent un roulement et une adhésion ferme du neutrophile à l'endothélium au niveau de sites préférentiels pour leur transmigration (97). Cette transmigration est facilitée par les intégrines *platelet/endothelial-cell-adhesion molecule* (PECAM), ICAM 1 et 2 et *vascular cell-adhesion molecule 1* (VCAM1) ainsi que des molécules de jonction endothéliales (*junctional adhesion molecules*, JAM-A, -B et -C) (98).

Après leur extravasation à travers la paroi vasculaire, les neutrophiles migrent jusqu'aux sites inflammatoires grâce aux gradients chimiokines, notamment CXCL1/2/5 (ainsi que l'IL-8 ou CXCL8 chez l'homme) et CCL3/5, ligands des récepteurs CXCR1/2 et CCR1 respectivement, exprimés de façon importante à la surface des neutrophiles. Ces derniers expriment également des récepteurs aux protéines du complément (C5a par exemple), aux médiateurs lipidiques circulants (comme le récepteur BLT1 au leucotriène LTB₄) ou à des peptides formylés d'origine mitochondriale ou microbienne tel que fMLP (via le *formyl peptide receptor 1*, FPR1) qui peuvent aussi jouer le rôle de chimioattractants et agir de façon simultanée ou séquentielle (93,97).

Les neutrophiles recrutés sont rapidement activés par différents signaux cytokiniques ou microbiens (via FPR1 ou TLR notamment) et participent activement à l'élimination des pathogènes par différents mécanismes, que sont la phagocytose, la dégranulation des différents granules antimicrobiens, la production de ROS et la formation de *neutrophiles extracellular traps* (NET). Le type et la concentration de ces différents signaux dans le milieu influence la réponse antimicrobienne du neutrophile (97). Par ailleurs, le rôle essentiel de ces cellules dans la première ligne de défense antimicrobienne est largement illustré par la sensibilité accrue aux infections, notamment bactériennes, des individus atteints de neutropénie ou d'agranulocytose congénitale ou acquise (59).

Au cours de la maturation des précurseurs (myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte) en neutrophiles terminaux dans la moelle osseuse, ceux-ci synthétisent une grande variété de protéines, comme des enzymes ou peptides antimicrobiens, qui sont stockés dans des granules cytoplasmiques. Ces granules sont de quatre types : primaires (ou azurophiles), secondaires (ou spécifiques), tertiaires (ou gélatinases) et enfin les vésicules sécrétoires, et se forment séquentiellement pendant la maturation. Les granules constituent des réserves de protéines préformées qui seront libérées rapidement dans l'environnement extracellulaire par les neutrophiles activés lors du processus de dégranulation (97,99). Les granules primaires sont les plus larges et contiennent de grandes quantités de myéloperoxydase (MPO), une enzyme impliquée dans la production de ROS, de lysozyme, de *bactericidal/permeability-increasing protein* (BPI) ainsi que des sérines protéases comme l'élastase ou la cathepsine G, et des défensines. Les

granules secondaires contiennent également du lysozyme, ainsi que la lactoferrine, la *neutrophil gelatinase associated protein* (NGAL, ou lipocaline 2) et la collagénase MMP8, tandis que les granules tertiaires, moins riches en peptides antimicrobiens, contiennent surtout de la gélatinase, des métalloprotéases et l'arginase 1. Les vésicules sécrétoires contiennent principalement des molécules d'adhésion, et interviennent lors de la phase de migration transendothéliale des neutrophiles. Elles contiennent également un certain nombre de protéines plasmatiques dont l'albumine, en raison de leur formation par endocytose (contrairement aux autres granules qui se forment à partir de l'appareil de golgi) (99).

La libération des différents granules, grâce aux flux calciques intracellulaires, est séquentielle lors de la phase inflammatoire, en fonction du type et de l'intensité des signaux activateurs des neutrophiles. Les vésicules sécrétoires sont ainsi les premiers libérés lors de la migration transendothéliale, puis les granules tertiaires, dont le contenu enzymatique facilite le passage à travers la membrane basale. Le contenu des granules secondaires et primaires est ensuite libéré par les neutrophiles activés au niveau des sites inflammatoires, soit directement dans le milieu extracellulaire, soit après fusion avec une vésicule de phagocytose pour former un phagolysosome, favorisant l'élimination des pathogènes phagocytés. Le contenu de ces granules est également essentiel à l'initiation du burst oxydatif via la MPO et la formation du complexe de la NADPH oxydase (97).

Les radicaux libres sont formés au cours du burst oxydatif par trois enzymes principales : la MPO, la NADPH oxydase et la NO synthase. Ce sont des substances instables à forte réactivité qui agissent par oxydation des protéines, lipides ou acides nucléiques, et ont un rôle à la fois comme agents antimicrobiens et dans la signalisation immunitaire. Le complexe de la NADPH oxydase s'assemble au niveau des membranes plasmatiques ou phagolysosomales et produit l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ à partir de l'oxygène, ce dernier pouvant ensuite se dismuter pour former le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou se combiner avec le NO (produit par la NO synthase) pour former le peroxyde d'azote $ONOO^-$. La MPO, libérée dans la vésicule phagolysosomale par la dégranulation, produit notamment de l'acide hypochloreux $HOCl$ à partir du peroxyde d'hydrogène. L'acide hypochloreux hautement réactif réagit avec le contenu du phagosome pour former ensuite des chloramines, qui participent à l'élimination des pathogènes phagocytés (100). La granulomatose

septique chronique, maladie héréditaire liée à un défaut de la NADPH oxydase, se traduit par une grande sensibilité aux infections des sujets atteints, soulignant l'importance de ces mécanismes pour le contrôle des infections (57).

La phagocytose est un processus cellulaire actif correspondant à l'internalisation de pathogènes ou débris cellulaires, dans une vésicule dérivée de la membrane plasmique appelée phagosome. Cette phagocytose peut être déclenchée par deux mécanismes principaux : la reconnaissance directe de PAMP à la surface des pathogènes, par les TLR principalement (les neutrophiles expriment tous les TLR sauf TLR3) ; et la reconnaissance d'opsonines (classiquement des Immunoglobulines ou protéines du complément) fixées à la surface des pathogènes et toxines. Ce phagosome va fusionner avec des granules dont le contenu protéique va être déversé dans la vésicule de fusion, qui est alors appelée phagolysosome. Contrairement aux phagosomes des macrophages, dont la maturation s'accompagne d'une acidification importante du milieu, ceux des neutrophiles restent alcalins ou neutres. Le pH alcalin de la vésicule est nécessaire à l'activation de nombreuses protéases granulaires, comme l'élastase ou la cathepsine G. La MPO est également libérée, de même que les protéines permettant l'assemblage du complexe de la NADPH oxydase, entraînant la production de ROS (97). Les protéases granulaires et ROS vont ainsi participer à l'élimination des pathogènes phagocytés par les différents mécanismes précédemment décrits. Certaines espèces microbiennes ont cependant développé des mécanismes leur permettant d'échapper à la phagocytose, comme la présence d'une capsule ou l'inhibition de la maturation du phagosome ou de sa fusion avec le lysosome (101–103).

La libération de NET, ou NETose, est une forme de mort cellulaire des neutrophiles activés qui se traduit par la libération dans le milieu extracellulaire de structures composées de chromatine décondensée associée à des histones et protéines granulaires et cytoplasmiques (97,104). La formation de NET a été décrite *in vitro*, sous l'effet de différentes stimulations, et également *in vivo* dans de nombreux modèles infectieux (105). La formation de NET semble être dépendante de la MPO et de la NADPH oxydase et donc de la production de ROS (97,106,107). Le mécanisme antimicrobien des NET passe par le piégeage des pathogènes dans le réseau de chromatine, permettant aux différentes protéines antimicrobiennes contenues et concentrées dans les NET d'éliminer les microorganismes (104).

Certaines bactéries du genre *streptococcus* expriment cependant des DNases ou endonucléases qui leur permettent de détruire les NETs et d'échapper ainsi aux mécanismes bactéricides (108,109). Les NET peuvent également avoir des effets négatifs : la libération dans le milieu extracellulaire de molécules du « soi » favorise en effet l'induction de désordres auto-immuns, comme le lupus érythémateux systémique (110).

Malgré la faible activité transcriptionnelle des neutrophiles matures (comparé à d'autres types cellulaires comme les macrophages), l'activation de ces derniers au niveau des sites inflammatoires induit la synthèse *de novo* de molécules de signalisation, cytokines et chimiokines mais également médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines et leukotriènes), qui participent à la communication intercellulaire au cours de la réponse inflammatoire. Les neutrophiles produisent notamment des chimiokines (comme CCL2, 3, 19 et 20) recrutant les monocytes inflammatoires (dont l'arrivée suit de très près celle des neutrophiles sur le site de l'inflammation) et cellules dendritiques. La production de TNF et IL1- β par les neutrophiles augmente par ailleurs les capacités antimicrobiennes des monocytes et macrophages, mais également leur production de chimiokines attirant les neutrophiles, créant une boucle d'amplification (97). Les neutrophiles peuvent également induire la maturation des cellules dendritiques, participant ainsi indirectement à l'initiation de la réponse adaptative (111). Le rôle des neutrophiles sur l'immunité adaptative est cependant encore sujet à débat, certaines études ayant montré un effet suppresseur des neutrophiles au niveau des organes lymphatiques, tandis que d'autres rapportent une capacité des neutrophiles à exprimer le CMHII et à présenter les antigènes aux lymphocytes dans certains contextes inflammatoires (97,112–114).

Le fort potentiel inflammatoire des facteurs libérés dans le milieu extracellulaire par les neutrophiles entraîne des dommages tissulaires, qui peuvent être sévères en cas d'activation massive ou prolongée. La mort des neutrophiles par pyroptose, une forme de mort cellulaire inflammasome-dépendante et nécrotique associée à une importante dégradation tissulaire, semble jouer un rôle dans le sepsis (115). Différentes pathologies inflammatoires chroniques sont également associées à un défaut de contrôle du recrutement et de l'élimination des neutrophiles, comme la BPCO, la mucoviscidose ou la polyarthrite rhumatoïde (97,116). La réponse

neutrophilique nécessite donc un contrôle strict par le microenvironnement lors de la phase de résolution de l'inflammation, notamment par la libération dans le milieu de nombreux signaux inhibant le recrutement des neutrophiles et induisant leur apoptose. Les macrophages jouent un rôle primordial dans cette régulation, par la phagocytose des neutrophiles apoptotiques, empêchant ainsi leur lyse et la libération de leur contenu hautement inflammatoire dans le milieu extracellulaire. Cette phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages est appelée efferocytose. Elle est facilitée par des modifications de l'expression de différents marqueurs de surface par les neutrophiles apoptotiques, comme la surexpression de ICAM-1, l'accumulation de phosphatidylsérine, ou la localisation membranaire de protéines normalement intracellulaires comme l'annexine 1 ou la calréticuline. Ce processus induit de plus un phénotype anti-inflammatoire chez les macrophages, associé à une diminution de la production d'IL-1 β , TNF et GM-CSF, et une augmentation de la production de TGF- β et IL-10. Les neutrophiles synthétisent également des médiateurs lipidiques anti-inflammatoires pendant la phase de résolution, tels que les résolvines, lipoxines et protectines, qui induisent notamment une inhibition du recrutement des neutrophiles et une augmentation du recrutement et de l'activation des monocytes/macrophages ainsi que la phagocytose « non-inflammatoire » des neutrophiles par ces cellules (116).

Malgré la vision classique des neutrophiles comme des cellules matures à un stade de différenciation terminal, exerçant leurs activités pro-inflammatoires après activation au niveau des sites d'inflammation, plusieurs études évoquent l'existence d'une plasticité de ces cellules. La classification la plus couramment retrouvée est celle faisant état de deux sous-populations de neutrophiles désignées N1 et N2 (par analogie avec les macrophages M1 et M2), caractérisées par des propriétés phénotypiques et fonctionnelles différentes. Comme pour les macrophages, c'est dans des modèles de cancers que ces deux populations ont été initialement identifiées. Les neutrophiles associés aux tumeurs adoptent un phénotype N2 anti-inflammatoire (produisant de l'IL-10, de l'arginase-1 et le facteur angiogénique VEGF notamment) favorisant la progression tumorale (117–119). La réversion vers un phénotype N1 pro-inflammatoire et cytotoxique (caractérisé par une production importante d'IL-12, TNF, IL-1 β et de ROS), via l'inhibition pharmacologique du TGF- β produit par le microenvironnement tumoral par exemple, induit une régression de la

tumeur. Si les neutrophiles N1 correspondent à la vision classique des neutrophiles activés, les neutrophiles N2 reflètent une dérégulation immunitaire induite par des microenvironnements particuliers, comme ceux des tumeurs, mais aussi d'autres types de syndromes inflammatoires aigus ou chroniques dans lesquels ils ont par la suite été identifiés. C'est le cas des brûlures sévères ou du syndrome de réponse inflammatoire systémiques (SRIS), où ils sont associés à une augmentation de la sensibilité aux surinfections bactériennes (120,121).

v. Monocytes

Les monocytes sont des cellules myéloïdes essentiellement circulantes qui se développent dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur myéloïde commun aux macrophages et cellules dendritiques. Ce dernier donne naissance aux progéniteurs des monocytes puis aux monocytes matures sous l'influence du *monocyte colony-stimulating factor* (M-CSF), ou à la lignée des cellules dendritiques sous l'influence du FLT3L. Les monocytes sont classiquement divisés en deux sous-populations en fonction des récepteurs qu'ils expriment : les monocytes inflammatoires ou classiques CCR2⁺, et les monocytes non-classiques ou résidents CX3CR1⁺ chez la souris (assimilés aux monocytes CD14⁺CD16⁺ présents chez l'homme) (122). Les deux populations de monocytes expriment également CCR1 et CCR3, impliqués dans des étapes différentes du passage transépithélial (transmigration), en collaboration avec des intégrines et molécules d'adhésion, dont CD62L, PSGL1 et ICAM1 (122).

Les monocytes inflammatoires CCR2⁺, également désignés Ly6C^{hi}, représentent 2 à 5% des leucocytes circulants à l'homéostasie. Leur fréquence augmente en cas d'inflammation ou d'infections (notamment bactériennes), et ils sont rapidement recrutés en périphérie grâce aux gradients de chimiokines CCL2 et CCL7 (ligands de CCR2) (93,122,123). Au niveau des sites infectieux, ils exercent des effets antimicrobiens directs, notamment par la phagocytose ou le burst oxydatif, ou se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques inflammatoires productrices de TNF et d'iNOS (93,124). Ils sont ensuite capables de migrer jusqu'aux nœuds lymphatiques, où ils peuvent transférer les antigènes qu'ils portent aux cDC ou se différencier en moDC et présenter directement l'antigène aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (122,125,126). Les monocytes CCR2⁺ peuvent

également acquérir un phénotype régulateur au niveau des sites inflammatoires pendant la phase de résolution, favorisant la réparation tissulaire via l'expression de VEGF, la clairance des débris cellulaires et la production d'IL-10 (127).

Les monocytes non-classiques CX3CR1⁺, de plus petite taille, expriment faiblement Ly6C et sont moins représentés que les monocytes CCR2⁺ dans la circulation. Ils sont également appelés *patrolling monocytes* en raison de leur capacité d'adhérence à l'endothélium vasculaire et de migration le long de l'endothélium des petits vaisseaux, où ils participent au maintien de l'intégrité et à la régulation de l'inflammation endothéliale. La fractalkine, CX3CL1, est une cytokine produite notamment au niveau de la zone marginale de la rate où elle est liée à la membrane des cellules, et est essentielle à l'activité de surveillance (*patrolling*) des monocytes CX3CR1⁺ (122). Ces cellules ont une longue durée de vie dans la circulation et migrent dans les tissus périphériques à l'homéostasie où ils se différencient en macrophages et cellules dendritiques tissulaires. Ils ont une faible capacité phagocytaire mais participent à la réponse inflammatoire, par la production de TNF notamment. En l'absence de stimuli inflammatoires, les CCR2⁺ qui ont une faible durée de vie dans la circulation, retournent dans la moelle osseuse où ils peuvent se différencier en CX3CR1⁺ (122,123,127).

III) Infections respiratoires basses et traitement

1. Les infections respiratoires basses

a) *Epidémiologie et facteurs de risques*

Les infections respiratoires basses regroupent les pneumonies communautaires et nosocomiales, les bronchites aiguës et exacerbations de bronchites chroniques et la bronchiolite du nourrisson. Selon le rapport de 2016 de l'organisation mondiale de la santé, elles représentent la quatrième cause de mortalité toutes causes confondues (derrière les cardiopathies ischémiques, les AVC et la BPCO) et la première cause de mortalité par maladies transmissibles, faisant de ces infections un problème majeur de santé publique (128). Le coût économique des infections respiratoires basses est également astronomique, représentant 20 à 80 milliards de dollars par an aux Etats-Unis. Les personnes les plus touchées sont principalement les personnes âgées, mais également les jeunes enfants (< 5 ans). Les pneumonies sont d'ailleurs la première cause de mortalité infantile dans le monde, en grande majorité dans les pays à faible revenu, et la première cause d'hospitalisation en pédiatrie dans les pays développés (129).

Bien que les pneumonies soient des affections aiguës causées par des microbes, elles se développent la plupart du temps à la faveur de terrains pathologiques ou environnementaux chroniques responsables d'un affaiblissement des défenses immunitaires, général ou pulmonaire en particulier. Ainsi, même si un contexte épidémique intervient dans certains cas particuliers, comme les épidémies saisonnières ou pandémies grippales par exemple, les pneumonies sont fréquemment considérées comme des infections opportunistes dont la survenue est en lien direct avec le statut immunitaire de l'hôte. L'âge constitue bien entendu un facteur de risque majeur, en raison de l'immaturation du système immunitaire chez le jeune enfant ou de l'immunosénescence ou d'inflammations chroniques (en plus de fréquentes comorbidités) chez le sujet âgé. Les immunodépressions (en particulier causées par le VIH, ou la malnutrition chez les enfants dans les pays à faible revenu) sont également un facteur de risque prépondérant. Parmi les comorbidités, les pathologies respiratoires chroniques (BPCO et asthme notamment), le diabète, l'obésité et les insuffisances cardiaques, hépatiques ou rénales chroniques augmentent significativement la susceptibilité aux pneumonies. Enfin, le tabagisme

actif ou passif (auquel peuvent être attribuées près d'un tiers des pneumonies), ainsi que la pollution de l'air intérieur et extérieur, augmentent également ce risque, en raison principalement d'une altération de la clairance mucociliaire et des réponses immunitaires dans les voies aériennes (129,130).

b) Définition, diagnostic et étiologies des pneumonies

Les pneumonies sont des infections respiratoires aiguës d'origine microbienne (bactérienne, virale ou fongique), dont la physiopathologie est liée en grande partie à la réponse inflammatoire de l'hôte. Sur le plan clinique, elles sont définies comme une accumulation de fluides exsudatifs dans le parenchyme pulmonaire, causant une obstruction des voies respiratoires se traduisant par une dyspnée et une toux. Ces symptômes respiratoires sont fréquemment accompagnés d'une fièvre importante, et parfois de troubles de la conscience et troubles digestifs. L'examen radiographique du poumon, sur lequel repose classiquement la confirmation du diagnostic de pneumonie, montre généralement des signes d'infiltration pulmonaire, plus ou moins caractéristiques en fonction de l'étiologie. Les pneumonies peuvent avoir des complications graves comme le sepsis et le syndrome de détresse respiratoire aigu, dont elles sont la première cause, et qui sont associés à un risque de mortalité élevé (129).

Les étiologies des pneumonies sont extrêmement nombreuses et généralement difficiles à établir. Cela s'explique en grande partie par la difficulté d'obtenir des prélèvements respiratoires fiables (les prélèvements d'expectorations sont fréquemment contaminés par la flore oropharyngée abondante) et la faible positivité de l'hémoculture (positive dans 5 à 15% des pneumonies hospitalisées). De plus, la prise d'antibiotiques peut également interférer avec les résultats, on parle alors d'infection « décapitée ». Les techniques de diagnostic récentes par PCR quantitative à partir des prélèvements nasopharyngés (pour l'identification des virus respiratoires ou bactéries atypiques) et la recherche d'antigènes urinaires du pneumocoque ou de *L. pneumophila*, ont cependant permis de raccourcir significativement le délai du diagnostic (résultats en moins de 24h, contre plusieurs jours pour les techniques microbiologiques). Par ailleurs les co-infections, notamment bactériennes et virales, sont souvent difficiles à mettre en évidence. Le diagnostic étiologique des pneumonies est réalisé uniquement en cas

d'hospitalisation, de complications ou d'échec thérapeutique, et ne doit en aucun cas retarder le début de l'antibiothérapie (129,131–133).

Selon plusieurs études européennes et américaines récentes, les virus sont responsables de 20 à 30% des pneumonies aiguës communautaires (**figure 4**). Même si les virus pouvant causer des pneumonies sont extrêmement variés, on observe une nette prédominance des rhinovirus et des virus Influenza (responsables de la grippe), sous forme d'épidémies saisonnières principalement (environ 20 et 30% des pneumonies virales, respectivement) (129). Un grand nombre de virus respiratoires émergents ont été identifiés depuis la fin des années 1990, tels que les coronavirus, responsables du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et du *Middle East respiratory syndrome* (MERS), le metapneumovirus humain, l'adénovirus 14 et certains sous-types zoonotiques du virus Influenza A (H5N1, h7N, h10N8). Bien que responsables le plus souvent de cas isolés ou regroupés en raison d'une faible adaptation à l'homme, ces virus induisent des pathologies sévères et font l'objet d'une surveillance étroite en raison d'un risque d'émergence de souches à potentiel pandémique (134).

Le pneumocoque, *Streptococcus pneumoniae*, est la cause la plus fréquente de pneumonies bactériennes (environ 35% des pneumonies bactériennes, et 5% des pneumonies toutes causes confondues), bien que sa prévalence ait diminué de façon significative après l'introduction des antibiotiques, et davantage encore depuis la vaccination (131,135). Les autres bactéries en cause sont *Mycoplasma pneumoniae*, responsable des pneumonies dites « atypiques » (12% des pneumonies bactériennes environ), suivi de *staphylococcus aureus*, *L. pneumophilla* (maladie des légionnaires) et des entérobactéries telles que *Klebsiella pneumoniae* ou *E. coli* (**figure 4**). Ces dernières, ainsi que *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, sont plus fréquentes lors de pneumonies associées aux soins, notamment sur ventilation assistée, et sont associées à une forte mortalité (129,131).

Enfin, il est important de noter que l'étiologie de la pneumonie reste indéterminée dans plus de la moitié des cas malgré la réalisation de différentes techniques de diagnostic. Par ailleurs, la proportion des co-infections est très probablement largement sous-estimée. Les infections virales, même modérées, induisent en effet des altérations des défenses immunitaires locales constituant un terrain propice pour le développement d'infections bactériennes secondaires (129,131,136).

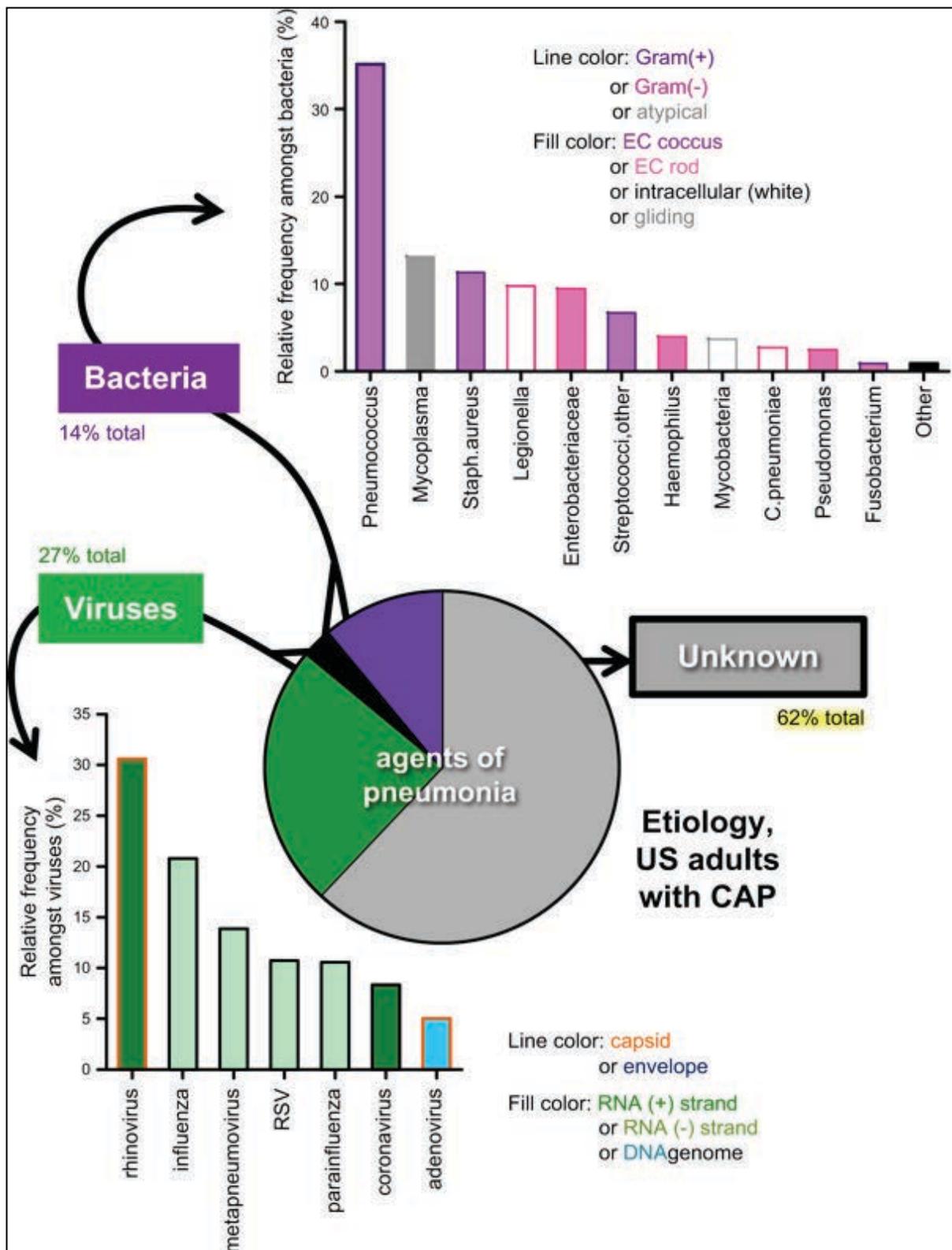


Figure 4 : Etiologie des pneumonies aiguës communautaires. Les données collectées proviennent de 2488 patients adultes immunocompétents hospitalisés pour pneumonie aiguë communautaire dans cinq hôpitaux (Etats-Unis) entre Janvier 2010 et Juin 2012. La recherche étiologique a été réalisée par culture, tests sérologiques, détection d'antigènes et tests de diagnostic moléculaire à partir des prélèvements respiratoires, sanguins et urinaires (129).

c) *Infections par les virus de la grippe*

i. Epidémiologie et transmission

Les virus Influenza A et B sont responsables des épidémies saisonnières de grippe, qui touchent chaque année 5 à 15% de la population mondiale et sont responsables de 250 000 à 500 000 morts (137,138). Les virus Influenza A (*influenza A virus*, IAV) sont également responsables des quatre pandémies mondiales survenues depuis le début du vingtième siècle : la grippe espagnole en 1918/1919 (H1N1), la grippe asiatique en 1957 (H2N2), la grippe de hong Kong en 1968 (H3N2) et enfin h1N1 en 2009 (139). La transmission du virus se fait principalement par voie aérienne, via les sécrétions respiratoires et les aérosols, favorisée par une faible température et un faible taux d'humidité, ou par les surfaces contaminées (137,140).

Les virus Influenza appartiennent à la famille des *orthomyxoviridae*. Leur matériel génétique est composé de huit segments d'ARN simple brin de polarité négative. Ces ARN codent pour les différentes protéines virales dont l'hémagglutinine (HA), principale cible antigénique de l'immunité adaptative, et la neuraminidase (NA), toutes deux exprimées à la surface du virus. La classification des virus du type A est basée sur le sous-type d'HA et NA qu'ils expriment. A l'heure actuelle, 18 HA et 11 NA ont été identifiées, la plupart chez les oiseaux sauvages. Trois souches de IAV circulent actuellement chez l'homme : H1N1, H2N2 et H3N2. H1N1 et H3N2 sont responsables de la plupart des cas lors des épidémies hivernales. Deux lignées majeures de virus influenza B circulent chez l'homme, désignées Victoria et Yamagata (137).

Ces virus sont caractérisés par un haut niveau de mutation au cours de leur cycle de réplication chez l'hôte, responsables de l'apparition régulière de nouvelles versions ou « variants » du virus par le phénomène de dérive antigénique. Ces variants, capables d'échapper partiellement à la mémoire immunitaire de l'hôte, sont responsables des épidémies saisonnières. Des nouveaux variants antigéniques apparaissent tous les 2-5 ans pour H3N2 et tous les 3-8 ans pour H1N1 et les virus du type B. Les virus du type A sont également susceptibles de subir des réassortiments génomiques par l'échange de fragments d'ARN entre différents sous-types de virus hébergés par un même hôte, principalement chez les oiseaux sauvages. Ce phénomène est qualifié de « variation antigénique », et est responsable de l'apparition de nouveaux sous-types contre lesquels l'homme n'est pas immunisé,

expliquant la survenue des pandémies. Aucun changement antigénique n'a été rapporté pour les virus de type B, dont le réservoir est essentiellement humain (137).

La principale mesure de prévention contre la grippe et ses complications est la vaccination annuelle des personnes à risques. Ces dernières incluent les femmes enceintes, les personnes immunodéprimées et atteintes de pathologies chroniques (diabète, asthme, BPCO, insuffisance respiratoire ou rénale chronique), le personnel médical et les personnes âgées. En raison de la mutation constante du virus, la composition du vaccin antigrippal est adaptée deux fois par an aux dernières souches circulantes, en Février dans l'hémisphère Nord et en Septembre dans l'hémisphère sud. Les vaccins actuels contiennent les dernières souches circulantes de virus A h1N1 et h3N2, ainsi que l'une des deux souches de virus B (pour les vaccins trivalents) ou les deux (pour les vaccins tétravalents) (137).

Les traitements antiviraux actuellement disponibles pour la grippe sont basés sur l'inhibition de la NA. Cependant, leur fenêtre thérapeutique réduite (l'efficacité diminue avec la durée de l'infection) et l'apparition de résistances limitent leur efficacité (141).

ii. Cycle de réplication virale et physiopathologie de l'infection

Les 8 complexes ribonucléoprotéiques portent les ARN codant pour les différentes protéines structurales et impliquées dans le cycle de réplication du virus, dont l'HA, impliquée dans l'attachement du virus aux cellules épithéliales ; la NA, nécessaire à la libération dans le milieu extracellulaire des néovirus, les protéines de la matrice virale et les protéines du complexe de l'ARN-polymérase (les polymérases basiques PB1 et PB2 et la polymérase acide) (137,139).

Le cycle de réplication intracellulaire du virus a lieu préférentiellement dans les cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures ou encore les macrophages. Elle peut également avoir lieu dans les cellules épithéliales alvéolaires dans le cas des souches très virulentes comme h5N1 (139). Le cycle débute par l'attachement du virus à la surface cellulaire par l'intermédiaire de la liaison de l'HA à des résidus d'acide sialique présents à la surface des cellules, ce qui déclenche l'internalisation du virus. Une fois le virus dans la cellule, les ribonucléotides viraux sont transportés dans le noyau et le complexe ARN-polymérase assure la transcription et la

réplication du génome viral. Les nouveaux virions vont alors être assemblés puis libérés dans le milieu extracellulaire par bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique, grâce à la NA qui clive les liaisons HA/acides sialiques (136,141).

La détection de l'ARN viral par les cellules infectées dépend en grande partie des TLR3 et TLR7, RIG-1 et NLRP3, induisant la production importante d'IFN-I et d'IRG, mais également de cytokines et chimiokines comme l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF, CCL2/3/5 ou CXCL10. Les monocytes sont recrutés pendant la phase précoce de l'infection, et se différencient en macrophages, mo-DC ou DC inflammatoires productrices de TNF/iNOs (TIP-DC). En plus des cellules épithéliales, les macrophages dérivés des monocytes, les cCD et pDC sont des sources majeurs d'IFN, amplifiant la réponse inflammatoire et antivirale. Les macrophages activés sont par ailleurs capables d'induire l'apoptose des cellules épithéliales infectées par l'intermédiaire du *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), bloquant de cette façon le cycle de réplication virale, mais causant par la même occasion d'importants dommages épithéliaux. Un recrutement de neutrophiles est également observé lors de l'infection grippale, participant à la défense antivirale mais aussi à l'inflammation épithéliale et donc à la pathogénèse pulmonaire, via la NETose et production de ROS. Les lymphocytes T CD8⁺ antigènes-spécifiques, activés après présentation antigénique par les cDC1 principalement, sont primordiaux pour la clairance virale (139,141).

Au cours de la phase de résolution de l'inflammation suivant la clairance de l'infection, la production de TGF- β et d'IL-10 par les cellules épithéliales des voies respiratoires induit un phénotype régulateur chez les macrophages alvéolaires, qui vont surexprimer le récepteur CD200R, inhibant les fonctions pro-inflammatoires des cellules myéloïdes exprimant le ligand CD200. La production d'IL-10 par les lymphocytes T CD8⁺, induite par l'IL-2 provenant des T CD4⁺ et l'IL-27 produite par les macrophages, DC et neutrophiles, participent aussi à la résolution (138,142).

La principale cause de mortalité liée aux infections grippales est attribuée aux infections bactériennes secondaires. La colonisation et l'invasion du tractus respiratoire par les bactéries est en effet largement facilitée par les dommages épithéliaux et l'immunosuppression causée par l'altérations des mécanismes de défenses antibactériens par l'infection virale. Ces infections secondaires peuvent survenir même après la clairance virale. Les principales bactéries en cause sont majoritairement *S. pneumoniae* et *S. aureus*, et sont généralement de mauvais

pronostic. Les mécanismes favorisant les surinfections bactériennes sont encore mal connus, mais plusieurs pistes existent, comme la diminution la clairance mucociliaire, ainsi que l'exposition de sites d'attachement au niveau de la membrane basale ou de la matrice extracellulaire (fibrine, fibrinogène, collagène), causée par la destruction des cellules épithéliales et l'altération de la couche muqueuse. Le clivage des acides sialiques par la NA virale facilite également l'accès des bactéries à leurs récepteurs. De plus, la réponse inflammatoire liée à l'infection virale augmente l'expression de certains récepteurs pouvant être utilisés par les bactéries pour faciliter l'invasion, comme la fixation de l'acide lipotéichoïque ou de la phosphorylcholine du pneumocoque au *platelet activating factor receptor* (PAF) exprimé par les cellules endothéliales (136). Par ailleurs, la production massive d'IFN de type I au cours de la réponse antivirale oriente vers une réponse immunitaire de type 1 et inhibe de ce fait le déclenchement de la réponse antibactérienne. Une déplétion des macrophages alvéolaires et une diminution des fonctions bactéricides des macrophages et neutrophiles sont également observées à la suite d'une infection grippale (136,141). Les surinfections peuvent également survenir lors de la phase de résolution et de réparation tissulaire après l'infection virale. En effet, lors de la réparation de l'épithélium, les cellules à un stade de différenciation intermédiaire peuvent avoir une expression modifiée de certains facteurs facilitant l'attachement des bactéries. La production locale de facteurs régulateurs comme l'IL-10 et la désensibilisation des TLR (qui peut durer jusqu'à plusieurs semaines après l'infection) impactent aussi la réponse antibactérienne (136).

d) *Pneumonie à S. pneumoniae*

i. Epidémiologie et transmission

S. pneumoniae est la première cause bactérienne d'infection respiratoire basse chez l'homme, et la première cause de décès par maladie infectieuse dans les pays industrialisés. C'est une bactérie Gram positif capsulée, organisée en diplocoques ou courtes chainettes. Plus de 90 sérotypes ont été identifiés à l'heure actuelle en fonction de leurs antigènes capsulaires.

Le pneumocoque est un microorganisme opportuniste des voies respiratoires supérieures, qu'il peut coloniser pendant plusieurs semaines ou mois de façon

asymptomatique, en s'accommodant des nombreuses bactéries commensales peuplant cette muqueuse (notamment de nombreuses espèces du genre *Streptococcus*). La fréquence du portage du pneumocoque est de 10% environ chez l'adulte sain, et 20 à 40% chez l'enfant. Ce foyer de colonisation est une source permanente de bactéries dans les sécrétions nasopharyngées, principale voie de transmission interhumaine des pneumocoques. Cependant un même individu est généralement porteur d'un seul sérotype, en raison de phénomènes de compétition entre bactéries. De plus, il existe d'importantes différences de virulence entre les sérotypes : certains, de phénotype persistant, seront essentiellement associés à une colonisation asymptomatique et développeront rarement une infection (sauf en cas d'immunodépression locale ou systémique), tandis que d'autres, de phénotype invasif, développeront des infections invasives très rapidement à la suite d'une transmission inter-individu, après une phase de portage réduite voire absente (143,144). Le pneumocoque est responsable de nombreux types d'infections locales ou invasives, comme des infections de la sphère ORL (otites et sinusites), des infections respiratoires basses (exacerbations de bronchites chroniques, pneumonies), ou des méningites ou septicémies (144).

Les études épidémiologiques montrent une importante plasticité génomique du pneumocoque en fonction de la provenance des souches, se traduisant par une grande variabilité d'expression de gènes de virulence ou de gènes impliqués dans la colonisation non-invasive de l'hôte (145,146). De plus, le pneumocoque est intrinsèquement compétent, ce qui lui permet de transférer et intégrer de l'ADN génomique à façon entre différentes espèces, voire entre différents genres bactériens, notamment de la flore nasopharyngée, et au sein du biofilm (dont la matrice extracellulaire est riche en ADN) (143,144). A l'instar d'autres pathogènes, le pneumocoque peut modifier son programme génétique, modulant la production de facteurs de virulence ou d'invasion en fonction des caractéristiques environnementales. La capsule, facteur de virulence majeur du pneumocoque, est soumise à un phénomène appelé « variation de phase ». Ce phénomène permet de contrôler la quantité de protéines capsulaires produites au cours de la phase de colonisation ou d'invasion. Une capsule fine (ou transparente) favorise la colonisation car elle permet une meilleure adhésion à l'épithélium et protège contre la phagocytose non-opsonique, tandis qu'une capsule épaisse (ou opaque) favorise

l'invasion et protège la bactérie contre la phagocytose dépendante des opsonines (102,144).

ii. Physiopathologie de l'infection

La colonisation du tractus respiratoire par les pneumocoques de phénotype persistant dépend de l'expression de nombreuses adhésines et de la formation d'un biofilm, qui protège les bactéries contre le système immunitaire de l'hôte. Ces bactéries expriment de plus de nombreux facteurs permettant d'échapper aux mécanismes de défenses immunitaires, comme la production de protéases à IgA et d'inhibiteurs de peptides antimicrobiens.

Lors de la phase d'invasion, la capsule protège la bactérie non seulement contre la clairance mucociliaire, favorisant la dissémination dans les voies respiratoires, mais également contre l'opsonisation et la phagocytose grâce à sa surface chargée négativement et l'encombrement stérique (147,148). La pneumolysine, une hémolysine sécrétée par la plupart des souches invasives, exerce une activité cytotoxique par la formation de pores au niveau des membranes cellulaires de l'hôte. Elle a également d'autres rôles sur l'immunité de l'hôte, comme l'inhibition du burst oxydatif par les phagocytes, l'inhibition de la motilité ciliaire, mais aussi l'induction de la production de cytokines et chimiokines via la signalisation par TLR4 ou NLRP3, ou la stimulation de la fixation du complément (149). Certaines souches virulentes de pneumocoques expriment une neuraminidase, similaire à celle des virus influenza, qui leur permet de traverser la couche muqueuse et d'accéder à des récepteurs à la surface des cellules épithéliales grâce au clivage des résidus d'acide sialique (136). La bactérie peut également se fixer au *platelet activating factor receptor* (PAFR) exprimé par les cellules épithéliales grâce à l'acide lipotéichoïque ou la phosphorylcholine, facilitant sa dissémination sanguine. De nombreuses autres protéines de surface facilitent l'adhésion aux cellules ou l'échappement aux défenses immunitaires, comme la *pneumococcal surface protein A* (PspA) qui empêche la fixation du C3b et augmente l'adhésion aux cellules épithéliales, la *choline binding protein A* (Cbp A) qui bloque le C3b et se fixe au *polymeric immunoglobulin receptor* durant l'invasion, la *pneumococcal surface antigen A* (Psa A) qui protège la bactérie du stress oxydatif, ou encore la hyaluronate lyase et l'énolase, qui dégradent la matrice cellulaire et se fixent à la fibronectine respectivement (143,150).

Les TLR jouent un rôle important dans la détection de la bactérie et le déclenchement de la réponse immunitaire, notamment via TLR2, qui reconnaît les acides lipotéichoïques de la paroi, ou TLR4, qui détecte la pneumolysine. Cette dernière peut également être reconnue par NLRP3, activant l'inflammasome. L'activation de ces récepteurs déclenche la production importante de cytokine et chimiokines (CXL1/2/5, CCL2/3, CCL20, IL-1 β , TNF, IL-17A) par les cellules épithéliales, de peptides antimicrobiens (notamment lysozyme, défensines et cathélicidines, ou mucines) et oriente vers une réponse de type Th17. La voie classique du complément et le système de la coagulation sont également activés (143,144). Au niveau alvéolaire, la protéine du surfactant SP-D est importante pour la clairance du pneumocoque. Le récepteur TLR9 est quant à lui essentiel pour la détection endosomale et l'élimination des bactéries phagocytées par les macrophages (151). La phagocytose du pneumocoque par les macrophages est également facilitée par l'expression du *scavenger receptor* MARCO. Les neutrophiles sont massivement recrutés lors de la phase précoce de l'infection, par le gradient chimiokinique produit par les cellules de l'environnement inflammatoire, mais également grâce aux propriétés chimioattractantes de la pneumolysine et du fMLP libérés par le pneumocoque. Les neutrophiles sont nécessaires à la clairance de l'infection pneumococcique, mais peuvent paradoxalement avoir un effet délétère lors d'une infection sévère en exacerbant l'inflammation tissulaire, et l'élimination des neutrophiles apoptotiques par les macrophages est essentielle lors de la phase de résolution de l'inflammation (143,152). La protéine C-réactive, une protéine de la phase aiguë de l'inflammation, est capable de se lier à la phosphorylcholine à la surface du pneumocoque et active le complément (153). Enfin, les lymphocytes CD4⁺ (dont l'activation a été montrée comme étant dépendante de la pneumolysine) sont essentiels à la clairance de l'infection, comme le confirme la sensibilité accrue des patients infectés par le VIH (143,150).

iii. Prévention et traitement

Les facteurs de risque d'infections à pneumocoque sont l'âge (< 2 ans ou > 65 ans), l'alcoolisme et le tabagisme, le diabète, les pathologies pulmonaires et hépatiques chroniques, la neutropénie, l'asplénie, l'infection par le VIH et les déficits immunitaires congénitaux (des immunoglobulines et du complément en particulier).

Les infections respiratoires par les virus influenza (et probablement aussi d'autres virus respiratoires) constituent également un facteur de risque prédominant, les surinfections bactériennes pneumococciques étant la principale cause de mortalité liée à la grippe. La prise récente d'antibiotiques constitue un facteur de risque d'infection respiratoire à pneumocoque, car ils entraînent une altération de la flore bactérienne normale des voies respiratoires, qui joue un rôle protecteur contre les infections par des phénomènes de compétition entre espèces (154). La fumée de cigarette altère aussi cette flore, ainsi que la clairance mucociliaire, favorisant la colonisation (143).

Deux vaccins dirigés contre les polysaccharides capsulaires du pneumocoque sont actuellement disponibles : le vaccin conjugué à 13 valences (VPC13, dirigé contre 13 sérotypes) et le vaccin polysaccharidique à 23 valences (VPP23). Le VPC13 entraîne une immunité et une réponse mémoire, et réduit également le portage nasopharyngé. Il est recommandé chez le nourrisson dès l'âge de 2 mois, administré de façon concomitante avec le vaccin hexavalent (diphtérie, tétanos, polyomyélite, coqueluche, *haemophilus influenzae* type b, hépatite B), ou chez l'enfant ou l'adulte non préalablement vaccinés par le VPC13 présentant un risque élevé d'infection invasive à pneumocoque (IIP). Le VPP23, beaucoup moins immunogène (notamment chez le nourrisson), nécessite une administration tous les 5 ans et ne protège pas contre le portage. Il est recommandé chez l'adulte à risque élevé d'IIP (155). Cependant, bien que la vaccination ait permis une diminution significative du portage et de l'incidence globale des IIP, il a rapidement été observé en parallèle une augmentation de la prévalence du portage et des infections à sérotypes non-vaccinaux. La diminution du portage des sérotypes vaccinaux laisse en effet la place libre pour l'implantation des sérotypes non vaccinaux (ainsi que d'autres bactéries compétitives, comme *S. aureus* par exemple). Cette observation est à prendre en compte pour le développement de futures stratégies vaccinales, qui pourrait se baser sur d'autres cibles que les polysaccharides capsulaires (143,144).

En raison de la potentielle gravité des pneumonies bactériennes, l'introduction d'un traitement antibiotique est préconisée le plus rapidement possible après le diagnostic. Pour les pneumonies communautaires, le traitement est généralement ambulatoire, l'hospitalisation n'étant recommandée qu'en cas de complications ou signes de gravité. Le traitement est prescrit de façon empirique, en fonction d'un

faisceau d'arguments cliniques et radiologiques. La pneumonie à pneumocoque se présente typiquement sous la forme d'une « pneumonie franche lobaire aigue », avec une forte fièvre, une toux avec expectorations purulentes et une infiltration du parenchyme pulmonaire concentrée sur un seul lobe le plus souvent. La présence de facteurs de risque d'infections à pneumocoque chez le patient est un argument supplémentaire. Le traitement probabiliste de première intention est l'amoxicilline par voie orale pour les formes ambulatoires ou en hospitalisation conventionnelle, ou les céphalosporines de 3^{ème} génération (famille des β -lactamines) administrées par voies parentérale en soins intensifs et réanimation. Les principales alternatives aux β -lactamines sont les macrolides et fluoroquinolones, comme la lévofloxacine. Le traitement est dans tous les cas réévalué après 48/72h en fonction de l'évolution clinique et des éventuels résultats microbiologiques (156).

2. Antibiothérapie

a) Généralités

La découverte de la pénicilline (substance antimicrobienne naturelle produite par certaines espèces fongiques du genre *Penicillium*) et des sulfonamides (avec le prontosil, isolé d'un colorant), et leur distribution à grande échelle au début des années 1940, sera suivie par de très nombreuses autres aux cours des décennies suivantes, désignées comme « l'âge d'or » des antibiotiques (157). Les antibiotiques sont répartis en différentes familles en fonction de leur structure et mécanisme d'action. Les β -lactamines, dont le chef de file est la pénicilline, inhibent la synthèse du peptidoglycane bactérien en se fixant à des intermédiaires de synthèses, les *penicillin binding proteins* (PBP). Les glycopeptides (comme la vancomycine et teicoplanine) inhibent également la synthèse de la paroi bactérienne mais via la fixation sur des cibles différentes, à savoir les résidus D-Ala D-Ala, entraînant un encombrement stérique qui bloque l'action des transglycosylases. Les aminosides, macrolides, tétracyclines et le chloramphénicol inhibent la synthèse protéique en se fixant au niveau des ARN ribosomiaux bactériens (16S ou 23S), tandis que les quinolones, sulfamides, nitrofuranes ou encore la rifampicine bloquent la synthèse de l'ADN à différents niveaux.

L'utilisation en thérapeutique des antibiotiques est gouvernée par trois considérations majeurs : leur spectre antibactérien (activité sur les Gram positifs/négatifs ou les deux et résistances intrinsèques de certaines bactéries); leurs caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (qui seront détaillées plus loin) ; et enfin leur toxicité pour le patient, soit la balance bénéfice-risque du traitement (ex : la forte toxicité rénale des aminosides, limitant leur utilisation aux infections sévères). Une quatrième considération est apparue aux cours de ces dernières décennies : la résistance acquise des bactéries aux antibiotiques. L'utilisation d'antibiotiques contre lesquels la bactérie cible est peu sensible ou résistante fait courir un risque d'échec thérapeutique, mais aussi de sélection de mutants résistants en exerçant une pression de sélection sur les bactéries. Certains antibiotiques ont été de ce fait quasiment voire complètement abandonnés dans certaines indications (158).

b) Pharmacocinétique et pharmacodynamique

La pharmacocinétique d'une molécule administrée à un organisme est l'ensemble des paramètres d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination qui conditionnent son devenir dans l'organisme. La pharmacodynamique est l'étude du lien entre les paramètres d'exposition (dose et voie d'administration, pharmacocinétique de la molécule) et les effets cliniques observés (clairance de l'infection et effets secondaires) (158).

La capacité des antibiotiques à pénétrer ou non dans les cellules est évidemment importante à prendre en compte pour le traitement des infections à bactéries intracellulaires, comme *L. pneumophila* ou *Salmonella* spp. La distribution tissulaire de la molécule est également primordiale. Par exemple, le traitement des méningites nécessite l'utilisation de molécules capables de passer la barrière hémato-encéphalique (même si en pratique l'inflammation rend cette barrière plus perméable), tandis que les antibiotiques dont la voie principale d'élimination de l'organisme est rénale vont être intéressants pour le traitement des infections urinaires en raison de leur accumulation dans la vessie. De plus, seule la fraction libre d'antibiotique (non liée aux protéines), est biologiquement active. L'effet des antibiotiques peut par ailleurs être qualifié de bactériostatique (arrêt de la croissance bactérienne) ou bactéricide (qui tue les bactéries). Cependant, si cette notion est facilement appréciable *in vitro*, sa relevance physiologique est plus compliquée à

établir, et peut dépendre de paramètres pharmacocinétiques comme la concentration plasmatique. De plus, l'association de molécules ayant des effets individuels bactériostatiques peut résulter en un effet combiné bactéricide (158).

Un autre aspect important de la pharmacodynamique des antibiotiques est la notion d'antibiotiques « temps-dépendant » ou « concentration-dépendant ». Pour les antibiotiques temps-dépendant, comme les β -lactamines, la durée pendant laquelle la concentration d'antibiotique est supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la souche bactérienne conditionne l'efficacité du traitement. Cela se traduit en pratique par une efficacité supérieure lors d'une administration à intervalles déterminés de doses fractionnées, par rapport à la même dose totale administrée en une seule fois. Pour les antibiotiques dit « concentration-dépendants » (comme les aminosides et quinolones), ce phénomène n'est pas observé et l'efficacité est dépendante du rapport concentration/CMI. Enfin, un effet « post-antibiotique » est observé avec certains antibiotiques (comme la vancomycine ou l'azythromycine), qui se traduit par un allongement du temps de reprise de la croissance bactérienne, même après l'élimination totale de l'antibiotique de l'organisme (158). Par ailleurs, les caractéristiques pharmacocinétiques d'un traitement peuvent varier considérablement d'un patient à l'autre en raison de variabilités physiologiques ou pathologiques (comme une insuffisance rénale par exemple), nécessitant parfois des dosages plasmatiques répétés et une adaptation des doses au patient. Tous ces paramètres doivent être pris en compte pour le choix de l'antibiotique, des doses administrées et de la fréquence des administrations (158).

c) Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques représentent une avancée majeure en termes de santé publique et ont rapidement été utilisés à large échelle au niveau mondial, dans le domaine de la santé humaine, mais également dans l'industrie agro-alimentaire. Cependant, des résistances à ces molécules ont commencé à être détectées très rapidement après leur introduction dans les années 1940. Pendant les premières décennies, ce problème a été efficacement contrebalancé par la découverte et l'introduction régulière de nouvelles substances antibiotiques sur le marché, de même classe ou de classes différentes. Cependant, ce rythme s'est considérablement ralenti par la

suite, et à l'heure actuelle aucune nouvelle classe d'antibiotique n'a reçu d'AMM depuis 30 ans (159–161).

Du point de vue clinique, la sensibilité d'une souche bactérienne à un traitement antibiotique est définie par un niveau d'activité antimicrobienne associée à un fort taux de succès clinique, tandis que la résistance est définie par un niveau d'activité antimicrobienne associée à un haut risque d'échec thérapeutique, prenant donc en compte les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des molécules. Ces considérations cliniques ont été transposées à l'évaluation *in vitro* de la sensibilité de bactéries aux antibiotiques par l'établissement de valeurs « seuils » de CMI permettant de prédire au mieux l'efficacité ou l'échec probable d'un traitement clinique. Ces valeurs seuils, qui classent les souches en sensibles, peu sensibles (intermédiaires) ou résistantes, sont donc propres à chaque antibiotique (voire même peuvent varier en fonction des indications pour un antibiotique donné), et permettent d'orienter le choix du traitement antibiotique à administrer au patient. Cette méthode classiquement utilisée en routine présente cependant des lacunes : elle ne permet pas de détecter des résistances de bas niveau (non détectables, mais à fort risque de devenir résistantes en clinique sous la pression de sélection exercée par le traitement), ou des populations hétérogènes de bactéries (une population très minoritaire non détectée peut être résistante à l'antibiotique, et sera « sélectionnée » par le traitement antibiotique), faisant courir un risque d'échec thérapeutique. Les nouvelles techniques de séquençage et métagénomique sont essentielles à l'identification des gènes ou groupes de gènes associés à la résistance et la surveillance globale de leur propagation chez l'homme et dans l'environnement, mais ne sont pas utilisées en routine (160,162).

Les résistances bactériennes peuvent être acquises par deux mécanismes distincts : par des mutations chromosomiques ponctuelles (ou l'accumulation de mutations ponctuelles conduisant progressivement à une résistance, comme pour les fluoroquinolones) ; ou bien par la transmission d'ADN entre différentes espèces bactériennes, soit d'ADN libre (transformation) (c'est le cas pour les bactéries du genre *streptococcus* et *Neisseiria*), soit par des virus bactériophages (transduction), soit par le transfert de plasmides/transposons (conjugaison) suivi d'une recombinaison ou transposition. Les plasmides sont des ADN circulaires se répliquant indépendamment de l'ADN chromosomique de la bactérie, et pouvant

contenir des gènes de résistances ou d'autres traits. Les transposons sont des éléments génétiques mobiles pouvant être portés par les plasmides et capables de s'intégrer à l'ADN chromosomique par recombinaison. Plusieurs gènes de résistances peuvent être transmis simultanément sous forme de cassettes de gènes portées par des intégrons, comprenant leur propre promoteur et intégrase, et s'intégrer à l'ADN chromosomique de façon stable par recombinaison (163).

Le principal mécanisme de résistance du pneumocoque à la pénicilline et aux β -lactamines en général est la production par la bactérie de PBP de faible affinité pour la pénicilline. Elles sont acquises par transformation entre différentes espèces bactériennes, souvent au sein de la flore oropharyngée ou de biofilms (comme pour *S. pneumoniae*), ou par le *Staphylococcal cassette chromosome* dans le cas de *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Ces résistances, peuvent parfois être surmontées par une augmentation des doses d'antibiotiques (143). Les β -lactamases, des enzymes dégradant les β -lactamines, sont quant à elles retrouvées chez un grand nombre de bactéries Gram positives (notamment *S. aureus*) ou Gram négatives (comme *E. coli*). Elles peuvent avoir un spectre plus ou moins large, limité à une sous-classe de β -lactamines, ou inhiber la plupart des β -lactamines, comme les β -lactamases à spectre étendu (BLSE), répandues chez les entérobactéries. Elles sont généralement transmises par des plasmides et transposons, ou exprimées de façon intrinsèque (comme pour *P. aeruginosa*). Les inhibiteurs de β -lactamases, associés aux β -lactamines (comme l'association amoxicilline-acide clavulanique) permettent de surmonter ces résistances (163).

Le cotrimoxazole est l'association du thrimethoprim et du sulfaméthoxazole, ciblant deux enzymes impliquées dans la synthèse d'acide folique nécessaire à la synthèse d'ADN bactérien (la dihydroptéroate synthase et la dihydrofolate réductase, respectivement). Des mutations au niveau des gènes codant pour ces enzymes et affectant leur affinité pour l'antibiotique (ou l'acquisition par intégrons ou plasmides de gènes codant pour des enzymes insensibles à ces antibiotiques) sont retrouvées chez plusieurs espèces bactériennes, dont *S. pneumoniae* et *E. coli*. La résistance aux fluoroquinolones est liée essentiellement à des modifications de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV par mutation au niveau des gènes correspondant, mais plus récemment une transmission plasmidique a été mise en évidence. Le haut risque de développement de résistances aux fluoroquinolones est problématique et a conduit à

une mesure de restriction de leur utilisation, afin de la réserver aux cas d'infections sévères. La surexpression par amplification génique de transporteurs d'efflux (ou pompes d'efflux), qui rejettent les antibiotiques hors de la bactérie, confère souvent une résistance simultanée à plusieurs classes antibiotiques, ou à une seule classe (ex : macrolides, liée au gène *meI*). Elles sont retrouvées chez de très nombreuses bactéries. La production de méthylase modifiant le ribosome 23S (lié au gène *erm* notamment), conférant une résistance croisée aux macrolides, lincosamides, et à la streptogramine B (phénotype MLS_B) (162,163).

Certaines conditions physiopathologiques peuvent par ailleurs diminuer la sensibilité d'une souche bactérienne au traitement, même en l'absence de gènes de résistance. C'est le cas des bactéries présentes dans les biofilms (comme *S. pneumoniae* ou *P. aeruginosa* par exemple), qui subissent des changements métaboliques expliquant cette perte de sensibilité, ou de *Mycobacterium tuberculosis*, qui forment des foyers tissulaires contenant des bactéries dont le métabolisme ralenti et la faible accessibilité aux traitements expliquent la persistance (164,165).

La notion de *fitness cost* est également à prendre en compte. En effet, l'acquisition de gènes de résistance par une bactérie s'accompagne fréquemment d'une perte de virulence, limitant la sélection et la propagation des mutants résistants apparaissant au sein d'une population bactérienne. Ces bactéries peuvent cependant acquérir secondairement des mutations permettant de compenser cette perte de fitness (160,166).

d) Résistance aux antibiotiques : contexte actuel et enjeux

En France en 2017, 46% des pneumocoques isolés de prélèvements respiratoires lors de pleuro-pneumopathies présentaient une sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) et environ 5% étaient résistantes à l'amoxicilline (CMI > 2 mg/L) et 2.5% aux fluoroquinolones. Le taux de résistance aux macrolides (notamment de phénotype MLS_B, par enzymes inactivatrices et plus rarement par efflux) est de 32% chez l'enfant et 21% chez l'adulte au cours des infections invasives. Cependant, plus de 70% des souches PSDP présentaient aussi une résistance aux macrolides. La résistance au cotrimoxazole au cours des infections invasives était de 8% et celle

des tétracyclines de 20%. La multirésistance chez le pneumocoque (résistance à aux moins trois familles) est fréquemment liée à la présence de transposons contenant plusieurs gènes de résistances transmis simultanément (comme les transposons *Tn1545*, *Tn1916* et apparentés), conférant des résistances aux macrolides, tétracyclines, cotrimoxazole et aminosides (167).

L'organisation mondiale de la santé considère la situation actuelle comme une menace de grande ampleur pour la santé publique. On estime actuellement que 700 000 personnes meurent chaque année à cause d'infections résistantes, et ce chiffre pourrait monter à 10 millions en 2050. Les bactéries multirésistantes faisant l'objet d'une surveillance particulièrement étroite à l'heure actuelle sont *P. aeruginosa*, intrinsèquement résistante à de nombreuses classes antibiotiques et responsable d'infections très sévères notamment en milieu hospitalier, les souches de *E coli* et *K. pneumoniae* porteuses de BLSE, les SARM et SARM résistants à la vancomycine, et *Mycobacterium tuberculosis* MDR ou XDR (163).

La résistance aux antibiotiques pose non seulement un problème dans le cadre du traitement des infections bactériennes, mais également dans le contexte de leur utilisation préventive au cours des procédures médicales et chirurgicales invasives et des chimiothérapies anticancéreuses, associées à un risque infectieux élevé (162). La surprescription de ces molécules et leur mauvais suivi dans les pays industrialisés, leur accès limité dans les pays à faible revenu conduisant à des traitements non optimaux ainsi que le non-respect des règles d'hygiène en milieu hospitalier jouent un grand rôle dans la progression des résistances. L'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation des animaux d'élevage contribue également en grande partie au problème. Plusieurs programmes nationaux et internationaux et campagnes d'informations ont été lancés ces dernières années pour inciter à un meilleur usage des antibiotiques, qui permettrait de ralentir l'apparition et la progression des résistances. Dans le même temps, la recherche d'alternatives thérapeutiques aux antibiotiques connaît un regain d'intérêt (159,161,162).

IV) **Nouvelles approches anti-infectieuses**

1. Antibiotiques : nouvelles molécules, thérapies combinées et adjuvants

Le succès de l'antibiothérapie au cours de l'âge d'or des antibiotiques résulte d'une balance favorable entre le rythme d'introduction de nouvelles molécules sur le marché et la vitesse d'acquisition de résistances par les bactéries. Cependant, la raréfaction des potentielles sources naturelles d'antibiotiques et le désintérêt progressif de l'industrie pharmaceutique devant le faible retour sur investissement (coût de recherche et développement trop élevé par rapport à la faible durée de vie de la molécule sur le marché), ont progressivement conduit à une inversion de cette balance (161,162).

Pour pallier à cette situation, des programmes nationaux et internationaux ont été lancés ces dernières décennies pour encourager la recherche sur les antibiotiques (notamment via le screening à haut débit) et faciliter les procédures de mise sur le marché. La plupart des candidats antibiotiques ayant récemment reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou en phase d'essais cliniques appartiennent à des classes déjà existantes. Pour les β -lactamines on peut citer par exemple la ceftaroline et le ceftopibrole (AMM en 2012 et 2014 respectivement) pour le traitement des pneumonies (notamment à SARM) ou la ceftazidime-avibactam et la ceftozalone-avibactam (AMM 2016) pour les infections urinaires compliquées et infections intra-abdominales. Pour les glycopeptides, la dalbavancine indiquée dans les infections cutanées à SARM (AMM en 2015) et la fidaxomycine contre les infections à *Clostridium difficile* (AMM en 2011). La bédaquiline, un nouvel antituberculeux de la famille des diarylquinolines, inhibe spécifiquement l'ATP (adénosine 5'-triphosphate) synthase mycobactérienne, une enzyme essentielle à la production d'énergie chez *Mycobacterium tuberculosis*, et est active à la fois sur les bacilles tuberculeux en répliation et les bacilles dormants (AMM en 2014). Une céphalosporine injectable possédant une activité anti- β -lactamase (S649266) est actuellement en essai clinique de phase III contre les infections à bactéries Gram négatif multirésistantes, et un nouveau macrolide, la solythromycine, est testé en phase III contre les pneumonies communautaires bactériennes (168). Enfin, la brilacidine, un analogue de β -défensines, est présentée comme le chef de file d'une nouvelle classe d'antibiotiques : les analogues synthétiques de peptides antimicrobiens. Elle a reçu un avis favorable pour une étude clinique de phase III

dans le traitement des mucosites orales associées aux chimiothérapies anticancéreuses (161,162).

Cependant, l'une des approches ayant reçu un regain d'intérêt ces dernières années est l'association d'antibiotiques existants dans des stratégies thérapeutiques synergiques, c'est-à-dire dont l'effet combiné est plus efficace que la somme des effets de chaque traitement individuel. La combinaison synergique de plusieurs molécules de classes différentes présente l'avantage d'accélérer l'élimination des bactéries et de couvrir un spectre antimicrobien plus large, limitant de ce fait l'apparition et la sélection de bactéries résistantes. C'est le cas du traitement contre la tuberculose par exemple, qui associe plusieurs molécules de mécanismes différents (isoniazide, rifampicine, pyrazinamide, éthambutol), ou de l'association β -lactamine – aminoside, qui présente une activité synergique contre les infections enterocociques. L'effet synergique peut résulter de plusieurs mécanismes : le ciblage de différentes étapes d'un même processus (par exemple le triméthoprim et le sulfaméthoxazole pour l'inhibition de la synthèse d'acide folique), ou encore l'un des antibiotiques peut favoriser l'entrée ou réduire l'efflux de l'autre molécule (par exemple, la désorganisation de la paroi bactérienne par les β -lactamines favorise l'accès des aminosides à leur cible intracellulaire, l'ARN ribosomique 16S) (162,169). Les méthodes *in vitro* de screening à haut débit et les matrices de données prédictives basées sur les caractéristiques biochimiques des molécules sont des outils précieux pour identifier de nouvelles associations synergiques (169–171).

Les adjuvants d'antibiothérapie, dénués de propriétés antimicrobiennes en eux-mêmes mais capables de contrer les mécanismes de résistances aux antibiotiques auxquels ils sont associés, représentent également une piste prometteuse. Les inhibiteurs de β -lactamases, dont plusieurs sont déjà disponibles sur le marché en association avec des β -lactamines (comme l'amoxicilline-acide clavulanique, la piperacilline-tazobactam ou plus récemment la ceftazidime-avibactam) en sont un exemple. Un inhibiteur de carbapénémase (RPX7009 ou vaborbactam) est actuellement en cours d'essai clinique de phase III. Plusieurs candidats adjuvants bloquant la dégradation enzymatique des aminosides par les aminoglycoside kinases ont été identifiés, comme les pyrazolopyrimidines ou les tropolones. Des études de screening ont également identifié des composés capables de contrer la sélection de souches de bactéries Gram négatif surexprimant les pompes d'efflux TetA ou AcrA–

AcrB–TolC. D'autres adjuvants d'antibiothérapie potentiels ciblant la paroi des bactéries dans le but d'augmenter l'accessibilité des antibiotiques à leur cible sont actuellement étudiés, comme des inhibiteurs de la synthèse d'acide lipotéichoïque ou du peptidoglycane (162,169).

2. Modulation du système immunitaire inné

Dans le cadre des thérapeutiques anti-infectieuses, la stimulation directe de l'immunité innée présente deux avantages majeurs. Premièrement, l'activation de mécanismes de défenses innés multiples et non-spécifiques offre une protection à large spectre, potentiellement efficace contre une grande variété de pathogène ; et deuxièmement, la multiplicité de ces mécanismes antimicrobiens permet d'éviter la sélection de souches microbiennes résistantes, contrairement aux antibiotiques, antiviraux et antifongiques qui ont généralement une cible unique sur le pathogène. La stimulation aspécifique de l'immunité innée fait cependant courir le risque d'une exacerbation de la réponse inflammatoire systémique et tissulaire accompagnant certaines infections, et doit donc être étroitement contrôlée pour ne pas devenir délétère (172).

De par leur expression ubiquitaire et leur rôle central dans le déclenchement des mécanismes de défense innés, les PRR constituent des cibles de choix pour les thérapies anti-infectieuses. Plusieurs agonistes et antagonistes des PRR sont déjà sur le marché, comme l'Imiquimod (Aldara[®]), agoniste de TLR7, indiqué dans le traitement des verrues génitales causées par les *human papillomavirus* (HPV) et des kératoses, et le *monophosphoryl lipid A* (MPLA), dérivé du LPS et agoniste de TLR4, intégré comme adjuvant dans la composition du vaccin anti-HPV Cervarix[®].

L'utilisation d'agonistes des TLR à des fins thérapeutiques est également l'objet de nombreuses études précliniques et cliniques. Par exemple, une étude a montré que l'administration en tant qu'adjuvant de poly I:C (agoniste de TLR3) avec un vaccin ciblant CD40 permettait d'augmenter la réponse immune anti-VIH-1 et de réduire les réservoirs du virus dans un modèle murin humanisé (173). Son innocuité a été démontrée au cours d'une étude clinique chez des patients atteints du VIH traités par antirétroviraux (174). La stimulation de TLR2 a également démontré un effet

protecteur contre diverses infections chez l'animal, comme l'infection létale à pneumovirus (via l'administration de CL-49, agoniste bifonctionnel de TLR2 et NOD2), les pneumonies à SARM ou IAV, ou en tant qu'adjuvant de vaccination contre *Bordetella pertussis*, bactérie responsable de la coqueluche (175–177). Des études ont montré un effet protecteur de l'administration muqueuse d'agonistes de TLR4 dans des modèles murins d'infection grippale, à norovirus, à *P. aeruginosa* ou encore à *Francisella tularensis* (178–181). Les propriétés adjuvantes des agonistes de TLR4 ont également été étudiées, dans des protocoles vaccinaux contre *S. pneumoniae* ou *E. coli* ou le virus West Nile chez la souris, ou contre le VIH-1 chez l'homme (phase I) (182–185). D'autre part, des antagonistes de TLR4, comme la polymoxin-B et l'éritoran sont testés dans le traitement du sepsis dans des études cliniques de phase III et IV (172). Le G-9620, agoniste de TLR7, a montré un effet supprimeur prolongé de la multiplication du virus de l'hépatite B chez le chimpanzé, et une augmentation des réponses antivirales des lymphocytes T et NK contre le virus chez l'homme (186,187). Le composé G-9620 a également été testé chez l'animal en tant qu'adjuvant de vaccination contre le SIV (virus de l'immunodéficience simiesque), la grippe, ou encore le virus de l'hépatite B (188–190). Par ailleurs, l'administration de l'agoniste de TLR9 MGN1703 chez des patients atteints par le VIH sous thérapie antirétrovirale a permis de réverser la latence du virus, mais également d'augmenter l'activation des cellules NK, deux mécanismes importants pour l'éradication du virus (191).

Les agonistes de NOD1 et NOD2 ont montré un effet protecteur dans le cadre d'infections létales à *S. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *C. albicans*, et contre *K. pneumoniae* et *S. enteritidis*, mais aussi au cours d'infections virales par le CMV, les virus de la grippe ou le rotavirus (192). L'activation de RIG-I permet de contrôler l'infection par le virus de l'herpès de type 1 (HSV1) chez la souris, via la surexpression de STING, et a également montré un effet protecteur contre l'infection à IAV après une seule injection, et réduit la mortalité liée à la surinfection par *S. pneumoniae* (193,194).

D'autre part, un très grand nombre d'études cliniques de phase I, II ou III ont été menées ou sont en cours pour l'évaluation d'agonistes des PRR dans le cadre de thérapies anticancéreuses (195).

3. La flagelline

Parmi les agonistes de PRR, nous nous intéressons plus particulièrement à la flagelline, sous-unité majeure du flagelle bactérien et agoniste de TLR5, qui a montré des propriétés anti-infectieuses dans de nombreux modèles animaux.

a) Rôles du flagelle bactérien

Le flagelle est un organite cellulaire externe mesurant 10 µm de long environ et doué d'un mouvement rotatoire hélicoïdal qui permet de propulser la bactérie. Cette motilité facilite l'invasion de l'hôte par la bactérie et son évation des mécanismes de défense comme la clairance mucociliaire et la phagocytose, constituant donc un facteur de virulence majeur pour de nombreuses bactéries, dont *Salmonella* spp, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *L. pneumophila* ou encore *P. aeruginosa*. Son rôle n'est cependant pas limité à la mobilité, puisque des études ont montré sa contribution dans l'adhérence, la formation de biofilm, la sécrétion de molécule, et la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Le flagelle est constitué de trois parties : le corps basal, le filament mobile et le crochet qui sert de lien entre les deux. Le corps basal permet d'ancrer la structure à la membrane de la bactérie grâce à différents anneaux. Il abrite un moteur dirigeant les mouvements du filament, et un système de sécrétion de type III (T3SS) qui a un rôle actif dans la formation du flagelle en acheminant les protéines nécessaires à son assemblage et à l'élongation du filament, mais également pour la sécrétion de protéines de virulence dans le milieu ou dans les cellules de l'hôte. Le filament flagellaire, constitué d'un assemblage de molécules de flagelline (plus de 20 000) disposées de façon hélicoïdale, est la partie la plus longue et mobile du flagelle (**figure 5**) (201,202).

Le déplacement des bactéries flagellées s'effectue grâce au chimiotactisme, un ensemble de systèmes sensoriels analysant les caractéristiques de l'environnement (composition chimique, température, viscosité). Lorsque les bactéries ont atteint leurs zones cibles, elles subissent une différenciation grâce à des changements métaboliques, favorisant la formation de biofilm, la production de facteurs de virulence et/ou d'adhérence, s'accompagnant parfois d'une perte du flagelle. Le flagelle peut cependant participer directement à l'adhésion aux surfaces cellulaires par l'intermédiaire de la flagelline, comme dans le cas d'*E. coli*, de *C. difficile* ou *P.*

aeruginosa, notamment via l'adhésion aux mucines de surface membranaire des cellules épithéliales (201). La flagelline possède un caractère immunogène, c'est-à-dire qu'elle induit la production d'anticorps. La diminution d'expression ou la suppression du flagelle lorsque ce dernier n'est plus nécessaire constitue donc un moyen pour certaines bactéries d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Ce phénomène a été observé chez certaines souches commensales d'*E. coli* au sein du microbiote, et également chez *S. Typhimurium* et *L. pneumophila*. D'autres mécanismes d'échappement ont été décrits, comme l'alternance d'expression des protéines de flagelline (variation de phase, par exemple FljB et FliC chez *S. Typhimurium*), ou la modification structurale ou glycosylation de la flagelline (201,202).

b) Structure de la flagelline

La flagelline FliC de *S. Typhimurium* est constituée de 495 acides aminés et possède un poids moléculaire de 65 KDa. Elle est constituée de quatre domaines : deux domaines constants D0 et D1, et deux domaines variables D2 et D3 (**figure 5**). Les domaines D0 et D1 correspondent aux chaînes N- et C-terminales de la protéine, et sont constitués d'hélices α formant une structure condensée. Ils sont impliqués dans la polymérisation de la flagelline lors de la formation du filament. Les domaines D2 et D3, formés de feuillets β , sont exposés au niveau de la surface externe du filament. Ils constituent la région hypervariable immunogène de la protéine, cible des anticorps anti-flagelline produits par l'hôte. Les motifs de reconnaissance par TLR5 se situent au niveau du domaine constant D1 (résidus 89-96), la présence de mutations de ce domaine abolissant la signalisation TLR5-dépendante. Par ailleurs, seule la flagelline sous forme monomérique est capable d'activer TLR5, les motifs hydrophobes sur D1 impliqués dans la signalisation étant masqués lorsque la flagelline est sous sa forme filamenteuse polymérisée. La libération de flagelline sous forme monomérique lors de l'infection de l'hôte peut ainsi résulter d'une sécrétion directe de flagelline monomérique dans le milieu, ou bien de l'action de protéases de l'hôte sur le flagelle. Les motifs de reconnaissance par NLRC4 se situent au niveau des acides aminés C-terminaux du domaine D0, ce dernier étant décondensé lorsque la flagelline se trouve sous forme monomérique libre (202,203). La flagelline utilisée dans toutes les expériences présentées dans ce mémoire est une protéine recombinante dérivée de

la flagelline FliC de *S. Typhimurium*, présentant une délétion des domaines hypervariables immunogènes D2 et D3. Cette flagelline recombinante sera désignée FliC_{Δ174-400} ou FliC dans la présentation des résultats (**figure 5C**).

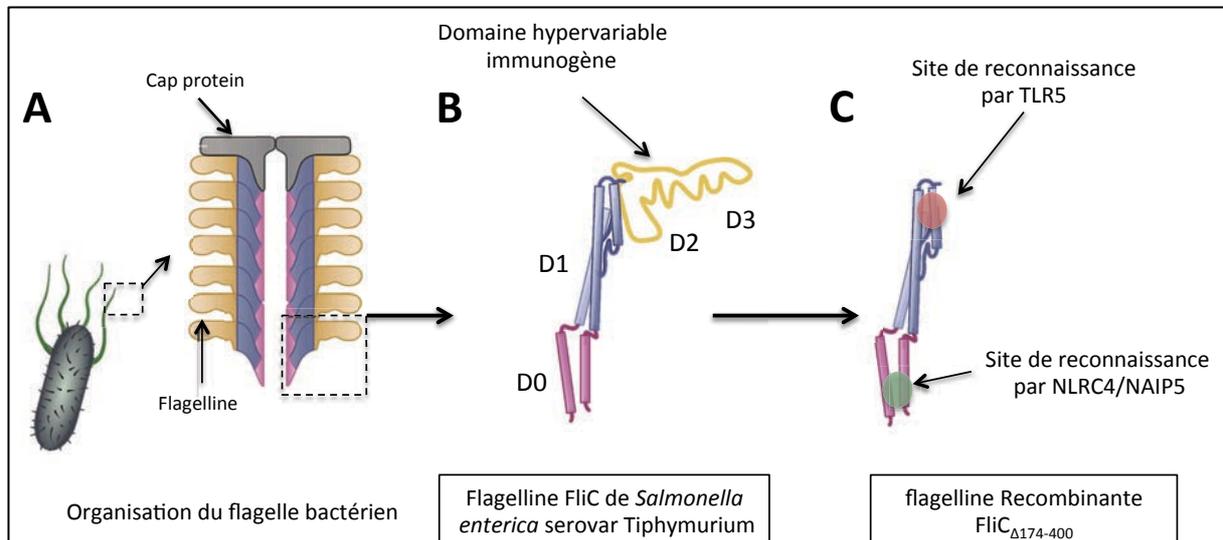


Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation du flagelle bactérien (A), de la structure de la flagelline FliC de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (B) et de la flagelline recombinante FliC_{Δ174-400}. D0, D1 : domaines invariants contenant les motifs de reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée TLR5 et NLRC4. D2, D3 : domaines hypervariables immunogènes. Adapté de *Vijayan et al., Trends Immunol. 2018 (203)*.

c) Réponse immunitaire induite par la flagelline

i. Réponse dépendante de TLR5

TLR5 est exprimé à la surface des cellules dendritiques, monocytes, macrophages, neutrophiles, lymphocytes B et cellules NK, ainsi que sur la surface basolatérale (et probablement apicale) des cellules épithéliales, sur les fibroblastes, kératinocytes ou encore les neurones. La reconnaissance de la flagelline par TLR5 entraîne la dimérisation du récepteur et la transduction intracellulaire de signal d'activation par la voie MyD88-dépendante, aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF-κB et à la synthèse de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire (**figure 1**). Les mécanismes de cette réponse diffèrent en fonction du compartiment, épithélial ou systémique, où se produit la détection de la flagelline (202,203).

Lors d'une administration de la flagelline par voie muqueuse, par exemple intranasale, la détection de l'agoniste dépend en grande partie des cellules épithéliales

respiratoires, qui expriment fortement TLR5. L'activation par la flagelline entraîne la production par les cellules épithéliales i) de chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules dendritiques (CCL20), neutrophiles (CXCL1/2/5 et CXCL8 chez l'homme), et monocytes (CCL2/3), ii) de cytokines pro-inflammatoires et facteurs de croissance (TNF, IL-6, IL-1 β , G-CSF) qui activent et prolongent la survie des cellules effectrices recrutées, et iii) de peptides antimicrobiens (β -défensines, mucines, cathélicidines, MMP-7) qui participent directement à l'activité antimicrobienne au niveau local. L'expression de iNOS et la production de ROS sont également augmentées, et un fort recrutement de neutrophiles est observé dans les voies respiratoires dans les premières heures suivant l'administration intra-nasale de flagelline. Par ailleurs, l'administration muqueuse de flagelline induit l'activation de l'immunité adaptative via le recrutement et l'activation des cDC (notamment CD11b+), et oriente vers une réponse de type Th2 et la production d'anticorps, de type IgG1 (systémiques) et IgA sécrétoires (au niveau des muqueuses) (203–207).

L'administration de flagelline par voie systémique induit également une activation de l'épithélium respiratoire, mais indirectement via les cDC sentinelles présentes au niveau basal de la muqueuse. L'activation de ces dernières induit la production d'IL-23, qui va secondairement activer les ILC de type 3. Les ILC3 vont alors libérer de l'IL-22, qui va se fixer sur ses récepteurs présents au niveau de la membrane basale des cellules épithéliales, déclenchant une réponse inflammatoire de type Th17, avec la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ainsi que de peptides antimicrobiens dans la lumière des voies respiratoires. Cette voie est notamment activée lors d'une infection invasive à *S. Typhimurium*, qui est capable d'endommager et de traverser l'épithélium et peut donc se retrouver au niveau basal. La stimulation indirecte de l'épithélium par la flagelline induit par ailleurs la production de facteurs de réparation tissulaire (203,207–209).

ii. Réponse dépendante de NLRC4/NAIP5

La flagelline peut également être détectée dans le compartiment cytoplasmique, par des récepteurs de la famille des NLR, NLRC4 et NAIP5. La détection par ces récepteurs induit l'activation de l'inflammasome, qui permet la maturation par la caspase 1 de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 en leurs formes actives sécrétées, IL-1 β et IL-18. Cela induit de plus la mort des cellules par pyroptose, un processus de mort

cellulaire inflammatoire, empêchant la réplication des bactéries flagellées à cycle intracellulaire, comme *S. Typhimurium*. La signalisation dépendante de NLRC4 participe par ailleurs à l'activation de l'immunité adaptative, et donc à l'activité adjuvante de la flagelline (203).

d) *La flagelline comme thérapie anti-infectieuse*

Grâce à ses capacités immunostimulantes, la flagelline a été utilisée comme adjuvant vaccinal lors d'administrations muqueuses ou systémiques. Des études chez l'animal ont mis en évidence cette capacité de stimulation des réponses adaptatives antigène-spécifiques (soit lors d'une co-administration avec l'antigène vaccinal, soit avec des protéines de fusion flagelline – antigène) par voie nasale, orale ou systémique. La capacité immuno-adjuvante de la flagelline a été montrée dans des protocoles vaccinaux contre une grande variété de pathogènes bactériens (*C. jejuni*, *Y. pestis*, *M. tuberculosis*, *S. pneumonia*, *P. aeruginosa*), viraux (les virus influenza, le VIH ou le virus de la rage) ou parasitaires (genre *Plasmodium* ou *Schistosoma mansoni*) (210).

Outre son rôle adjuvant, la signalisation TLR5 joue un rôle central dans les défenses innées antimicrobiennes, et représente de ce fait une cible potentielle pour la prophylaxie à court terme, voire le traitement d'infections non seulement bactériennes, mais également virales ou fongiques en raison du large spectre des mécanismes de défenses induits. Il a notamment été montré chez l'animal un rôle protecteur de l'administration intra-péritonéale répétée de flagelline contre une infection intestinale à *S. Typhimurium*, à entérocoque résistant à la vancomycine (via l'induction de l'expression IL-22-dépendante de RegIIIγ) et contre une infection à *C. difficile* (211–213). Un effet protecteur de la flagelline contre une infection intestinale à *Y. pseudotuberculosis*, selon un mécanisme indépendant de l'IL-22, a également été montré par la voie intra-péritonéale (214). La flagelline administrée par voie intranasale exerce d'autre part un effet protecteur chez la souris contre des infections pulmonaires à *S. pneumoniae*, à *P. aeruginosa* (notamment via l'induction de la production de *cathelicidin-related antimicrobial peptide* CAMP), ou encore à *Burkholderia cepacia* (204,205,215,216). Un effet protecteur a également été démontré dans un modèle d'infection systémique à *P. aeruginosa* chez la souris brûlée, selon un mécanisme dépendant de l'activation des neutrophiles (120).

L'administration locale (topique) de flagelline protégeait également contre l'infection de la cornée par *P. aeruginosa* et *Candida albicans* chez la souris (217,218). Un effet protecteur de la flagelline contre des infections virales, comme le CMV, le rotavirus ou la grippe a également été observé (219–221).

Bien que la plupart de ces études démontrent un effet de la flagelline administrée en prophylaxie ou en co-administration avec le pathogène, l'effet de la flagelline en thérapeutique, lorsque l'infection est installée, a été relativement peu étudié. Notre équipe a récemment démontré, dans un modèle murin d'infection respiratoire à pneumocoque de sérotype 1, qu'un traitement combinant un antibiotique (l'amoxicilline par voie orale ou le cotrimoxazole par voie systémique) et l'administration intra-nasale de flagelline, était plus efficace que le traitement par antibiotique seul, à la fois en termes de diminution de la charge bactérienne pulmonaire et splénique et en terme de survie des animaux (205). Cet effet était dépendant de la signalisation via TLR5, démontré par une absence de protection chez les souris *Tlr5*^{-/-} ou lors de l'administration d'une flagelline mutante possédant une délétion dans le domaine de reconnaissance de la protéine par TLR5. De plus, l'analyse histologique du poumon des animaux infectés par le pneumocoque et traités par amoxicilline associée à la flagelline a montré que l'administration de flagelline n'entraînait pas d'exacerbation de l'inflammation au niveau pulmonaire. Cet effet protecteur de la flagelline s'accompagnait par ailleurs d'un recrutement de neutrophiles au niveau du parenchyme pulmonaire et de la production locale de chimiokines impliquées dans le recrutement de neutrophiles, comme CXCL1 et CXCL2, suggérant un potentiel rôle de ces cellules dans l'efficacité de la flagelline.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'activation des PRR par leurs ligands naturels ou synthétiques est à la base du déclenchement des mécanismes de défense immunitaires innés, faisant de ces récepteurs des cibles thérapeutiques de choix pour le traitement des pathologies infectieuses. L'épithélium des voies aériennes joue un rôle central dans la défense contre les pathogènes au cours des pneumonies. Le récepteur TLR5, notamment, est fortement exprimé à la surface des cellules épithéliales respiratoires, et la stimulation directe de ce dernier par la flagelline administrée par voie intra-nasale a précédemment été associée à un effet protecteur en prophylaxie, et à une augmentation de l'index thérapeutique des antibiotiques en utilisation combinée au cours d'une pneumonie létale à *S. pneumoniae* chez la souris (205,215). La progression de la résistance aux antibiotiques, étant un problème mondial majeur de Santé Publique, positionne ce travail dans une perspective d'amélioration des traitements et de réduction d'échecs thérapeutiques.

Dans un premier temps, nous avons déterminé le type d'interaction thérapeutique résultant de l'association antibiotique – flagelline contre la pneumonie à *S. pneumoniae*, afin de caractériser si l'efficacité supérieure du traitement combiné par rapport à l'antibiothérapie seule résultait d'une simple additivité des effets de chaque traitement ou bien d'un effet synergique. Nous avons pour cela réalisé une étude *in vivo* dans un modèle de pneumonie létale à pneumocoque de sérotype 1 chez la souris, afin de quantifier et comparer l'effet du traitement en monothérapie ou combiné sur la charge bactérienne pulmonaire, avec deux antibiotiques différents, l'amoxicilline et le cotrimoxazole. L'efficacité du traitement combiné amoxicilline – flagelline a ensuite été étudiée dans un modèle de pneumonie secondaire (post-grippale) provoquée par une souche de pneumocoque de sérotype 3 résistante à l'amoxicilline.

Le second objectif de ma thèse a consisté en l'étude des mécanismes de défense immunitaires cellulaires et moléculaires responsables de l'efficacité anti-infectieuse de la flagelline en association avec les antibiotiques. Nous avons tout d'abord analysé, chez des souris infectées par le pneumocoque de sérotype 1, la dynamique de la clairance bactérienne pulmonaire lors du traitement combiné antibiotique + flagelline. Les réponses immunitaires moléculaires et cellulaires induites au niveau

pulmonaire par la flagelline ont été étudiées grâce à des analyses de transcriptomique, protéomique et cytométrie en flux entre 2 h et 24 h après administration du traitement. Par la suite, le rôle des neutrophiles dans la clairance bactérienne dépendante de la flagelline a plus spécifiquement été étudié par des approches *in vivo* de déplétion des neutrophiles ou d'inhibition de leur recrutement.

RESULTATS

Article I : Synergie entre antibiotiques et agoniste du récepteur TLR5 dans le traitement des pneumonies bactériennes sensibles ou résistantes aux antibiotiques

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Frontiers in Immunology* :

Therapeutic Synergy Between Antibiotics and Pulmonary Toll-Like Receptor 5 Stimulation in Antibiotic-Sensitive or -Resistant Pneumonia. Matarazzo L, Casilag F, Porte R, Wallet F, Cayet D, Faveeuw C, Carnoy C, Sirard JC. *Front Immunol.* 2019 Apr 9;10:723. doi: 10.3389/fimmu.2019.00723

L'article sous sa forme publiée définitive est disponible en Annexe I.

INTRODUCTION

Les pneumonies constituent une cause majeure de mortalité et morbidité dans le monde. Le traitement des pneumonies d'origine bactérienne (dont le pneumocoque, *S. pneumoniae* est la cause la plus fréquente) repose essentiellement sur l'antibiothérapie. Dans le contexte actuel de perte d'efficacité des antibiotiques, la modulation de l'immunité innée par le ciblage des *pattern-recognition receptors* (PRR), première ligne de défense anti-infectieuse, représente une approche prometteuse. En effet, l'activation des PRR, notamment des *Toll-like receptors* (TLR), induit la mobilisation rapide de nombreux mécanismes de défense antimicrobiens moléculaires et cellulaires, évitant ainsi le risque d'émergence de résistances. La flagelline, protéine majeure du flagelle bactérien, est l'agoniste du TLR5, exprimé de façon ubiquitaire à la surface de nombreuses cellules immunitaires et structurales comme les cellules épithéliales respiratoires. L'équipe a récemment montré chez la souris qu'un traitement combinant l'administration intra-nasale de flagelline à une dose subthérapeutique d'antibiotique (l'amoxicilline ou le cotrimoxazole) était plus efficace que l'antibiotique seul contre une infection respiratoire létale à pneumocoque sensible de sérotype 1, et contre une pneumonie secondaire post-grippale par cette même bactérie.. Ces observations sont les premières à mettre en évidence l'intérêt de l'administration respiratoire d'immunomodulateurs tels que la flagelline en tant que complément de l'antibiothérapie des pneumonies bactériennes.

L'administration simultanée de deux molécules peut résulter en un effet additif ou indépendant, c'est-à-dire égal à la somme des effets propres à chaque molécule, ou bien en un effet supérieur (qualifié alors de synergique), ou inférieur (antagoniste). Dans le cadre des thérapies anti-infectieuses, la synergie permet d'augmenter l'efficacité du traitement et de limiter l'apparition de la pharmacorésistance, mais aussi potentiellement de diminuer les doses ou la fréquence d'administration en clinique, atténuant les effets indésirables des médicaments.

Dans la présente étude, nous avons analysé, dans un modèle in vivo murin d'infections respiratoires à *S. pneumoniae*, la nature et l'ampleur des interactions entre les antibiotiques et la flagelline administrée par voie intra-nasale en regard de

leur efficacité thérapeutique sur la diminution de la charge bactérienne pulmonaire. De plus, nous avons étudié l'effet du traitement combiné antibiotique – flagelline sur une souche de *S. pneumoniae* résistante aux antibiotiques (dont l'amoxicilline) dans un modèle de pneumonie pneumococcique en surinfection post-grippale, et caractérisé la réponse immunitaire induite par la flagelline dans ce modèle.

MATERIELS ET METHODES

I) Infections bactériennes et virales

1. Souches bactériennes

La souche de *S. pneumoniae* de serotype 1 (**Sp1**, isolat clinique E1586) a été obtenue auprès du *National Reference laboratory – Ministry of health*, Uruguay (222). La souche de *S. pneumoniae* de serotype 3 (**Sp3**, numéro de souche 104491) provient de la Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France) et a été isolée à partir de sécrétions bronchiques humaines. Elle est résistante à l'amoxicilline (CMI : 2 mg/L), au cefotaxime, à la doxycycline, à l'érythromycine, au chloramphénicol, à la streptomycine et au cotrimoxazole.

2. Préparation des stocks et conservation

Les bactéries sont mises en culture sur milieu solide gélosé *Tryptic Soy Agar + 5%* sang de mouton (Biomérieux) et incubées à 37°C pendant 12 à 24 h. Les colonies fraîches sont ensuite inoculées en milieu liquide *Todd hewitt Yeast Broth* (THYB) et incubées à 37°C jusqu'à ce que le milieu atteigne une densité optique entre 0,7 et 0,9 unités d'absorbance à 600 nm. Les cultures sont stockées en milieu THYB + 12% glycérol à -80°C jusqu'à 3 mois. La concentration en bactéries est déterminée par étalement de dilutions en séries sur gélose au sang et dénombrement des unités formant colonie (*colony-forming units*, CFU) après incubation à 37°C.

Pour les infections, les tubes de *bactéries* sont décongelés, lavés au Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS, Gibco, Grand Island, NY) stérile et dilués dans du PBS à la concentration appropriée.

3. Modèle d'infection murine

a) Autorisations et normes de sécurité

Les souris femelles BALB/cJ, Swiss et C57BL/6 de 6 à 8 semaines utilisées dans les expérimentations ont été fournies par les laboratoires Janvier, Saint Berthevin, France et Envigo (Huntingdon, UK). Les animaux sont maintenus en cages ventilées

(6 animaux maximum par cage) et manipulés sous hotte à flux d'air laminaire vertical (class II A2, ESCO, hatboro, PA) dans des locaux de norme de sécurité biologique de niveau 2 (n° d'agrément de l'établissement : A 59-350009). Toutes les expériences réalisées sont en accord avec les réglementations nationales et institutionnelles actuelles et ont toutes été approuvées par le Comité d'Éthique en Expérimentation Animale du Nord-Pas-de-Calais (protocole CEEA 062011).

b) Infection des souris

Préalablement à l'infection intra-nasale, les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de 1,25 mg de kétamine et 0,25 mg de xylazine dans 250 µl de PBS. L'infection primaire par *S. pneumoniae* serotype 1 (Sp1) a été réalisée par administration intra-nasale de $2-4 \times 10^6$ CFU dans 30 µl de PBS (205).

Le modèle d'infection grippale ayant été développé dans notre laboratoire chez les souris C57BL/6 (96,223), le modèle de surinfection pneumococcique avec Sp3 a été réalisé chez ces animaux. Les souris ont été infectées par voie intra-nasale par 50 *plaque-forming units* (PFU) de virus influenza A h3N3 Scotland/20/74 dans 30 µl de PBS (223). Les souris ont été secondairement infectées, sept jours plus tard, par 10^3 CFU de Sp3 dans 30 µl de PBS par voie intra-nasale.

Les souris ont ensuite été sacrifiées aux temps indiqués par injection intrapéritonéale de 5,48 mg de sodium pentobarbital dans 100 µl de PBS et les organes ont été collectés pour les différentes expérimentations.

c) Dénombrement des colonies bactériennes dans les organes

Pour le dénombrement des bactéries dans le poumon et la rate, les organes ont été broyés à l'aide d'un broyeur UltraTurrax homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany) puis les bactéries viables ont été comptabilisées par dénombrement des CFU après étalement sur gélose au sang de dilutions en séries et incubation 12 à 24 h à 37°C.

II) Administration des traitements

1. Flagelline

a) Production

La flagelline recombinante FliC_{Δ174-400} utilisée dans toutes les expérimentations mentionnées dans ce mémoire (désignée FliC) est issue de la flagelline FliC de *S. typhimurium* (224) délétée des domaines hypervariables immunogènes D2 et D3 et présentant un tag histidine en carboxy-terminal. La construction a été générée par PCR, clonée dans le vecteur d'expression pET22b⁺ avant d'être intégrée dans la souche *E. coli* BL21 pour la production de la protéine. Après destruction des bactéries sous french press, la fraction soluble a été déplétée en lipopolysaccharide (LPS) par extraction au Triton X-114 (225) puis purifiée par chromatographie.

b) Administration

Pour s'assurer que la flagelline est présente essentiellement sous forme de monomères, la protéine a été chauffée 10 min à 65°C avant utilisation. La flagelline a ensuite été administrée aux souris par voie intra-nasale à la dose de 2,5 µg dans 30 µl de PBS après une anesthésie de courte durée par inhalation d'isoflurane (Axience, Pantin, France).

2. Antibiotiques

a) Amoxicilline

L'amoxicilline trihydrate (AMX) (VERTANAL™, Sigma-Aldrich) a été administrée aux souris infectées par voie intragastrique à la dose indiquée dans les expérimentations, dans 200 µl d'eau.

b) Cotrimoxazole

Le cotrimoxazole ou sulfaméthoxazole (SXT) (Bactrim® Roche, Basel, Switzerland), a été administré à la dose totale de 1 mg (soit 0.84 mg de sulfaméthoxazole et 0.16 mg de triméthoprime) ou 4 mg (3.34 mg de sulfaméthoxazole et 0.66 mg de triméthoprime) dans 200 µl de PBS par voie intrapéritonéale.

III) Test de synergie

1. Quantification de l'effet d'un traitement

L'effet de chaque traitement sur la charge bactérienne pulmonaire des souris infectées par le pneumocoque a été quantifié par le calcul du taux de croissance bactérienne résiduelle ou *Percent-growth* ($\%_{\text{growth}}$). Celui-ci correspond au rapport de la charge bactérienne pulmonaire moyenne (CFU) après traitement, sur la charge bactérienne moyenne des souris du groupe non traité (*untreated*). Soit, pour un composé A :

$$\%_{\text{growth}}(A) = \text{moyenne [CFU]}_{(A)} / \text{moyenne [CFU]}_{(\text{untreated})} \times 100$$

Ainsi, plus un traitement est efficace, plus le $\%_{\text{growth}}$ correspondant sera faible et inversement.

2. Effet additif théorique

Afin de déterminer le potentiel d'additivité ou de synergie des traitements combinés, l'effet observé du traitement combiné a été comparé à l'effet additif théorique (*Predicted additive effect*), attendu en cas d'additivité des deux composés. Il est calculé comme le produit des $\%_{\text{growth}}$ de chaque composé utilisé seul, soit :

$$\text{Predicted additive effect (A+B)} = \%_{\text{growth}}(A) \times \%_{\text{growth}}(B)$$

Si l'effet observé du traitement combiné ($\%_{\text{growth}}(A+B)$) est supérieur à l'effet additif théorique (se traduisant par un $\%_{\text{growth}}$ plus faible), cela suggère que les deux composés sont synergiques, tandis qu'un effet observé égal à l'effet additif théorique reflète une additivité (226).

IV) Cytométrie en flux

1. Préparation des cellules

a) *Liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA)*

Après sacrifice des souris, les LBA ont été prélevés par voie intratrachéale par lavage avec 3 x 1 ml de PBS + 5% de sérum de veau fœtal (SVF). Les LBA ont ensuite été filtrés sur filtre de nylon de 70 μm , puis les cellules ont été lavées au

FACS *buffer* (PBS + 2% SVF) et incubées pendant 30 minutes à 4°C et à l'obscurité avec la solution de marquage (50 µl de solution pour 1-2 x 10⁶ cellules) contenant les anticorps fluorescents dilués dans un mélange en proportions égales de FACS *buffer* et de surnageant d'hybridome 2.4G2 (contenant les anticorps anti-CD16 et anti-CD32 dirigés contre les récepteurs au fragment Fc des anticorps).

b) Poumons

Les poumons ont été perfusés avec du PBS avant prélèvement et récupérés dans du milieu RPMI + 5% SVF. Une solution de collagénase la (2 mg/ml) et DNase I (80 µg/ml) a été injectée dans le poumon et après une incubation de 15 min à 37°C, les poumons ont été broyés et filtrés à travers un filtre de 70 µm. Après centrifugation et aspiration du surnageant, les cellules ont été reprises dans 10 ml de Percoll 20%, puis lavées deux fois au FACS *buffer* avant d'être filtrées sur filtre de nylon. Les cellules ont ensuite été incubées à l'obscurité et à 4°C pendant 30 minutes dans 50 µl de solution de marquage pour 1-2. 10⁶ cellules.

2. Analyse phénotypique des cellules par cytométrie en flux

Les données ont été collectées sur un cytomètre en flux de type LSR Fortessa (Becton-Dickinson) et analysées à l'aide du logiciel BD FACSDiva software. Les cellules ont été sélectionnées selon leur taille et leur granulosité et l'expression ou non à leur surface des marqueurs CD45 (marqueur des cellules leucocytaires), CD11b et CD11c, Siglec F, Ly6C, Ly6G et CCR2. Du iodure de propidium (PI) à été ajouté à la suspension cellulaire 5 min avant acquisition pour éliminer de l'analyse les cellules mortes, dont la membrane altérée permet l'entrée et la fixation du PI à l'ADN. Les neutrophiles, macrophages et monocytes inflammatoires ont été définis à partir des cellules vivantes, CD45 positives selon les caractéristiques d'expression de marqueurs suivantes : macrophages (SiglecF⁺, CD11b⁻, CD11c⁺), neutrophiles (SiglecF⁻, Ly6G⁺, CD11b⁺) et monocytes inflammatoires (SiglecF⁻, CD11b⁺, Ly6C⁺, CCR2⁺). Les anticorps utilisés (**Tableau 1**) ont été obtenus auprès de BD Biosciences (San Jose, CA) ou Biolegend (San Diego, CA).

Tableau 1 : liste des anticorps utilisés pour l'analyse par cytométrie en flux

Spécificité	clone	Fluorochrome
CD45	30F11	APC/Cy7
Siglec F	E50-2440	AF647
CD11c	HL3	PE/Cy7
CD11b	M1/70	BV785
Ly6G	1A8	FITC
Ly6C	HK1.4	PerCp/Cy5.5
CCR2	SA203G11	Bv421

V) Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR en temps réel

1. Extraction de l'ARNm et rétrotranscription

Après sacrifice des animaux, les poumons ont été récupérés dans 2 ml de tampon de Lyse RA1 (Macherey-Nagel) en présence d'un agent réducteur, le Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) et homogénéisés à l'aide d'un disperseur Polytron® avant d'être congelés à -20°C. L'extraction des ARN a été effectuée à l'aide du kit Nucleospin® RNA II (Macherey-Nagel). En bref, 350 µL de lysat d'organes ont été filtrés sur colonne puis à travers une membrane de silice adsorbant l'ARN. La membrane a ensuite été traitée successivement avec une solution de désoxyribonucléase I pour éliminer des contaminations d'ADN génomique puis avec deux tampons de lavage différents pour éliminer les sels, métabolites et composants cellulaires macromoléculaires. Puis l'ARN purifié a été élué dans un volume adapté d'eau RNase-free. La qualité et la quantité des ARN ont été évaluées par la mesure des densités optiques à 260 et 280 nm. La rétrotranscription de l'ARNm en ADN complémentaire (ADNc) a ensuite été réalisée à l'aide du "High Capacity cDNA Archive kit®" (Applied Biosystems). Pour cela, l'ARN purifié a été mis en contact avec un tampon contenant des amorces « *random primers* », un mélange de dinucléotides triphosphates (dNTPs), l'enzyme « *reverse transcriptase* » et un inhibiteur de RNase. Le mélange a été incubé 10 min à 25°C, 2h à 37°C et 10 min à 95°C sur un appareil MyCycler™ (Bio-Rad). Les cDNA ont ensuite été conservés à -20°C.

2. PCR en temps réel

L'expression des gènes a été analysée par PCR (*polymerase chain reaction*) en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques des gènes d'intérêt (**Tableau 2**) et de Sybr Green Master Mix® (Applied Biosystems) contenant l'ADN polymérase, les dNTPs et le composé fluorescent Sybr Green® permettant la quantification de l'ADN. Pour chaque couple d'amorces, un contrôle de la spécificité de l'amplification a été réalisé en remplaçant l'ADNc par de l'eau. L'incorporation du Sybr Green® à l'amplicon a été suivie en temps réel par mesure de la fluorescence émise sur l'automate Quantstudio 12k (Applied Biosystems). La quantité initiale d'ARNm dans l'échantillon est proportionnelle au signal de fluorescence représenté par la valeur du cycle seuil (Ct), déterminé dans une zone où l'amplification est exponentielle. La limite de détection dans nos expériences a été fixée à une valeur de Ct de 34 cycles. La mesure du ΔCt ($\Delta Ct = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de référence}}$) normalise le niveau d'ARNm du gène d'intérêt à celui d'un gène de référence, ou gène de ménage, dont l'expression reste constante (*Actb* ou *B2m*). La quantité relative d'ARN dans l'échantillon est exprimée selon la formule : $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{condition2}} - \Delta Ct_{\text{condition1}})}$.

Tableau 2 : séquences des amorces utilisées pour l'analyse par RT qPCR

Gène	Amorce sens (F)	Amorce anti-sens (R)
<i>Actb</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<i>B2m</i>	TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC	GGGTGGCGTGAGTATACTTGAA
<i>Ccl20</i>	TTTTGGGATGGAATTGGACAC	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC
<i>Cxcl1</i>	CTTGTTTCAGAAAATTGTCCAAAA	CAGGTGCCATCAGAGCAGTCT
<i>Cxcl2</i>	CCCTCAACGGAAGAACCAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC
<i>Il1b</i>	AATCTATACCTGTCCTGTGTAATGAAAGAC	TGGGTATTGCTTGGGATCCA
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
<i>S100a9</i>	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT	TGTCATTTATGAGGGCTTCATTT
<i>Actb</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<i>B2m</i>	TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC	GGGTGGCGTGAGTATACTTGAA

VI) Dosage des protéines dans le LBA, le poumon et le sérum

Les LBA ont été prélevés par injection et ré-aspiration de 2 fois 1 ml de PBS contenant des inhibiteurs de protéase (cOmplete, EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche) et les poumons ont été perfusés avec du PBS et récupérés dans 2 ml de tampon d'extraction (T-PER, *Tissue extraction protein reagent*, Termofisher) contenant des inhibiteurs de protéase avant d'être et homogénéisés à l'aide d'un disperseur Polytron® et congelés à -20°C. La concentration en chimiokines CCL20, CXCL1 et CXCL2, et en cytokines IL-6, IL-1 β et TNF a été déterminée dans le LBA et le poumon par *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (kits provenant de eBioscience, R&D Systems ou Becton Dickinson).

VII) Analyses statistiques

Les graphiques et analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel Graph Pad Prism® (GraphPad Software®). Les données ont été analysées avec le test non-paramétrique de Mann & Whitney permettant la comparaison de deux groupes indépendants. Pour la comparaison simultanée de plus de deux groupes, le test de Kruskal-Wallis a été appliqué, couplé au test de comparaison multiple de Dunn. La significativité est définie par une valeur de $p < 0,05$ et représentée de la façon suivante : * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$.

RESULTATS

l) **Mise en évidence de la synergie de l'association antibiotique – flagelline contre l'infection respiratoire à pneumocoque de sérotype 1 chez la souris**

Dans cette première partie, nous avons voulu déterminer si l'efficacité supérieure du traitement combinatoire antibiotique – flagelline par rapport à l'antibiotique ou la flagelline seuls (205) était due à un effet additif des deux composés, ou bien s'il existait un phénomène de synergie entre les deux.

L'effet résultant de l'administration conjointe de deux molécules peut être de trois types (170) :

- **Additif**, correspondant à un effet combiné égal à la somme des effets propres à chaque molécule, obtenus lors de leur utilisation en monothérapie. Cette somme est appelée « effet additif théorique ». Cela reflète une absence d'interaction directe ou indirecte entre les mécanismes d'actions des deux molécules.
- **Synergique**, lorsque l'effet combiné est supérieur à l'effet additif théorique.
- **Antagoniste**, lorsque l'effet combiné est inférieur à l'effet additif théorique. Cet effet peut être lié à des phénomènes de compétition entre les deux molécules pour la fixation sur une même cible, ou d'inhibition par l'un des composés des voies de signalisation activées par l'autre.

La plupart des études évaluant le potentiel synergistique de différents agents antimicrobiens utilisent des systèmes *in vitro* et des approches sous formes de *checkerboard*, où les deux molécules testées sont utilisées à doses croissantes, seules ou en association (170,171,227). Cependant, contrairement aux antibiotiques, la flagelline ne possède par d'effet antibactérien direct, mais plutôt un effet indirect, impliquant la détection par des cellules sentinelles, la production de nombreux facteurs antimicrobiens par différents types cellulaires, notamment les cellules épithéliales, et le recrutement et l'activation de cellules immunitaires effectrices tuant les pathogènes via différents mécanismes. Ce mode d'action indirect rend les tests *in vitro* inapplicables en l'absence de modèle reproduisant ces conditions physiologiques complexes. Nous avons donc étudié la nature et l'amplitude des

interactions entre flagelline et antibiotiques dans un modèle d'infection respiratoire létale à Sp1 chez la souris.

1. Détermination de la dose minimale de flagelline nécessaire pour obtenir une saturation de la réponse immunitaire *in vivo* en contexte infectieux

L'approche *in vivo* ne permettant pas, pour des raisons de coût et de faisabilité, de tester un large éventail de combinaisons de doses de chaque molécule à la manière des *checkerboards*, nous avons dans un premier temps recherché la dose minimale de flagelline FliC_{Δ174-400} induisant une saturation de la réponse immunitaire chez les souris infectées par Sp1. Pour cela, les souris BALB/c ont reçu une dose létale de Sp1 par voie intra-nasale, puis ont été traitées par amoxicilline par voie orale (5 µg par animal, soit 0,2 mg/kg), associé à l'administration intra-nasale de flagelline à différentes doses, allant de 1 ng à 25 µg par animal (soit 0,4 µg à 1 mg/kg). La réponse immunitaire a ensuite été analysée par la mesure de l'expression relative dans le poumon, 4h après traitement, de différents gènes classiquement induits par la flagelline, tels que ceux codants pour les chimiokines CXCL1, CXCL2 et CCL20, les cytokines inflammatoires IL-1β et IL-6 et le peptide antimicrobien S100A9 (205,207–209,222). Les résultats de RT-qPCR montrent une saturation de l'amplitude de l'expression de *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl20*, *Il6* et *Il1b* à partir de 1 µg de flagelline (**figure 6**). Nous avons finalement choisi la dose saturante de 2,5 µg de FliC_{Δ174-400} pour notre étude de synergie *in vivo*.

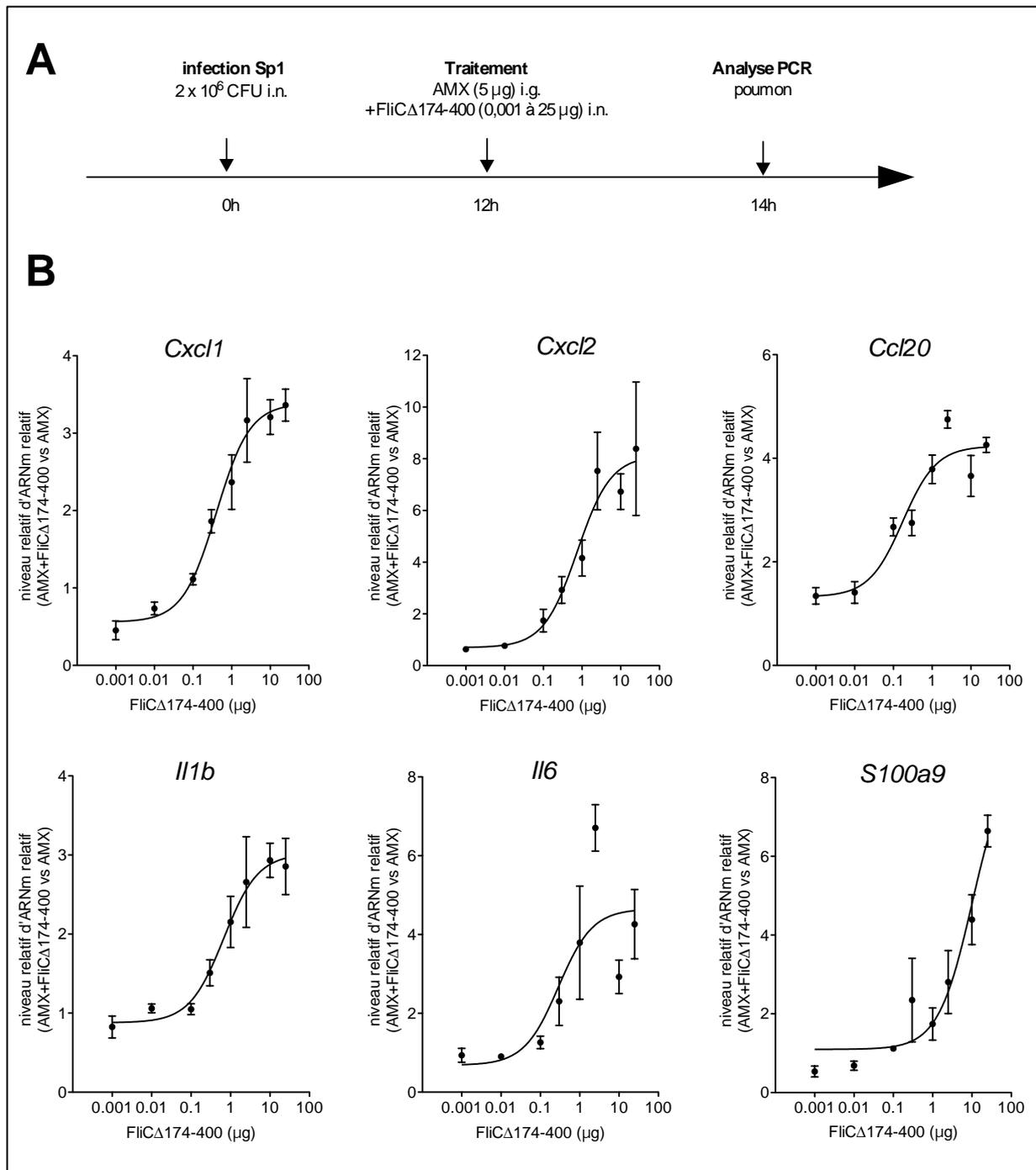


Figure 6: Effet de la dose de flagelline sur la réponse transcriptionnelle du poumon. A) Les souris BALB/c (n=4 par groupe) ont été infectées par voie intra-nasale par 2×10^6 CFU de *S. pneumoniae* Sp1 et traitées 12h plus tard par l'amoxicilline (AMX; 5 µg, administration intragastrique) combiné à l'administration intra-nasale de différentes doses de flagelline FliC Δ 174-400 (0.001, 0.1, 0.3, 1, 2.5, 10, and 25 µg dans 30 µl de PBS) ou de véhicule seul (PBS). Les poumons ont été prélevés 2 h post-traitement, puis l'ARN a été extrait et l'ARNm rétrotranscrit en ADN complémentaire. **B)** L'expression des gènes a été mesurée par PCR quantitative. Le niveau d'expression relative de chaque gène est exprimé par rapport aux gènes de référence *Actb* et *B2m* et la condition de référence AMX+PBS (arbitrairement assigné à la valeur de 1). Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM.

2. Etude des propriétés synergiques de l'association antibiotique – flagelline

Deux antibiotiques ont été testés en association à la flagelline : l'amoxicilline (AMX) et le cotrimoxazole (SXT). L'AMX appartient à la famille des bêtalactamines et agit par inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi des bactéries, en se liant aux protéines liant les pénicillines (PLP). C'est l'antibiotique de première intention des pneumonies communautaires à pneumocoques. Le SXT est l'association de deux antibiotiques, le sulfaméthoxazole et le triméthoprime, agissant par inhibition de la synthèse d'ADN, via le blocage de la synthèse d'acide folique. Il n'est pas recommandé en première intention pour le traitement des pneumonies communautaires en raison de la fréquence des résistances.

a) Synergie amoxicilline - flagelline

Afin de déterminer le type d'interaction thérapeutique entre antibiotique et flagelline *FliC_{Δ174-400} in vivo*, les souris Swiss ont été infectées par une dose intra-nasale létale de Sp1 (4×10^6 CFU) puis traitées 12h après par administration intragastrique d'AMX à la dose de 5 ou 40 μg (0,2 et 1,6 mg/kg, respectivement), l'instillation intra-nasale de flagelline à dose saturante (2,5 μg dans 30 μl de PBS) ou combinaison des deux traitements. La charge bactérienne pulmonaire a été déterminée 12h après traitement (**figure 7A**). Les résultats montrent un effet antibactérien quasiment nul de la flagelline administrée en monothérapie, et un effet très limité de l'AMX en monothérapie, avec une réduction de la charge pulmonaire de 5 et 7 fois (pour les doses 5 et 40 μg , respectivement) par rapport aux souris non traitées. Le traitement combiné induit une diminution de la charge bactérienne d'un facteur 10 pour flagelline + AMX 5 μg et 82 pour flagelline + AMX 40 μg (**figure 7B**), démontrant un effet antibactérien significativement supérieur à celui de la même dose d'AMX administrée seule.

Afin d'étudier le type d'interaction entre AMX et flagelline, nous avons quantifié l'effet de chaque traitement (combinaison ou monothérapie) par le calcul du pourcentage de croissance bactérienne résiduelle par rapport au groupe contrôle de souris non traitées ($\%_{\text{growth}}$). Nous avons ainsi comparé l'effet observé du traitement combiné à l'effet additif théorique de l'association, calculé comme le produit des effets de chaque traitement administré en monothérapie (soit $\%_{\text{growth(AMX)}} \times$

$\%_{\text{growth(flagelline)}}$). Les résultats montrent une croissance bactérienne résiduelle observée plus faible que la valeur théorique pour les deux doses d'AMX (8,4% vs 19,2% pour AMX 5 μg et 1,2% vs 12,3% pour AMX 40 μg), suggérant un effet synergique entre AMX et flagelline (**figure 7C**).

b) Synergie cotrimoxazole – flagelline

Des résultats similaires ont été obtenus avec l'association de la flagelline intra-nasale à un autre antibiotique, le SXT, administré par voie intrapéritonéale à la dose de 1 mg ou 4 mg (40 ou 160 mg/kg, respectivement) (**figure 7A**). La comparaison de la charge bactérienne pulmonaire 12h post-traitement montre une efficacité significativement supérieure du traitement combiné SXT-flagelline par rapport au SXT seul (**figure 7D**). De plus, les $\%_{\text{growth}}$ obtenus expérimentalement pour le traitement combiné étaient inférieurs aux valeurs théoriques prédites en cas d'additivité pour chaque dose de SXT (14% vs 23,5% pour la dose 1 mg et 0,88% vs 7,3% pour la dose 4 mg) (**figure 7E**), indiquant une interaction synergique entre la flagelline et le SXT.

Ces résultats démontrent l'existence d'une synergie thérapeutique entre les antibiotiques et l'administration intra-nasale de flagelline contre l'infection pulmonaire à Sp1 chez la souris. De plus, cette synergie semble être indépendante de la dose et du mécanisme d'action de l'antibiotique, puisqu'elle a été observée avec deux antibiotiques aux mécanismes d'action différents (l'AMX inhibant la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne et le SXT inhibant la production d'acide folique nécessaire à la synthèse d'ADN).

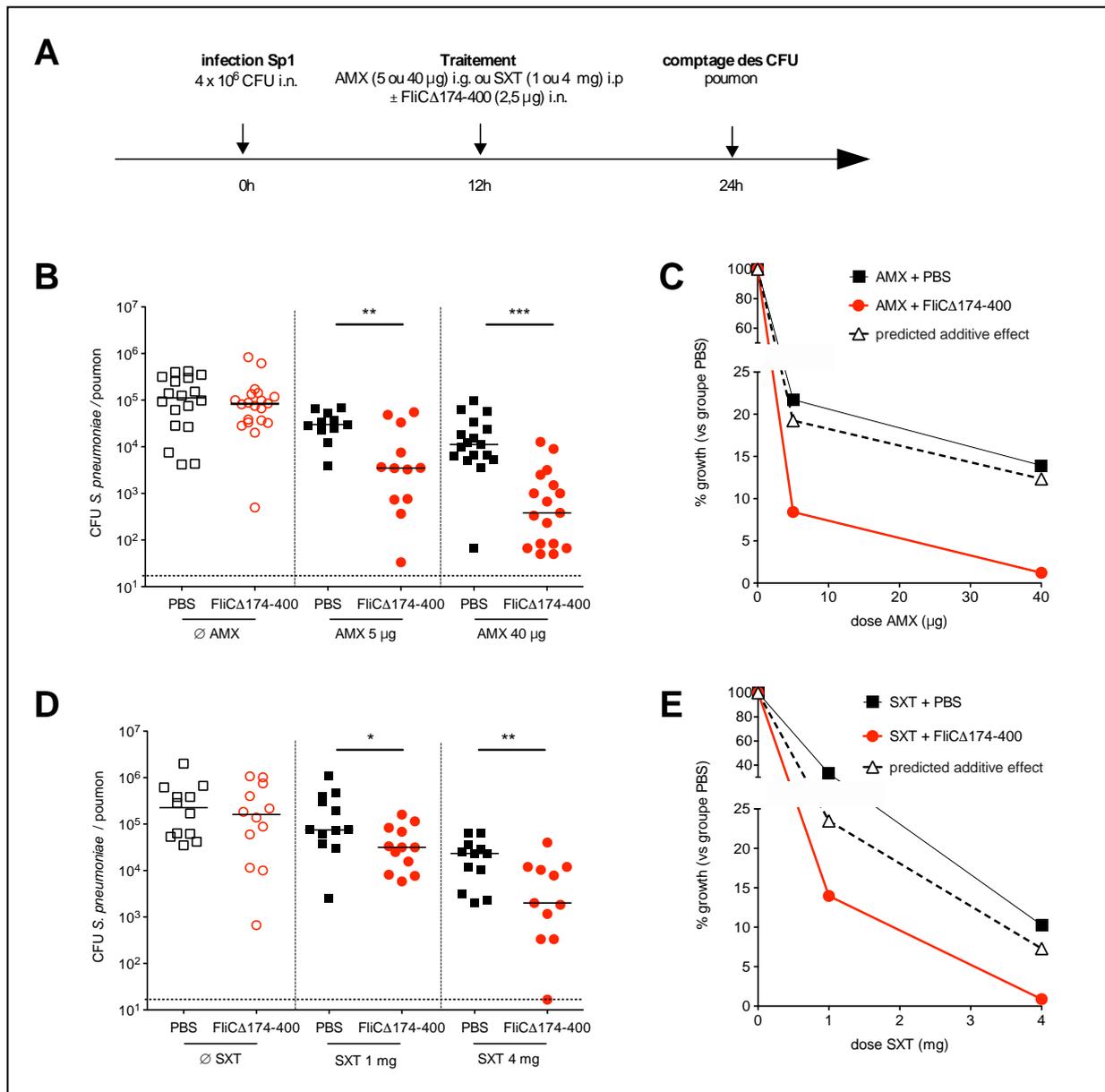


Figure 7: Synergie de l'association antibiotique - flagelline dans le traitement de l'infection pulmonaire à pneumocoque sensible de sérotype 1. **A)** Des souris Swiss ($n=12-20$) ont été infectées par voie intra-nasale avec 4×10^6 CFU de *S. pneumoniae* Sp1. Les animaux ont été traités 12 h plus tard par une administration intragastrique d'amoxicilline (AMX; 5 ou 40 μg) (**B**, **C**), une administration intrapéritonéale de cotrimoxazole (SXT; 1 ou 4 mg) (**D**, **E**) et/ou l'administration intra-nasale de flagelline FliC Δ 174-400 (2,5 μg dans 30 μl de PBS) ou de PBS seul. Les poumons ont été prélevés 12h après traitement, broyés et différentes dilutions ont été déposées sur gélose au sang. (**B**, **D**) Charge bactérienne pulmonaire représentée pour chaque groupe sous forme de médiane + valeurs individuelles. La ligne pointillée représente le seuil de détection. Test de Mann-Whitney (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$). (**C**, **E**) Quantification de l'effet des traitements sur la croissance bactérienne par le pourcentage de croissance résiduelle (%_{growth}) chez les souris traitées (antibiotique + PBS ou antibiotique + FliC Δ 174-400) par rapport aux souris non traitées (PBS). L'effet additif théorique a été calculé comme suit : %_{growth} [antibiotique] \times %_{growth} [flagelline]. Les valeurs ont été groupées en fonction de la dose d'antibiotique.

II) Synergie de l'association amoxicilline – flagelline contre l'infection pulmonaire à pneumocoque résistant aux antibiotiques en contexte de surinfection post-grippale

1. Mise en place du modèle de surinfection post-grippale par un pneumococque de sérotype 3 résistant aux antibiotiques

L'antibiorésistance étant un problème de santé publique majeur, nous avons voulu déterminer si le traitement combiné antibiotique – flagelline était efficace contre l'infection pulmonaire par une souche de pneumocoque résistante aux antibiotiques. Nous avons pour cela développé un modèle d'infection par une souche de pneumocoque de sérotype 3 (Sp3) isolée de prélèvements respiratoires cliniques et résistante à un grand nombre d'antibiotiques, dont l'amoxicilline (CMI de 2 mg/L, soit 125 fois supérieure à celle de la souche Sp1). Cependant, nous n'avons pas réussi à induire une infection respiratoire létale chez les souris avec cette souche, même à forte dose, soit 10^7 CFU (**figure 8A-C**).

L'infection par les virus de la grippe induit des dommages pulmonaires importants et une diminution de la réponse immunitaire locale, favorisant les surinfections bactériennes, même après l'élimination du virus (136,228–230). Nous avons donc développé un modèle d'infection avec la souche Sp3 dans un contexte de surinfection grippale, soit 7 jours après l'infection intra-nasale par une dose sublétale (50 PFU) de virus influenza A H3N2. Dans ce contexte, l'infection par Sp3 induit une mortalité de 100% accompagnée d'une perte de poids significative pour une dose de 10^3 CFU (**figure 8C**).

L'étude de la cinétique de l'infection (en contexte de surinfection grippale) met en évidence une augmentation progressive de la charge bactérienne pulmonaire jusqu'à atteindre un plateau à partir de 24h post-infection, autour de 10^7 CFU par poumon. Cette phase de plateau coïncide avec l'apparition dès 24h de la bactérie dans la rate, indiquant une translocation de la bactérie et son passage systémique (**figure 8D, E**).

En conclusion, ces résultats montrent que la souche Sp3 induit une infection létale chez les animaux préalablement infectés par le virus de la grippe.

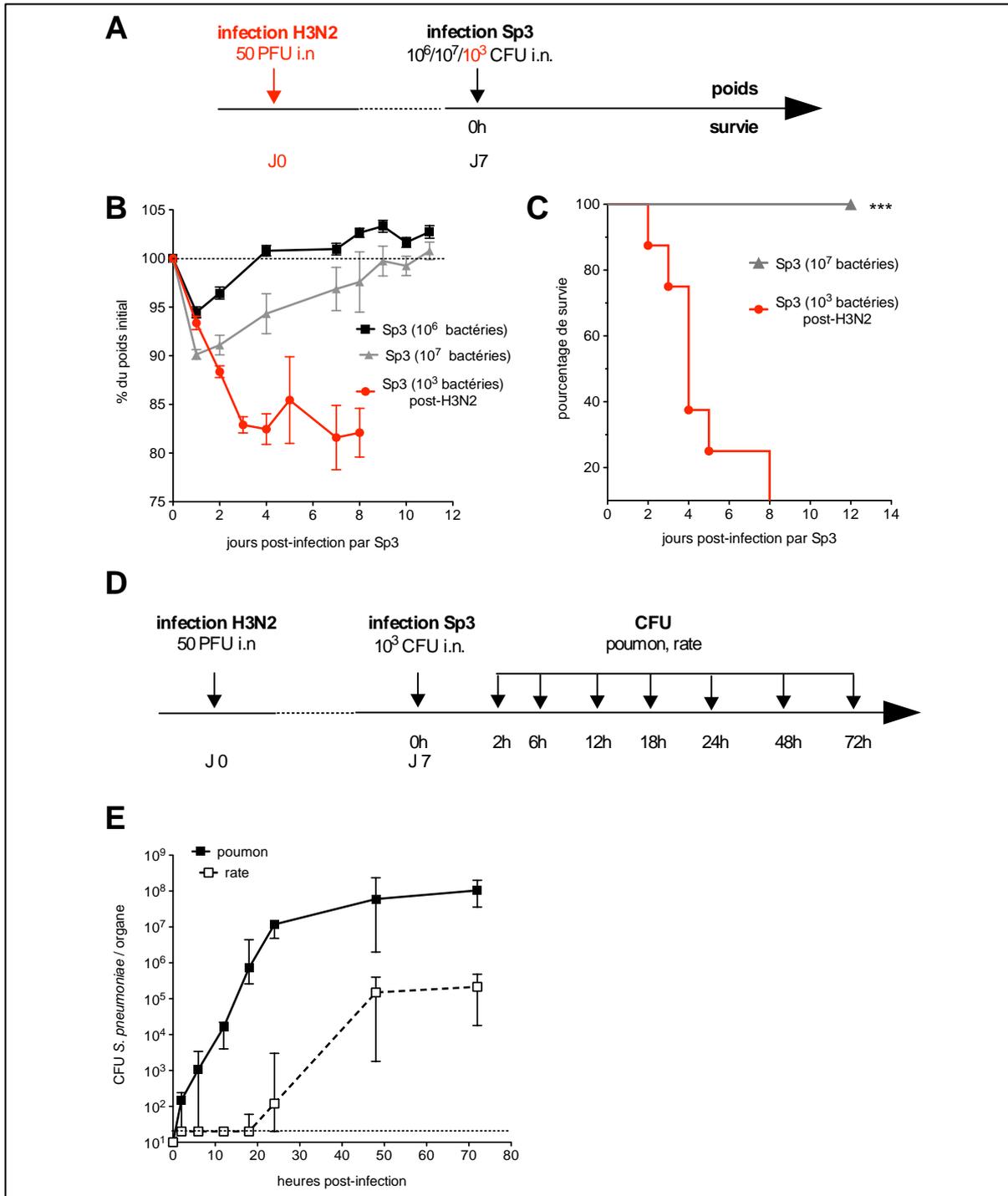


Figure 8 : modèle d'infection par une souche de pneumocoque de sérotype 3 résistante aux antibiotiques. (A–C) Les souris C57BL/6J ($n = 5-8$) ont été infectées par voie intra-nasale par 10^6 ou 10^7 CFU de Sp3 dans $30 \mu\text{l}$ de PBS ou avec 50 PFU de virus influenza H3N2 dans $30 \mu\text{l}$ de PBS suivie 7 jours plus tard par 10^3 CFU de *S. pneumoniae* Sp3 par voie intra-nasale. Les souris ont été pesées toutes les 24 h pendant 12 j après l'infection par Sp3. **(B)** Les poids sont exprimés en pourcentage du poids initial et représentés sous forme de moyenne + SEM. **(C)** Survie des souris. Les données ont été comparées par log-rank test. *** $p < 0.001$. **(D, E)** Les souris C57BL/6J ont été infectées par voie intra-nasale avec 50 PFU de virus H3N2 puis 7 jours après par 10^3 CFU de *S. pneumoniae* Sp3. **(E)** Charge bactérienne dans les poumons et la rate ($n = 5$). Les organes ont été prélevés aux temps indiqués, broyés et différentes dilutions ont été déposées sur gélose au sang. Les valeurs sont représentées par la médiane + écart-type des CFU. La ligne pointillée correspond au seuil de détection.

2. Efficacité du traitement combiné amoxicilline – flagelline contre l'infection pulmonaire par pneumocoque résistant à l'amoxicilline

Afin de tester l'efficacité du traitement combiné antibiotique – flagelline dans le modèle de surinfection, les souris ont été infectées comme précédemment par 10^3 CFU de Sp3, 7 jours après une infection sublétalement par le virus H3N2. Les animaux ont ensuite été traités 12 h après l'infection Sp3 par AMX seule, flagelline seule, ou la combinaison des deux (**figure 9A**). En raison du niveau de résistance important de la souche, les doses d'AMX ont été augmentées à 100 μ g (4 mg/kg) et 350 μ g (14 mg/kg), correspondant à des taux plasmatiques attendus d'environ 1 fois et 4 fois la CMI, respectivement (Pr Charlotte Kloft, communication personnelle).

La flagelline seule induit une diminution de la charge bactérienne pulmonaire de l'ordre de 5,6 fois par rapport aux souris non traitées et l'AMX seule de 3,7 fois (pour la dose 100 μ g) et 74,6 fois (pour la dose 350 μ g), tandis que le traitement combiné (antibiotique – flagelline) entraîne une réduction de la charge bactérienne de près de 5500 fois pour les deux doses (**figure 9B**).

La comparaison des %_{growth} observé et théorique du traitement combiné (0,7 contre 8,9% pour AMX 100 μ g et 0,02 contre 0,9% pour AMX 350 μ g) démontre la synergie entre l'AMX et flagelline dans ce contexte de surinfection post-grippale par un pneumocoque résistant à l'AMX (**figure 9C**). Par ailleurs, après deux administrations des traitements à 12 et 36 h post-infection, le traitement combiné augmente significativement la survie des souris par rapport aux traitements par AMX ou flagelline seuls (**figure 9D, E**).

Ces résultats mettent en évidence la synergie thérapeutique de l'association AMX – flagelline dans le contrôle de l'infection par un pneumocoque antibiotique-résistant dans un contexte pathophysiologique de surinfection grippale.

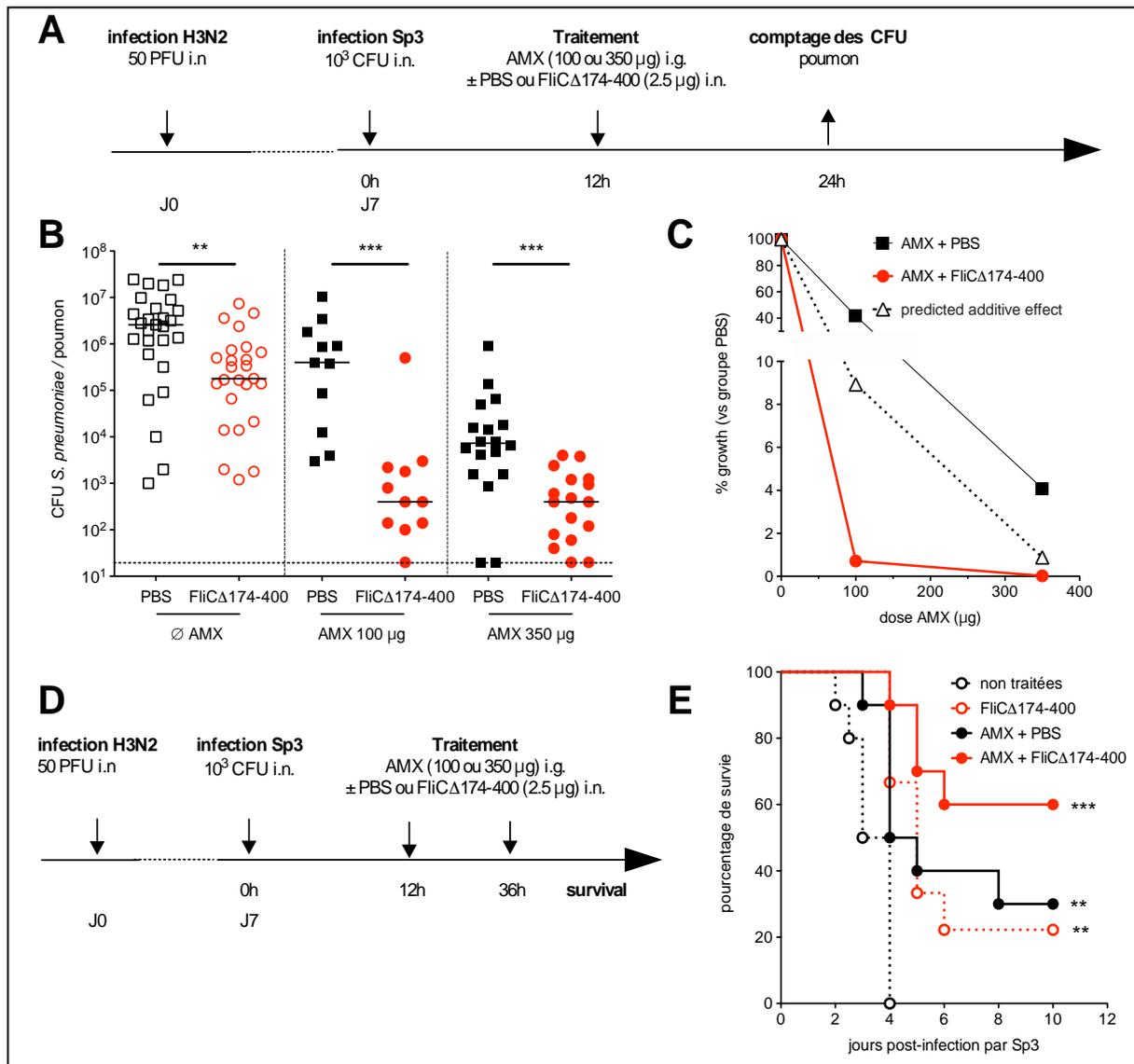


Figure 9 : Synergie entre amoxicilline et flagelline dans le traitement l'infection pulmonaire à pneumocoque résistant à l'amoxicilline. (A) Les souris C57BL/6J (n = 12–28) ont été infectées par voie intra-nasale par 50 PFU de virus H3N2 dans 30 µl de PBS puis 7 jours plus tard par 10³ CFU de *S. pneumoniae* Sp3 dans 30 µl de PBS. Les souris ont été traitées 12 h après l'infection Sp3 par administration intra-nasale de flagelline FliC_{Δ174-400} (2,5 µg dans 30 µl de PBS), administration intragastrique d'amoxicilline (AMX; 100 or 350 µg), ou combinaison des deux. Les poumons ont été prélevés 12h après infection, broyés et différentes dilutions ont été déposées sur gélose au sang. (B) Charge bactérienne pulmonaire représentée pour chaque groupe par la médiane + valeurs individuelles de CFU pour chaque souris. La ligne pointillée représente le seuil de détection. Test de Mann-Whitney (* p<0.05, ** p<0.01, and *** p<0.001). (C) Quantification de l'effet des traitements sur la croissance bactérienne par le pourcentage de croissance résiduelle (%_{growth}) chez les souris traitées (AMX + PBS ou AMX + FliC_{Δ174-400}) par rapport aux souris non traitées (PBS). L'effet additif théorique a été calculé comme suit : %_{growth} [antibiotique] × %_{growth} [flagelline]. Les valeurs ont été groupées en fonction de la dose d'AMX. (D, E) Pour l'étude de survie, les souris ont reçu une deuxième dose du même traitement à 36h après infection puis ont été suivies toutes les 24 h pendant 10 jours. Les données des groupes traités ont été comparées à celles du groupe non traité par log-rank test (**p < 0.01, and ***p < 0.001).

3. Réponse immunitaire induite par l'administration intra-nasale de flagelline dans le contexte de surinfection grippale par le pneumocoque

L'infection par les virus influenza entraînant des modifications majeures de l'intégrité pulmonaire et des populations cellulaires immunitaires, nous avons cherché à déterminer l'impact de la flagelline au cours de l'infection post-grippale par la souche Sp3 résistante aux antibiotiques. Pour cela, les souris infectées par H3N2 puis surinfectées 7 jours plus tard par Sp3 par voie intra-nasale ont été traitées par AMX à la dose de 100 µg, associée ou non à la flagelline (2,5 µg), 12 h après l'infection pneumococcique. Une analyse transcriptionnelle a été réalisée par RT-qPCR à partir des poumons prélevés 2 h après traitement (**figure 10A**). Les résultats montrent que malgré le contexte fortement inflammatoire lié à la double infection, la flagelline induit une augmentation significative de *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl20*, *Il6*, *Il1b* et *S100a9*, qui sont des gènes classiquement associés à la réponse pulmonaire dépendante de TLR5 (**figure 10B**).

Nous avons ensuite quantifiée la production des chimiokines CCL20, CXCL1 et CXCL2 et des cytokines inflammatoires IL-1β, IL-6 et TNF dans le LBA et l'extrait de protéines pulmonaires 6h après traitement. Les taux de chimiokines et TNF étaient augmentés à la fois dans le poumon (**figure 10C**) et le LBA (**figure 10D**) des souris traitées par AMX – flagelline par rapport aux souris traitées par AMX seule. Nous avons également observé une augmentation, non statistiquement significative, de l'IL-6 dans les deux compartiments. L'IL-1β a été détectée uniquement dans le poumon et était significativement augmentée chez les souris traitées par flagelline.

L'administration intra-nasale de flagelline étant associée à un fort recrutement de neutrophiles au niveau pulmonaire à la fois chez les souris naïves et infectées par le pneumocoque Sp1 (205), nous avons évalué le recrutement cellulaire 12 h après traitement dans le poumon et le LBA par cytométrie en flux. Les résultats montrent une augmentation significative du nombre de neutrophiles à la fois dans le parenchyme pulmonaire (**figure 10E**) et le LBA (**figure 10F**) des souris traitées par le traitement combiné.

Par ailleurs, la réponse immunitaire induite par la flagelline était également détectable dans le sang, la production de médiateurs inflammatoires étant significativement augmentée à 2 h (pour IL-6, CCL20, CXCL1 et CXCL2) et 6h (pour CCL20 et CXCL1) par rapport aux souris traitées par AMX seule. Cependant, les

niveaux sanguins de ces protéines diminuaient par la suite jusqu'à un niveau indétectable ou très faible à 12h, suggérant que l'administration intra-nasale de flagelline n'induit pas d'inflammation systémique prolongée (**figure 11**).

Ces résultats démontrent que la réponse à la flagelline est stimulée de façon effective dans le contexte de co-infection pulmonaire par le virus de la grippe et le pneumocoque et suggèrent que les neutrophiles pourraient être les cellules effectrices impliquées dans le contrôle de l'infection par le pneumocoque.

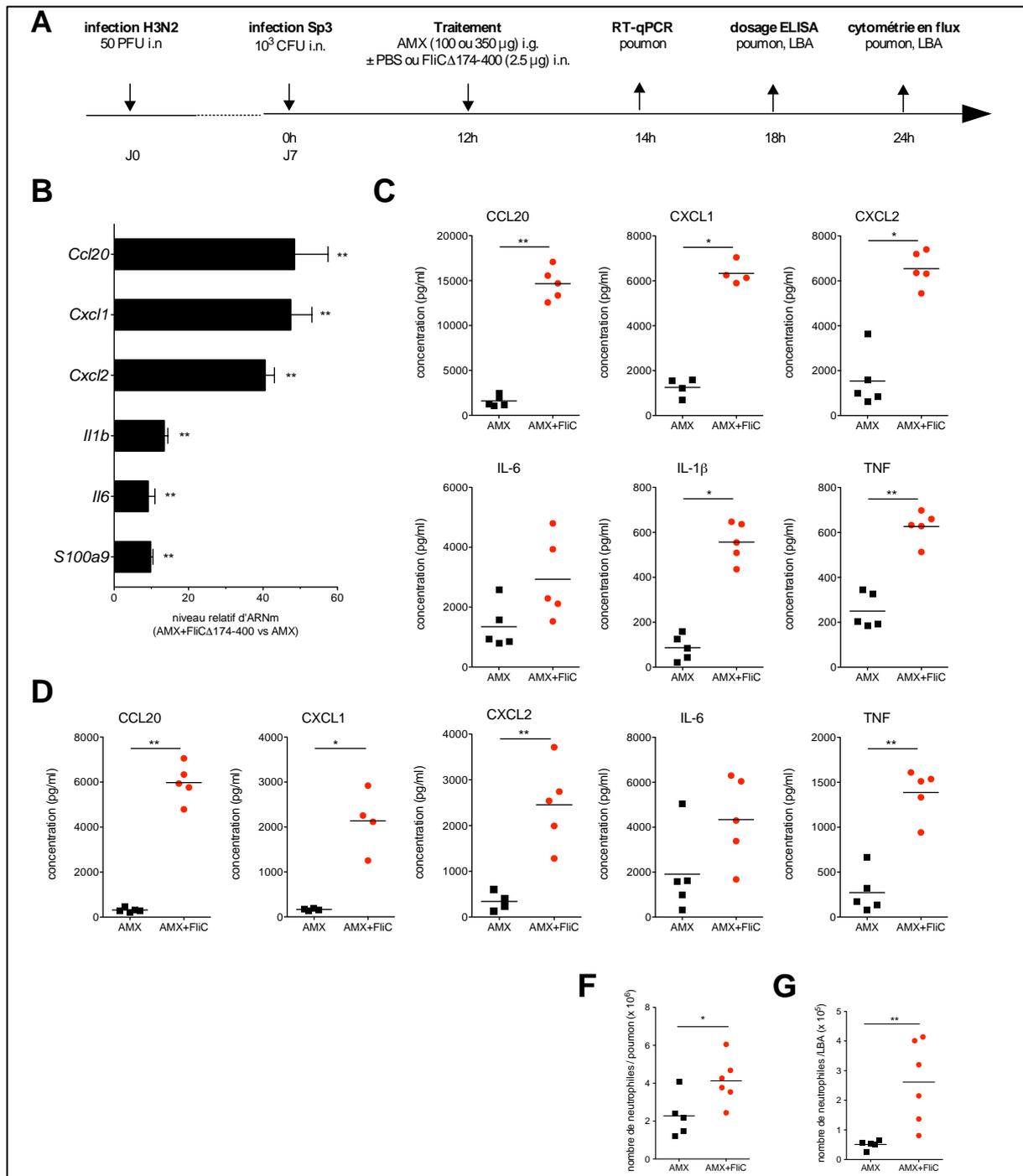


Figure 10 : Réponse immunitaire pulmonaire induite par la flagelline en contexte de surinfection pneumococcique post-grippale. **A)** Les souris C57BL/6J (n = 4–6) ont été infectées par voie intra-nasale par 50 PFU de virus H3N2 dans 30 µl de PBS puis 7 jours plus tard par 10³ CFU de *S. pneumoniae* Sp3 dans 30 µl de PBS. Les souris ont été traitées 12 h après par AMX (100 µg, administration intragastrique) et administration intra-nasale de flagelline FliC_{Δ174-400} (2,5 µg dans 30 µl de PBS) ou du PBS seul. **(B)** Les poumons ont été collectés 2h après traitement et broyés avant extraction de l'ARN et analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR. Le niveau d'expression relatif de chaque gène est exprimé par rapport aux gènes de références *Actb* et *B2m* et au groupe de référence AMX+PBS (arbitrairement assigné à une valeur de 1). Les données sont représentées par la moyenne + SEM. Les poumons **(C)** et le LBA **(D)** ont été prélevés 6h après traitement et la quantité de chimiokines et cytokines a été mesurée par ELISA. Les données ont été comparées par test

de Mann-Whitney et représentées sous forme de valeurs individuelles et moyenne. Les poumons (**E**) et le LBA (**F**) ont été prélevés 12 h après traitement. Les suspensions cellulaires ont été marquées par un mélange d'anticorps spécifiques de marqueurs de surface et analysées par cytométrie en flux. Les neutrophiles ont été définis comme les cellules CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ après exclusion des cellules mortes (iodure de propidium⁺) et des macrophages alvéolaires (CD45⁺SiglecF⁺CD11c⁺) de l'analyse. Le nombre de neutrophiles dans le parenchyme pulmonaire (**D**) et le LBA (**E**) est représenté sous forme de valeurs individuelles et moyenne. Les données ont été comparées par le test de Mann-Whitney (* : p < 0.05, ** : p < 0.01).

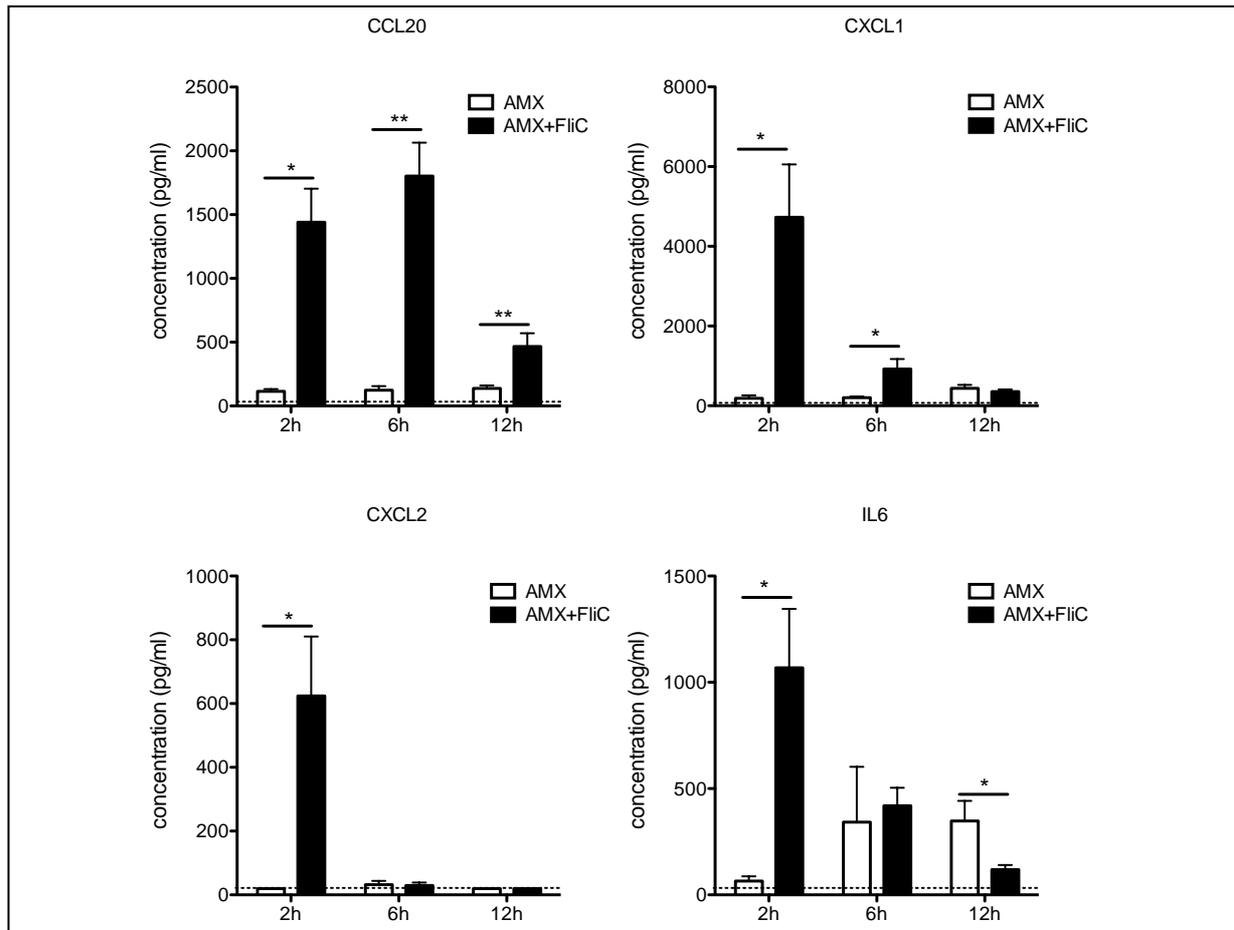


Figure 11 : Réponse immunitaire systémique induite par la flagelline en contexte de surinfection pneumococcique post-grippale. Les souris C57BL/6J (n = 4–6) ont été infectées par voie intra-nasale par 50 PFU de virus H3N2 dans 30 µl de PBS puis 7 jours plus tard par 10³ CFU de *S. pneumoniae* Sp3 dans 30 µl de PBS. Les souris ont été traitées 12 h après par AMX (100 µg, administration intragastrique) et administration intra-nasale de flagelline FlIC_{Δ174–400} (2,5 µg dans 30 µl de PBS) ou du PBS seul. Le sang a été prélevé 2 h, 6 h et 12 h après traitement et la quantité de chimiokines et cytokines a été mesurée par ELISA dans le sérum. Les données ont été comparées par le test de Mann-Whitney et représentées sous forme de moyenne et écart-type (SEM). (* : p < 0.05, ** : p < 0.01).

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Au cours des analyses réalisées chez la souris dans le modèle de surinfection post-grippale, nous avons constaté des changements macroscopiques du parenchyme pulmonaire touchant des zones délimitées du poumon, et caractérisées par un aspect hémorragique ou « hépatisé » (**figure 13A**). Ces modifications ont été observées spécifiquement lors de la surinfection pneumococcique post-grippale, suggérant une relation causale à l'infection virale. Ces résultats suggèrent que les zones « hépatisées » du poumon constituent un terrain plus propice à l'invasion bactérienne que les zones d'aspect « sain ».

Une étude histologique a été réalisée pour comparer les parties « saines » et « hépatisées » d'un même poumon au cours de la surinfection post-grippale par pneumocoque. Comparées aux zones « saines », les zones « hépatisées » montrent une infiltration cellulaire beaucoup plus importante des alvéoles et espaces interstitiels, associée à une perte totale des structures alvéolaires (**figure 12**).

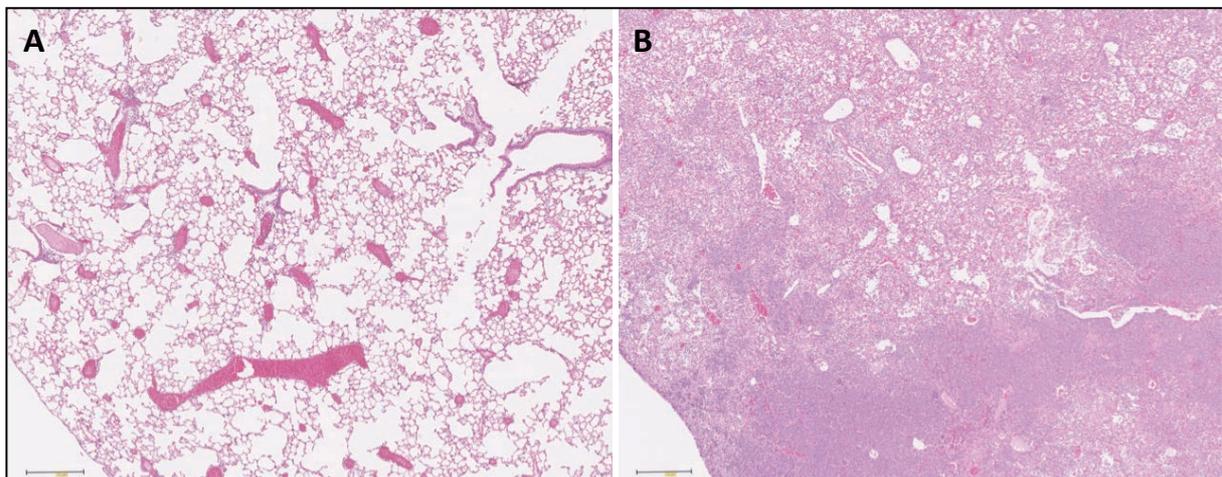


Figure 12 : Analyse histologique du poumon de souris en contexte de surinfection pneumococcique post-grippale. Les souris C57BL/6J ont été infectées par voie intranasale par 50 PFU de virus de la grippe H3N2 dans 30 µl de PBS puis 7 jours plus tard par 10³ CFU de *S. pneumoniae* Sp3 dans 30 µl de PBS. Les zones « saines » (**A**) et « hépatisées » (**B**) des poumons ont été prélevées 60 h après l'infection bactérienne, et les coupes de poumons ont été colorées à l'hématoxyline et éosine. La barre dans chaque image représente une échelle de 250 µm. Les coupes, colorations et images ont été réalisées par le laboratoire Althisia.

Nous avons ensuite comparé la charge bactérienne pneumococcique dans les deux zones. Malgré une tendance à l'augmentation dans les zones « hépatisées », aucune différence significative de charge bactérienne n'a été observée avec les zones « saines ». De plus, une forte dispersion des valeurs de CFU est observée dans les zones « hépatisées » (**figure 13B**). Ces résultats suggèrent que les parties du poumon fortement dégradées par l'infection grippale ne constituent pas des zones privilégiées pour l'invasion par les bactéries lors d'une infection pneumococcique secondaire. Cependant, il serait intéressant de comparer l'activité transcriptionnelle de ces deux zones dans le cadre de la surinfection et de la stimulation par la flagelline.

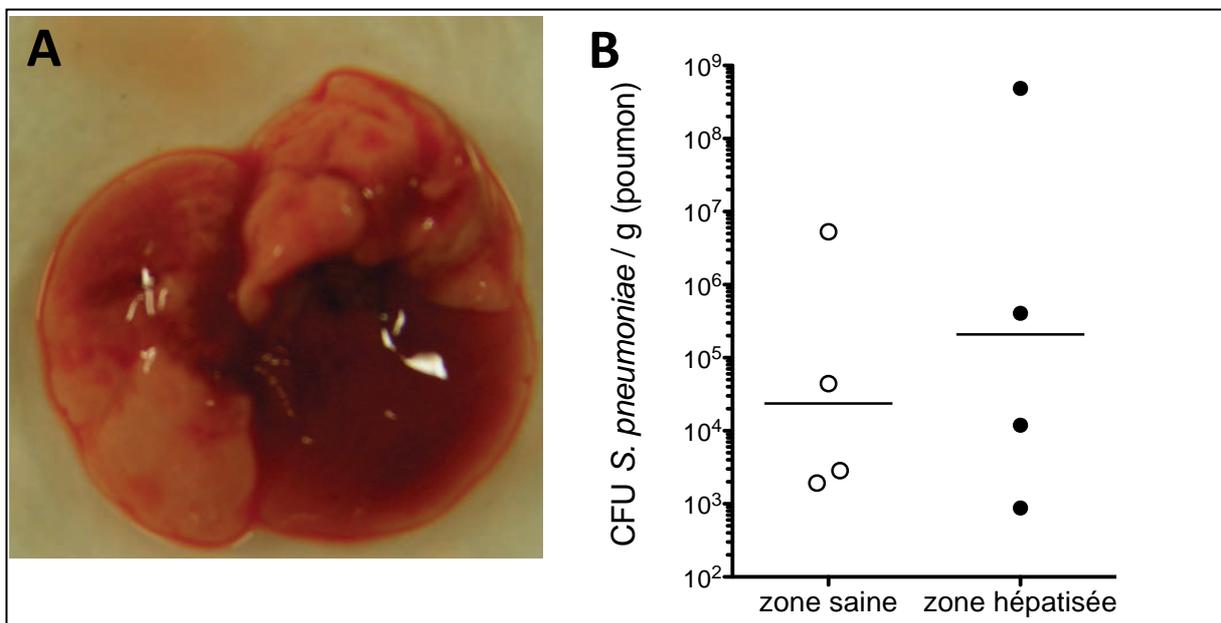


Figure 13 : Etude de la charge bactérienne pulmonaire en fonction de l'atteinte du parenchyme pulmonaire en contexte de surinfection pneumococcique post-grippale. Les souris C57BL/6J (n = 4) ont été infectées par voie intra-nasale par 50 PFU de virus H3N2 dans 30 μ l de PBS puis 7 jours plus tard par 10³ CFU de Sp3 dans 30 μ l de PBS. Les poumons ont été prélevés 24h après infection en séparant les zones saines et hépatisées, broyés et différentes dilutions ont été déposées sur gélose au sang. **A)** photographie représentative d'un poumon de souris présentant des zones d'apparence saine et d'apparence hépatisée. **B)** Charge bactérienne pulmonaire rapportée au poids de la zone prélevée, représentée pour chaque groupe par la médiane + valeurs individuelles de CFU pour chaque souris. L'analyse des données par le test statistique de Mann Withney n'a pas mis en évidence de différence significative entre les groupes.

DISCUSSION / PERSPECTIVES DE L'ARTICLE I

Les résultats présentés dans cette étude démontrent l'efficacité d'une stratégie thérapeutique combinant un antibiotique (AMX ou SXT) et un immunomodulateur de l'immunité innée contre les infections respiratoires causées par *S. pneumoniae*. L'efficacité du traitement combiné antibiotique - flagelline, démontrée antérieurement chez des souris consanguines BALB/c et C57BL/6 par Porte et al. (205) , a été ici étendue aux souris Swiss non consanguines, montrant que la protection est indépendante du fond génétique de la souris. Nos résultats démontrent de plus une interaction synergique entre flagelline et antibiotique. Cette synergie semble être indépendante de la dose d'antibiotique et du mécanisme d'action, puisque l'AMX agit sur la paroi cellulaire bactérienne et que le SXT inhibe la synthèse de l'ADN.

Nous avons également mis en évidence que l'immunostimulation induite par la flagelline dans le poumon est un processus dose-dépendant qui atteint un niveau de saturation à partir d'une dose de quelques microgrammes chez la souris. Par ailleurs, la flagelline est capable de déclencher une réponse immunitaire innée pulmonaire dans un contexte fortement inflammatoire de co-infection grippale et pneumococcique.

Enfin, cette étude est la première à avoir démontré l'efficacité de la stimulation de l'immunité innée dans le traitement de pneumonie sévère due à une bactérie résistante aux antibiotiques, ouvrant ainsi de nouvelles voies pour le traitement des pneumonies dans le contexte actuel de progression des résistances aux antimicrobiens.

Il a été démontré précédemment que l'administration intra-nasale de flagelline induisait une réponse innée locale dépendante de TLR5, avec une activité antibactérienne à large spectre. Cette réponse pulmonaire comprend en effet la production de divers peptides antimicrobiens (cathélicidine et β -défensines notamment), cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1 β et IL-6) et chimiokines (CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL5 et CXCL8) (203,205,206,209,222,231). La production de cytokines et de chimiokines est corrélée avec le recrutement de cellules phagocytaires (et en particulier de neutrophiles) dans les poumons après

l'administration intra-nasale de flagelline à des souris naïves (209,232,233). De plus, notre équipe a montré que l'administration intra-nasale de flagelline déclenche une réponse transcriptionnelle aussi bien dans le contexte d'une infection pneumococcique que lors d'une infection grippale (205). Ici, nous avons mis en évidence que la signature immunitaire innée du poumon, induite par l'instillation respiratoire de flagelline, est toujours efficace dans un contexte fortement inflammatoire avec lésions pulmonaires associées comme celui causé par la surinfection pneumococcique post-grippale (**figure 11**). Fait intéressant, des rapports antérieurs ont indiqué que l'infection grippale induit une désensibilisation partielle mais soutenue des réponses innées dépendantes des récepteurs TLR et une réduction de leur expression (234). Nos observations démontrent cependant que, dans le contexte physiopathologique de la surinfection, la flagelline demeure capable de déclencher un niveau de réponse immunitaire suffisant et d'exercer un effet synergique en association avec les antibiotiques (**figure 10**).

Les cellules épithéliales des voies respiratoires ont été identifiées comme une composante importante pour la détection de la flagelline et le déclenchement des voies de signalisation TLR5-dépendantes à l'homéostasie (206,207). Ces cellules sentinelles sont capables non seulement de détecter des signaux de danger introduits dans les voies aériennes, mais produisent également de nombreux facteurs agissant directement sur les pathogènes, ou indirectement via la mobilisation des cellules immunitaires effectrices, notamment phagocytaires. Plus généralement, la signalisation TLR au niveau de l'épithélium des voies aériennes représente un moteur essentiel de la défense antibactérienne (53). Récemment, Anas et al. ont démontré une contribution essentielle des cellules épithéliales pulmonaires en réponse à la flagelline dans le contexte d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* (235). Nos résultats montrent que l'expression de différents composés associés aux réponses épithéliales (peptide antimicrobien S100A9, cytokines IL-1 β et TNF et chimiokines CCL20, CXCL1, et CXCL2) est également augmentée après l'administration du traitement combiné dans le modèle de surinfection grippale (**figure 11**). Cela confirme le rôle primordial de l'épithélium dans la réponse innée locale induite par la flagelline, même dans le contexte fortement inflammatoire de la surinfection. Par ailleurs, l'administration locale, en ciblant l'épithélium, présente un avantage pour l'immunostimulation car elle permet

de réduire les doses administrées et d'éviter les effets indésirables systémiques des molécules.

Nos données contribuent à mettre en évidence le potentiel thérapeutique de l'association de deux molécules ayant des modes d'action distincts : un antibiotique ayant un effet direct sur les bactéries et un stimulateur de l'immunité innée à activité antibactérienne indirecte via la mobilisation de cellules phagocytaires et la production de peptides antimicrobiens, chimiokines et cytokines. Bien que les mécanismes responsables de cette synergie restent encore à définir, plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Il est en effet possible que les mécanismes de la réponse immunitaire innée aient un impact sur le métabolisme ou l'intégrité structurale des bactéries, augmentant leur sensibilité à l'antibiotique. Ces mécanismes peuvent également modifier la distribution de l'antibiotique dans le tissu pulmonaire (notamment via une augmentation de la perméabilité tissulaire), tandis que l'antibiotique, en endommageant le pathogène, pourrait également favoriser son élimination par le système immunitaire.

D'autre part, il a été montré que la flagelline, en modulant l'immunité innée dans les voies respiratoires, renforçait la réponse adaptative épithéliale et systémique (207,209). Cette propriété pourrait être intéressante à exploiter pour susciter une mémoire immunitaire anti-pathogène et prévenir les infections récurrentes et rechutes.

En tant que bactérie opportuniste, *S. pneumoniae* colonise fréquemment les voies respiratoires supérieures et représente la principale cause de pneumonie aigue communautaire bactérienne (236). Cependant, de nombreuses autres espèces bactériennes peuvent être responsables de pneumonies, notamment dans le cadre particulier des pneumonies associées aux soins de santé, comme la ventilation assistée. On retrouve ainsi des bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, des bactéries à Gram négatif comme *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*, des mycoplasmes (*M. pneumoniae*) et des bactéries intracellulaires (*Legionella pneumophila*) (132). Le diagnostic et le traitement des pneumonies sont compliqués par la grande variété d'agents causatifs et la progression des résistances bactériennes aux antibiotiques. Dans ce contexte, les stimulateurs de l'immunité innée comme la flagelline sont d'un grand intérêt car ils activent une grande variété de mécanismes immunitaires antimicrobiens,

potentiellement efficaces contre un large spectre de pathogènes. En effet, la flagelline a déjà démontré des propriétés protectrices contre divers agents pathogènes, y compris des bactéries à Gram négatif (*S. Typhimurium*, *E. coli* et *P. aeruginosa*) et Gram positif (*S. pneumoniae*, *E. faecalis* ou *C. difficile*) (205,211,213,231,237,238) , et nos résultats semblent indiquer que l'efficacité synergique du traitement combiné est indépendante du sérotype de pneumocoque, puisque cet effet a été observé avec deux souches différentes, de sérotypes 1 et 3. De plus, nos résultats montrent que la synergie thérapeutique entre antibiotique et flagelline est indépendante du mécanisme d'action de l'antibiotique - ce qui suggère que la flagelline peut potentiellement être combinée avec divers antibiotiques pour s'adapter à un grand nombre de situations cliniques.

Compte tenu de la progression de la résistance aux antibiotiques, un modèle d'infection par des bactéries résistantes aux antibiotiques constitue un outil important pour le développement de stratégies anti-infectieuses alternatives. Nous avons tout d'abord tenté de développer un tel modèle chez des souris immunocompétentes dans un contexte d'infection primaire. Cependant, la souche résistante de pneumocoque de sérotype 3 dont nous disposons, provenant d'un isolat clinique, s'est révélée incapable d'induire une infection létale chez les animaux, même à fortes doses (figure 3). Des études rapportent que l'acquisition de résistances aux antibiotiques est souvent associée à une perte de virulence de la bactérie (166), qui pourrait expliquer la très faible virulence de la souche Sp3 chez des souris naïves.

De nombreux cas de pneumonies bactériennes résultent de co-infections ou de surinfections virus - bactéries (en particulier avec les virus de la grippe) (136). Comme le montrent les figures 3 et 4, l'infection par le virus de la grippe crée un environnement favorable pour la colonisation et l'invasion par la souche Sp3 peu virulente. Nos données démontrent que le traitement combiné flagelline + AMX réduit efficacement la charge bactérienne de Sp3 dans le poumon, et améliore la survie des souris. La preuve de concept présentée ici est potentiellement transposable à la clinique pour les patients présentant des co-infections et des surinfections, qui sont des causes fréquentes d'hospitalisation et de complication des pneumonies.

Les antibiotiques constituent le traitement standard des pneumonies bactériennes, et la progression des souches résistantes est une préoccupation majeure de santé publique (159). Lors du choix des antibiotiques et des modalités de traitement

(posologie, voie et schéma d'administration) pour un patient donné, le médecin doit tenir compte des caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des antibiotiques utilisés. La relation entre l'exposition *in vivo* au médicament (soit son absorption, sa distribution tissulaire et son élimination) et la sensibilité *in vitro* des bactéries (CMI) conditionne non seulement l'efficacité thérapeutique, c'est à dire l'élimination de l'infection, mais aussi les effets indésirables ou toxiques du traitement (239). Ainsi, la dose maximale d'antibiotique pouvant être administrée à un patient compte tenu de sa toxicité peut ne pas être suffisante pour obtenir des taux tissulaires permettant une clairance efficace de l'infection dans le cas de bactéries hautement résistantes. Nos données suggèrent que l'association avec la flagelline permettrait de rétablir l'efficacité de l'antibiothérapie dans le cas d'infections par des souches bactériennes résistantes.

En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que la stimulation sélective de l'immunité innée pulmonaire par la flagelline améliore l'efficacité thérapeutique du traitement antibiotique grâce à un effet synergique. Chez l'homme, cette approche pourrait constituer une alternative pertinente pour le traitement des infections bactériennes. En effet, le traitement combiné antibiotique – flagelline permettrait notamment de réduire les doses d'antibiotiques utilisées, limitant ainsi leur toxicité potentielle. D'autre part, ce type de stratégie préviendrait théoriquement la sélection de souches résistantes, rendue improbable en raison de la grande variété de mécanismes antibactériens directs et indirects impliqués dans l'immunostimulation.

En conclusion, la caractérisation moléculaire et cellulaire des mécanismes de défense antibactériens contribuant à l'efficacité de la flagelline et à la synergie avec les antibiotiques devrait ouvrir de nouvelles voies de développement d'immunothérapie des infections respiratoires.

Etude II : Contribution des neutrophiles à la protection contre les pneumonies induite par une thérapie combinée antibiotique – flagelline

INTRODUCTION

Nous avons préalablement démontré l'efficacité du traitement combiné antibiotique - flagelline par rapport à l'antibiotique seul contre l'infection à pneumocoque chez la souris (205). Ces expériences ont mis en évidence une réduction de la charge bactérienne pulmonaire et splénique après deux administrations de flagelline et de l'antibiotique. Plus récemment nous avons montré qu'un traitement unique d'AMX + FliC diminuait significativement la charge bactérienne pulmonaire dans un modèle d'infection à souches de *S. pneumoniae* sensibles ou résistantes aux antibiotiques (**article I**). Ces études ont démontré la pertinence de la combinaison d'un antibiotique à action direct avec un immunomodulateur de l'immunité innée pour traiter les infections respiratoires à *S. pneumoniae*. Cependant les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l'effet thérapeutique restent à définir. Un recrutement de neutrophiles, associé à l'administration de flagelline, a été observé dans les deux études mais leur implication dans l'effet thérapeutique reste à démontrer.

Au cours de cette étude, nous avons cherché dans un premier temps à étudier l'impact de la flagelline sur la dynamique de clairance bactérienne au cours de l'infection à *S. pneumoniae* Sp1, en comparant l'effet thérapeutique d'une administration unique et conjointe de flagelline par voie intra-nasale et d'amoxicilline par rapport à l'effet de l'amoxicilline seule. Les déterminants immunologiques responsables de l'efficacité anti-infectieuse du traitement combiné avec la flagelline ont été explorés en étudiant :

- les voies de signalisation activées dans le poumon au cours de l'infection pneumococcique grâce à des analyses transcriptomiques et protéomiques entre 2 h et 24 h après traitement antibiotique ± flagelline
- l'impact de la flagelline sur les populations pulmonaires de neutrophiles, macrophages alvéolaires et monocytes inflammatoires, entre 2 h et 48 h après administration des traitements.

Par la suite, le rôle des neutrophiles dans l'efficacité thérapeutique induite par la flagelline a été plus particulièrement étudié, par des approches de déplétion ou d'inhibition du recrutement de ces cellules.

MATERIELS ET METHODES

Cf matériels et méthodes de l'article I. Informations additionnelles :

I) Infection bactérienne et traitement

Toutes les infections de cette étude ont été réalisées avec la souche de *S. pneumoniae* de serotype 1 (**Sp1**, isolat clinique E1586). Les souris femelles BALB/cJ, de 6 à 8 semaines ont été infectées par une dose de 2×10^6 CFU par voie intra-nasale après anesthésie par un mélange de kétamine et xylazine.

La flagelline $\text{FliC}_{\Delta 174-400}$ a été administrée aux souris par voie intra-nasale à la dose de 2,5 μg dans 30 μl de PBS après une anesthésie de courte durée par inhalation d'isoflurane (Axience, Pantin, France). L'amoxicilline trihydrate (AMX) (VERTANAL™, Sigma-Aldrich) a été administrée aux souris infectées par voie intragastrique à la dose de 5 μg par souris (soit environ 0,2 mg/kg), dans 200 μl d'eau.

II) Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR en temps réel

Tableau 3: Liste des séquences d'amorces

Gène	Amorce sens (F)	Amorce anti-sens (R)
<i>Actb</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<i>Ccl20</i>	TTTTGGGATGGAATTGGACAC	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC
<i>Cxcl2</i>	CCCTCAACGGAAGAACCAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC
<i>Il1b</i>	AATCTATACCTGTCCTGTGTAATGAAAGAC	TGGGTATTGCTTGGGATCCA
<i>S100a9</i>	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT	TGTCATTTATGAGGGCTTCATTT
<i>Il10</i>	CAGAGCCACATGCTCCTAGA	TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT
<i>Camp</i>	GCCTAAAGACTGCGACTTCC	CCAATCTTCTCCACCTTT
<i>Ngp</i>	GCCTAAAGACTGCGACTTCC	TGAAGAATTTCCCTGTGCAA
<i>Mmp8</i>	AACCGGAAGACATACTTCTTCATAA	GGGTCCATGGATCTTCTTTG
<i>Ifitm6</i>	CCGGATCACATTACCTGGTC	CATGTGCGCCACCATCTT
<i>Itgb2l</i>	CCTCCAGGGAGCAAAGTG	CCCAGCTAGGACAGGTAGCA
<i>Retnlg</i>	GGAACTTCTTGCCAATCGAG	TGCCTGAAGCCGTGATACTA
<i>Fkbp5</i>	TGTTCAAGAAGTTCACAGAGC	CCTTCTTGCTCCAGCTTT
<i>Zbtb16</i>	AATGCATTTACTGGCTCATTCA	CAGGGCATCCTCCTTTGAG

III) Analyse cellulaire par cytométrie en flux

Les lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été prélevés par trois injections et aspirations endo-trachéales successives d'1 ml de PBS + 5% SVF, puis filtrés à travers un filtre nylon de 70 μm , et les cellules ont été comptées sur lame de Neubauer.

Les poumons perfusés avec du PBS ont été récupérés dans du milieu RPMI + 5% SVF, finement découpés aux ciseaux puis traités avec une solution de collagénase la et DNase I pendant 15 min à 37°C avant d'être désagrégés à la seringue et filtrés à travers un filtre de 70 μm . Les suspensions cellulaires ont été centrifugées sur Percoll 20%, puis lavées deux fois au "FACS buffer" avant d'être filtrées sur nylon. Le sang a été prélevé par ponction rétro-orbitale après anesthésie létale des souris dans des tubes contenant de l'héparine (Héparine Choay[®] solution injectable, Sanofi). Les globules rouges du sang et des suspensions cellulaires de poumon ont été lysés par incubation des culots cellulaires dans 2 ml de solution de lyse (Pharmlyse, BD Bioscience) pendant 3 min à température ambiante.

Les cellules de LBA, de poumon et de sang ont été marquées par un mélange d'anticorps fluorescents et analysés par cytométrie en flux comme décrit précédemment (cf. matériels et méthodes de l'article I). Après exclusion des cellules mortes par un marquage à l'iodure de propidium et des lymphocytes (lignage CD3⁺ et B220⁺), les neutrophiles, macrophages et monocytes inflammatoires ont été définies à partir des cellules CD45 positives selon les caractéristiques d'expression de marqueurs suivantes : macrophages (SiglecF⁺CD11b^{neg}CD11c⁺) (sauf dans le sang où ils sont absents), neutrophiles (SiglecF^{neg}Ly6G⁺CD11b⁺) et monocytes inflammatoires (SiglecF^{neg}CD11b⁺Ly6C⁺CCR2⁺). Les anticorps utilisés sont listés dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : liste des anticorps fluorescents

Spécificité	clone	Fluorochrome
CD45	30F11	BV650 ou AF700
Siglec F	E50-2440	AF647 ou BV421
CD11c	HL3	PE/Cy7
CD11b	M1/70	BV785
Ly6G	1A8	PE ou FITC
Ly6C	HK1.4	FITC ou APC/Cy7
CCR2	SA203G11	BV421
B220	RA3-6B2	APC/Cy7
CD3	17A2	APC/Cv7
CXCR2	SA044G4	PE
Sca-1	D7	AF647
CD49d	R1-2	PE

IV) Analyse transcriptomique par *microarrays*

Après sacrifices des souris, les poumons ont été perfusés par l'injection intracardiaque de PBS. Après extraction de l'ARN à l'aide du kit Nucleospin RNA II (Macherey Nagel, Duren, Germany), le rendement total en ARN et la qualité ont été évalués sur le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies). L'expression génique a ensuite été analysée pour chaque souris grâce à des puces *microarrays 60-mer oligonucleotides 8x60k v2* (Agilent Technologies). Le marquage, l'hybridation et la détection de cRNA ont été réalisés conformément aux instructions du fournisseur (Agilent Technologies). Pour chaque *microarray*, les cRNA marqués à la cyanine 3 ont été synthétisés à l'aide du kit de marquage QuickAmp à partir de 50 ng d'ARN total. Un *RNA Spike-In* a été ajouté à tous les tubes et utilisé comme contrôle positif des étapes de marquage et d'amplification. Les cRNA marqués ont été purifiés et 600 ng de chaque cRNA ont ensuite été hybridés et lavés conformément aux instructions du fabricant. Les *microarrays* ont été numérisés sur un scanner Agilent G2505C et les données extraites à l'aide du logiciel Agilent Feature Extraction © (FE version 10.7.3.1). Les comparaisons statistiques et le filtrage ont été réalisés avec le paquetage limma R avec une normalisation à 75%. Les gènes différentiellement exprimés ont été déterminés par des valeurs p ajustées inférieures à 0,05 en utilisant la méthode *false discovery rate* de Benjamini et hochberg. L'analyse des voies de

signalisation a été effectuées à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, Redwood City, Californie, USA).

V) Analyse protéomique

Pour l'analyse protéomique, les LBA ont été prélevés avec deux injections et aspirations endo-trachéales successives d'1 ml de PBS contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases (cOmplete™, Sigma-Aldrich) et conservés à -20°C. Une hydrolyse du mucus a été réalisée par addition de 1 µg/ml DNase I et 1 mM d'un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT). La quantité totale de protéines dans le LBA a été déterminée par la méthode colorimétrique de Bradford (Bio-Rad) selon les instructions du fabricant. Les protéines du LBA ont été concentrées par précipitation sur glace pendant 30 min en présence d'acide trichloroacétique (TCA) à 10%, suivie d'une centrifugation (10 000 rpm, 10 min) puis deux lavages successifs du culot protéique avec 500 µL d'acétone. Les protéines ont ensuite été reprises dans un volume de tampon de charge d'électrophorèse Laemmli (Sigma-Aldrich) + 10% DTT (80 µL pour un volume de LBA initial de 1200 µL, soit une concentration des protéines de 15 fois) (**figure 2**).

Une séparation des protéines a été réalisée par migration sur gel d'électrophorèse dénaturant SDS-PAGE, puis le gel a été découpée en trois bandes, analysées séparément après une digestion à la trypsine. La séparation des peptides tryptiques a été réalisée par chromatographie haute performance en phase liquide sur un appareil Ultimate 3000 RSLCnano System (Dionex/Thermo Scientific), puis les peptides élués ont été identifiés par un spectromètre de masse Q-Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Germany). L'identification des séquences peptidiques obtenues est basée sur les banques de données Uniprot et Gene ontology. Cette analyse a été réalisée en collaboration avec la plateforme de protéomique et peptides modifiés (P3M, institut Pasteur de Lille, France). L'analyse des voies de signalisation a été effectuées à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, Redwood City, Californie, USA).

VI) **Modèle de déplétion et souris chimères**

1. Déplétion des neutrophiles

La déplétion des neutrophiles chez les souris BALB/c femelles a été obtenue par l'injection intrapéritonéale, 6h après l'infection, d'un anticorps ciblant le marqueur de surface spécifique des neutrophiles Ly6G (rat IgG2b, clone NIMP-R14) ou de l'anticorps isotype HB-152 (100 µg dans 200 µL de PBS) (240).

2. Souris chimères *Cxcr2*^{-/-}

Les souris BALB/c femelles de 7 semaines (Charles River Laboratories, France) ont été irradiées par une dose de 7,5 Gray à un débit de 15 Gray/h (Biomep) puis reconstituées sous 24h avec de la moelle osseuse de souris BALB/c (*wild type*, WT) ou de souris transgéniques (sur fond BALB/c) présentant une délétion du gène *Cxcr2* codant pour le récepteur aux chimiokines CXCR2 (Jackson, *stock number* 002724). La reconstitution a été contrôlée après 4 semaines grâce à l'analyse des cellules sanguines par cytométrie en flux, et les expériences ont été réalisées au minimum 6 semaines après la reconstitution.

VII) **Tests bactériologiques *in-vitro***

La souche de pneumocoque D-PEP-22 utilisée dans les tests bactériologiques *in-vitro* a été fournie par le Professeur J-W Veening (Department of Fundamental Microbiology, University of Lausanne). Elle est dérivée de D39 et inclut une construction plasmidique contenant le gène de la luciférase, sous le contrôle d'un promoteur constitutif de la bactérie. La demi-vie de la luciférase est de 3 min chez *S. pneumoniae*, et la luminescence émise sert donc de témoins du niveau d'activité transcriptionnelle de la bactérie en temps réel (241).

Les LBA ont été prélevés par lavage avec 3 x 1ml de PBS + 5% SVF. Les poumons perfusés avec du PBS ont été récupérés dans du milieu RPMI + 5% SVF, finement découpés aux ciseaux puis traités avec une solution de collagénase la et DNase I pendant 15 min à 37°C, avant d'être désagrégés à la seringue et filtrés à travers un filtre de 70 µm. Les suspensions cellulaires ont été centrifugées sur gradient de

Percoll 20%, puis lavées deux fois au FACS *buffer* avant d'être filtrées sur filtre de nylon. Les neutrophiles ont été purifiés à l'aide du kit de purification magnétique Neutrophil isolation kit, des colonnes MACS LS et du séparateur magnétique MACS (Miltenyi Biotec) selon les instructions du fabricant. La pureté de la fraction purifiée a été contrôlée par cytométrie en flux (marquage CD45, Ly6G, CD11b) et était supérieure à 95%.

Les bactéries D-PEP22 en milieu C+Y (à raison de 10^6 CFU) ont été déposées dans des plaques 96 puits blanches à fond plats transparent, avec 100 μ L de LBA, 10^5 neutrophiles purifiés ou du milieu seul, en présence de D-Luciférine (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) (volume total 200 μ L). La plaque a été incubée à 37°C et la luminescence et la densité optique ont été enregistrées toutes les 10 min pendant au minimum 8 h par un lecteur de plaque Spark[®] 10M (Tecan). Toutes les conditions d'incubations ont été réalisées en triplicats.

RESULTATS

l) Impact de la flagelline sur la dynamique de clairance bactérienne

La dynamique de clairance de *S. pneumoniae* a été évaluée après l'administration conjointe de flagelline et d'amoxicilline et comparée à celle de l'amoxicilline seule sur le cours de l'infection. Pour cela, les souris ont été infectées par une dose intra-nasale létale de pneumocoque Sp1 de 2×10^6 CFU, puis ont été traitées par amoxicilline à la dose subthérapeutique de 0,2 mg/kg par voie orale, associée ou non à une administration intra-nasale de flagelline, ou bien n'ont reçu aucun traitement (**figure 14A**). L'évolution de l'infection a été suivie au cours du temps par la détermination du nombre de bactéries pulmonaires et spléniques. Dans un premier temps, nous avons constaté chez les souris infectées mais non traitées une diminution du nombre de bactéries pulmonaires dans les premières heures (2×10^5 CFU à 12 h et 18 h), et une absence de dissémination systémique (bactéries spléniques indétectables) à 12 h. Cette phase peut correspondre à une phase d'adaptation, où la clairance immunitaire est plus forte que la prolifération bactérienne. Une augmentation progressive de la charge bactérienne pulmonaire est ensuite observée entre 18 h et 48 h jusqu'à atteindre 10^8 bactéries. De façon concomitante, un passage systémique avec un accroissement rapide des bactéries a été constaté dans la rate après 12 h (**figure 14B-C**). Sous amoxicilline seule (AMX+PBS), on observe une réduction initiale de la charge bactérienne pulmonaire (d'environ 10 fois à 12 h post-traitement) et un contrôle de la dissémination systémique dans les 12 premières heures post-traitement. Ensuite, la croissance bactérienne pulmonaire et la dissémination systémique augmentent rapidement jusqu'à des niveaux équivalents à ceux des souris infectées non traitées. En revanche, lorsque la flagelline est associée à l'amoxicilline (AMX+FliC $_{\Delta 174-400}$), la croissance bactérienne pulmonaire est inhibée plus longtemps et la dissémination systémique est retardée. La différence entre les deux traitements est maximale à 36 h (ou 48h post-infection), avec une réduction de la charge bactérienne pulmonaire de 10 fois pour AMX+PBS contre 10 000 fois pour AMX+FliC $_{\Delta 174-400}$ par rapport aux souris infectées non traitées. Dans le même temps, la charge bactérienne splénique associée au traitement AMX+PBS est comparable à celle des souris non traitées (autour de 10^6 CFU), tandis qu'elle est significativement inférieure (10^2 CFU) en

réponse au traitement AMX+FliC $\Delta_{174-400}$ (**figure 14B-C**). Ces résultats démontrent tout d'abord que l'efficacité des traitements est maximale 12h après administration, que ce soit pour l'antibiotique seul ou associé à la flagelline, avec néanmoins une efficacité à 6h plus importante avec le traitement combiné. De plus, l'administration intra-nasale de flagelline en association avec l'amoxicilline prolonge la durée d'inhibition de la croissance bactérienne et de la dissémination systémique par rapport à l'antibiotique seul chez la souris.

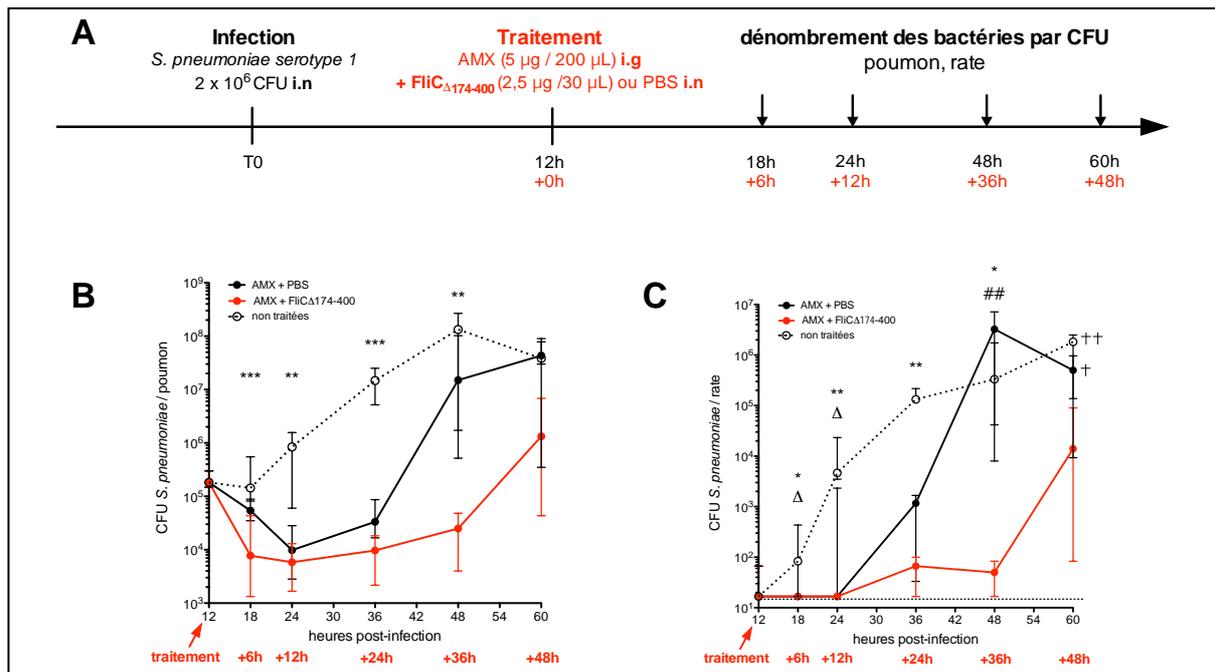


Figure 14 : Effet du traitement par amoxicilline ou amoxicilline + flagelline sur la charge bactérienne pulmonaire et splénique de souris infectées par *S. pneumoniae*. (A) Les Souris BALB/c femelles de 7 semaines (n = 6 souris par groupe) ont été infectées par 2×10^6 CFU de *S. pneumoniae* Sp1 par voie intra-nasale puis traitées 12h après par amoxicilline par voie intragastrique (5 μ g dans 200 μ l d'eau) associée à une administration intra-nasale de flagelline FliC $\Delta_{174-400}$ (2,5 μ g dans 30 μ L de PBS) ou de PBS seul, ou bien n'ont reçu aucun traitement. Les organes ont ensuite été prélevés aux temps indiqués, broyés, puis étalés sur géloses pour numération. La charge bactérienne a été mesurée dans les poumons (B) et la rate (C). Les résultats sont représentés sous forme de médiane + étendue des valeurs. La ligne pointillée représente le seuil de détection. Les données ont été comparées par le test One way ANOVA, indépendamment pour chaque temps (*** : p < 0,001 ; ** : p < 0,01 ; * : p < 0,05 ; pour AMX+FliC $\Delta_{174-400}$ vs non traitées) (Δ : p < 0,05 pour AMX+PBS vs non traitées) (## : p < 0,01 pour AMX+FliC $\Delta_{174-400}$ vs AMX+PBS). † : souris décédée.

II) Etude cinétique de la réponse immunitaire induite par la flagelline en association avec l'amoxicilline au cours de l'infection par *S. pneumoniae*

Nous avons ensuite réalisé des études transcriptomiques, protéomiques et de cytométrie en flux, dans le but d'identifier de potentiels effecteurs modulés par l'administration de flagelline, en contexte infectieux ou chez les souris naïves. L'évolution dans le temps de la réponse à la flagelline a été analysée à 2 h, 4 h et 8 h après traitement pour la réponse transcriptionnelle (dans le poumon) et entre 2 h et 48 h pour la réponse cellulaire (dans le poumon, le LBA et le sang) (**figure 15A**). L'évolution des protéines dans le LBA après administration de flagelline à des souris naïves a été étudiée grâce à l'analyse protéomique qualitative et semi-quantitative, entre 3 h et 24 h après l'administration de flagelline (**figure 15B**).

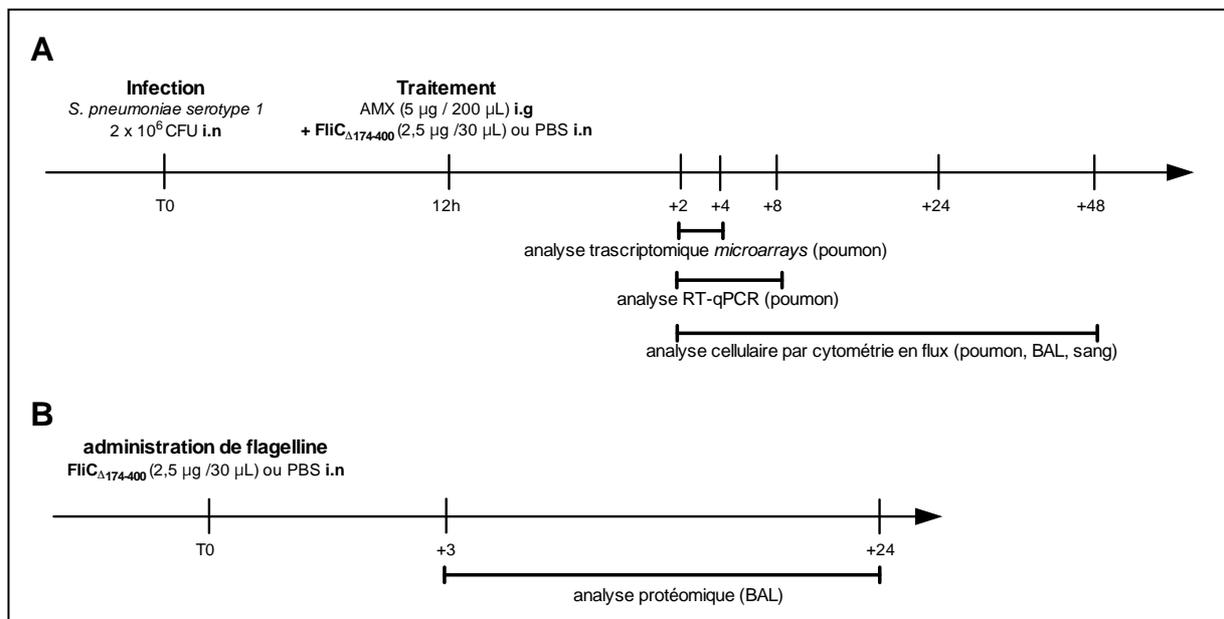


Figure 15 : Approches expérimentales développées pour caractériser les mécanismes immunitaires impliqués dans l'effet thérapeutique de la flagelline en contexte infectieux (**A**) ou à l'homéostasie, chez les souris naïves (**B**).

1. Analyse transcriptionnelle de la réponse à la flagelline au cours de l'infection et du traitement par amoxicilline

a) Analyse transcriptomique par microarrays

Des souris ont été infectées par le pneumocoque et traitées pendant 2 h et 4 h par amoxicilline seule (AMX+PBS) ou associée à la flagelline (AMX+FliC_{Δ174-400}). Les poumons ont été prélevés pour une analyse transcriptomique par *microarrays*.

L'analyse d'expression différentielle entre les souris traitées par AMX+FliC $\Delta_{174-400}$ et par AMX+PBS a mis en évidence une expression augmentée ou diminuée (*fold change* (FC) > 2) de 885 gènes à 2 h et 1079 gènes à 4 h. A partir de ces résultats, une analyse par *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) nous a permis d'identifier les voies de signalisation les plus modulées par la flagelline (**tableau 5**).

Un grand nombre de voies sont relatives à l'activation des réponses inflammatoires et antimicrobiennes. Ceci est associé notamment à une surexpression par la flagelline de gènes codant pour des cytokines proinflammatoires et récepteurs cytokiniques (IL-1 β , IL-36A/G, IL1R2, IL1RN, TNFR2, IL18RAP), ou pour des protéines liées à la transduction intracellulaire des signaux d'activation, comme IRAK3, IKK- ϵ (IKBKE), la *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 8* (MAP3K8) (**voir schéma en figure 1 de l'introduction**) ou les protéines de la famille des *phosphoinositide 3-kinases* (PI3K). De façon générale, l'expression différentielle de ces voies est généralement plus marquée à 2 h qu'à 4 h.

Les voies associées au recrutement et à l'activation des cellules immunitaires innées sont également fortement induites par la flagelline à 2 h et 4 h. Parmi les gènes liés à ces voies dont l'expression est augmentée par la flagelline, on peut citer les gènes codant pour les chimiokines CXCL2/3 (neutrophiles), CCL11 (éosinophiles), CCL17 (lymphocytes T) et CCL20 (cellules dendritiques et cellules lymphoïdes), et les récepteurs aux chimiokines ou chimioattractants exprimés par les phagocytes comme FRP1 et FRP2 (récepteurs au fMLP), ou encore le C5AR1 (récepteur au complément C5). Enfin, on retrouve une surexpression de gènes codant pour des protéases de la matrice extracellulaire facilitant le trafic cellulaire au travers des endothéliums, épithéliums et du tissu conjonctif (MMP25, MMP7, MMP8, MMP9), et des molécules d'adhésion des phagocytes aux cellules endothéliales ou épithéliales (sélectines SELE et SELP ou le syndecan SDC4).

Les voies de signalisation relatives à l'activité cellulaire antimicrobienne sont également fortement modulées. Elles sont associées notamment à la surexpression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la production de ROS (telles que la MPO ou les *neutrophil cytosolic factors* NFC1 et NFC4, régulant l'activation de la NADPH oxydase), et dans la phagocytose (comme les protéines de la famille des *Ras homolog family members* RHOB, RHOF ou RHOU jouant un rôle dans la

réorganisation du cytosquelette, ou le récepteur au fragment Fc des immunoglobulines FcγRIIIα/β)

De façon intéressante, une signature spécifique d'une réponse régulatrice est également mise en évidence dès 2 h post-administration de flagelline, en lien avec la cytokine anti-inflammatoire IL-10, impliquée dans le maintien de l'homéostasie et la résolution de l'inflammation, et avec la signalisation via le récepteur au TNF, TNFR2. La signalisation via ce récepteur induit le recrutement des facteurs anti-apoptotiques BIRC2 et BIRC3, et l'absence de TNFR2 a été associée à une exacerbation de l'inflammation tissulaire au cours d'une infection à *L. pneumophilla* chez la souris (242,243) (**tableau 5**).

Ces résultats mettent en évidence l'activation rapide des voies de signalisation impliquées dans le recrutement et l'activation des cellules innées effectrices, ainsi que des mécanismes cellulaires antimicrobiens comme la phagocytose et le burst oxydatif.

Tableau 5 : Principales voies de signalisation régulées dans le poumon de souris infectées par pneumocoque et traitées par la flagelline et amoxicilline. Les souris BALB/c femelles de 7 semaines (n = 3 souris par groupe) ont été infectées par 2×10^6 CFU de *S. pneumoniae* Sp1 par voie intra-nasale puis traitées 12h après par amoxicilline par voie intra-gastrique (5 µg dans 200 µl d'eau pour préparation injectable) associée à une administration intra-nasale de flagelline FliC $_{\Delta 174-400}$ (2,5 µg dans 30 µl de PBS) ou de PBS. Les poumons perfusés au PBS ont été prélevés 2 h et 4 h après traitement et une analyse transcriptomique a été réalisée par *microarray* après extraction de l'ARN. Les données ont ensuite été analysées grâce au logiciel *Ingenuity pathway analysis* (IPA), permettant de mettre en évidence les voies de signalisations différentiellement régulées entre les deux conditions. NS : $p > 0,05$; Vert clair : $0,05 < p > 0,01$; vert moyen : $0,01 < p > 10^{-4}$; vert foncé : $p < 10^{-4}$.

Voies de signalisation	P-value		protéines impliquées
	2h	4h	
activation des réponses inflammatoires et antimicrobiennes			
<i>IL-6 Signaling</i>	4,07E-05	4,17E-02	IRS2, IL1B, CD14, TNFRSF1B, PIK3R5, IL1R2, IL36A, IL1RN, IL18RAP, FGFR4, IL36G, PIK3C2G, IKBKE
<i>NF-κB Signaling</i>	6,17E-05	1,86E-03	IRS2, TLR7, IL1B, TNFRSF1B, PIK3R5, IL1R2, FCER1G, IL36A, IRAK3, CARD11, IL1RN, MAP3K8, FLT1, NTRK3, TLR6, FGFR4, PRKCZ, IL36G, PIK3C2G
<i>Toll-like Receptor Signaling</i>	2,69E-05	2,40E-02	TLR7, IL1RN, IL1B, CD14, TLR6, IL36A, IL36G, IRAK3
<i>p38 MAPK Signaling</i>	1,70E-04	8,91E-03	HIST1H3C, IL1RN, IL1B, TNFRSF1B, IL18RAP, IL1R2, TIFA, MAPT, FAS, IL36A, IL36G, IRAK3
<i>IL-8 Signaling</i>	5,25E-03	3,09E-03	GNA13, IRS2, MTOR, GNG7, PIK3R5, RHOC, NOX4, RAC2, RHOJ, IRAK3, CR2, FLT1, PRKCH, BCL2L1, FGFR4, PRKCZ, RHOV, PIK3C2G, PRKCG, IKBKE
<i>Acute Phase Response Signaling</i>	1,55E-04	NS	IL1RN, MTOR, IL1B, TNFRSF1B, APOH, SERPINA3, FGA, IL36A, AMBP, IL36G, FGG, IKBKE
<i>Coagulation System</i>	4,57E-04	2,82E-02	FGA, F3, PLAT, F13A1, FGG
recrutement et activation des cellules immunitaires			
<i>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	1,26E-13	1,51E-07	MMP25, MMP9, CLDN8, CCL20, IL1R2, FPR1, SELE, IL36A, CXCR4, IL1RN, C5AR1, CCL17, MMP11, IL1B, TNFRSF1B, FPR2, CCL11, CLDN15, CXCL2, TNFRSF11B, MMP7, CCL19, SELP, IL18RAP, MMP8, SDC4, CSF3, CXCL3, IL36G
<i>Agranulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	2,95E-08	1,23E-04	MMP25, MYH7, MMP11, MMP9, IL1B, CLDN8, CCL20, CCL11, MYH10, CLDN15, SELE, CXCL2, IL36A, MMP7, CCL19, CXCR4, IL1RN, SELP, C5AR1, MMP8, CCL17, SDC4, CXCL3, IL36G
<i>Leukocyte Extravasation Signaling</i>	5,25E-03	6,76E-03	MMP25, NCF4, IRS2, MMP11, MMP9, RAPGEF4, NCF1, CLDN8, PIK3R5, IRS1, CLDN15, RAC2, TXK, MMP7, CXCR4, DLC1, ITK, MMP8
<i>Dendritic Cell Maturation</i>	4,90E-04	1,91E-02	PLCD4, IRS2, IL1B, TNFRSF1B, PLCB4, PIK3R5, IRS1, COL1A2, IL36A, NFKBIA, TNFRSF11B, IL23A, CD83, IL1RN, CD80, IL36G, TLR2, FCGR3A/FCGR3B
<i>Communication between Innate and Adaptive Immune Cells</i>	1,38E-03	1,78E-05	CD83, TLR7, IL1RN, IL1B, Tlr13, CD80, IL36A, IL36G, TLR2
activités cellulaires antimicrobiennes			
<i>Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages</i>	3,16E-05	5,62E-05	NCF4, S100A8, IRS2, TNFRSF1B, MPO, NCF1, PIK3R5, MAP3K6, IRS1, NFKBIA, FOS, TNFRSF11B, APOC2, PPP1R3C, MAP3K8, RHOB, ARG2, RHOF, TLR2, RHOU
<i>Phagosome Formation</i>	1,26E-04	3,02E-07	PLCD4, IRS2, TLR7, PLCB4, PIK3R5, IRS1, SYK, RHOB, Tlr13, RHOF, TLR2, RHOU, FCGR3A/FCGR3B
réponse régulatrice			
<i>IL-10 Signaling</i>	1,26E-05	8,51E-05	FCGR2B, IL1RN, IL1B, CD14, IL18RAP, ARG2, IL10, IL1R2, IL36A, IL36G, FCGR2A, IKBKE
<i>TNFR2 Signaling</i>	1,15E-03	NS	BIRC2, TNFRSF1B, BIRC3, IKBKE

b) Confirmation par RT-qPCR

Pour confirmer les résultats transcriptomiques, nous avons réalisé une seconde expérience avec des souris infectées par la souche de pneumocoque Sp1, non traitées ou traitées par AMX+PBS ou AMX+FliC Δ 174-400 pendant 2 h, 4 h et 8 h. Plusieurs gènes, parmi les plus fortement surexprimés en transcriptomique, ont été choisis pour être validés par RT-qPCR (**figure 16A**). *Mmp8*, *Camp* et *Ngp* (dont les niveaux d'expression sont multipliés par 10 à 30 par la flagelline), codent pour des protéines fortement associées aux granules des neutrophiles, tandis que *Itgb2l* et *Retnlg* sont impliqués dans le chimiotactisme des leucocytes. *Iftim6* est associé à la défense antivirale et *Zbtb16*, codant pour le facteur de transcription PLZF, est impliqué dans le développement et la différenciation des cellules lymphoïdes innées. Son expression est multipliée par 25 à 4 h post-traitement dans l'analyse transcriptomique. Par ailleurs, l'expression de *Fkbp5*, codant pour l'immunophiline *FK506 binding protein 5* est augmentée 15 fois à 2 h et 9 fois à 4 h. FKBP5 est majoritairement reconnu pour son rôle dans la modulation de la signalisation des récepteurs aux stéroïdes et le développement de pathologies psychiatriques, mais possède également la capacité de potentialiser l'activation de la transcription NF- κ B-dépendante via l'interaction avec les protéines du complexe IKK (244). Le gène codant pour la cytokine anti-inflammatoire IL-10, dont l'expression est multipliée par 6,5 à 4h post-traitement par flagelline, a également été testé. La surexpression de ces différents gènes 2h et 4h après traitement par flagelline a été confirmée par la RT-qPCR, sauf pour *Zbtb16* et *FkBP5*, dont l'augmentation n'est ressortie significative qu'à 4 h (**figure 16B**). Ceci est en accord avec l'analyse transcriptomique pour *Zbtb16* (qui mettait en évidence en surexpression significative uniquement à 4h), mais pas pour *Fkbp5*, pour lequel la surexpression était également importante à 2 h en transcriptomique. Par ailleurs, le gène de l'IL-10 est significativement surexprimé aux temps 2 h et 4 h par RT-qPCR. Enfin, l'expression de gènes associés à la réponse pro-inflammatoire à la flagelline, codant pour les chimiokines CCL20 et CXCL2, la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β et le peptide antimicrobien S100A9, a été étudiée en parallèle dans cette analyse RT-qPCR. Les résultats indiquent également une surexpression significative de ces gènes par la flagelline à 2 h et/ou 4 h post-traitement (**figure 16B**).

Au cours de cette étude par RT-qPCR, nous avons également analysé plus spécifiquement l'effet transcriptionnel propre à l'infection (souris infectées et non traitées) par rapport à l'état basal (souris naïves) (**figure 16C**). Les résultats chez les souris non traitées montrent que l'infection pneumococcique en elle-même induit une forte augmentation de la transcription pulmonaire de certains gènes pro-inflammatoires, notamment ceux codant CCL20 et CXCL2 (environ 350 et 200 fois, respectivement), ou IL-1 β (50 fois). Une augmentation plus modérée, voire une absence d'effet a été notée pour les autres gènes analysés. Cependant, l'administration de flagelline induit une forte surexpression de ces gènes qui vient potentialiser celle due à l'infection. L'effet de la flagelline est généralement maximal à 2 h, puis diminue progressivement à 4 h et 8 h. Par ailleurs, le traitement par AMX seule en contexte d'infection ne semble par influencer l'expression des gènes étudiés (**figure 16C**).

Une exception est cependant observée pour le gène *Zbtb16*, codant pour le facteur transcriptionnel *promyelocytic leukaemia zinc finger* (PLZF), impliqué dans le développement et les fonctions des ILC, cellules NK, NKT et lymphocytes T $\gamma\delta$. Le traitement AMX+FliC $\Delta_{174-400}$ augmente sensiblement les transcrits de *Zbtb16* (2 à 3 fois) à 2 h, 4 h ou 8 h post-traitement par rapport aux souris naïves. En revanche, le traitement par l'amoxicilline seule a été associé à une diminution d'expression 4 h post-traitement (divisée par 6 par rapport aux naïves). Cela explique qu'une différence significative de l'expression de *Zbtb16* ait été observée entre les groupes AMX+FliC $\Delta_{174-400}$ et AMX+PBS à 4 h mais pas à 2h (**figure 16A-B**). Des études complémentaires seraient nécessaires pour déterminer si ces résultats impliquent une inhibition de l'expression du gène sous l'effet de l'amoxicilline ou une variation du nombre de cellules lymphoïdes exprimant *Zbtb16* dans le poumon.

En conclusion, ces résultats apportent d'une part, une validation de l'analyse transcriptomique, et d'autre part, davantage de précisions sur la cinétique de la réponse transcriptionnelle pulmonaire en réponse à l'administration intra-nasale de flagelline au cours de l'infection pneumococcique. Cet effet est rapide, maximal dès 2 h après administration, mais transitoire, avec une diminution progressive à 4 h et 8 h.

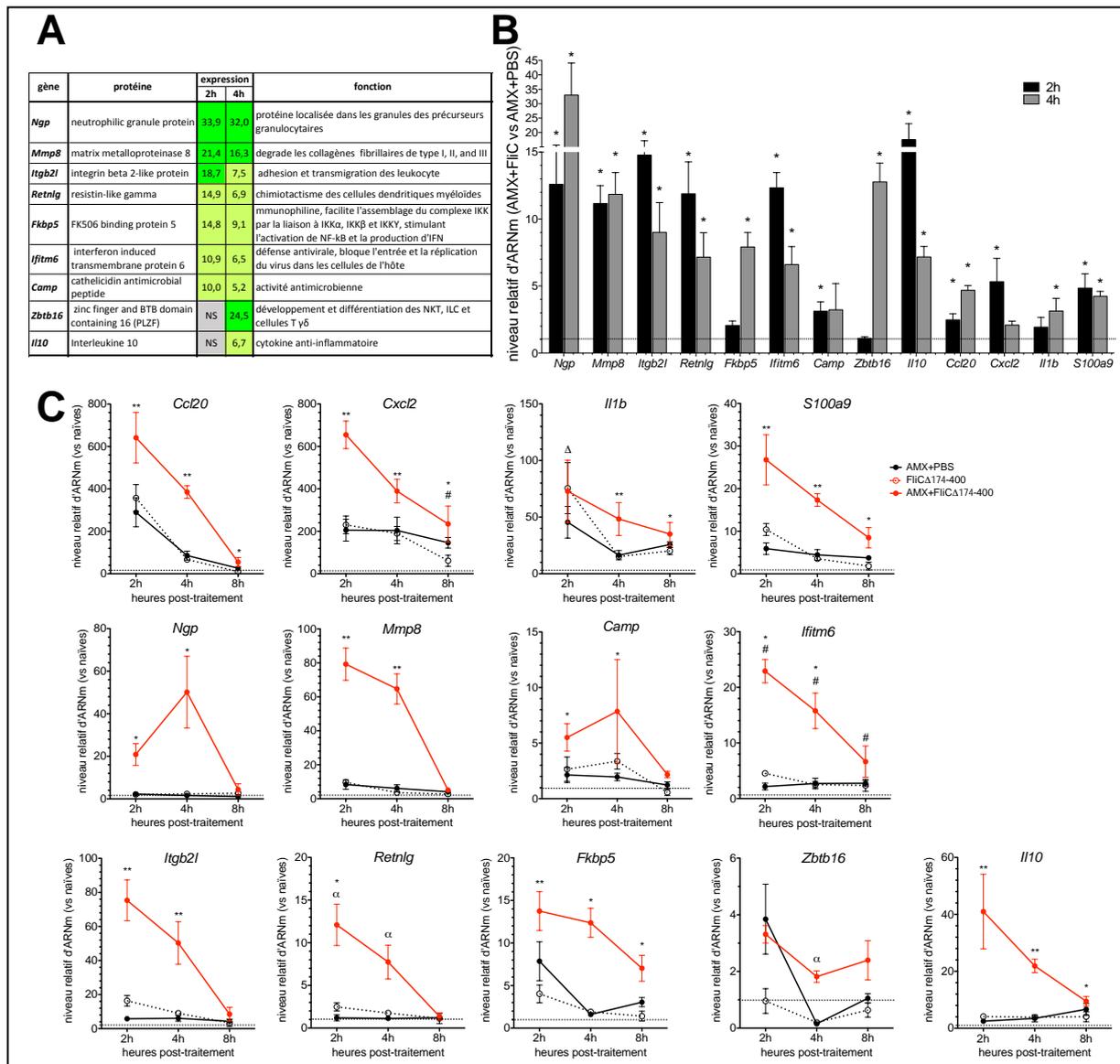


Figure 16 : Analyse par de la réponse transcriptionnelle pulmonaire induite par la flagelline au cours de l'infection à pneumocoque. A) Expression relative (AMX+FliC / AMX+PBS) des gènes d'intérêt au cours de l'analyse transcryptomique. B-C) Les souris BALB/c femelles de 7 semaines (n = 3-4 souris par groupe) ont été infectées par 2×10^6 CFU de *S. pneumoniae* Sp1 par voie intra-nasale puis traitées 12 h après par amoxicilline par voie intra-gastrique (5 μ g dans 200 μ L d'eau) associée à une administration intra-nasale de flagelline FliC Δ 174-400 (2,5 μ g dans 30 μ L de PBS) ou de PBS seul. Un groupe de souris n'a pas été traité. Les poumons ont été prélevés 2 h, 4 h et 8 h après traitement, puis l'ARN a été extrait et l'ARNm rétrotranscrit en ADN complémentaire. L'expression des gènes a été mesurée par PCR quantitative. Le niveau d'expression relative de chaque gène est exprimé par rapport au gène de référence *Actb* et au groupe AMX+PBS (B) ou aux souris naïves (non infectées, non traitées) (C). Le niveau d'ARN relatif fixé à 1 (ligne pointillée) correspond à une absence d'activation. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. L'étude des différences statistiques entre les groupes AMX+FliC Δ 174-400 et AMX+PBS a été réalisée grâce au test de Mann Whitney (* : p < 0,05) (B). Les différences statistiques entre les différents groupes (C) ont été étudiées par le test One way ANOVA, indépendamment pour chaque temps (: p < 0,01 ; * : p < 0,05 ; pour AMX+FliC Δ 174-400 vs naïves) (Δ : p < 0,05 pour non traités vs naïves) (# : p < 0,05 pour AMX+PBS vs naïves, α : p < 0,05 pour AMX+FliC Δ 174-400 vs AMX+PBS).**

2. Analyses protéomiques des voies aériennes en réponse à la flagelline

Une première analyse protéomique du LBA de souris traitées par une administration intra-nasale de flagelline a été réalisée, entre 3h et 24 h après le traitement (**figure 17A-B**). Le nombre de spectres spécifiques d'une protéine identifiés par la spectrométrie de masse apporte une information semi-quantitative de la quantité initiale de la protéine dans l'échantillon. Le calcul du ratio (nombre de spectre dans le groupe Flagelline / nombre de spectre dans le groupe de souris contrôles) nous a permis d'apprécier l'impact de la flagelline sur la production et la sécrétion des différentes protéines dans les voies aériennes. Ainsi, le nombre de protéines dont le taux est augmenté par la flagelline dans les voies aériennes (ratio > 2,5) était de 20 à 3 h, 40 à 6 h, 26 à 12 h, 82 à 18 h et 36 à 24 h, suggérant une réponse maximale 18h post-administration (**figure 17C**).

La flagelline a induit particulièrement la production de protéines possédant des propriétés antimicrobiennes, spécifiques des granulocytes. Ces protéines sont stockées dans les granules des cellules pour être libérées rapidement dans le but d'éliminer les microorganismes. Parmi ces protéines figurent la NGP (augmentée 10 à 20 fois), la MPO (impliquée dans la production de ROS), les protéines antimicrobiennes CAMP, BPI, lactoferrine et S100A8/S100A9 (qui s'associent pour former le complexe de la calgranuline) ainsi que la lipocaline 2 (ou *neutrophil-gelatinase associated-protein*, NGAL) (**figure 17D**). Le taux de ces protéines est maximal à 18 h (sauf pour la NGP et la lactoferrine dont le taux est plus élevé à 6h). L'administration intra-nasale de flagelline stimulant fortement le recrutement pulmonaire de neutrophiles (via la production locale de chimiokines) (209,215), l'augmentation des protéines dans les voies aériennes est probablement en lien avec ce recrutement. Des études complémentaires *in vitro* seront cependant nécessaires pour déterminer si la flagelline stimule effectivement la dégranulation des neutrophiles recrutés.

La protéine C3 du complément, ainsi que les facteurs B (CFB, activateur) et H (CFH, inhibiteur) apparaissent également induits par la flagelline. De façon intéressante, les variations de C3 et du facteur activateur CFB ont montré un profil comparable, avec un maximum à 18 h et un taux plus faible à 6h, tandis que le facteur inhibiteur CFH suit l'évolution inverse, avec un maximum à 6h et une diminution à 18h, suggérant

une régulation temporelle des voies du complément suite à l'administration de flagelline (figure 17E).

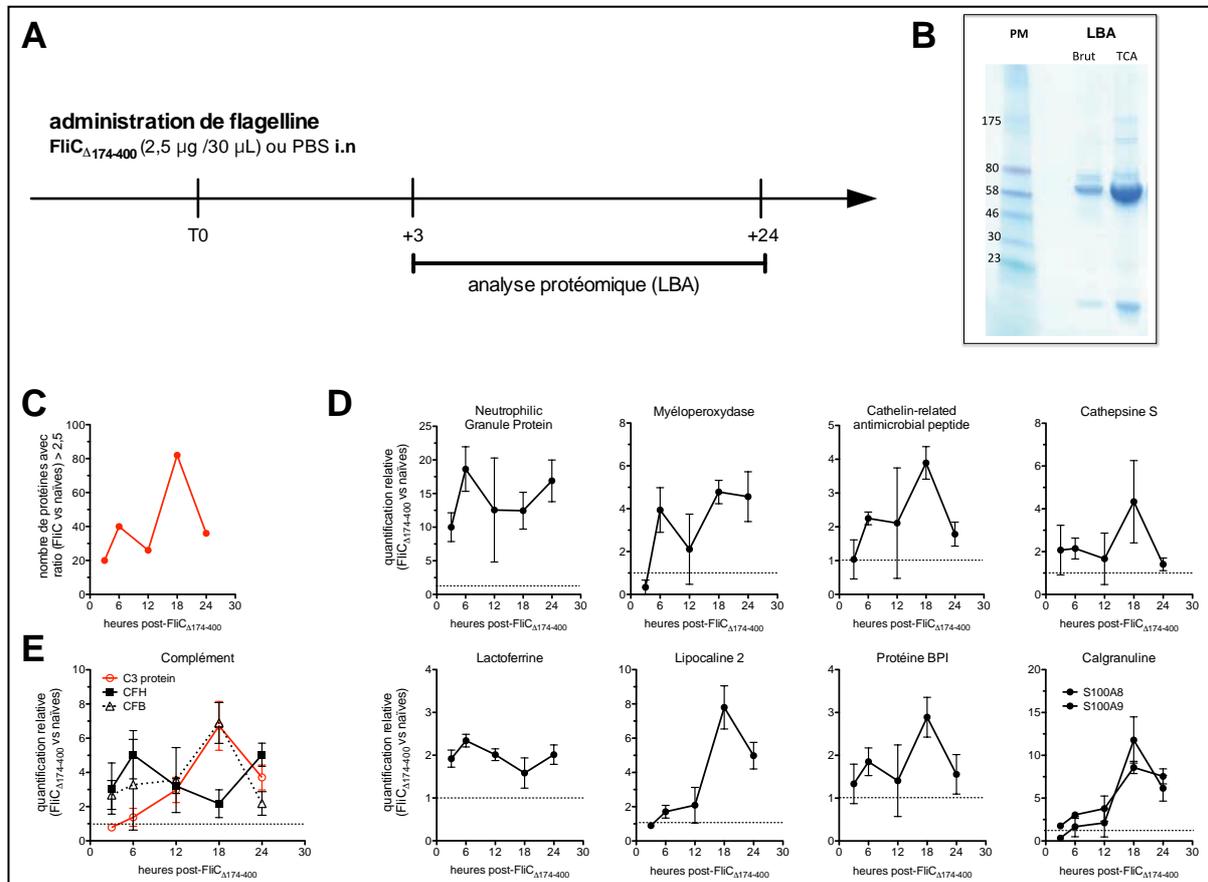


Figure 17 : Etude protéomique du LBA de souris traitées par la flagelline. (A) Les souris BALB/c femelles de 7 semaines ($n = 3$ par groupe) ont reçu une administration intra-nasale de flagelline (2,5 μ g dans 30 μ l de PBS) ou de PBS pour le groupe de souris naïves servant de référence. Les LBA ont été prélevés 3 h, 6 h, 12 h, 18 h et 24 h après administration. Après concentration des protéines par l'acide trichloroacétique (TCA), une analyse protéomique a été réalisée par chromatographie associée à la spectrométrie de masse. **(B)** électrophorèse sur gel SDS-PAGE (gradient 4-12%) d'un volume équivalent de LBA avant (Brut) et après concentration des protéines par le TCA. Les protéines ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie. Un marqueur de poids moléculaire (PM), contenant un mélange de protéines de poids moléculaires connus, a été utilisé en parallèle (les PM correspondant à chaque bande sont indiqués en kDa). **(C)** Nombre de protéines dont le ratio du nombre de spectre est augmenté d'un facteur 2,5 ou plus dans le groupe FliC Δ 174-400 par rapport aux souris naïves, ou dont le nombre moyen de spectre est $\geq 2,5$ lorsque la protéine n'était pas détectée dans le groupe de souris naïves. **(D-E)** Evolution cinétique du taux relatif des protéines dans le LBA de souris traitées par la flagelline par rapport aux souris naïves. La ligne pointillée représente le taux dans le groupe de souris naïves, arbitrairement fixé à 1.

Une analyse IPA des données protéomiques a mis en évidence une activation des voies de signalisation impliquées dans le recrutement de leucocytes, principalement autour de 18-24 h (**tableau 6**). Les voies associées à l'activité antimicrobienne, comme la phagocytose et la production de ROS, les systèmes du complément et de la coagulation, ainsi que du granzyme A (protéine cytotoxique et bactéricide produite notamment par les lymphocytes T et cellules NK) sont activées dès 3 h ou 6 h, même si leur taux est généralement maximal à 18 h (**tableau 6**). Ces résultats semblent donc concorder avec ceux de la transcriptomique puisque les mêmes voies de signalisation ont été identifiées par les deux types d'analyse. Cependant, une étude protéomique du LBA au cours de l'infection des souris par la souche de pneumocoque Sp1 (actuellement en cours d'analyse), sera nécessaire pour confirmer la pertinence de ces résultats dans le contexte infectieux.

Il est important de noter que ces analyses donnent essentiellement un aperçu général des gènes/protéines mobilisés et des voies de signalisations activées par l'administration intra-nasale de flagelline, mais pas de leurs rôles respectifs dans l'effet anti-infectieux de la flagelline, qui devront être investigués par des tests fonctionnels.

Tableau 6 : Analyse IPA de l'étude protéomique du LBA de souris traitées par la flagelline. Les souris BALB/c femelles de 7 semaines (n=3 par groupe) ont reçu une administration intra-nasale de flagelline (2,5 µg dans 30 µl de PBS) ou de PBS pour le groupe de souris naïves servant de référence. Les LBA ont été prélevées 3 h, 6 h, 2 h, 18 h et 24 h après administration de flagelline et une analyse protéomique a été réalisée par chromatographie associée à la spectrométrie de masse. A partir de ces résultats, une analyse des voies de signalisation a été réalisée grâce au logiciel *Ingenuity pathway analysis* (IPA), en prenant en compte les taux relatifs de chaque protéine dont le ratio du nombre de spectre (FliC_{Δ174-400} vs naïves) est > 2, où dont le nombre moyen de spectre est > 2 dans le cas d'une absence de détection de la protéine dans le groupe de souris naïves. Vert clair : p > 0,05 ; vert moyen : 0,05 < p > 10⁻⁴ ; vert foncé : p < 10⁻⁴.

Voie de signalisation	P-value					protéines
	3h	6h	12h	18h	24h	
recrutement des cellules immunitaires et signalisation						
<i>Acute Phase Response Signaling</i>	ND	5,89E-03	3,63E-03	2,04E-06	2,24E-03	CFB, SERPINA3, PLG, C3, ITIH4, HP, CP, SERPINF2, SERPINA1,
<i>agranulocyte adhesion and diapedesis</i>	ND	NS	NS	NS	2,88E-04	Cxcl15, MSN, ACTG1, ICAM1, MYH9
<i>leucocytes extravasation signaling</i>	ND	NS	NS	NS	4,57E-04	VLC, MSN, ACTG1, ACTN1, ACTN4, ICAM1
<i>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	NS	NS	NS	2,45E-02	2,19E-03	HSPB1, Cxcl15, MSN, ICAM1
<i>epithelial adherens junction signaling</i>	ND	NS	NS	NS	1,02E-03	VLC, ACTG1, ACTN1, ACTN4, MYH9
activité antimicrobienne						
<i>Granzyme A signaling</i>	NS	8,91E-08	4,47E-08	4,37E-05	3,63E-07	HIST1H1C, HIST1H1D, Hist1h1e, HIST1H1T, HMGB2
<i>Complement System</i>	4,79E-02	2,88E-03	4,17E-05	7,24E-03	4,79E-06	CFH, CFB, C3, Scgb2b27 (includes others)
<i>Coagulation System</i>	4,47E-02	5,89E-05	1,86E-03	2,40E-04	NS	SERPINC1, KNG1, PLG, SERPINF2, SERPINA1,
<i>Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages</i>	NS	NS	NS	5,62E-04	2,14E-02	PPP1R14A, MPO, CLU, S100A8, SERPINA1, RHOC,
<i>Phagosome Maturation</i>	NS	4,07E-02	NS	1,74E-03	NS	MPO, PRDX2, CTSS, PRDX5,
<i>clathrin-mediated endocytose signaling</i>	NS	NS	NS	5,01E-03	2,29E-02	CLU, S100A8, HSPA8, SERPINA1, ACTG1

3. Analyse du recrutement cellulaire pulmonaire induit par la flagelline au cours du traitement de l'infection à pneumocoque

Les données de transcriptomique et protéomique suggèrent une modulation des voies du recrutement et de l'activation des cellules myéloïdes (dont les granulocytes) pulmonaires, ainsi que leurs capacités antimicrobiennes. Nous avons analysé par cytométrie en flux l'impact de la flagelline sur trois populations cellulaires myéloïdes potentiellement impliquées dans l'effet thérapeutique de la flagelline : les neutrophiles, les monocytes inflammatoires (CCR2⁺) et les macrophages alvéolaires résidents (**figure 18A**). Les populations ont été étudiées dans le parenchyme pulmonaire (**figure 18B**), le LBA (**figure 18C**) et le sang (**figure 18D**) de souris

infectées par le pneumocoque entre 2 h et 48 h après traitement des souris par amoxicilline seule (AMX+PBS) ou associée à la flagelline (AMX+ FliC $_{\Delta 174-400}$).

Les neutrophiles sont massivement recrutés dans le parenchyme pulmonaire dès 2 h après administration du traitement chez les souris traitées AMX+ FliC $_{\Delta 174-400}$ (4 fois par rapport aux souris AMX+PBS). Ce recrutement lié à la flagelline est cependant transitoire et le nombre de neutrophiles rejoint celui des souris AMX+PBS dès 12 h post-traitement (**figure 18B**). Dans le LBA, on peut observer deux vagues de recrutement de neutrophiles, l'une à 4 h et l'autre à 24 h (**figure 18C**). Si l'origine de la première vague est corrélée avec l'augmentation des neutrophiles dans le parenchyme à 2 h, l'origine de la deuxième vague de neutrophiles dans le LBA reste à déterminer. Dans le sang, la proportion de neutrophiles est d'environ 15 à 20% chez les souris infectées (contre 8% chez les souris naïves). Chez les souris traitées par AMX+PBS, ce pourcentage augmente ensuite jusqu'à 40% à 18 h, tandis qu'il reste stable autour de 20% chez les souris traitées par AMX+ FliC $_{\Delta 174-400}$ (**figure 18D**).

La flagelline stimule également le recrutement de monocytes inflammatoires CCR2⁺ dans le poumon et le LBA de façon transitoire à 4 h post-traitement (**figure 18B**). Ce taux diminue ensuite chez les souris traitées par flagelline par rapport au groupe AMX+PBS chez qui le nombre de monocytes augmente fortement à 18 h dans le parenchyme pulmonaire et le sang (**figure 18C-D**). La diminution du recrutement des monocytes inflammatoires par la flagelline pourrait potentiellement avoir pour effet de réduire la réaction inflammatoire délétère au niveau du tissu pulmonaire. Par ailleurs, la flagelline n'a pas d'impact significatif sur le nombre de macrophages alvéolaires dans le parenchyme pulmonaire et le LBA (**figure 18B-C**).

Pris dans leur ensemble, ces différentes analyses suggèrent un rôle important des neutrophiles recrutés dans l'effet anti-infectieux de la flagelline, par les mécanismes de phagocytose, burst oxydatif et production de peptides antimicrobiens.

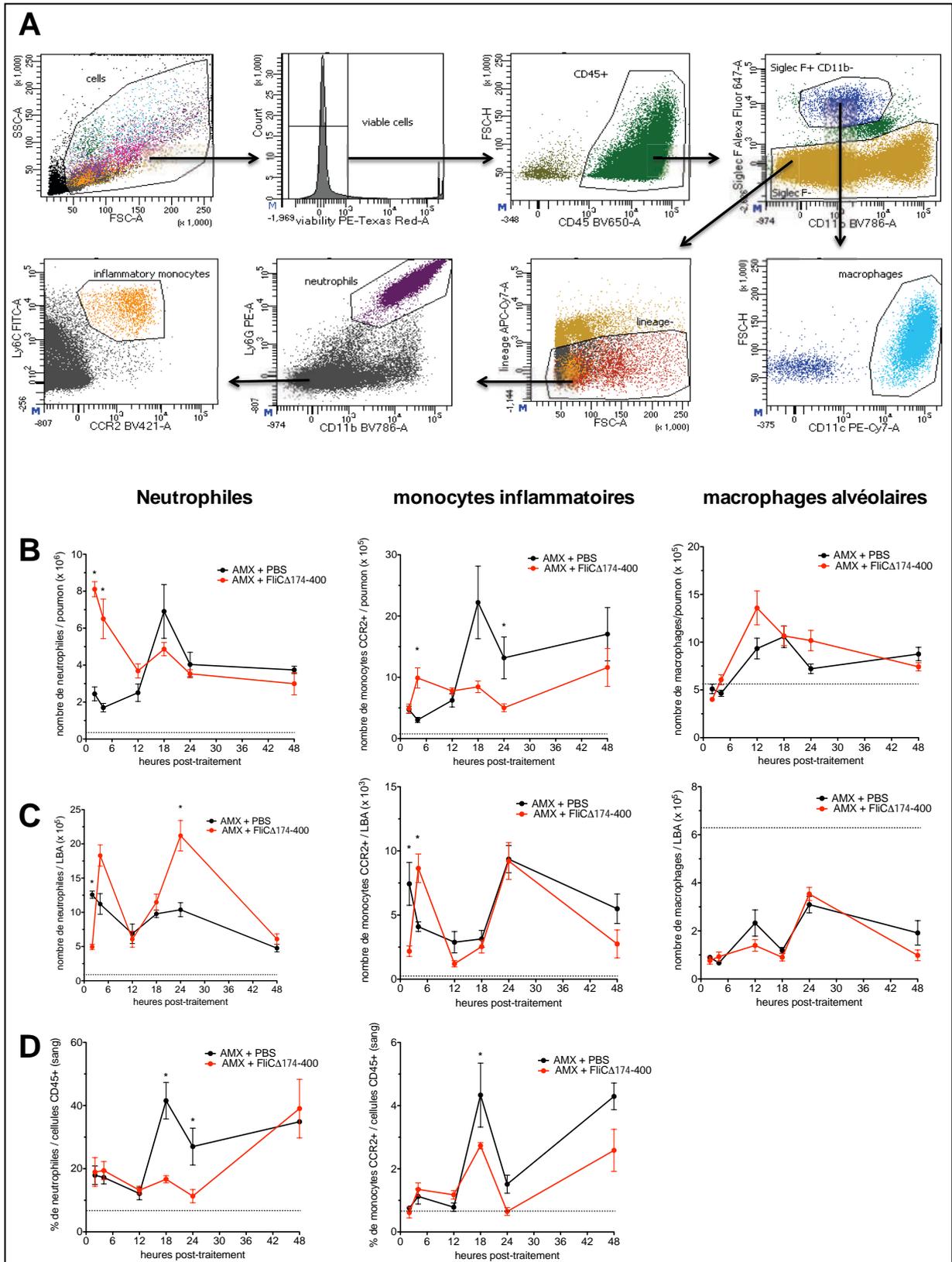


Figure 18 : Analyse cinétique des populations cellulaires par cytométrie en flux. Les souris BALB/c femelles de 7 semaines ($n = 4$ souris par groupe) ont été infectées par 2×10^6 CFU de *S. pneumoniae* Sp1 par voie intra-nasale puis traitées 12 h après par amoxicilline (AMX) par voie intra-gastrique ($5 \mu\text{g}$ dans $200 \mu\text{L}$ d'eau) associée à une administration intra-nasale de flagelline FliC Δ 174-400 ($2,5 \mu\text{g}$ dans $30 \mu\text{L}$ de PBS) ou de PBS seul. Les poumons, le LBA et le sang ont été prélevés 2 h, 4 h, 12 h, 18 h, 24 h et 48 h après traitement. Les

suspensions cellulaires ont été marquées par un mélange d'anticorps spécifiques de marqueurs de surface et analysées par cytométrie en flux. **(A)** Après exclusion des cellules mortes (iodure de propidium⁺) et des lymphocytes T et B (lignage CD3, B220) de l'analyse, les neutrophiles ont été définis comme les cellules CD45⁺ SiglecF^{Neg} CD11b⁺ Ly6G⁺, les monocytes inflammatoires comme CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺ CCR2⁺ et les macrophages alvéolaires comme CD45⁺ SiglecF⁺ CD11b^{Neg} CD11c⁺ (exemple d'un échantillon de cellules pulmonaires). Les cellules ont été identifiées dans le parenchyme pulmonaire **(B)**, le LBA **(C)** et le sang **(D)**. La ligne pointillée représente les taux ou pourcentage de chaque population chez les souris naïves (non infectées, non traitées). Les données sont présentées sous forme de moyenne + SEM, et les groupes AMX+PBS et AMX+ FliC_{Δ174-400} ont été comparés par le test de Mann Whitney (* : p < 0.05).

III) Implication des neutrophiles dans l'effet anti-infectieux du traitement combiné AMX + FliC_{Δ174-400}

Les études observationnelles nous ont conduit à émettre l'hypothèse que le recrutement de neutrophiles joue un rôle essentiel dans l'efficacité anti-infectieuse de la flagelline combinée à l'antibiothérapie contre l'infection respiratoire à pneumocoque. Pour tester cette hypothèse, deux approches ont été réalisées : i) une déplétion des neutrophiles par administration aux souris d'un anticorps anti-Ly6G et ii) des souris chimères *Cxcr2*^{-/-} présentant un défaut de recrutement des neutrophiles.

1. Déplétion des neutrophiles

Les souris ont été infectées par une dose létale de pneumocoque, puis la déplétion des neutrophiles a été obtenue par administration intrapéritonéale d'un anticorps anti-Ly6G 6 h après l'infection (les souris contrôles ont reçu un anticorps isotype). Les souris ont ensuite été divisées en groupes: non traitées, traitées 12 h après l'infection par amoxicilline seule (AMX+PBS) ou combinée à la flagelline (AMX+FliC_{Δ174-400}). La charge bactérienne pulmonaire et splénique a été mesurée 12 h après administration des traitements **(figure 19A)**. Une étude de cytométrie en flux a tout d'abord montré que l'anticorps anti-Ly6G éliminait > 90% des neutrophiles du poumon et du LBA par rapport aux souris ayant reçu l'anticorps isotype **(figure 19B)**. Chez les souris contrôles (isotype), le traitement combiné (AMX+FliC_{Δ174-400}) a démontré comme attendu un effet thérapeutique significativement supérieur au traitement AMX+PBS. Chez les souris rendues neutropéniques, aucune différence n'a été démontrée entre traitement combiné et

traitement par amoxicilline seule (**figure 19C**). Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse que les neutrophiles jouent un rôle essentiel dans l'efficacité anti-infectieuse de la flagelline. En revanche, la supériorité du traitement combiné est toujours observée dans la rate des souris traitées par l'anticorps anti-Ly6G (**figure 19D**). Cela suggère que d'autres mécanismes, indépendants du recrutement des neutrophiles, seraient impliqués dans le contrôle de la dissémination / prolifération systémique de la bactérie avec le traitement AMX+FliC $_{\Delta 174-400}$.

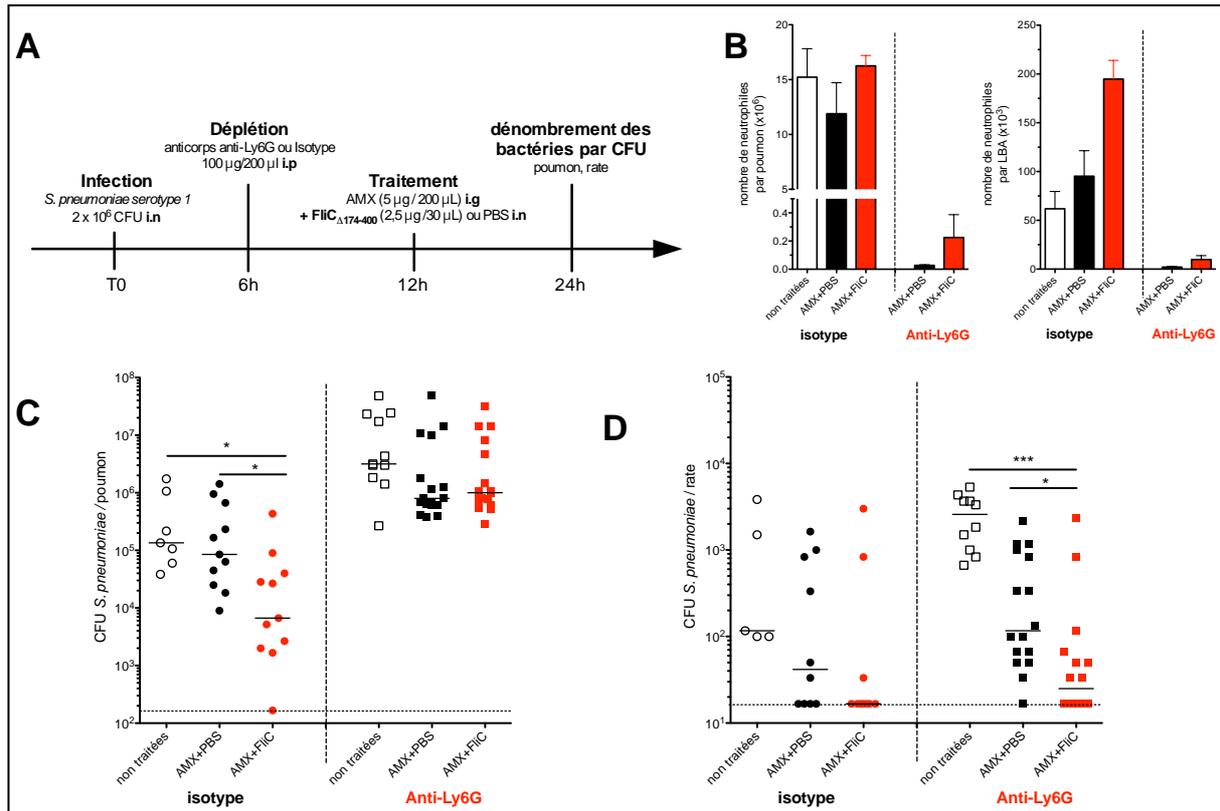


Figure 19 : Effet du traitement AMX+FliC $_{\Delta 174-400}$ contre l'infection pneumococcique en contexte de déplétion des neutrophiles. (A) Les souris BALB/c femelles de 7 semaines ont été infectées par 2×10^6 CFU de *S. pneumoniae* Sp1 par voie intra-nasale, puis ont reçu 6 h après une injection intrapéritonéale d'anticorps anti-Ly6G ou isotype contrôle (100 μ g dans 200 μ l de PBS). Les souris ont ensuite été traitées 12 h après infection par amoxicilline par voie intragastrique (5 μ g dans 200 μ l d'eau pour préparation injectable) associée à une administration intra-nasale de flagelline FliC $_{\Delta 174-400}$ (2,5 μ g dans 30 μ l de PBS) ou de PBS, ou bien n'ont reçu aucun traitement. Les organes ont été prélevés 12 h après le traitement. Les suspensions cellulaires de poumon et de LBA ont été marquées par un mélange d'anticorps fluorescents et analysées par cytométrie en flux. **(B)** Nombre de neutrophiles (CD45 $^+$ Siglec $^-$ Ly6G $^+$ CD11b $^+$) dans le poumon et le LBA. **(C,D)** Les poumons et les rates ont été broyés et la charge bactérienne a été mesurée après étalement des broyats sur gélose. Les résultats sont représentés sous forme de valeurs individuelles + médiane. La ligne pointillée représente le seuil de détection. Les données ont été comparées par le test One way ANOVA (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; * : $p < 0,05$).

2. Souris chimères $Cxcr2^{-/-}$

Afin de consolider les résultats obtenus avec l'expérience de déplétion, nous avons utilisé un modèle de souris possédant une déficience du recrutement de neutrophiles. Pour cela, nous avons utilisé des souris $Cxcr2^{-/-}$, présentant une inactivation du gène codant pour le récepteur CXCR2, impliqué dans le recrutement des neutrophiles par les chimiokines CXCL1/2/3/5/7 chez la souris. Nous avons créé des chimères par irradiation de souris BALB/c *wild type* (WT) et reconstitution avec de la moelle de souris $Cxcr2^{-/-}$ ($Cxcr2^{-/-} \rightarrow WT$). Des souris irradiées reconstituées avec de la moelle de souris WT (WT \rightarrow WT) ont servi de témoin de reconstitution. L'irradiation détruisant les cellules à renouvellement rapide comme les cellules médullaires, mais pas les cellules stromales radiorésistantes, le phénotype $Cxcr2^{-/-}$ chez les souris chimères concerne essentiellement les leucocytes produits par la moelle osseuse. L'analyse par cytométrie en flux des neutrophiles sanguins a montré que plus de 99% des neutrophiles expriment CXCR2 à leur surface chez les souris WT \rightarrow WT, tandis que cette expression est absente chez les souris $Cxcr2^{-/-} \rightarrow WT$ à près de 99%, validant ainsi le modèle (**figure 20A**). Après infection, un défaut de recrutement de neutrophiles dans le poumon et les voies aériennes a été observé chez les souris $Cxcr2^{-/-} \rightarrow WT$ par rapport aux souris contrôles (WT \rightarrow WT). En revanche, le pourcentage sanguin de neutrophiles et son augmentation suite à l'infection ne sont pas impactés par l'absence d'expression de CXCR2 (**figure 20B**).

Afin d'étudier l'effet de la flagelline dans ce contexte, les souris chimères WT \rightarrow WT et $Cxcr2^{-/-} \rightarrow WT$ ont été infectées par Sp1 et traitées à 12 h par AMX seule (AMX+PBS) ou combinée à la flagelline (AMX+FliC $_{\Delta 174-400}$) ou laissées non traitées, puis la charge bactérienne pulmonaire a été déterminée dans le poumon et la rate 12 h après le traitement. Chez les souris témoins (WT \rightarrow WT) nous avons observé un effet significativement supérieur du traitement combiné par rapport au traitement par AMX seule sur la charge bactérienne dans le poumon (**figure 20C**). Chez les souris $Cxcr2^{-/-} \rightarrow WT$, cet effet est aboli. Aucune différence n'est observée dans la rate entre les souris traitées par AMX+PBS et AMX+FliC $_{\Delta 174-400}$, (**figure 20D**).

L'absence d'effet protecteur de la flagelline dans ces deux modèles confirme donc le rôle essentiel des neutrophiles dans l'efficacité du traitement combiné contre l'infection à pneumocoque.

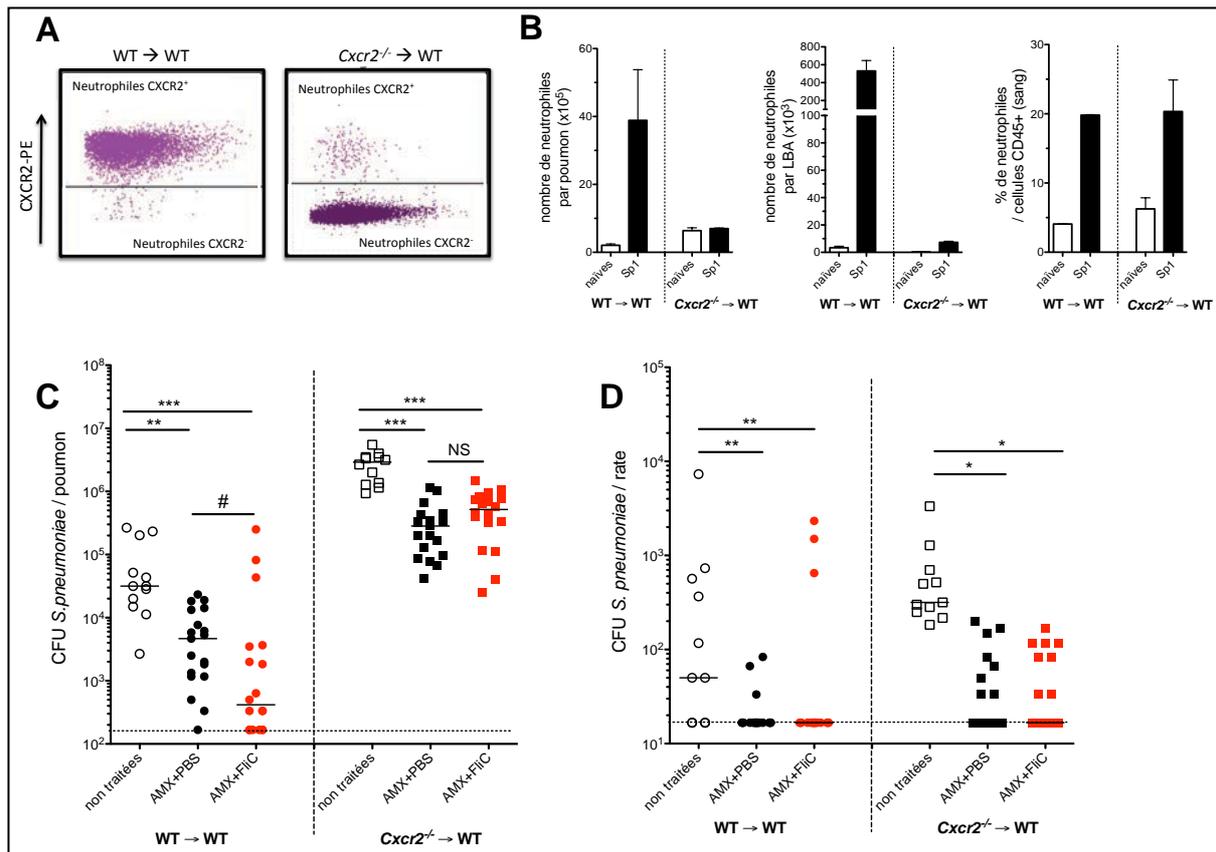


Figure 20 : Effet du traitement AMX + FliC_{Δ174-400} contre l'infection pneumococcique chez les souris chimères *Cxcr2*^{-/-}. Les souris BALB/c femelles ont été irradiées puis reconstituées avec une suspension cellulaire de moelle osseuse provenant de souris BALB/c *wild type* (WT → WT) ou de souris transgéniques *Cxcr2*^{-/-} (*Cxcr2*^{-/-} → WT). **(A)** Expression de CXCR2 à la surface des neutrophiles sanguins (CD45⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺) de souris WT → WT et *Cxcr2*^{-/-} → WT, 4 semaines après la reconstitution (n = 2 par groupe). **(B)** Les souris WT → WT et *Cxcr2*^{-/-} → WT ont été infectées par 2 x 10⁶ Sp1 ou non infectées (naïves) et le nombre de neutrophiles dans le poumon, le LBA et le sang a été déterminé par cytométrie en flux 24h après l'infection (n = 2 par groupe). **(C,D)** Les souris WT → WT et *Cxcr2*^{-/-} → WT ont été infectées par 2 x 10⁶ CFU de *S. pneumoniae* Sp1 par voie intra-nasale, puis traitées 12 h après infection par amoxicilline par voie intragastrique (5 µg dans 200 µl d'eau pour préparation injectable) associée à une administration intra-nasale de flagelline FliC_{Δ174-400} (2,5 µg dans 30 µL de PBS) ou de PBS seul, ou bien n'ont reçu aucun traitement. La charge bactérienne a été mesurée dans les poumons **(C)** et la rate **(D)** prélevés 12 h après le traitement. Les résultats sont représentés sous forme de valeurs individuelles + médiane. La ligne pointillée représente le seuil de détection. Les données ont été comparées par One way ANOVA entre tous les groupes (***) : p < 0,001 ; ** : p < 0,01 ; * : p < 0,05) et par le test de Mann et Whitney entre les groupes AMX+PBS et AMX+FliC_{Δ174-400} (# : p < 0,05 ; NS : p > 0,05).

3. Etude phénotypique des neutrophiles recrutés au cours du traitement par la flagelline

Afin de poursuivre la caractérisation des neutrophiles recrutés, leur phénotype a été analysé. Pour cela, l'expression de marqueurs d'activation par les neutrophiles du parenchyme et des voies aériennes a été mesurée par cytométrie en flux chez les souris infectées par le pneumocoque et traitées par AMX+PBS ou AMX+FliC $_{\Delta 174-400}$. L'analyse cellulaire a été réalisée 4 h après administration des traitements, temps pour lequel la différence de nombre de neutrophiles entre les souris traitées par AMX+FliC $_{\Delta 174-400}$ et par AMX+PBS est maximale (**figure 18**). Les variations de CD49d, décrit comme marqueur spécifique des neutrophiles pro-inflammatoires N1, du marqueur *stem cell antigen-1* (Sca-1) exprimé notamment par les précurseurs hématopoïétiques et des progéniteurs de la lignée granulopoïétique, et de CD11b (une intégrine impliquée dans le recrutement et la phagocytose) ont été étudiées à la surface des neutrophiles. Aucune différence significative du niveau d'expression de ces différents marqueurs n'a été observée entre les neutrophiles du poumon et du LBA de souris non traitées, ou traitées par amoxicilline seule ou combinée à la flagelline (**figure 21**). La flagelline ne semble donc pas modifier l'état d'activation des neutrophiles recrutés au niveau du parenchyme pulmonaire et du LBA, tout au moins concernant l'expression des marqueurs étudiés ici.

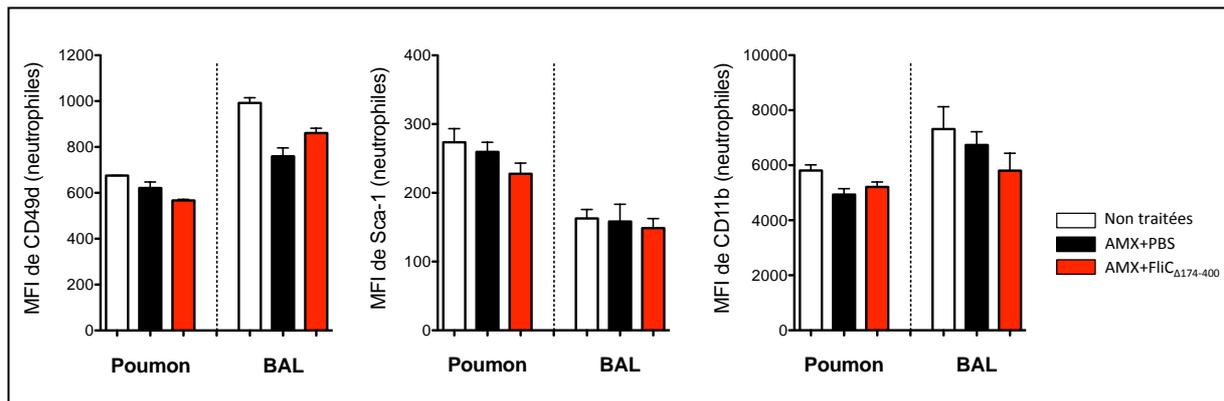


Figure 21 : Analyse phénotypique des neutrophiles par cytométrie en flux. Les souris BALB/c femelles de 7 semaines ($n = 4$ souris par groupe) ont été infectées par 2×10^6 CFU de *S. pneumoniae* Sp1 par voie intra-nasale puis traitées 12 h après par amoxicilline par voie intra-gastrique ($5 \mu\text{g}$ dans $200 \mu\text{l}$ d'eau) associée à une administration intra-nasale de flagelline FliC Δ 174-400 ($2,5 \mu\text{g}$ dans $30 \mu\text{L}$ de PBS) ou de PBS seul, ou laissées non traitées. Les poumons et le LBA ont été prélevés 4 h après traitement. Les suspensions cellulaires ont été marquées par un mélange d'anticorps spécifiques de marqueurs de surface et analysées par cytométrie en flux. Après exclusion des cellules mortes (iodure de propidium⁺) de l'analyse, les neutrophiles ont été définis comme les cellules CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺. L'intensité moyenne de fluorescence (*mean fluorescence intensity*, MFI) des marqueurs d'intérêt a été déterminée à la surface des neutrophiles. Les données sont présentées sous forme de moyenne + SEM. Aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes (One way ANOVA).

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

1. Etude fonctionnelle des neutrophiles recrutés au cours du traitement par la flagelline

Dans le but d'étudier l'effet de la flagelline sur les capacités bactéricides des neutrophiles, nous avons réalisés des tests fonctionnels *ex-vivo* en utilisant une souche de pneumocoque de sérotype 2 contenant une intégration génomique du gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur constitutif (DPEP22). L'expression constitutive de luciférase par la bactérie permet de suivre, en présence de luciférine, l'activité transcriptionnelle de la bactérie par la mesure de la luminescence émise (241). Cette mesure permet de mettre en évidence des variations sensibles au sein de la population bactérienne. En effet, l'activité transcriptionnelle précède les variations de densité bactérienne en phase de croissance, et s'estompe au cours de la phase stationnaire. En parallèle, la densité bactérienne est mesurée avec la densité optique à 595 nm.

Des neutrophiles purifiés à partir du poumon de souris contrôles (PBS) ou traitées pendant 4 h par flagelline (FliC $_{\Delta 174-400}$), ont été mis en contact avec la souche DPEP22, avec une *multiplicity of infection* (MOI) de 10 (soit 10 bactéries pour 1 cellule) et incubés à 37°C (**figure 22A-B**). Une diminution de l'activité métabolique des bactéries est observée en présence des neutrophiles par rapport aux bactéries en milieu seul (intensité de luminescence relative de 25 000 vs 40 000). En revanche, l'effet des neutrophiles semble similaire, qu'ils proviennent de souris PBS ou FliC $_{\Delta 174-400}$ (**figure 22A**). Aucune différence notable n'est observée sur la densité bactérienne entre les différentes conditions d'incubation (**figure 22B**). Ces résultats suggèrent que la flagelline n'a pas d'impact sur les capacités bactéricides des neutrophiles pulmonaires.

Nos précédents résultats ont mis en évidence que le LBA conditionné par la flagelline est enrichi en peptides antimicrobiens (potentiellement associés aux granules des neutrophiles) (**figures 17 et 18**). L'effet sur la croissance de la bactérie du LBA de souris contrôles (PBS) ou ayant reçu une administration intra-nasale de flagelline (FliC $_{\Delta 174-400}$) a donc été étudié. De façon surprenante, l'activité

transcriptionnelle des bactéries incubées avec du LBA est fortement augmentée, suggérant que le LBA stimule les bactéries **(figure 22C)**. En revanche, l'augmentation de l'activité transcriptionnelle en présence de LBA ne se traduit pas par une augmentation de la densité optique. Au contraire, si aucune différence visible de la densité optique n'est observée entre les bactéries contrôles et incubées avec du LBA de souris naïves, le LBA de souris traitées par flagelline semble entraîner une diminution modeste de la quantité de bactéries dans le milieu **(figure 22D)**.

Ces études suggèrent que la flagelline ne stimule pas les capacités bactéricides des neutrophiles recrutés dans le parenchyme pulmonaire et les voies aériennes. Ces résultats sont cependant préliminaires et nécessitent d'être consolidés.

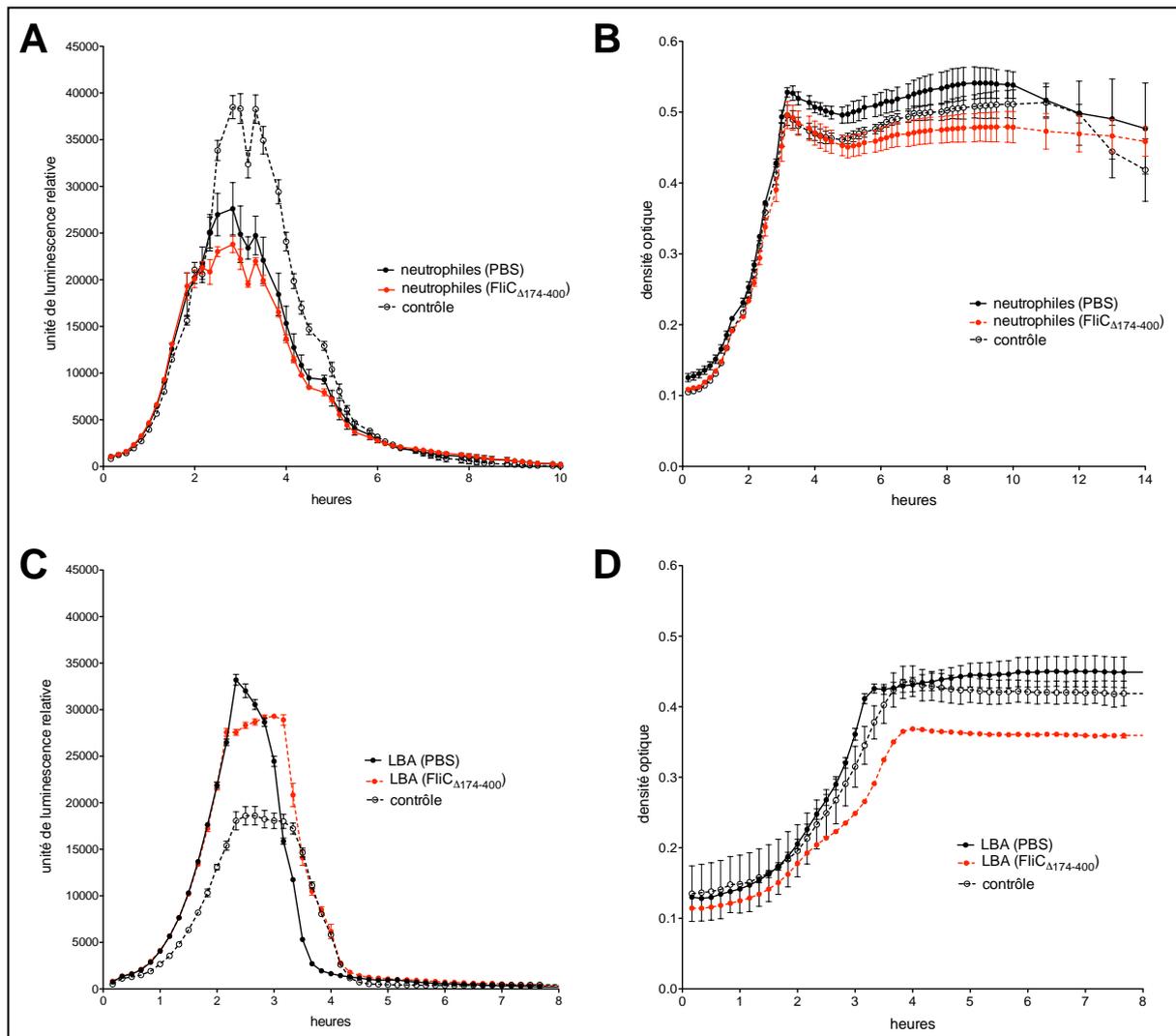


Figure 22 : Effet du LBA ou des neutrophiles pulmonaires sur la croissance du pneumocoque *in vitro*. Les souris ont reçu une administration intra-nasale de flagelline FliC Δ 174-400 (2,5 μ g dans 30 μ l de PBS) ou de PBS seul puis les poumons ou le LBA ont été prélevés, respectivement, 4 h (A-B) ou 16 h (C-D) après administration de flagelline (A-B) Les neutrophiles du poumon de souris naïves (PBS) ou traitées par flagelline (FliC Δ 174-400) ont été purifiés par sélection négative sur colonne magnétique puis incubés à 37°C avec la souche de pneumocoque D-PEP-22 (10⁶ CFU + 10⁵ cellules par puits, MOI 10:1). La luminescence (A) et la densité optique (B) ont été mesurées toutes les 10 minutes pendant 14 h. (C-D) Le LBA de souris naïves (PBS) ou traitées par flagelline (FliC Δ 174-400) a été incubé à 37°C avec la souche de pneumocoque D-PEP-22 (10⁶ CFU) en présence de luciférine puis la luminescence (C) et la densité optique à 595 nm (D) ont été mesurées toute les 10 minutes pendant 8 h. Les puits contrôles ont été incubés en présence de milieu seul et servent de témoin de croissance de la bactérie. Les données sont représentées sous forme de la moyenne des triplicats techniques pour chaque groupe + SEM.

2. Effet de la flagelline sur le poids et la perméabilité pulmonaire au cours de l'infection pneumococcique

Au cours de l'étude de la cinétique de l'effet des traitements par amoxicilline seule ou combinée à la flagelline (**figure 14**), nous avons pesé les poumons et les rates des animaux lors de leur prélèvement aux points 12 h et 36 h post-traitement. Le point 12 h correspond au temps pour lequel l'effet des traitements AMX+PBS et AMX+FliC Δ 174-400 est le plus fort (**figure 14B-C**). Aucune différence significative du poids des poumons et des rates n'a été relevée entre les souris AMX+PBS, AMX+FliC Δ 174-400 et non traitées à ce temps (**figure 23A-B**). A 36 h post-traitement, une augmentation du poids du poumon et de la rate chez les souris non traitées est observée par rapport au point 12 h. En revanche, le poids des poumons et de la rate des souris traitées par AMX+FliC Δ 174-400 reste à un niveau comparable au poids observé à 12 h post-traitement (**figure 23B**).

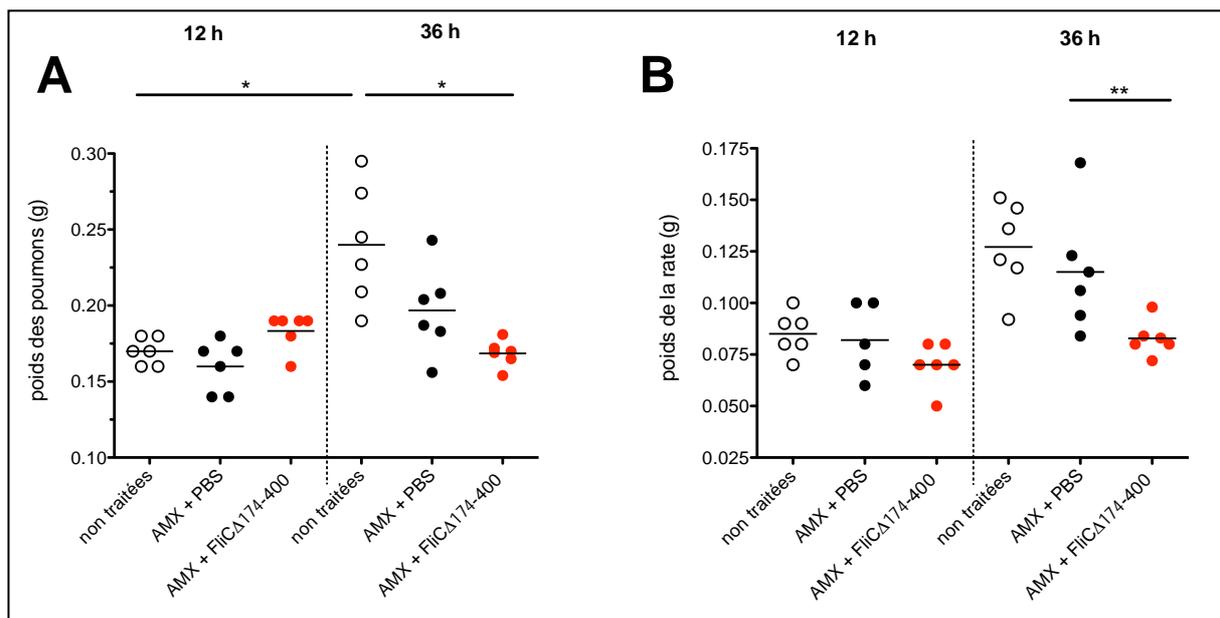


Figure 23 : Effet du traitement par amoxicilline ou amoxicilline + flagelline sur le poids pulmonaire et splénique de souris infectées par *S. pneumoniae*. Les Souris BALB/c femelles de 7 semaines (n = 6 souris par groupe) ont été infectées par 2×10^6 CFU de *S. pneumoniae* Sp1 par voie intra-nasale puis traitées 12h après par amoxicilline par voie intragastrique (5 μ g dans 200 μ l d'eau pour préparation injectable) associée à une administration intra-nasale de flagelline FliC Δ 174-400 (2,5 μ g dans 30 μ L de PBS) ou de PBS seul, ou bien n'ont reçu aucun traitement. Les poumons (**A**) et la rate (**B**) ont ensuite été prélevés et pesés 12 h et 36 h après administration des traitements. Les résultats sont représentés sous forme de médiane + range et les différents groupes ont été comparés par One way ANOVA (** : p < 0,01 ; * : p < 0,05).

Lors d'une inflammation tissulaire, d'origine infectieuse ou non, des protéines exerçant un effet vasodilatateur sont produites par l'environnement inflammatoire, entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire et une infiltration de cellules, protéines et liquide depuis la circulation. Ce phénomène explique l'augmentation du poids du poumon observée au cours de l'infection pneumococcique, et est corrélé avec l'augmentation de la charge bactérienne pulmonaire (**figure 23A**). L'augmentation modérée du poids du poumon chez les souris AMX+FliC Δ ₁₇₄₋₄₀₀ à 12 h pourrait donc être liée à l'accroissement transitoire du recrutement de neutrophiles dans le poumon dans les 12 premières heures suivant l'infection (**figure 18**). En revanche, l'absence d'augmentation du poids pulmonaire à 36 h post-infection chez les souris traitées par la thérapie combinée est un argument supplémentaire du fait que la flagelline n'entraîne pas d'exacerbation de l'inflammation pulmonaire, et limite par ailleurs l'inflammation causée par l'infection.

Pour appuyer cela, nous avons réalisé une étude de la perméabilité pulmonaire chez les souris infectées par Sp1 et traitées par amoxicilline, amoxicilline + flagelline ou non traitées. L'étude a été réalisée à un temps relativement tardif après l'administration des traitements (24 h post-traitement, soit 36 h post-infection).

Les souris ont reçu une administration intra-nasale d'un glycopeptide couplé à un fluorochrome, le FITC-Dextran, une heure avant le sacrifice des souris. Le Dextran, de haut poids moléculaire, ne traverse pas la barrière épithéliale à l'homéostasie, mais son passage peut être augmenté en cas d'accroissement de la perméabilité épithéliale, notamment lors d'une inflammation. Le Dextran a été dosé dans le sérum des souris, via l'intensité de la fluorescence du FITC à 495 nm, par un lecteur Spark[®] (Tecan) (**figure 24A**). En parallèle, un dosage des protéines totales a été réalisé dans le LBA par la méthode de Bradford (**figure 24B**). Bien qu'aucune différence significative du FITC-dextran dans le sérum ni de la quantité de protéines dans le LBA ne soit rapportée, on observe tout de même une tendance à la diminution de ces paramètres chez les souris traitées par AMX+FliC Δ ₁₇₄₋₄₀₀, semblant aller dans le sens des résultats précédents.

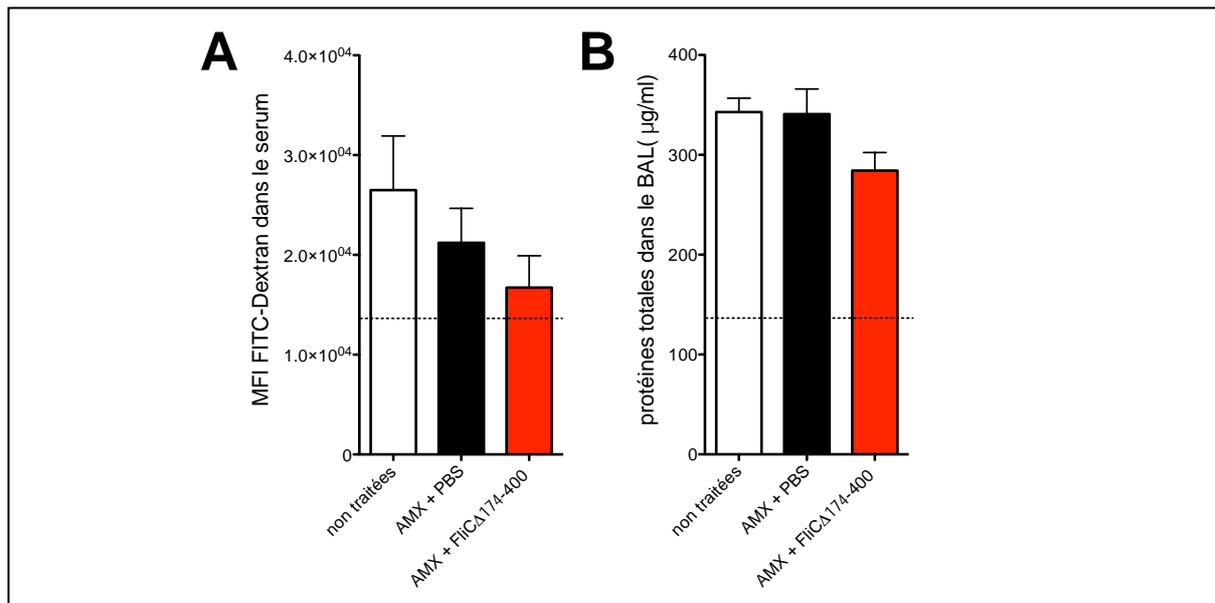


Figure 24 : Effet du traitement par amoxicilline ou amoxicilline + flagelline sur la perméabilité pulmonaire 24 h après traitement. Les Souris BALB/c femelles de 7 semaines (n = 4 souris par groupe) ont été infectées par 2×10^6 CFU de *S. pneumoniae* Sp1 par voie intra-nasale puis traitées 12h après par amoxicilline par voie intragastrique (5 µg dans 200 µl d'eau pour préparation injectable) associée à une administration intra-nasale de flagelline FliC Δ 174-400 (2,5 µg dans 30 µL de PBS) ou de PBS seul, ou bien n'ont reçu aucun traitement. Les souris ont ensuite reçu 10 µg de FITC-Dextran dans 50 µL de PBS par voie intra-nasale 23 h post-traitement, puis le sang et le LBA ont été prélevés une heure plus tard. **A)** Intensité de fluorescence du FITC dans le sérum. **B)** Dosage des protéines totales dans le LBA par la méthode de Bradford. La ligne pointillée représente les niveaux chez les souris naïves (non infectées, non traitées). Aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes (One way ANOVA).

DISCUSSION / PERSPECTIVES DE L'ETUDE II

Cette étude montre que l'administration par voie intra-nasale de flagelline au cours du traitement antibiotique de l'infection respiratoire pneumococcique active des voies de signalisation impliquées dans le recrutement, l'activation et les fonctions antimicrobiennes des cellules immunitaires, notamment des neutrophiles. Ces observations ont été corrélées à une augmentation du nombre de neutrophiles et monocytes inflammatoires dans le parenchyme pulmonaire et les voies aériennes dans les premières heures suivant l'administration de flagelline. Nos résultats montrent de plus que les neutrophiles mobilisés dans le tractus respiratoire par la flagelline sont essentiels pour contenir l'infection.

Les analyses transcriptionnelles (transcriptomique et RT-qPCR), montrent une activation très rapide, dès 2 h, des mécanismes pro-inflammatoires et anti-infectieux au cours du traitement des souris par la thérapie combinée (**Tableau 5, figure 16**). De façon remarquable, cette activation dépendante de la flagelline s'exprime dans un contexte inflammatoire induit par l'infection à *S. pneumoniae*. Ces résultats sont en adéquation avec d'autres études réalisées au cours de l'infection pulmonaire par *S. pneumoniae*. Munoz et al. ont en effet montré que l'administration de flagelline par voie intra-nasale au moment du challenge infectieux stimule l'expression pulmonaire de *Cxcl1/2*, *Ccl20* *Tnf* et *Il6* ainsi que le recrutement de neutrophiles dans le parenchyme pulmonaire et les voies aériennes (215). Par ailleurs, Porte et al. ont observé une augmentation des neutrophiles dans les voies aériennes, ainsi qu'une surexpression des gènes *Ccl20* et *Cxcl1* induite par la flagelline au cours d'une infection pneumococcique, et 7 jours après une infection grippale (205). Une stimulation locale des réponses immunitaires anti-infectieuses a également été observée lors d'une administration parentérale de la flagelline, contre l'infection pulmonaire à *S. pneumoniae* ou *P. aeruginosa*, ou encore au cours de l'infection intestinale par *Y. pseudotuberculosis* (204,208,214). Par ailleurs, une étude transcriptomique a montré qu'un traitement topique par flagelline 24 h avant une infection de la cornée par *P. aeruginosa* chez la souris résultait en une surexpression de 114 gènes liés à la réponse antimicrobienne, dont *S100a8* et *S100a9* (245). En conclusion, l'intervention immunothérapeutique avec les flagellines bactériennes

permet d'augmenter les défenses antimicrobiennes dépendantes de TLR5 dans un contexte hautement inflammatoire.

Les voies de signalisation associées au recrutement et à l'activation des cellules immunitaires ont également été observées dans l'analyse protéomique (**tableau 6**). La cinétique de production des protéines dans les voies aériennes est cependant retardée (avec un pic entre 18 et 24 h) en regard de la réponse transcriptionnelle pulmonaire et du recrutement des neutrophiles et monocytes. Cette discordance pourrait être expliquée par (i) une faible sensibilité des dosages protéomiques, (ii) la méthode d'analyse des peptides, (iii) la compartimentation des signaux et effecteurs, (iv) les mécanismes propres de régulation de la production des protéines (i.e., régulation non transcriptionnelle), et (v) la nature même de l'expérience réalisée en l'absence de toute infection. Une étude protéomique du lavage broncho-alvéolaire d'animaux infectés par *S. pneumoniae* et traités a récemment été réalisée et est en cours d'analyse. Elle devrait apporter de nouvelles informations sur la nature des processus anti-infectieux induits dans les voies aériennes. De façon concomitante, l'activation de mécanismes régulateurs semble accompagner cette réponse pro-inflammatoire. La voie de signalisation associée à la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est significativement modulée, de même que celle associée au récepteur TNFR2 (**figure 16**). L'IL-10 contribue au maintien de l'homéostasie tissulaire et participe à la résolution de l'inflammation en régulant la production de cytokines pro-inflammatoires et les mécanismes de réparation (242). La signalisation via TNFR2 induit le recrutement des facteurs anti-apoptotiques BIRC2 et BIRC3, et l'absence de TNFR2 a été associée à une exacerbation de l'inflammation tissulaire au cours d'une infection à *L. pneumophilla* chez la souris (242,243). De plus, lors d'une étude transcriptomique du poumon 2 h et 4 h après administration intra-nasale de flagelline à des souris C57Bl/6 naïves, nous avons également observé une forte expression différentielle des voies de signalisation associées à l'IL-10 et au TNFR2 chez les souris traitées par flagelline, indiquant qu'une réponse régulatrice est également induite en contexte non infectieux. D'autre part, Carvalho et al. ont montré que la flagelline induit la production d'IL-1 β par les macrophages (principalement selon un mécanisme dépendant de la détection intracellulaire de la flagelline par NLRC4), et du *secreted IL-1 receptor antagonist* (sIL-1Ra) via la stimulation de TLR5 par les macrophages et les cellules épithéliales intestinales. La déficience en TLR5

s'accompagnait chez les animaux d'un déséquilibre de la production d'IL-1 β par rapport au sIL-1Ra et d'une augmentation de l'inflammation, mettant en évidence la composante régulatrice de la signalisation TLR5 (246). Par ailleurs, il a été mis en évidence que le contexte inflammatoire (en l'occurrence la signalisation via le *Platelet-activating factor receptor*, PAFR) module la réponse des macrophages aux agonistes des TLR. Cela se traduit par une diminution de l'expression de facteurs pro-inflammatoires et l'augmentation de facteurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 en réponse à la stimulation des macrophages par des agonistes de TLR4 et TLR2 (247). Enfin, des études chez l'animal rapportent que le traitement prophylactique par flagelline prévient la production de facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et CXCL2 ainsi que le recrutement de neutrophiles en diminuant l'inflammation causée par l'infection, dans des modèles d'infections bactériennes ou fongiques de la cornée par exemple (217,248). L'effet protecteur de la flagelline pourrait donc opérer au travers de trois activités : (i) la stimulation de défenses antimicrobiennes, (ii) la régulation négative des réponses inflammatoires et (iii) l'activation des mécanismes de réparation tissulaire. Cette dernière activité reste cependant à explorer.

Les approches par déplétion cellulaire et souris chimères démontrent un rôle clé des neutrophiles dans la protection induite par la flagelline contre l'infection respiratoire pneumococcique. Ces résultats confirment ceux obtenus par Munoz et al., qui montrent que l'élimination des neutrophiles par administration d'un anticorps anti-GR1 (Ly6G/Ly6C) abolie l'effet protecteur de la flagelline administrée par voie intranasale pendant le challenge infectieux par *S. pneumoniae* (215). De la même façon, la flagelline protège contre une infection de la cornée par *C. albicans* et *P. aeruginosa* au travers de mécanismes dépendants des neutrophiles (217,248). Cependant, la neutropénie est un facteur aggravant de l'infection pneumococcique et la déplétion expérimentale des neutrophiles est systématiquement associée à une augmentation de la colonisation bactérienne pulmonaire et splénique. Bien que nos résultats suggèrent que la flagelline n'a plus d'effet thérapeutique en absence de neutrophiles, on ne peut pas exclure que la plus grande sensibilité à l'infection des animaux rendus neutropéniques masque cet effet. Les souris chimères *Cxcr2*^{-/-} \rightarrow WT ont l'avantage d'avoir un pool de neutrophiles circulants, mais qui ne sont pas mobilisables par l'infection ou l'immunostimulation. Bien que ce modèle soit de prime abord moins « sensibilisant » qu'une déplétion, la sensibilité à l'infection est plus

grande dans les souris chimères $Cxcr2^{-/-}$ → WT que dans les souris contrôles WT → WT. L'ajustement de l'innoculum, de façon à obtenir un niveau d'infection comparable chez les souris contrôles et déplétées ou KO, pourrait permettre de s'affranchir de ce biais potentiel. Des expériences complémentaires ciblant l'activité bactéricide des neutrophiles permettraient de consolider leur rôle dans la réponse thérapeutique à la flagelline combiné à l'antibiotique. D'autre part, un effet significatif de la flagelline est observé dans la rate des souris déplétées en neutrophiles, malgré une perte de son efficacité dans le poumon (**figure 19**). Cette observation suggère que d'autres mécanismes, dépendant de la flagelline mais indépendant du recrutement des neutrophiles, seraient impliqués dans le contrôle de la dissémination systémique de la bactérie.

L'existence d'une hétérogénéité des neutrophiles a été décrite dans des modèles d'infection, cancer ou inflammation (119–121,249,250). Cette hétérogénéité se manifeste par une polarisation des neutrophiles dans le microenvironnement inflammatoire, en cellules pro-inflammatoires (avec notamment une augmentation des capacités antimicrobiennes et cytotoxiques) ou à l'inverse anti-inflammatoires (favorisant la progression tumorale ou les surinfections). Nous avons choisi de mesurer les variations d'expression de Sca1, CD49d et CD11b à la surface des neutrophiles dans le poumon et du LBA au cours du traitement par flagelline de souris infectées par le pneumocoque. Sca-1 (ou Ly-6A) est un marqueur de surface des précurseurs hématopoïétiques et des progéniteurs de la lignée granulopoïétiques (251). L'expression de Sca-1 par les granulocytes circulants et pulmonaires représente un marqueur d'immaturité accompagnant une stimulation importante de la granulopoïèse et la libération dans le sang de neutrophiles immatures. CD49d, sous-unité α de l'intégrine VLA-4 (*very late activating antigen 4*) participe au recrutement des leucocytes de la circulation vers le site de l'inflammation et a été décrit comme marqueur spécifique des neutrophiles pro-inflammatoires N1 dans des modèles murins de cancers et d'infections (120,121,249). Enfin, CD11b, également appelé Mac-1, correspond à une chaîne d'intégrine α M, impliquée dans le chimiotactisme, l'adhésion et la transmigration des neutrophiles. Elle se combine avec le CD18 pour former le récepteur au complément C3 et joue un rôle crucial dans la phagocytose des neutrophiles (252). Bien que l'expression de ces trois

marqueurs ne soit pas modifiée dans les expériences réalisées, il est possible que la flagelline entraîne une modification de l'expression d'autres marqueurs d'activation des neutrophiles, qui n'ont pas été investigués ici (par exemple ICAM1 et CD62L, impliqués dans l'adhésion et la transmigration, le marqueur de dégranulation CD63, ou les marqueurs CXCR4 et olfactomedin-4 associés à des phénotypes de neutrophiles régulateurs et pro-angiogéniques) (252–255). D'autre part, cette analyse a été réalisée 4 h après l'administration des traitements, correspondant au niveau maximum du recrutement des neutrophiles dans le poumon et le LBA par la flagelline. Une analyse de ces marqueurs par cytométrie en flux pourrait permettre de caractériser les variations d'expression à des temps plus tardifs après leur recrutement. L'analyse de l'hétérogénéité des neutrophiles devra être poursuivie par des approches d'études fonctionnelles et des techniques d'analyse de type *single cell* permettant d'identifier plus efficacement d'éventuelles différences d'activation des neutrophiles recrutés dans le poumon au cours de l'infection pneumococcique, en présence ou en l'absence de flagelline.

Il a été montré que, si les neutrophiles sont essentiels à la clairance de nombreuses infections, un recrutement soutenu et prolongé de ces cellules est associé à un mauvais pronostic (152). Dans notre étude, un recrutement important de neutrophiles est observé au niveau pulmonaire très rapidement après l'administration de flagelline, mais de façon transitoire. De même, la flagelline semble prévenir l'augmentation du pourcentage sanguin de neutrophiles observée chez les souris infectées non traitées. Ceci suggère que l'administration intra-nasale de flagelline n'entraîne pas d'exacerbation prolongée de l'inflammation locale et systémique, même lorsqu'elle est administrée en contexte infectieux, limitant ainsi les dommages tissulaires. Porte et al. ont d'ailleurs montré l'absence d'exacerbation de l'inflammation pulmonaire de la flagelline au cours de l'infection pneumococcique par des examens histologiques (réalisés 48 h après administration des traitements) (205). Les tests de perméabilité pulmonaire que nous avons réalisés, ainsi que la diminution du poids du poumon chez les souris traitées par flagelline à 36h, semblent conforter toutes ces observations.

Lors des tests bactériologiques *ex-vivo* visant à caractériser les capacités bactéricides des neutrophiles et lavages bronchoalvéolaires conditionnés par la flagelline, une augmentation de l'activité transcriptionnelle des bactéries a été

observée en présence du LBA de souris naïves ou traitées par flagelline. Deux hypothèses pourraient expliquer cet accroissement de l'activité bactérienne en présence de LBA : (i) le LBA contiendrait des composés servant de nutriments aux bactéries, favorisant leur croissance et contrebalançant les éventuels effets microbicides du LBA, (ii) la présence de cellules et protéines antimicrobiennes dans le LBA pourrait entraîner un stress des bactéries, se traduisant par une augmentation transitoire de leur activité transcriptionnelle.

D'autres approches pour étudier les capacités fonctionnelles *ex-vivo* des neutrophiles sont envisagées et/ou en cours de mise au point. Nous disposons de plusieurs souches fluorescentes, capsulées ou non, de *S. pneumoniae* qui devraient permettre d'étudier la phagocytose par imagerie ou cytométrie en flux. La re-stimulation *ex-vivo* de neutrophiles pulmonaires purifiés est également une piste que nous étudions actuellement, afin d'analyser les capacités de dégranulation et/ou production cytokinique des neutrophiles. La mise au point de ces tests est cependant compliquée par la très courte durée de vie des neutrophiles murins *ex-vivo* (lors d'une expérience récente, nous avons observé une mortalité cellulaire d'environ 25% au bout de 2h d'incubation à 37°C, et de 35 à 40% au bout de 4 h). Cependant, compte tenu de nos résultats actuels, il semblerait qu'une différence quantitative plutôt que qualitative des neutrophiles serait à l'origine du rôle de ces cellules dans l'efficacité thérapeutique de la flagelline.

En conclusion, cette étude moléculaire et cellulaire apporte des explications sur la dynamique de la réponse immunitaire et de l'effet protecteur du traitement combiné amoxicilline - flagelline contre l'infection respiratoire à pneumocoque. La compréhension de ces mécanismes et de leur dynamique est en effet un prérequis essentiel en vue d'une transposition en clinique d'un tel traitement.

DISCUSSION GENERALE

Dans le contexte actuel de perte d'efficacité de l'antibiothérapie, l'utilisation d'immunomodulateurs dans les stratégies thérapeutiques anti-infectieuses est une voie prometteuse de recherche et développement. L'activation de la réponse immunitaire innée présente en effet l'avantage de mobiliser un grand nombre de mécanismes antimicrobiens cellulaires et moléculaires de l'hôte, efficaces contre une grande variété d'agents pathogènes. Par conséquent, la sélection de populations bactériennes résistantes à l'immunité innée est improbable.

Les TLR, du fait de leur expression ubiquitaire, représentent une cible de choix pour l'immunomodulation à visée thérapeutique. Plusieurs agonistes de TLR sont déjà utilisés chez l'homme, comme adjuvant vaccinal (le MPLA, agoniste de TLR4, dans le Cervarix[®] et le Fendrix[®]), ou traitement antiviral local contre les verrues génitales (Imiquimod, agoniste de TLR7 (Aldara[®]). De nombreuses autres études cliniques utilisant les agonistes de TLR sont développées, dans le cadre de thérapies anti-tumorales notamment (256). De plus, des flagellines recombinantes (Entolimod ou CBLB502 de Cleveland Biolabs ou la série VAX de Vaxinnate) ont déjà été testées chez l'homme sous forme injectée dans des protocoles d'adjuvants vaccinaux et de thérapies antitumorales (257–259).

L'efficacité de la stratégie combinée antibiotique – flagelline contre l'infection respiratoire à pneumocoques est liée à leur activité synergique (**article I**). L'utilisation en thérapeutique anti-infectieuse de molécules synergiques présente l'avantage de i) renforcer l'efficacité du traitement, ii) permettre une diminution des doses de chaque molécule limitant ainsi leurs éventuels effets indésirables et iii) prévenir la sélection de souches résistantes à l'une des molécules. Les capacités thérapeutiques du traitement combiné ont été révélées dans des infections par des souches sensibles aux antibiotiques (avec des doses subthérapeutiques d'antibiotique) (205), mais également par des souches résistantes (avec des doses d'antibiotiques correspondant à des taux plasmatiques proches de la CMI).

L'amoxicilline est un antibiotique temps-dépendant, son activité dépendant du temps pendant lequel le taux plasmatique est supérieur à la CMI ($T > CMI$). Dans nos

expériences, trois hypothèses peuvent expliquer l'effet synergique: (i) la flagelline pourrait impacter la pharmacocinétique de l'antibiotique en augmentant la durée du temps > CMI, (ii) les doses sub-thérapeutiques d'antibiotiques, quoique non bactéricides, changeraient l'activité et la robustesse de la bactérie la rendant ainsi vulnérable aux effecteurs du système immunitaire innée ou (iii) une combinaison de ces hypothèses. Une analyse pharmacocinétique des antibiotiques, une analyse cinétique détaillée de la réponse innée et des tests sur bactéries conditionnées avec des antibiotiques seront des approches essentielles pour répondre à cette problématique. Le laboratoire a récemment mis en place un modèle de co-infection utilisant deux souches isogéniques de pneumocoques possédant des niveaux de résistances variables à l'amoxicilline (sensible, CMI = 0,016 mg/L ou résistante, CMI = 4 mg/L). L'expression de fluorochromes différents permet leur discrimination par imagerie ou cytométrie en flux. Ce modèle de co-infection a pour but d'éprouver l'hypothèse que l'efficacité de la flagelline est indépendante de la résistance aux antibiotiques. Bien que l'effet synergique entre flagelline et antibiotique semble indépendant de la dose et du mécanisme d'action de l'antibiotique, des études complémentaires seront nécessaires pour élucider les mécanismes et la dynamique de cette synergie.

La flagelline, de nature protéique, est très vite dégradée par l'organisme, évitant son accumulation et une stimulation immunitaire prolongée (207). De plus, la signalisation TLR est connue pour être auto-réglée par des mécanismes d'inhibition négative (telle que la production de TNFAIP3 qui cible la cascade de phosphorylation/ubiquitination des TLR, ou ZFP36 qui déstabilise des ARNm de gènes cibles) (260). Dans le cas du traitement des souris par administration intranasale de flagelline au cours de l'infection respiratoire pneumococcique, l'activation pro-inflammatoire est transitoire et s'accompagne d'une composante régulatrice. De fait, aucun signe d'exacerbation de l'inflammation tissulaire (infiltration cellulaire soutenue, augmentation de la perméabilité vasculaire, ou excès de mortalité) n'a été observé avec la flagelline au cours de nos expériences, que ce soit en contexte de pneumonies primaires ou de surinfections grippales à pneumocoque. Ces résultats, bien qu'encourageants, sont cependant bien loin de refléter la variété des situations cliniques. En effet de nombreuses pathologies, infectieuses ou non, sont associées à

une activation inflammatoire aigue ou chronique pouvant influencer la réponse de l'organisme à une stimulation immunitaire.

Nos travaux privilégient une voie locale d'administration qui présente plusieurs avantages: le ciblage du tissu infecté, le ciblage des cellules sentinelles (i.e., les cellules épithéliales respiratoires), une dose plus faible par rapport à une voie parentérale, et une moindre toxicité. Dans le cadre du traitement des infections pulmonaires, l'administration par voie respiratoire d'agonistes TLR a déjà démontré une efficacité chez l'animal, avec la flagelline (204,205,215,221), ou d'autres agonistes de TLR. Par exemple, l'équipe d'Evans a montré l'efficacité synergique d'une stimulation conjointe de TLR2/6 et TLR9 par voie respiratoire pour protéger les souris contre l'infection pulmonaire par *P. aeruginosa* ou *S. pneumoniae* (261). Une étude clinique de phase I, dont le but est de tester l'innocuité de la flagelline lors d'une administration par nébulisation à des individus sains, sera réalisée dans le cadre du projet européen FAIR et permettra d'évaluer le niveau inflammatoire associé à la flagelline.

Notre étude a par ailleurs démontré un recrutement accru de neutrophiles induit par la flagelline, qui est associé à l'efficacité du traitement combiné antibiotique – flagelline. Comment les neutrophiles mobilisés *de novo* par la flagelline se distinguent des neutrophiles recrutés par l'infection reste une énigme. En effet, une importante plasticité de ces cellules en fonction du contexte inflammatoire a été mise en évidence dans de nombreux modèles animaux (250,262). Cependant, nos résultats semblent suggérer qu'une différence quantitative plutôt que qualitative des neutrophiles est responsable de la protection. L'étude transcriptomique, par *single cell* notamment, des neutrophiles pulmonaires au cours de l'infection et/ou du traitement par flagelline est une piste envisagée pour tenter de mettre en évidence un phénotype particulier des neutrophiles associés à la flagelline. D'autres approches pour étudier les capacités fonctionnelles *ex-vivo* des neutrophiles sont envisagées et/ou en cours de mise au point. L'utilisation de souches de pneumocoque fluorescentes, couplée à l'imagerie ou la cytométrie en flux, est une option intéressante pour étudier la phagocytose des bactéries. D'autre part, les techniques d'imagerie en temps réel ou d'immunohistochimie (avec marquage différentiel des bactéries, neutrophiles et cellules épithéliales) seront intéressantes

pour étudier l'interaction neutrophile/bactérie, *ex vivo* ou au sein du tissu pulmonaire. Finalement l'environnement conditionné par la flagelline dans le tractus respiratoire (opsonines, facteurs de différenciation, cytokines, ...) est également une piste possible pour expliquer la capacité des neutrophiles à éliminer les bactéries.

Le rôle essentiel des neutrophiles est bien entendu à prendre en compte pour la transposition en clinique, car elle pourrait résulter en un défaut d'efficacité chez des patients souffrant de neutropénie/agranulocytose (d'origine cancéreuse ou médicamenteuse par exemple) ou d'un défaut des fonctions antimicrobiennes des neutrophiles (c'est le cas de certains déficits immunitaires primaires affectant la phagocytose ou le burst oxydatif des neutrophiles). Le rôle d'autres populations cellulaires, notamment les monocytes et macrophages alvéolaires, sera également à étudier.

Pour conclure, notre étude met en lumière l'intérêt d'une stratégie thérapeutique innovante, combinant l'antibiothérapie et la stimulation locale de l'immunité innée, contre les infections à germes sensibles mais aussi résistants aux antibiotiques. Ceci démontre que l'immuno-modulation peut être une alternative au "tout antibiotique" pour traiter les infections. Associés à l'antibiothérapie, les immunomodulateurs pourraient permettre de :

- attaquer le pathogène par de nombreux processus bactéricides, réduisant le risque d'échec thérapeutique et de sélection de résistances
- diminuer les posologies des antibiotiques : réduction de la dose et du temps de traitement, augmentation l'intervalle de temps entre les administrations, réduisant de ce fait les potentiels effets indésirables des antibiotiques
- réhabiliter d'anciens antibiotiques en les utilisant à des doses sub-toxiques.

La compréhension et l'intégration des mécanismes d'action et propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques d'une telle combinaison, auxquelles contribuent nos travaux, restent cependant nécessaires dans l'optique de la transposition en clinique de ce type de thérapie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):819–26.
2. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002 Apr 12;296(5566):298–300.
3. Ausubel FM. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol*. 2005 Oct;6(10):973–9.
4. Neyen C, Lemaitre B. Sensing Gram-negative bacteria: a phylogenetic perspective. *Curr Opin Immunol*. 2016 Feb;38:8–17.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783–801.
6. Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):815–22.
7. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:257–90.
8. Yang D, Han Z, Oppenheim JJ. Alarmins and immunity. *Immunol Rev*. 2017;280(1):41–56.
9. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):525–8.
10. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*. 2002 Nov 1;298(5595):1025–9.
11. Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol*. 2010 Jun;87(6):989–99.
12. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996 Sep 20;86(6):973–83.
13. Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991 May 30;351(6325):355–6.
14. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):394–7.
15. Jin MS, Lee J-O. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*. 2008 Aug 15;29(2):182–91.

16. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem*. 2000 Jan 28;275(4):2251–4.
17. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*. 2000 Nov;1(5):398–401.
18. Bulut Y, Faure E, Thomas L, Karahashi H, Michelsen KS, Equils O, et al. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol*. 2002 Feb 1;168(3):1435–40.
19. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):10229–33.
20. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 2002 Jan 7;195(1):99–111.
21. Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol*. 2002 Jun 15;168(12):5989–92.
22. Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmüller K-H, Jung G, Brock R, Akira S, et al. TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem*. 2006 Apr 7;281(14):9049–57.
23. Szomolanyi-Tsuda E, Liang X, Welsh RM, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus in vivo. *J Virol*. 2006 May;80(9):4286–91.
24. Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, et al. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Feb 3;101(5):1315–20.
25. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1099–103.
26. Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SLR, et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1247–53.
27. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000 Dec 7;408(6813):740–5.
28. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001 Oct 18;413(6857):732–8.

29. Gao D, Li W. Structures and recognition modes of toll-like receptors. *Proteins*. 2017;85(1):3–9.
30. Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*. 2005 Jul 22;309(5734):581–5.
31. Bell JK, Botos I, Hall PR, Askins J, Shiloach J, Segal DM, et al. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Aug 2;102(31):10976–80.
32. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi B-S, Lee H, Lee J-O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009 Apr 30;458(7242):1191–5.
33. Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, et al. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*. 2008 Apr 18;320(5874):379–81.
34. Yoon S, Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL, et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science*. 2012 Feb 17;335(6070):859–64.
35. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*. 2002 Nov 21;420(6913):329–33.
36. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003 Aug 1;301(5633):640–3.
37. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. 2005 Apr 7;434(7034):772–7.
38. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2003 May 1;170(9):4465–74.
39. Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotani T, Kato H, Takeshita F, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *J Exp Med*. 2005 Mar 21;201(6):915–23.
40. Wan Y, Kim TW, Yu M, Zhou H, Yamashita M, Kang Z, et al. The dual functions of IL-1 receptor-associated kinase 2 in TLR9-mediated IFN and proinflammatory cytokine production. *J Immunol*. 2011 Mar 1;186(5):3006–14.
41. Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim Y-M, Ploegh HL. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol*. 2008 Dec;9(12):1407–14.

42. Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogyo M, Barton GM. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med*. 2011 Apr 11;208(4):643–51.
43. Häcker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu L-C, Wang GG, et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*. 2006 Jan 12;439(7073):204–7.
44. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2003 May;4(5):491–6.
45. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):373–84.
46. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 30;388(4):621–5.
47. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J*. 2009 Apr 28;420(1):1–16.
48. Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Oct 9;7(1):a016246.
49. Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol*. 2014 Feb;16(2):185–94.
50. Dambuzza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol*. 2015 Feb;32:21–7.
51. Motta V, Soares F, Sun T, Philpott DJ. NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels. *Physiol Rev*. 2015 Jan;95(1):149–78.
52. Coers J, Vance RE, Fontana MF, Dietrich WF. Restriction of *Legionella pneumophila* growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways. *Cell Microbiol*. 2007 Oct;9(10):2344–57.
53. Leiva-Juárez MM, Kolls JK, Evans SE. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunol*. 2018;11(1):21–34.
54. Cao X. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2016 Jan;16(1):35–50.
55. Chow KT, Gale M, Loo Y-M. RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36:667–94.
56. Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JWM. Primary immunodeficiencies of pattern recognition receptors. *J Intern Med*. 2012 Dec;272(6):517–27.

57. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol*. 2015 Nov;35(8):696–726.
58. Fischer A, Rausell A. Primary immunodeficiencies suggest redundancy within the human immune system. *Sci Immunol*. 2016 Dec 23;1(6).
59. Fischer A, Rausell A. What do primary immunodeficiencies tell us about the essentiality/redundancy of immune responses? *Semin Immunol*. 2018;36:13–6.
60. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):975–9.
61. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*. 2002 May 13;162(9):1028–32.
62. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol*. 2000 Nov 15;165(10):5392–6.
63. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, et al. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*. 2003 Nov 17;198(10):1563–72.
64. von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku C-L, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*. 2008 Aug 1;321(5889):691–6.
65. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, et al. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Nov;45(11):2568–73.
66. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):27–35.
67. Brune K, Frank J, Schwingshackl A, Finigan J, Sidhaye VK. Pulmonary epithelial barrier function: some new players and mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Apr 15;308(8):L731-745.
68. Iwasaki A, Foxman EF, Molony RD. Early local immune defences in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(1):7–20.
69. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(12):827–35.
70. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS ONE*. 2010 Jan 5;5(1):e8578.

71. Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, McDonough JE, Campbell JD, Brothers JF, et al. Host Response to the Lung Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Aug 15;192(4):438–45.
72. Sung JC, Pulliam BL, Edwards DA. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends Biotechnol*. 2007 Dec;25(12):563–70.
73. Munkholm M, Mortensen J. Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2014 May;34(3):171–7.
74. Bou Saab J, Losa D, Chanson M, Ruez R. Connexins in respiratory and gastrointestinal mucosal immunity. *FEBS Lett*. 2014 Apr 17;588(8):1288–96.
75. Henderson AG, Ehre C, Button B, Abdullah LH, Cai L-H, Leigh MW, et al. Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. *J Clin Invest*. 2014 Jul;124(7):3047–60.
76. Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA, Leigh MW. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Oct 15;188(8):913–22.
77. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res*. 2018 16;122(6):877–902.
78. Ueno K, Koga T, Kato K, Golenbock DT, Gendler SJ, Kai H, et al. MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Mar;38(3):263–8.
79. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DME, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol*. 2006 Feb 15;176(4):2455–64.
80. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature*. 2015 Feb 26;518(7540):547–51.
81. Kopf M, Schneider C, Nobs SP. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):36–44.
82. van de Laar L, Saelens W, De Prijck S, Martens L, Scott CL, Van Isterdael G, et al. Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*. 2016 Apr 19;44(4):755–68.
83. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*. 2014 Feb;14(2):81–93.
84. Strickland D, Kees UR, Holt PG. Regulation of T-cell activation in the lung: alveolar macrophages induce reversible T-cell anergy in vitro associated with inhibition of interleukin-2 receptor signal transduction. *Immunology*. 1996 Feb;87(2):250–8.

85. Soroosh P, Doherty TA, Duan W, Mehta AK, Choi H, Adams YF, et al. Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3⁺ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J Exp Med*. 2013 Apr 8;210(4):775–88.
86. Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K, et al. The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med*. 2004 Jul 19;200(2):267–72.
87. Hung L-Y, Sen D, Oniskey TK, Katzen J, Cohen NA, Vaughan AE, et al. Macrophages promote epithelial proliferation following infectious and non-infectious lung injury through a Trefoil factor 2-dependent mechanism. *Mucosal Immunol*. 2019;12(1):64–76.
88. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Jul;14(7):399–416.
89. Porta C, Riboldi E, Ippolito A, Sica A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Semin Immunol*. 2015 Aug;27(4):237–48.
90. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*. 2017 10;79:541–66.
91. Kawano H, Kayama H, Nakama T, Hashimoto T, Umemoto E, Takeda K. IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *Int Immunol*. 2016;28(10):489–501.
92. Durai V, Murphy KM. Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity*. 2016 18;45(4):719–36.
93. Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Jan 29;7(5).
94. Krueger PD, Kim TS, Sung S-SJ, Braciale TJ, Hahn YS. Liver-resident CD103⁺ dendritic cells prime antiviral CD8⁺ T cells in situ. *J Immunol*. 2015 Apr 1;194(7):3213–22.
95. Stehle C, Hernández DC, Romagnani C. Innate lymphoid cells in lung infection and immunity. *Immunol Rev*. 2018;286(1):102–19.
96. Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Blanc F, Pichavant M, Renneson J, et al. Potential role of invariant NKT cells in the control of pulmonary inflammation and CD8⁺ T cell response during acute influenza A virus H3N2 pneumonia. *J Immunol*. 2011 May 15;186(10):5590–602.
97. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:459–89.
98. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep;7(9):678–89.

99. Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev.* 2016;273(1):11–28.
100. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie J-C, Gougerot-Pocidallo M-A, Dang PM-C. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev.* 2016;273(1):180–93.
101. Kuipers A, Stapels DAC, Weerwind LT, Ko Y-P, Ruyken M, Lee JC, et al. The *Staphylococcus aureus* polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis. *Microbiology (Reading, Engl).* 2016;162(7):1185–94.
102. Hyams C, Trzcinski K, Camberlein E, Weinberger DM, Chimalapati S, Noursadeghi M, et al. *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype invasiveness correlates with the degree of factor H binding and opsonization with C3b/iC3b. *Infect Immun.* 2013 Jan;81(1):354–63.
103. Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2009 May;7(5):355–66.
104. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):134–47.
105. Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010 Dec 15;185(12):7413–25.
106. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 2011 Jan 20;117(3):953–9.
107. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010 Nov 1;191(3):677–91.
108. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006 Feb 21;16(4):401–7.
109. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006 Feb 21;16(4):396–400.
110. Lee KH, Kronbichler A, Park DD-Y, Park Y, Moon H, Kim H, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun Rev.* 2017 Nov;16(11):1160–73.
111. Blomgran R, Ernst JD. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2011 Jun 15;186(12):7110–9.

112. Munder M, Schneider H, Luckner C, Giese T, Langhans C-D, Fuentes JM, et al. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood*. 2006 Sep 1;108(5):1627–34.
113. Beauvillain C, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guermontez P, et al. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):2965–73.
114. Culshaw S, Millington OR, Brewer JM, McInnes IB. Murine neutrophils present Class II restricted antigen. *Immunol Lett*. 2008 Jun 15;118(1):49–54.
115. Liu L, Sun B. Neutrophil pyroptosis: new perspectives on sepsis. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Jun;76(11):2031–42.
116. Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev*. 2016;273(1):357–70.
117. De Santo C, Arscott R, Booth S, Karydis I, Jones M, Asher R, et al. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol*. 2010 Nov;11(11):1039–46.
118. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. 2009 Sep 8;16(3):183–94.
119. Shaul ME, Levy L, Sun J, Mishalian I, Singhal S, Kapoor V, et al. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF β modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncoimmunology*. 2016;5(11):e1232221.
120. Neely CJ, Kartchner LB, Mendoza AE, Linz BM, Frelinger JA, Wolfgang MC, et al. Flagellin treatment prevents increased susceptibility to systemic bacterial infection after injury by inhibiting anti-inflammatory IL-10+ IL-12- neutrophil polarization. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e85623.
121. Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):215–26.
122. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011 Oct 10;11(11):762–74.
123. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421–52.
124. Sköld M, Behar SM. Tuberculosis triggers a tissue-dependent program of differentiation and acquisition of effector functions by circulating monocytes. *J Immunol*. 2008 Nov 1;181(9):6349–60.

125. Cheong C, Matos I, Choi J-H, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*. 2010 Oct 29;143(3):416–29.
126. Ersland K, Wüthrich M, Klein BS. Dynamic interplay among monocyte-derived, dermal, and resident lymph node dendritic cells during the generation of vaccine immunity to fungi. *Cell Host Microbe*. 2010 Jun 25;7(6):474–87.
127. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 2018 16;49(4):595–613.
128. The top 10 causes of death [Internet]. [cited 2019 Jan 8]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
129. Quinton LJ, Walkey AJ, Mizgerd JP. Integrative Physiology of Pneumonia. *Physiol Rev*. 2018 01;98(3):1417–64.
130. Feldman C, Anderson R. Cigarette smoking and mechanisms of susceptibility to infections of the respiratory tract and other organ systems. *J Infect*. 2013 Sep;67(3):169–84.
131. Musher DM, Abers MS, Bartlett JG. Evolving Understanding of the Causes of Pneumonia in Adults, With Special Attention to the Role of Pneumococcus. *Clin Infect Dis*. 2017 Oct 30;65(10):1736–44.
132. Ieven M, Coenen S, Loens K, Lammens C, Coenjaerts F, Vanderstraeten A, et al. Aetiology of lower respiratory tract infection in adults in primary care: a prospective study in 11 European countries. *Clin Microbiol Infect*. 2018 Feb 12;
133. Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N Engl J Med*. 2015 Jul 30;373(5):415–27.
134. Al-Tawfiq JA, Zumla A, Gautret P, Gray GC, Hui DS, Al-Rabeeh AA, et al. Surveillance for emerging respiratory viruses. *Lancet Infect Dis*. 2014 Oct;14(10):992–1000.
135. Cillóniz C, Amaro R, Torres A. Pneumococcal vaccination. *Curr Opin Infect Dis*. 2016 Apr;29(2):187–96.
136. McCullers JA. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Apr;12(4):252–62.
137. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Jan;16(1):47–60.
138. Shim JM, Kim J, Tenson T, Min J-Y, Kainov DE. Influenza Virus Infection, Interferon Response, Viral Counter-Response, and Apoptosis. *Viruses*. 2017 12;9(8).

139. Fukuyama S, Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol*. 2011 Aug;23(4):481–6.
140. Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog*. 2007 Oct 19;3(10):1470–6.
141. Cole SL, Ho L-P. Contribution of innate immune cells to pathogenesis of severe influenza virus infection. *Clin Sci*. 2017 01;131(4):269–83.
142. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):315–28.
143. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009 Oct 31;374(9700):1543–56.
144. Dockrell DH, Whyte MKB, Mitchell TJ. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. *Chest*. 2012 Aug;142(2):482–91.
145. Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Peterson S, et al. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*. 2001 Jul 20;293(5529):498–506.
146. Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, Quail MA, Burton J, van der Linden M, et al. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science*. 2011 Jan 28;331(6016):430–4.
147. Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun*. 2007 Jan;75(1):83–90.
148. Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E, Rohde M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*. 2005 Aug;73(8):4653–67.
149. Hirst RA, Kadioglu A, O'callaghan C, Andrew PW. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol*. 2004 Nov;138(2):195–201.
150. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Apr;6(4):288–301.
151. Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, et al. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol*. 2007 Mar;9(3):633–44.
152. Pechous RD. With Friends Like These: The Complex Role of Neutrophils in the Progression of Severe Pneumonia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:160.

153. Suresh MV, Singh SK, Ferguson DA, Agrawal A. Role of the property of C-reactive protein to activate the classical pathway of complement in protecting mice from pneumococcal infection. *J Immunol*. 2006 Apr 1;176(7):4369–74.
154. Ghaffar F, Muniz LS, Katz K, Smith JL, Shouse T, Davis P, et al. Effects of large dosages of amoxicillin/clavulanate or azithromycin on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, nonpneumococcal alpha-hemolytic streptococci, and *Staphylococcus aureus* in children with acute otitis media. *Clin Infect Dis*. 2002 May 15;34(10):1301–9.
155. Point sur les connaissances / Infections à pneumocoque / Maladies à prévention vaccinale / Maladies infectieuses / Dossiers thématiques / Accueil [Internet]. [cited 2019 Apr 23]. Available from: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Infections-a-pneumocoque/Point-sur-les-connaissances>
156. Chidiac C. Antibiothérapie par voie générale dans les infections respiratoires basses de l'adulte. Pneumonie aiguë communautaire. Exacerbations de bronchopneumopathie chronique obstructive. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2011 May;41(5):221–8.
157. Gould K. Antibiotics: from prehistory to the present day. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Mar;71(3):572–5.
158. Drusano GL. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of “bug and drug.” *Nat Rev Microbiol*. 2004 Apr;2(4):289–300.
159. WHO | Global action plan on antimicrobial resistance [Internet]. WHO. [cited 2018 Aug 23]. Available from: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>
160. Martinez JL. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol*. 2014 Mar;11:33–9.
161. Schäberle TF, Hack IM. Overcoming the current deadlock in antibiotic research. *Trends Microbiol*. 2014 Apr;22(4):165–7.
162. Crofts TS, Gasparini AJ, Dantas G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(7):422–34.
163. Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007 Mar 23;128(6):1037–50.
164. Hall CW, Mah T-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 01;41(3):276–301.
165. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004 Sep 10;305(5690):1622–5.

166. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*. 2010 Apr;8(4):260–71.
167. CNRP2018.pdf [Internet]. [cited 2019 Oct 2]. Available from: <http://cnr-pneumo.com/docs/rapports/CNRP2018.pdf>
168. Fernandes P, Martens E. Antibiotics in late clinical development. *Biochem Pharmacol*. 2017 01;133:152–63.
169. Wright GD. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends Microbiol*. 2016;24(11):862–71.
170. Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect*. 2015 Jun;3(3):e00149.
171. Rao GG, Li J, Garonzik SM, Nation RL, Forrest A. Assessment and modelling of antibacterial combination regimens. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Dec 18;
172. Hancock REW, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Mar 16;10(4):243–54.
173. Cheng L, Wang Q, Li G, Banga R, Ma J, Yu H, et al. TLR3 agonist and CD40-targeting vaccination induces immune responses and reduces HIV-1 reservoirs. *J Clin Invest*. 2018 01;128(10):4387–96.
174. Saxena M, Sabado RL, La Mar M, Mohri H, Salazar AM, Dong H, et al. Poly-ICLC, a TLR3 Agonist, Induces Transient Innate Immune Responses in Patients With Treated HIV-Infection: A Randomized Double-Blinded Placebo Controlled Trial. *Front Immunol*. 2019;10:725.
175. Rice TA, Brenner TA, Percopo CM, Ma M, Keicher JD, Domachowske JB, et al. Signaling via pattern recognition receptors NOD2 and TLR2 contributes to immunomodulatory control of lethal pneumovirus infection. *Antiviral Res*. 2016;132:131–40.
176. Tan ACL, Mifsud EJ, Zeng W, Edenborough K, McVernon J, Brown LE, et al. Intranasal administration of the TLR2 agonist Pam2Cys provides rapid protection against influenza in mice. *Mol Pharm*. 2012 Sep 4;9(9):2710–8.
177. Dunne A, Mielke LA, Allen AC, Sutton CE, Higgs R, Cunningham CC, et al. A novel TLR2 agonist from *Bordetella pertussis* is a potent adjuvant that promotes protective immunity with an acellular pertussis vaccine. *Mucosal Immunol*. 2015 May;8(3):607–17.
178. Abdul-Careem MF, Firoz Mian M, Gillgrass AE, Chenoweth MJ, Barra NG, Chan T, et al. FimH, a TLR4 ligand, induces innate antiviral responses in the lung leading to protection against lethal influenza infection in mice. *Antiviral Res*. 2011 Nov;92(2):346–55.
179. Lembo A, Pelletier M, Iyer R, Timko M, Dudda JC, West TE, et al. Administration of a synthetic TLR4 agonist protects mice from pneumonic tularemia. *J Immunol*. 2008 Jun 1;180(11):7574–81.

180. Lee W, Kim M, Lee S-H, Jung H-G, Oh J-W. Prophylactic efficacy of orally administered Bacillus poly- γ -glutamic acid, a non-LPS TLR4 ligand, against norovirus infection in mice. *Sci Rep*. 2018 06;8(1):8667.
181. Romero CD, Varma TK, Hobbs JB, Reyes A, Driver B, Sherwood ER. The Toll-like receptor 4 agonist monophosphoryl lipid a augments innate host resistance to systemic bacterial infection. *Infect Immun*. 2011 Sep;79(9):3576–87.
182. Liu Y, Wang H, Zhang S, Zeng L, Xu X, Wu K, et al. Mucosal immunization with recombinant fusion protein DnaJ- Δ A146Ply enhances cross-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice via interleukin 17A. *Infect Immun*. 2014 Apr;82(4):1666–75.
183. Liang H, Poncet D, Seydoux E, Rintala ND, Maciel M, Ruiz S, et al. The TLR4 agonist adjuvant SLA-SE promotes functional mucosal antibodies against a parenterally delivered ETEC vaccine. *NPJ Vaccines*. 2019;4:19.
184. Anderson J, Olafsdottir TA, Kratochvil S, McKay PF, Östensson M, Persson J, et al. Molecular Signatures of a TLR4 Agonist-Adjuvanted HIV-1 Vaccine Candidate in Humans. *Front Immunol*. 2018;9:301.
185. Van Hoeven N, Joshi SW, Nana GI, Bosco-Lauth A, Fox C, Bowen RA, et al. A Novel Synthetic TLR-4 Agonist Adjuvant Increases the Protective Response to a Clinical-Stage West Nile Virus Vaccine Antigen in Multiple Formulations. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0149610.
186. Boni C, Vecchi A, Rossi M, Laccabue D, Giuberti T, Alfieri A, et al. TLR7 Agonist Increases Responses of Hepatitis B Virus-Specific T Cells and Natural Killer Cells in Patients With Chronic Hepatitis B Treated With Nucleos(T)ide Analogues. *Gastroenterology*. 2018;154(6):1764-1777.e7.
187. Lanford RE, Guerra B, Chavez D, Giavedoni L, Hodara VL, Brasky KM, et al. GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(7):1508–17, 1517.e1-10.
188. Borducchi EN, Liu J, Nkolola JP, Cadena AM, Yu W-H, Fischinger S, et al. Antibody and TLR7 agonist delay viral rebound in SHIV-infected monkeys. *Nature*. 2018;563(7731):360–4.
189. Vecchi S, Bufali S, Uno T, Wu T, Arcidiacono L, Filippini S, et al. Conjugation of a TLR7 agonist and antigen enhances protection in the *S. pneumoniae* murine infection model. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014 Jul;87(2):310–7.
190. Van Hoeven N, Fox CB, Granger B, Evers T, Joshi SW, Nana GI, et al. A Formulated TLR7/8 Agonist is a Flexible, Highly Potent and Effective Adjuvant for Pandemic Influenza Vaccines. *Sci Rep*. 2017 21;7:46426.
191. Vibholm L, Schleimann MH, Højen JF, Benfield T, Offersen R, Rasmussen K, et al. Short-Course Toll-Like Receptor 9 Agonist Treatment Impacts Innate

- Immunity and Plasma Viremia in Individuals With Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Infect Dis*. 2017 Jun 15;64(12):1686–95.
192. Pashenkov MV, Dagil YA, Pinegin BV. NOD1 and NOD2: Molecular targets in prevention and treatment of infectious diseases. *Int Immunopharmacol*. 2018 Jan;54:385–400.
 193. Liu Y, Goulet M-L, Sze A, Hadj SB, Belgnaoui SM, Lababidi RR, et al. RIG-I-Mediated STING Upregulation Restricts Herpes Simplex Virus 1 Infection. *J Virol*. 2016 15;90(20):9406–19.
 194. Coch C, Stümpel JP, Lilien-Waldau V, Wohlleber D, Kümmerer BM, Bekeredjian-Ding I, et al. RIG-I Activation Protects and Rescues from Lethal Influenza Virus Infection and Bacterial Superinfection. *Mol Ther*. 2017 06;25(9):2093–103.
 195. Aleynick M, Svensson-Arvelund J, Flowers CR, Marabelle A, Brody JD. Pathogen Molecular Pattern Receptor Agonists: Treating Cancer by Mimicking Infection. *Clin Cancer Res*. 2019 May 23;
 196. de la Fuente-Núñez C, Silva ON, Lu TK, Franco OL. Antimicrobial peptides: Role in human disease and potential as immunotherapies. *Pharmacol Ther*. 2017 Oct;178:132–40.
 197. Khajanchi BK, Kirtley ML, Brackman SM, Chopra AK. Immunomodulatory and protective roles of quorum-sensing signaling molecules N-acyl homoserine lactones during infection of mice with *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun*. 2011 Jul;79(7):2646–57.
 198. Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jun;55(6):2655–61.
 199. Brackman G, Coenye T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Curr Pharm Des*. 2015;21(1):5–11.
 200. Miyairi S, Tateda K, Fuse ET, Ueda C, Saito H, Takabatake T, et al. Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone-protein conjugate protects mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Med Microbiol*. 2006 Oct;55(Pt 10):1381–7.
 201. Chaban B, Hughes HV, Beeby M. The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Oct;46:91–103.
 202. Ramos HC, Rumbo M, Sirard J-C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol*. 2004 Nov;12(11):509–17.
 203. Vijayan A, Rumbo M, Carnoy C, Sirard J-C. Compartmentalized Antimicrobial Defenses in Response to Flagellin. *Trends Microbiol*. 2018 May;26(5):423–35.

204. Yu F, Cornicelli MD, Kovach MA, Newstead MW, Zeng X, Kumar A, et al. Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide. *J Immunol*. 2010 Jul 15;185(2):1142–9.
205. Porte R, Fougeron D, Muñoz-Wolf N, Tabareau J, Georgel A-F, Wallet F, et al. A Toll-Like Receptor 5 Agonist Improves the Efficacy of Antibiotics in Treatment of Primary and Influenza Virus-Associated Pneumococcal Mouse Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Oct;59(10):6064–72.
206. Janot L, Sirard J-C, Secher T, Noulin N, Fick L, Akira S, et al. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur J Immunol*. 2009 Jun;39(6):1587–96.
207. Van Maele L, Fougeron D, Janot L, Didierlaurent A, Cayet D, Tabareau J, et al. Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. *Mucosal Immunol*. 2014 May;7(3):489–500.
208. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov S, Porte R, Deruy E, et al. Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Infect Dis*. 2014 Aug 1;210(3):493–503.
209. Fougeron D, Van Maele L, Songhet P, Cayet D, Hot D, Van Rooijen N, et al. Indirect Toll-like receptor 5-mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract. *Vaccine*. 2015 Jun 26;33(29):3331–41.
210. Hajam IA, Dar PA, Shahnawaz I, Jaume JC, Lee JH. Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med*. 2017 01;49(9):e373.
211. Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J Infect Dis*. 2010 Feb 15;201(4):534–43.
212. Jarchum I, Liu M, Lipuma L, Pamer EG. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infect Immun*. 2011 Apr;79(4):1498–503.
213. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, Frias A, Sloane VM, Xu J, et al. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol*. 2008 Jun 15;180(12):8280–5.
214. Porte R, Van Maele L, Muñoz-Wolf N, Foligné B, Dumoutier L, Tabareau J, et al. Flagellin-Mediated Protection against Intestinal *Yersinia pseudotuberculosis* Infection Does Not Require Interleukin-22. *Infect Immun*. 2017;85(2).
215. Muñoz N, Van Maele L, Marqués JM, Rial A, Sirard J-C, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun*. 2010 Oct;78(10):4226–33.
216. Zgair AK. Flagellin administration protects respiratory tract from *Burkholderia cepacia* infection. *J Microbiol Biotechnol*. 2012 Jul;22(7):907–16.

217. Kumar A, Gao N, Standiford TJ, Gallo RL, Yu F-SX. Topical flagellin protects the injured corneas from *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect.* 2010 Nov;12(12–13):978–89.
218. Liu X, Gao N, Dong C, Zhou L, Mi Q-S, Standiford TJ, et al. Flagellin-induced expression of CXCL10 mediates direct fungal killing and recruitment of NK cells to the cornea in response to *Candida albicans* infection. *Eur J Immunol.* 2014 Sep;44(9):2667–79.
219. Hossain MS, Ramachandiran S, Gewirtz AT, Waller EK. Recombinant TLR5 agonist CBLB502 promotes NK cell-mediated anti-CMV immunity in mice. *PLoS ONE.* 2014;9(5):e96165.
220. Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, Denning TL, et al. Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science.* 2014 Nov 14;346(6211):861–5.
221. Georgel A-F, Cayet D, Pizzorno A, Rosa-Calatrava M, Paget C, Sencio V, et al. Toll-like receptor 5 agonist flagellin reduces influenza A virus replication independently of type I interferon and interleukin 22 and improves antiviral efficacy of oseltamivir. *Antiviral Res.* 2019 Aug;168:28–35.
222. Muñoz N, Van Maele L, Marqués JM, Rial A, Sirard J-C, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun.* 2010 Oct;78(10):4226–33.
223. Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Renneson J, Blanc F, Pichavant M, et al. Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: potential role in protection against lung epithelial damages. *J Biol Chem.* 2012 Mar 16;287(12):8816–29.
224. Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard J-C. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol.* 2008 Aug 1;181(3):2036–43.
225. Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol.* 2000 Jan 21;76(2–3):97–119.
226. Planer JD, Hulverson MA, Arif JA, Ranade RM, Don R, Buckner FS. Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Jul;8(7):e2977.
227. Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol.* 2014 Dec;52(12):4124–8.
228. McNamee LA, Harmsen AG. Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun.* 2006 Dec;74(12):6707–21.

229. Kudva A, Scheller EV, Robinson KM, Crowe CR, Choi SM, Slight SR, et al. Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice. *J Immunol*. 2011 Feb 1;186(3):1666–74.
230. Rynda-Apple A, Robinson KM, Alcorn JF. Influenza and Bacterial Superinfection: Illuminating the Immunologic Mechanisms of Disease. *Infect Immun*. 2015 Oct;83(10):3764–70.
231. Yu F, Cornicelli MD, Kovach MA, Newstead MW, Zeng X, Kumar A, et al. Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide. *J Immunol*. 2010 Jul 15;185(2):1142–9.
232. Muñoz-Wolf N, Rial A, Fougeron D, Tabareau J, Sirard J-C, Chabalgoity JA. Sublingual flagellin protects against acute pneumococcal pneumonia in a TLR5-dependent and NLRC4-independent fashion. *Future Microbiol*. 2016;11:1167–77.
233. Honko AN, Mizel SB. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect Immun*. 2004 Nov;72(11):6676–9.
234. Didierlaurent A, Ferrero I, Otten LA, Dubois B, Reinhardt M, Carlsen H, et al. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol*. 2004 Jun 1;172(11):6922–30.
235. Anas AA, van Lieshout MHP, Claushuis TAM, de Vos AF, Florquin S, de Boer OJ, et al. Lung epithelial MyD88 drives early pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by a flagellin dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016 01;311(2):L219-228.
236. Donkor ES. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:7.
237. Jarchum I, Liu M, Lipuma L, Pamer EG. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infect Immun*. 2011 Apr;79(4):1498–503.
238. Andersen-Nissen E, Hawn TR, Smith KD, Nachman A, Lampano AE, Uematsu S, et al. Cutting edge: Tlr5^{-/-} mice are more susceptible to *Escherichia coli* urinary tract infection. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):4717–20.
239. de Velde F, Mouton JW, de Winter BCM, van Gelder T, Koch BCP. Clinical applications of population pharmacokinetic models of antibiotics: Challenges and perspectives. *Pharmacol Res*. 2018 Aug;134:280–8.
240. Hassane M, Demon D, Soulard D, Fontaine J, Keller LE, Patin EC, et al. Neutrophilic NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion regulates the $\gamma\delta$ T17 cell response in respiratory bacterial infections. *Mucosal Immunol*. 2017;10(4):1056–68.
241. Sorg RA, Veening J-W. Microscale insights into pneumococcal antibiotic mutant selection windows. *Nat Commun*. 2015 Oct 30;6:8773.

242. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:71–109.
243. Fujita M, Ikegame S, Harada E, Ouchi H, Inoshima I, Watanabe K, et al. TNF receptor 1 and 2 contribute in different ways to resistance to *Legionella pneumophila*-induced mortality in mice. *Cytokine.* 2008 Nov;44(2):298–303.
244. Romano S, Xiao Y, Nakaya M, D'Angelillo A, Chang M, Jin J, et al. FKBP51 employs both scaffold and isomerase functions to promote NF- κ B activation in melanoma. *Nucleic Acids Res.* 2015 Aug 18;43(14):6983–93.
245. Gao N, Sang Yoon G, Liu X, Mi X, Chen W, Standiford TJ, et al. Genome-wide transcriptional analysis of differentially expressed genes in flagellin-pretreated mouse corneal epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of S100A8/A9. *Mucosal Immunol.* 2013 Sep;6(5):993–1005.
246. Carvalho FA, Aitken JD, Gewirtz AT, Vijay-Kumar M. TLR5 activation induces secretory interleukin-1 receptor antagonist (sIL-1Ra) and reduces inflammasome-associated tissue damage. *Mucosal Immunol.* 2011 Jan;4(1):102–11.
247. Ishizuka EK, Filgueiras LR, Rios FJ, Serezani CH, Jancar S. PAFR activation of NF- κ B p65 or p105 precursor dictates pro- and anti-inflammatory responses during TLR activation in murine macrophages. *Sci Rep.* 2016 24;6:32092.
248. Gao N, Kumar A, Guo H, Wu X, Wheeler M, Yu F-SX. Topical flagellin-mediated innate defense against *Candida albicans* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 May 10;52(6):3074–82.
249. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell.* 2009 Sep 8;16(3):183–94.
250. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.* 2015 Feb 3;10(4):562–73.
251. Shi X, Siggins RW, Stanford WL, Melvan JN, Basson MD, Zhang P. Toll-like receptor 4/stem cell antigen 1 signaling promotes hematopoietic precursor cell commitment to granulocyte development during the granulopoietic response to *Escherichia coli* bacteremia. *Infect Immun.* 2013 Jun;81(6):2197–205.
252. Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C, Glogauer M. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp Cell Res.* 2016 Mar 15;342(2):200–9.
253. Liu W, Yan M, Liu Y, McLeish KR, Coleman WG, Rodgers GP. Olfactomedin 4 inhibits cathepsin C-mediated protease activities, thereby modulating neutrophil

- killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in mice. *J Immunol*. 2012 Sep 1;189(5):2460–7.
254. Christoffersson G, Vågesjö E, Vandooren J, Lidén M, Massena S, Reinert RB, et al. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*. 2012 Nov 29;120(23):4653–62.
 255. Abdel-Latif D, Steward M, Macdonald DL, Francis GA, Dinauer MC, Lacy P. Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood*. 2004 Aug 1;104(3):832–9.
 256. Iribarren K, Bloy N, Buqué A, Cremer I, Eggermont A, Fridman WH, et al. Trial Watch: Immunostimulation with Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2016 Mar;5(3):e1088631.
 257. Turley CB, Rupp RE, Johnson C, Taylor DN, Wolfson J, Tussey L, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*. 2011 Jul 18;29(32):5145–52.
 258. Treanor JJ, Taylor DN, Tussey L, Hay C, Nolan C, Fitzgerald T, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125) in healthy young adults. *Vaccine*. 2010 Dec 6;28(52):8268–74.
 259. Cui B, Liu X, Fang Y, Zhou P, Zhang Y, Wang Y. Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2018;17(4):335–49.
 260. Adelaja A, Hoffmann A. Signaling Crosstalk Mechanisms That May Fine-Tune Pathogen-Responsive NF κ B. *Front Immunol*. 2019;10:433.
 261. Duggan JM, You D, Cleaver JO, Larson DT, Garza RJ, Guzmán Pruneda FA, et al. Synergistic interactions of TLR2/6 and TLR9 induce a high level of resistance to lung infection in mice. *J Immunol*. 2011 May 15;186(10):5916–26.
 262. Garley M, Jabłońska E. Heterogeneity Among Neutrophils. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017 May 30;

ANNEXES

Annexe I : article I au format publication

L'article est disponible en *open access*



Therapeutic Synergy Between Antibiotics and Pulmonary Toll-Like Receptor 5 Stimulation in Antibiotic-Sensitive or -Resistant Pneumonia

OPEN ACCESS

Edited by:

Cynthia Calzas,
Institut National de la Recherche
Agronomique (INRA), France

Reviewed by:

David Roy,
Université de Sherbrooke, Canada
Loïc Guillot,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM),
France

*Correspondence:

Christophe Carnoy
christophe.carnoy@univ-lille.fr
Jean-Claude Sirard
jean-claude.sirard@inserm.fr

†Present Address:

Rémi Porte,
Department of Immunology and
Inflammation, Humanitas University,
Rozzano, Italy

Specialty section:

This article was submitted to
Vaccines and Molecular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 30 November 2018

Accepted: 18 March 2019

Published: 09 April 2019

Citation:

Matarazzo L, Casilag F, Porte R,
Wallet F, Cayet D, Faveeuw C,
Carnoy C and Sirard J-C (2019)
Therapeutic Synergy Between
Antibiotics and Pulmonary Toll-Like
Receptor 5 Stimulation in
Antibiotic-Sensitive or -Resistant
Pneumonia. *Front. Immunol.* 10:723.
doi: 10.3389/fimmu.2019.00723

Laura Matarazzo, Fiordiligie Casilag, Rémi Porte[†], Frederic Wallet, Delphine Cayet, Christelle Faveeuw, Christophe Carnoy* and Jean-Claude Sirard*

Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR8204 - CIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

Bacterial infections of the respiratory tract constitute a major cause of death worldwide. Given the constant rise in bacterial resistance to antibiotics, treatment failure is increasingly frequent. In this context, innovative therapeutic strategies are urgently needed. Stimulation of innate immune cells in the respiratory tract [via activation of Toll-like receptors (TLRs)] is an attractive approach for rapidly activating the body's immune defenses against a broad spectrum of microorganisms. Previous studies of the TLR5 agonist flagellin in animal models showed that standalone TLR stimulation does not result in the effective treatment of pneumococcal respiratory infection but does significantly improve the therapeutic outcome of concomitant antibiotic treatment. Here, we investigated the antibacterial interaction between antibiotic and intranasal flagellin in a mouse model of pneumococcal respiratory infection. Using various doses of orally administered amoxicillin or systemically administered cotrimoxazole, we found that the intranasal instillation of flagellin (a dose that promotes maximal lung pro-inflammatory responses) induces synergistic rather than additive antibacterial effects against antibiotic-susceptible pneumococcus. We next set up a model of infection with pneumococcus that is resistant to multiple antibiotics in the context of influenza superinfection. Remarkably, the combination of amoxicillin and flagellin effectively treated superinfection with the amoxicillin-resistant pneumococcus since the bacterial clearance was increased by more than 100-fold compared to standalone treatments. Our results also showed that, in response to flagellin, the lung tissue generated an innate immune response even though it had been damaged by the influenza virus and pneumococcal infections. In conclusion, we demonstrated that the selective boosting of lung innate immunity is a conceptually advantageous approach for improving the effectiveness of antibiotic treatment and fighting antibiotic-resistant bacteria.

Keywords: flagellin, Toll-like receptor 5, antibiotic, resistance, *Streptococcus pneumoniae*, pneumonia, superinfection

INTRODUCTION

Pneumonia constitutes a major cause of death, morbidity and health resource use worldwide. The main causative agents identified in adult patients hospitalized for community-acquired pneumonia (CAP) are viruses (in 27–30% of cases, the most common being rhinovirus, influenza and coronavirus) and bacteria (14–23% of cases, with a marked predominance of *Streptococcus pneumoniae* infections) (1–3). When faced with overt clinical signs of bacterial pneumonia, the standard of care is antibiotic treatment. The combination of a constant rise in antibiotic resistance in recent decades with a decline in the discovery of new drugs has led to an increase in treatment failure and mortality (4). In 2017, the World Health Organization's Global Action Plan highlighted the urgent need to control the emergence of antibiotic resistance (5). Given this context, a number of new anti-infectious treatment strategies are being developed.

The modulation of innate immunity [by targeting immune receptors, such as Toll-like receptors (TLRs)] is a promising approach (6, 7). Indeed, innate immunity is highly conserved in evolution, and this system constitutes the first line of defense against invading pathogens. Moreover, innate immunity triggers a broad range of antimicrobial defense mechanisms and immune cells—thereby greatly reducing the risk of resistance in the pathogens. Moreover, activation of TLR signaling has been associated with a favorable outcome in infections with antibiotic-resistant bacteria or colonization resistance by such pathogens (8–10). These observations support that stimulation and effector activities of innate immunity are not influenced by the antibiotic resistance mechanisms carried by bacteria. Flagellin is the main protein component of the bacterial flagellum and is a natural agonist of TLR5; the latter is expressed at the surface of a many different cell types, including mucosal epithelial cells and immune cells such as dendritic cells, macrophages, and lymphocytes (11). Various studies in animal models have highlighted the antimicrobial potency of flagellin against a wide variety of bacterial infections [such as intestinal infections caused by *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecium*, *Clostridium difficile*, and *Escherichia coli* (8, 12–14), respiratory infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *S. pneumoniae* (15, 16)], and viral and fungal infections (17–19). Although most studies have demonstrated the protective effect of flagellin administered before or during exposure to a microbial pathogen, the protein's immunostimulatory efficacy in therapeutic context has not been extensively characterized. Using a mouse model of *S. pneumoniae* lung infection, we recently demonstrated that combination treatment with mucosally administered flagellin and an orally or intraperitoneally administered low-dose (i.e., subtherapeutic) antibiotic is more effective than the antibiotic alone (i.e., with a lower bacterial load in the lung, and a lower mortality rate). Furthermore, the combination treatment was also effective in a model of post-flu pneumococcal superinfection (20). The effectiveness of these combination therapies depends on TLR5 signaling as demonstrated using TLR5-deficient animals and TLR5-mutated recombinant flagellin (20). Our studies highlighted that the airway epithelium is the main

TLR5-specific signaling compartment (21–23). Taken as a whole, these observations are the first to highlight the added value of respiratory delivery of flagellin as an immunomodulatory biologic for the adjunct treatment of bacterial pneumonia (i.e., in addition to the standard of care).

Our working hypothesis was that simultaneous treatment with an antibiotic and intranasal, i.e., respiratory flagellin constitutes a “double hit” against the pathogen. A combination of two drugs may result in independent actions or specific (i.e., additive, synergistic, or antagonistic) effects that define the biological outcome (24–26). An interaction between two drugs is considered to be synergistic when the measured effect of the combination treatment exceeds the predicted cumulative value of the two components given separately. Synergy increases treatment efficacy, and is expected to limit the emergence of drug resistance. Furthermore, synergy allows the physician to decrease the dose level or the frequency of dosing, which thereby dampens adverse drug reactions and may even enable the rehabilitation of neglected drugs. Conversely, an antagonistic combination treatment has a smaller effect than the predicted cumulative value of the two components given separately. Most studies of potentially synergistic antimicrobial agents are performed in *in vitro* systems such as bacterial cultures, using checkerboard assays and increasing doses of each drug (25, 27). Unlike antibiotics that directly affect the bacteria, immunomodulatory biologic activity requires sentinel cells for detection, downstream signaling and thus the production of antimicrobial effectors and the recruitment and/or activation of innate immune cells. At present, there are no comprehensive *in vitro* models of this complicated physiological system.

In the present study, we quantified the nature and magnitude of the interactions between antibiotics and intranasal instillation of flagellin with regard to antibacterial effectiveness in a murine model of *S. pneumoniae* respiratory infections. Furthermore, we wanted to assess the efficacy of this novel therapeutic strategy against infection with antibiotic-resistant bacteria, which represents major public health issues today. To this aim, we investigated the combination's effect on antibiotic-resistant *S. pneumoniae* in a relevant model of post-flu pneumococcal pneumonia, and characterized the immune response induced by the flagellin-mediated protection.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Cultures

Serotype 1 *S. pneumoniae* (Sp1; clinical isolate E1586) was obtained from the National Reference Laboratory—Ministry of Health, Uruguay (15). Serotype 3 *S. pneumoniae* (Sp3; strain 104491) was provided by the Institut Pasteur (Paris, France); it is a multidrug-resistant clinical isolate from a human bronchial secretion, and is resistant to amoxicillin (AMX), cefotaxime, doxycycline, erythromycin, chloramphenicol, streptomycin, and cotrimoxazole (SXT). Working stocks were prepared as described previously (15, 28). Briefly, fresh colonies grown on blood-agar plates were incubated in Todd Hewitt Yeast Broth (THYB) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) at 37°C until the OD_{600nm} reached 0.7–0.9 units. Cultures were stored at –80°C

in THYB + glycerol 12% (vol./vol.) for up to 3 months. For infection, working stocks were thawed and washed with sterile Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS, Gibco, Grand Island, NY) and diluted to the appropriate concentration. The number of bacteria (as colony forming units [CFUs]) was confirmed by plating serial dilutions onto 5% sheep blood agar plates.

Mouse Models of Infection

Female BALB/cJ mice, female Swiss mice, and male C57BL/6J mice (6–8 weeks old) (Janvier Laboratories, Saint Berthevin, France, or Envigo, Huntingdon, UK) were maintained in individually ventilated cages and handled in a vertical laminar flow cabinet (class II A2, ESCO, Hatboro, PA). All experiments complied with institutional regulations and ethical guidelines (C59-350009, Institut Pasteur de Lille; Protocol 2015121722429127). Prior to intranasal infection, the mice were anesthetized via the intraperitoneal injection of 1.25 mg (50 mg/kg) ketamine plus 0.25 mg (10 mg/kg) xylazine in 250 μ l of PBS. For primary infections with Sp1, $2\text{--}4 \times 10^6$ CFU were inoculated intranasally in 30 μ l PBS, as described previously (20). The influenza infection model was developed in our laboratory on the C57BL/6J mice (29, 30). The Sp3 pneumococcal superinfection model was therefore performed in these animals. Briefly, mice were first infected intranasally with 30 μ l PBS containing 50 plaque-forming units (PFUs) of the pathogenic, murine-adapted H3N2 influenza A virus strain Scotland/20/74, as described previously (30, 31). Seven days later, animals were infected intranasally with 10^3 CFU of Sp3 in 30 μ l PBS. For the determination of bacterial counts in lung and spleen, mice were sacrificed at selected times via the intraperitoneal injection of 5.47 mg of sodium pentobarbital in 100 μ l PBS. Tissues were collected and homogenized with an UltraTurrax homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany), and viable counts were determined by plating serial dilutions onto blood agar plates and incubating them at 37°C for 12–24 h.

Flagellin and Antibiotic Administration

The recombinant flagellin FliC $_{\Delta 174\text{--}400}$ came from *S. enterica* serovar Typhimurium FliC and was produced with an histidine tag, as described previously (20, 32). The protein FliC $_{\Delta 174\text{--}400}$ was certified to be immunologically active in reporter cells and in mouse assays, and the residual lipopolysaccharide concentration was determined to be <20 pg per μ g of flagellin (20). For flagellin treatment, FliC $_{\Delta 174\text{--}400}$ (1 ng to 25 μ g in 30 μ l PBS) was administered intranasally under light anesthesia via isoflurane inhalation (Axience, Pantin, France). Control animals received intranasal PBS alone. Mice were treated either intragastrically with AMX [5–350 μ g of amoxicillin trihydrate (Sigma-Aldrich) in 200 μ l water per animal] or intraperitoneally with SXT—a combination of the antibiotics sulfamethoxazole and trimethoprim (Bactrim[®] Roche, Basel, Switzerland) at total doses of 1 mg (0.84 mg sulfamethoxazole and 0.16 mg trimethoprim) or 4 mg (3.34 mg sulfamethoxazole and 0.66 mg trimethoprim) in 200 μ l PBS per animal.

Testing for Synergy and Proportional Effects

The treatments' effects on *S. pneumoniae* lung infection were quantified as the percentage bacterial growth (%_{growth}), corresponding to the ratio of the mean bacterial load in the lungs of infected, treated mice to the load in infected, non-treated (control) mice. For example, the effect of treatment A was calculated as follows: %_{growth[A]} = (mean CFU_[A]/mean CFU_[control]) \times 100. The predicted additive effect (or predicted %_{growth}) of a combination treatment was calculated as described previously (33). Briefly, the predicted %_{growth} of a treatment combining compounds A and B is the product of the experimentally defined %_{growth} values for each standalone treatment (predicted%_{growth[A+B]} = %_{growth[A]} \times %_{growth[B]}). If the experimental %_{growth} for the combination treatment is lower or higher than the predicted %_{growth}, then the two drugs are synergistic or antagonistic, respectively. When the experimental and predicted %_{growth} values are identical, the two drugs' effects are additive.

Transcriptional Analysis by RT-qPCR

Total lung RNA was extracted with the NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) and reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The cDNA was amplified using SYBR green-based real-time PCR on a Quantstudio 12K PCR system (Applied Biosystems). Relative mRNA levels ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) were determined by comparing first the PCR cycle thresholds (C_q) for the gene of interest and the reference genes *Actb* and *B2m* (ΔC_q), and then the ΔC_q values for infected mice treated with the AMX+flagellin combination treatment and with AMX alone (control group) ($\Delta\Delta C_q$). All the primers used in the study (listed in Table 1) were validated for efficacy.

Cell Analysis by Flow Cytometry

Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid samples were obtained after intratracheal injection of 3×1 ml of PBS supplemented with 5% fetal calf serum (FCS). Lungs were perfused with PBS, excised and finely minced then digested in a solution of RPMI 1640 medium (Gibco) containing 1 mg/ml collagenase VIII (Sigma-Aldrich) and 80 μ g/ml DNase I (Sigma-Aldrich) for 20 min at 37°C. After washes, red blood cells were removed using a lysis solution (Pharmlyse, BD Bioscience). Lung cell homogenates were then suspended in a 20% percoll gradient and centrifuged at 2,000 rpm without brake at room temperature for 10 min. The cell pellets were washed with PBS supplemented with 2% FCS and cells were filtrated before antibody labeling. BAL and lung cells were stained with anti-CD45-allophycocyanin-cyanine 7 (clone 30F11), anti-CD11b-Brilliant Violet 785 (clone M1.70), anti-SiglecF-AlexaFluor 647 (clone E50-2440), anti-Ly6C-peridinin chlorophyll protein-cyanine 5.5 (clone HK1.4), anti-Ly6G-phycoerythrin (clone 1A8), anti-CD11c-phycoerythrin-cyanine 7 (clone HL3), and CCR2-Brilliant Violet 421 (clone SA203G11) antibodies. Dead cells were excluded from the analysis using propidium iodide. The antibodies were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA) or BioLegend (San Diego, CA). Data

TABLE 1 | Sequences of the primers used for qPCR assays.

Target gene	Forward primer (F)	Reverse primer (R)
<i>Actb</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGTCCTCTCGT
<i>B2m</i>	TGGTCTTTCTGGTCTTGTC	GGGTGGCGTGAGTATACTTGAA
<i>Ccl20</i>	TTTTGGGATGGAATTGGACAC	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC
<i>Cxcl1</i>	CTTGTTTCAGAAAATTGTCCAAAA	CAGGTGCCATCAGAGCAGTCT
<i>Cxcl2</i>	CCCTCAACGGAAGAACCAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC
<i>Il1b</i>	AATCTATACCTGTCTGTGTAATGAAAGAC	TGGGTATTGCTTGGGATCCA
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGAAATCGTGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
<i>S100a9</i>	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT	TGTCATTATGAGGGCTTCATT

were collected on a BD LSR Fortessa and analyzed with the BD FACSDiva software.

Cytokine and Chemokine Production

Concentration of CCL20, CXCL1, CXCL2, IL-6, IL-1 β , and TNF was determined in BAL fluids and lung homogenates by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA kit from eBioscience, R&D Systems or Becton Dickinson). BAL fluids were obtained by intratracheal injection of 2 \times 1 ml PBS supplemented with protease inhibitors (Roche). Lungs were perfused with PBS and collected in T-PER reagent (Pierce) supplemented with protease inhibitors and debris were eliminated by centrifugation. All samples were stored at -20°C .

Statistical Analysis

The results were described as the mean \pm standard error of the mean (SEM) or the median (range), as indicated. Intergroup differences were analyzed using the Mann-Whitney test and the log rank test. All analyses were performed with Prism software (version 5.0, GraphPad Software, La Jolla, CA). The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

RESULTS

Determination of the Minimum Dose of Intranasal Flagellin for the Full Activation of Respiratory Tract Innate Immune Responses

In earlier research, we had shown that the intranasal administration of a combination of flagellin FliC $_{\Delta 174-400}$ and low-dose antibiotics improved the therapeutic outcome of lung infection with the antibiotic-susceptible Sp1 [minimum inhibitory concentration (MIC) $_{\text{AMX}} = 0.016 \mu\text{g/ml}$] (20). Given the difficulty of performing *in vitro* checkerboard assays with immunomodulators, we therefore sought to evaluate the nature of antibiotic-flagellin interactions *in vivo*. We first defined the dose of flagellin that promoted saturating immune responses in Sp1-infected mice (Figure 1). Intranasally administered flagellin was associated with the production of various innate immunity-related components, including chemokines (CXCL1, CXCL2, and CCL20), inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6), and antimicrobial peptides (S100A9), along with the recruitment of neutrophils to the airways

(15, 16, 20, 21, 23, 28). Mice were treated simultaneously with oral AMX (0.2 mg/kg) and intranasal flagellin FliC $_{\Delta 174-400}$ (at doses of 0.4 μg to 1 mg/kg, i.e., 1 ng to 25 μg per animal). Immune responses were analyzed by monitoring the lung transcription of inflammatory genes associated with TLR5 signaling and by comparing mRNA levels to animals that received AMX alone. The results showed that doses from 1 to 25 μg per animal saturated the upregulation of transcriptional response for *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl20*, *Il1b*, and *Il6* genes. Ultimately, the dose of 2.5 μg of FliC $_{\Delta 174-400}$ was selected as a saturating immunostimulatory dose in the context of pneumococcal infection and lung inflammation.

The Combination of Antibiotics and Respiratory Instillation of Flagellin Displays Synergistic Therapeutic Activity Against *S. pneumoniae* Infection

The next set of experiments was designed to characterize the therapeutic interaction between intranasal flagellin FliC $_{\Delta 174-400}$ and oral AMX. Mice were infected with Sp1 and treated 12 h later with either a single intranasal instillation of flagellin (2.5 μg), a single intragastric administration of suboptimal AMX doses of 5 μg (0.2 mg/kg) or 40 μg (1.6 mg/kg) or the combination treatment. To define the treatments' efficacy, lung bacterial counts were measured at 12 h post-treatment. The results showed that flagellin alone had mostly no antibacterial effect, whereas 5 and 40 μg doses of AMX alone were, respectively, associated with 5- and 7-fold smaller bacterial loads, relative to untreated mice (Figure 2A). The combination treatment (AMX + FliC $_{\Delta 174-400}$) induced a 10-fold relative decrease in bacterial counts for 5 μg of AMX and a 82-fold relative decrease for 40 μg of AMX—showing that AMX-flagellin combination treatment is more effective than the corresponding dose of AMX or flagellin as monotherapy (Figure 2A). The nature of the interactions between flagellin and antibiotics was further analyzed by comparing the bacterial growth upon treatment. The % $_{\text{growth}}$ values for the combination treatment (8.4% for flagellin + AMX 5 μg and 1.2% for flagellin + AMX 40 μg) were much lower than the corresponding predicted % $_{\text{growth}}$ values for additive effects, calculated as % $_{\text{growth}}[\text{AMX}] \times \%$ $_{\text{growth}}[\text{flagellin}]$ (19.2% for flagellin + AMX 5 μg and 12.3% for flagellin + AMX 40 μg) (Figure 2B).

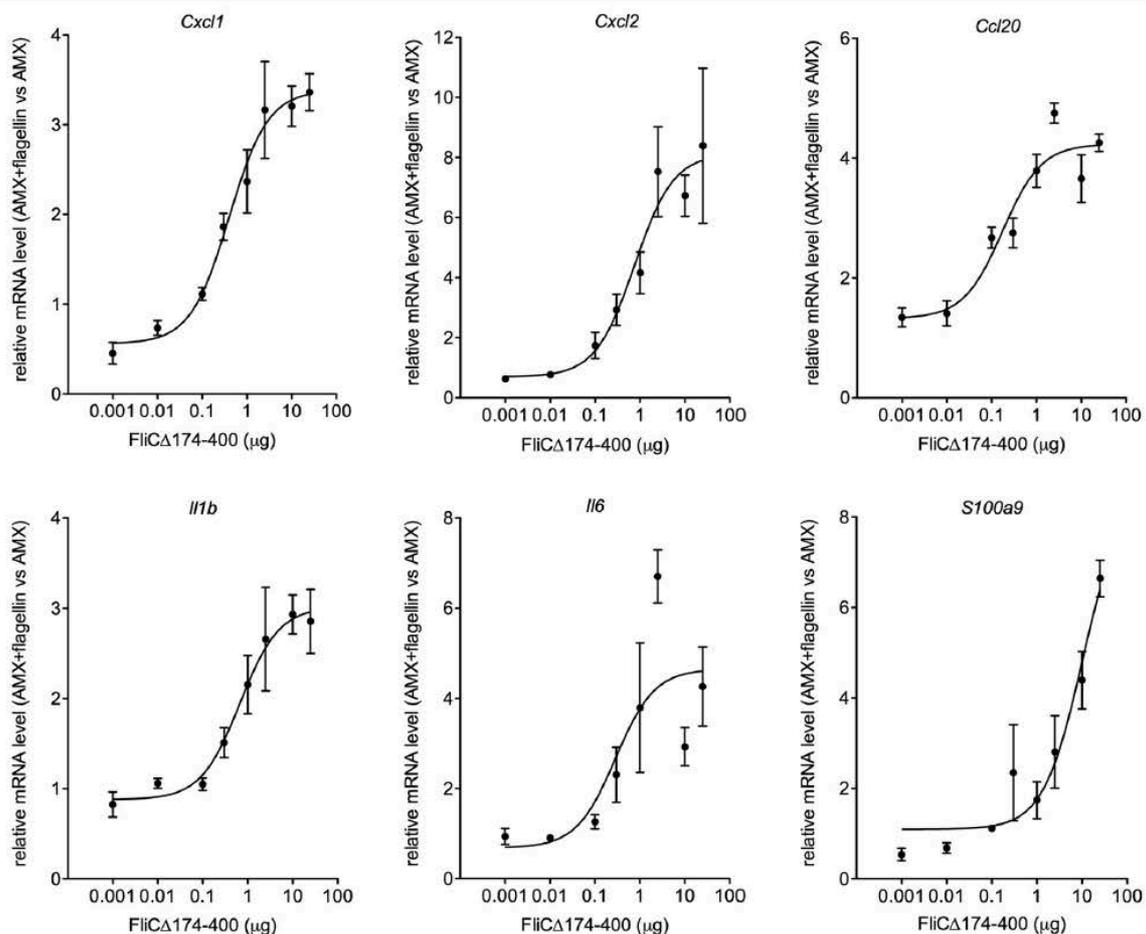


FIGURE 1 | The effect of the flagellin dose on the transcriptional response of immune system-related genes. BALB/c mice ($n = 4$ per group) were infected intranasally with 2×10^6 Sp1 and treated 12 h later with the antibiotic amoxicillin (AMX; 5 μ g, intragastric administration) combined with the intranasal administration of various doses of flagellin FliC Δ 174–400 (0.001, 0.1, 0.3, 1, 2.5, 10, and 25 μ g in 30 μ l of PBS) or vehicle only (PBS). Lungs were collected 2 h post-treatment, and RNA was extracted and reverse-transcribed. Gene expression was analyzed using quantitative PCR assays. The relative expression level for each gene is expressed against that of the reference genes *Actb* and *B2m* and the reference condition AMX+PBS (arbitrarily set to a value of 1). The data are quoted as the mean \pm SEM.

This experiment indicated strong synergy between the two compounds.

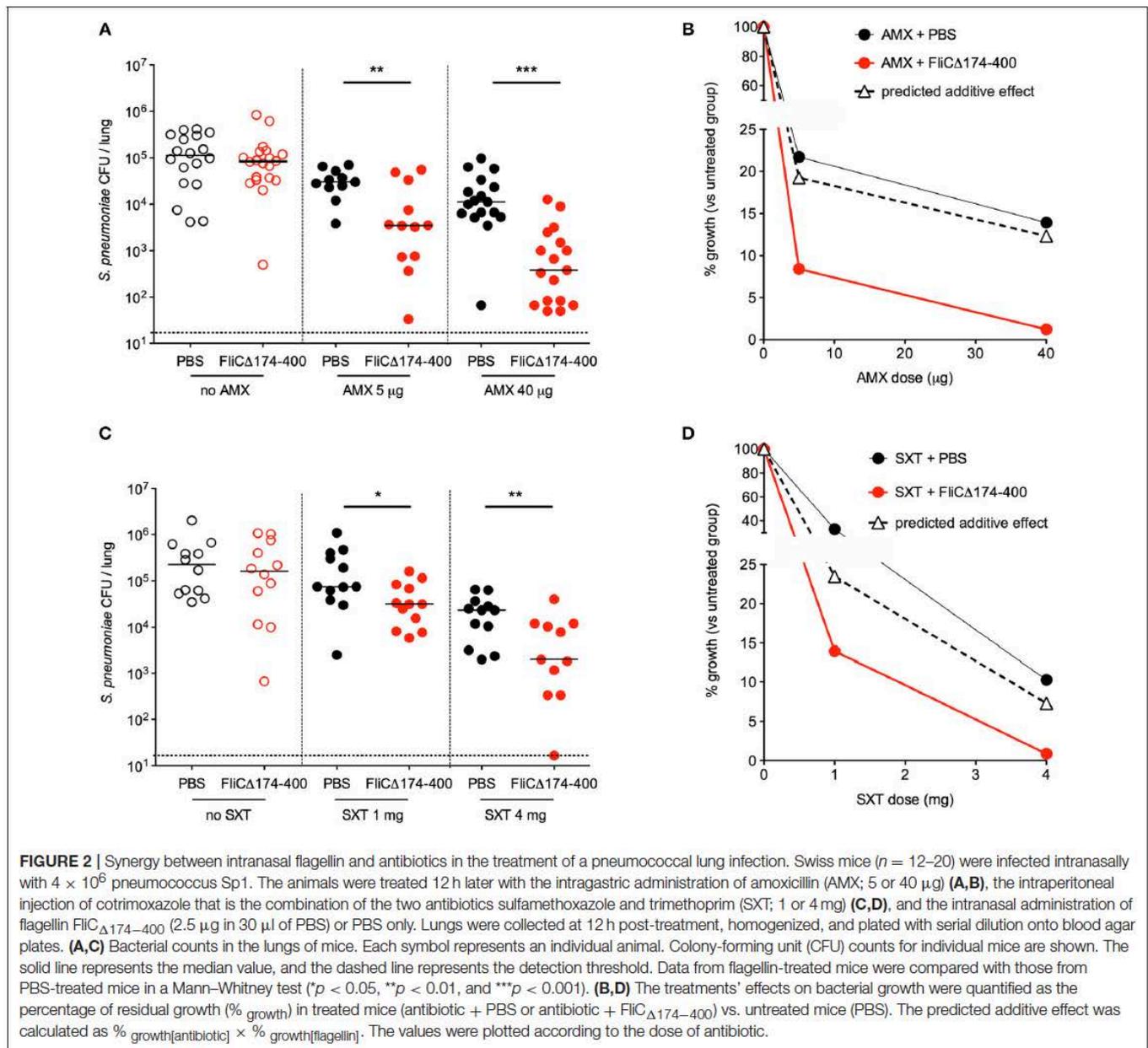
Similar experiments were carried out with the combination of the antibiotic SXT and flagellin (Figures 2C,D). The antibiotic SXT was administered intraperitoneally at doses of 1 and 4 mg (40 and 160 mg/kg, respectively). Flagellin (2.5 μ g) significantly improved the therapeutic outcome of SXT treatment, as evidenced by CFU counts in the mice's lungs 12 h after administration of the treatments (Figure 2C). The experimental %_{growth} values for the combination treatment were lower than the corresponding predicted %_{growth} values (14 vs. 23.5% for SXT 1 mg, and 0.88 vs. 7.3% for SXT 4 mg)—reflecting a synergy between flagellin and SXT (Figure 2D).

Taken as a whole, these results show that antibiotics + flagellin had a strong synergistic effect on pneumococcal lung infection in mice. Furthermore, the synergy seems to be independent of the type of antibiotic, since it was

observed with a compound that inhibits bacterial cell wall (AMX) and a pair of compounds that inhibits folic acid synthesis (SXT).

A Model of Pneumonia With Antibiotic-Resistant *S. pneumoniae* in a Post-influenza Context

Next, we looked at whether the combination treatment's effect on an antibiotic-sensitive *S. pneumoniae* strain was also exerted on antibiotic-resistant bacteria. To this end, a mouse model of infection with a Sp3 strain that is resistant to a wide range of antibiotics including AMX ($MIC_{AMX} = 2 \mu$ g/ml, i.e., 125-fold higher than for Sp1) was developed. We found that the Sp3 strain failed to induce a lethal infection and other signs of disease (weight loss) in naïve mice—even at high doses of challenge (10^6 or 10^7 bacteria per animal) (Figures 3A,B). Given that the influenza virus infection increases susceptibility to bacterial



infections even after it has been eliminated (34–37), Sp3 infection was assessed in mice that had already been exposed to the virus. Briefly, mice were infected first with an intranasal, sublethal dose of H3N2 virus (50 PFU) and then infected 7 days later with 10^3 CFU of Sp3. This bacterial superinfection induced significant weight loss and was 100% lethal (Figures 3A,B). The bacterial counts increased gradually over time, and reached 10^7 CFU per lung 24 h post-infection (Figure 3C). Sp3 was also detected in the spleen—indicating a translocation and systemic dissemination of the bacteria—from 24 h post-infection onwards (Figure 3C). In conclusion, the antibiotic-resistant Sp3 strain induced effective pneumonia when animals had been previously exposed to experimental flu.

An Amoxicillin + Flagellin Combination Is Effective Against Amoxicillin-Resistant *S. pneumoniae*

In order to test the efficacy of an antibiotic+flagellin combination treatment in the post-influenza Sp3 superinfection model, mice were treated with AMX alone, flagellin $\text{FliC}_{\Delta 174-400}$ alone, or a combination of both compounds 12 h after the bacterial infection (Figure 4A). Due to the high level of AMX resistance, the doses of antibiotic used were 100 μg (4 mg/kg) and 350 μg (14 mg/kg). Using this regimen, the serum concentration levels of AMX in naïve animals were expected to be close to $1 \times \text{MIC}$ and $4 \times \text{MIC}$, respectively (Professor Charlotte Kloft, personal communication). Flagellin treatment alone decreased bacterial

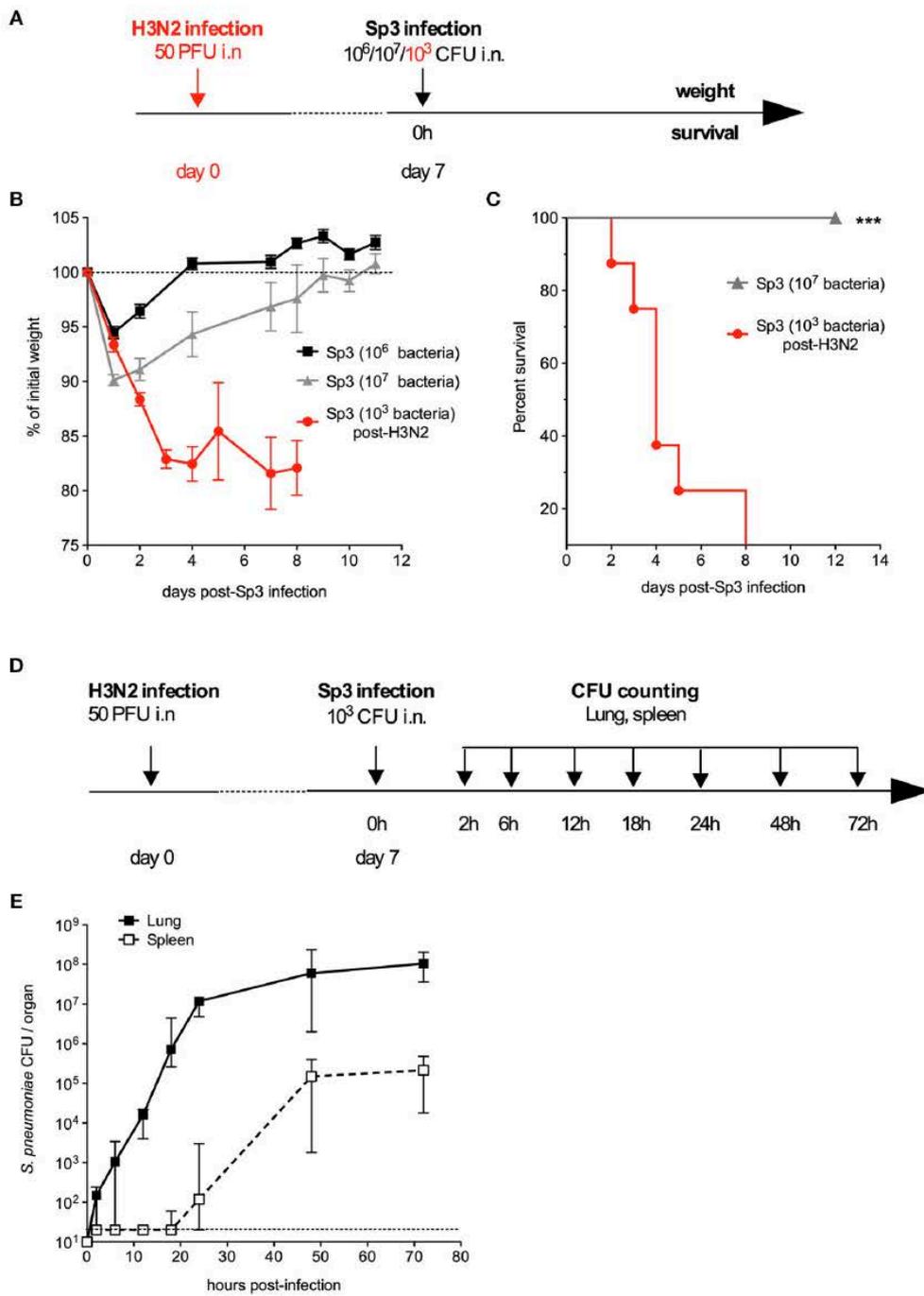


FIGURE 3 | A murine model of pneumonia due to antibiotic-resistant pneumococcus. **(A–C)** C57BL/6J mice ($n = 5–8$) were infected intranasally with 10^6 or 10^7 antibiotic-resistant pneumococcus Sp3 in 30 μ l of PBS or with 50 PFUs of H3N2 virus in 30 μ l of PBS followed 7 days later by intranasal administration of 10^3 Sp3. **(B)** Body weight was monitored after Sp3 infection and expressed as a percentage of the initial weight. The data are quoted as the mean \pm SEM. **(C)** Survival was monitored daily for 12 days. Data were compared in a log-rank test. $***p < 0.001$. **(D,E)** C57BL/6J mice were infection intranasally with 50 PFUs of H3N2 virus in 30 μ l of PBS followed 7 days later by intranasal administration of 10^3 Sp3. **(E)** Bacterial counts in the lung and spleen of mice ($n = 5$). Tissues were collected at the indicated times post-Sp3 infection, and plated in serial dilutions on blood-agar plates. The values correspond to the median (range) CFU count. The dashed line represents the detection threshold.

counts in the lungs by 5.6-fold, whereas AMX treatments decreased bacterial counts by 3.7-fold (for a dose of 100 μ g) and 74.6-fold (for a dose of 350 μ g). When AMX was combined with

flagellin, bacterial counts were of 5,526- and 5,485-fold lower for the 100 and 350 μ g doses of antibiotic, respectively. These results show a significant therapeutic advantage for the combination

treatment, relative to standalone AMX or flagellin treatments (Figure 4B). We also determined CFU counts in the spleen; both AMX and AMX + flagellin treatments (either with 100 or 350 μg of the antibiotic) were able to prevent systemic dissemination of the infection (data not shown). Comparison of %_{growth} for the observed effect of the combination treatment vs. predicted additive effect (0.7 vs. 8.9% for AMX 100 μg , and 0.02 vs. 0.9% for AMX 350 μg) demonstrated the synergy of the combination in the context of superinfection and antibiotic resistance (Figure 4C). After two administrations of treatments 12 and 36 h after Sp3 superinfection, the flagellin + AMX combination was found to significantly improve the survival of mice, relative to standalone treatments (Figure 4D). These data strongly suggest that flagellin + AMX have synergistic therapeutic effects to control the antibiotic-resistant pneumococcal infections in relevant pathophysiological contexts.

The Respiratory Administration of Flagellin During Amoxicillin Treatment Stimulates Innate Immunity in the Context of Pneumococcal Post-influenza Superinfection

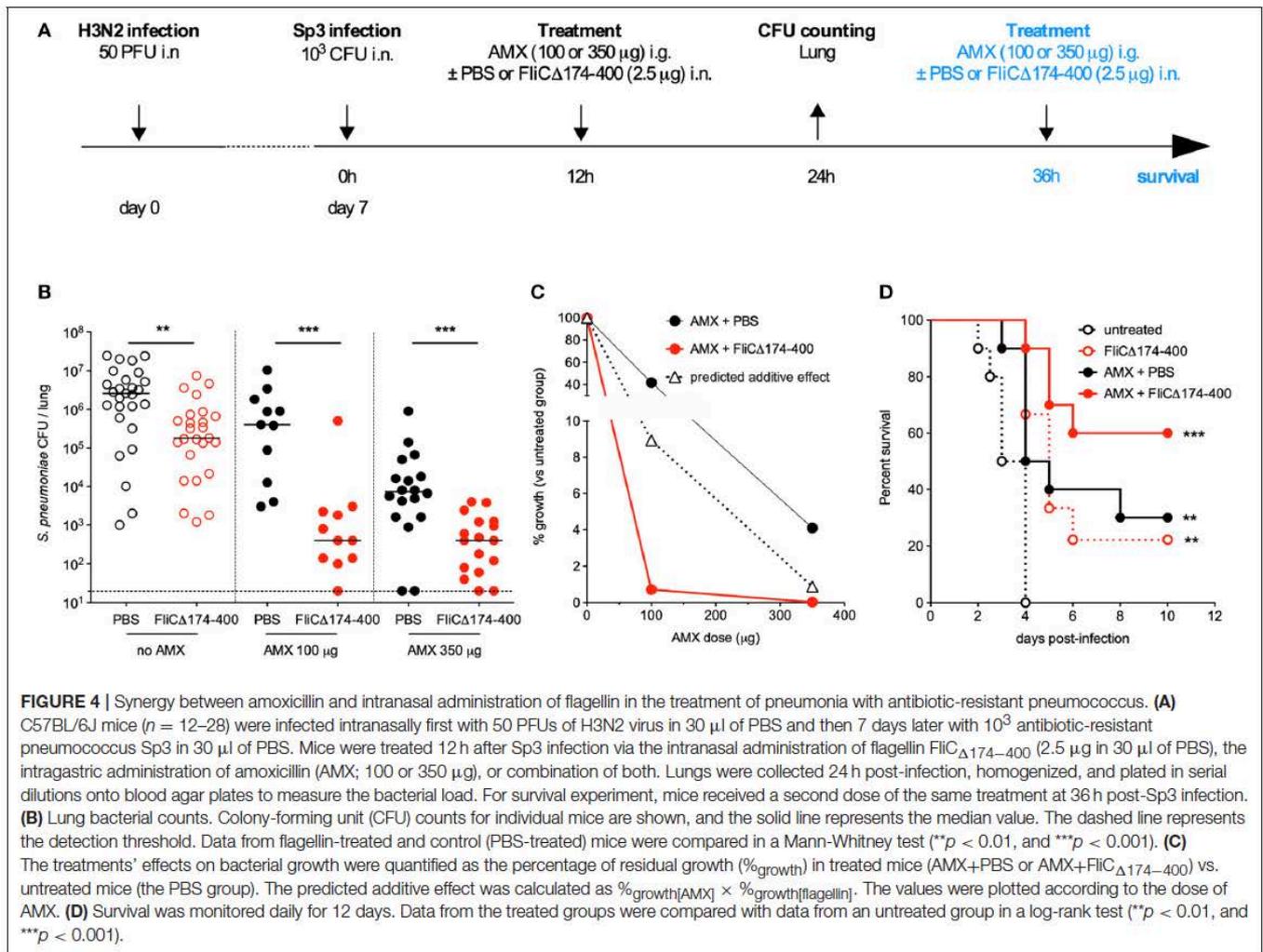
Since infection by influenza virus induces major changes in lung integrity and immune cell populations, we investigated the immunomodulatory impact of flagellin on post-flu respiratory infections by the antibiotic-resistant Sp3 strain. To this end, C57BL/6 mice were infected with influenza A virus at day 0 and then challenged with antibiotic-resistant Sp3 at day 7. Treatments with oral AMX (100 μg) combined or not with intranasal flagellin (2.5 μg) were administered 12 h after Sp3 infection. Lungs were collected 2 h post-treatment for transcriptional analysis using RT-qPCR assays, as described in Figure 1. We observed that despite the superinfection, flagellin still enhanced the transcription of *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl20*, *Il1b*, *Il6*, and *S100a9* genes, i.e., surrogate markers of TLR5-mediated lung stimulation (Figure 5A). We next quantified the cytokine/chemokine production after 6 h of treatment both in the BAL fluids and lung protein extracts. Delivery of flagellin in the lung of AMX-treated pneumococcal superinfection significantly increased levels of CCL20, CXCL1, CXCL2, and Tumor-necrosis factor (TNF) both in the lungs (Figure 5B) and in the BAL fluids (Figure 5C) in AMX+flagellin-treated mice compared with AMX+PBS-treated mice. We also observed increased IL-6 production in both compartments although it was not statistically significant. Production of IL-1 β (or pro-IL-1 β) was detected only in the lung tissue and was increased in flagellin-treated mice. Finally, we used flow cytometry to evaluate immune cell populations in BAL fluids and lung tissue collected 12 h post-treatment. The analysis showed that the neutrophil counts were higher in mice having receiving the combination treatment (i.e., TLR5 stimulation and AMX) than in mice having receiving AMX alone both in the lung tissues (Figure 5D) and the BAL fluids (Figure 5E). Interestingly, the innate response to combination treatment was also detectable in blood since the production of the inflammatory mediators were significantly augmented at 2 h (for IL-6, CCL20, CXCL1, and CXCL2) and

6 h (CCL20 and CXCL1) compared to AMX alone treatment (Supplementary Figure 1). The blood cytokine production then diminished to an undetectable or very low level at 12 h. Thus, these observations showed that the mucosal delivery of flagellin does not induce sustained systemic inflammation. Overall, the innate immune response to flagellin was effectively stimulated in the context of the influenza immunological imprinting, the superinfection challenge, and the antibiotic treatment.

DISCUSSION

Our present results demonstrated the synergistic efficacy of a combination of an antibiotic (AMX or SXT) and the local administration of the immunomodulatory biologic flagellin against respiratory infections caused by *S. pneumoniae*. Of note, the efficacy of combined antibiotic + flagellin treatment, previously demonstrated in inbred BALB/c and C57BL/6 mice by Porte et al. (20), was here extended to outbred Swiss mice, showing genetic background independence of the protection. Remarkably, flagellin was able to trigger lung innate immune responses in the context of inflammation (i.e., airways damaged by bacterial pneumonia and flu). Immunostimulation in the lung was a dose-dependent process that was saturating by microgram-per-animal levels of flagellin. The synergy appeared to be independent of the antibiotic dose level and the antibiotic's target, since AMX acts on the bacterial cell wall and SXT inhibits DNA synthesis. The present study is also the first to have demonstrated that stimulating innate immunity can treat severe pneumonia induced by antibiotic-resistant pathogenic bacteria; this may open up new avenues for the treatment of pneumonia in the context of growing antimicrobial resistance.

It has been demonstrated that intranasal administration of flagellin activates TLR5-dependent local innate responses with broad-spectrum antibacterial activity (11, 15, 16, 20, 21, 23). The pulmonary response includes the production of various antimicrobial peptides (i.e., cathelicidin antimicrobial peptide and the β -defensins), cytokines (TNF, IL-1 β , and IL-6), and chemokines (i.e., CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL5, and CXCL8). This cytokine and chemokine production is in line with the observed recruitment of phagocytes (and especially neutrophils) in the lung following the intranasal administration of flagellin to naïve mice (15, 23, 38). Flagellin intranasal administration specifically triggers TLR5-mediated transcription in the lungs from 2 to 30 h after a pneumococcus infection or from 7 to 14 days after an influenza infection (20). Here, we demonstrated that the lung innate immune signature induced by intranasal instillation of flagellin is still effective in a highly inflammatory context with associated lung damage (pneumococcal post-influenza superinfection), and is not influenced by antibiotic treatment (Figure 5). Interestingly, earlier reports indicated that influenza infections promote the partial but sustained desensitization of TLR-mediated lung innate responses and a reduction in TLR expression (39). Our observations demonstrate that, in the physiopathological context of superinfection, flagellin is still able to trigger sufficient levels of innate defense and exert synergy with antibiotics (Figure 4).



Airway epithelial cells have been identified as an important component for detection of flagellin and TLR5 signaling at homeostasis (21, 22). These sentinel cells not only sense danger signals introduced in the conducting airways but also produce factors to directly impair the colonization and growth of pathogens or indirectly mobilize phagocytic and immune cells to clear infection. More generally, airway epithelium TLR signaling represent a key driving force in antibacterial defense (40). Recently, Anas et al. demonstrated an essential contribution of epithelial signaling in the respiratory tract in response to flagellin in the context of infection with *Pseudomonas aeruginosa* (41). Our data showed that several antimicrobial peptides (S100A9), cytokines (IL-1 β and TNF), and chemokines (CCL20, CXCL1, and CXCL2) that were associated to epithelial responses are also upregulated after the administration of the combination treatment in the post-flu superinfection model, suggesting that the epithelium is also an important flagellin-specific driving force in the lung damaged by viral and bacterial infections. Targeting epithelium is a serious benefit for immunostimulation since it allows reducing the dose and bypassing systemic adverse effects.

Our data contribute to highlight the therapeutic potential of the association of two drugs with distinct modes of action:

an antibiotic with a direct effect on bacteria, and a TLR5-specific stimulator of innate immunity with indirect antibacterial activity mobilizing both multiple phagocytic host cells and various antimicrobial factors such as antibacterial peptides, and chemokines and cytokines that mobilize and activate immune cells. Besides pathogen killing, the multitargeting of innate immunity by flagellin could impact on bacterial fitness and thereby increase susceptibility to the antibiotic. The innate immune response induced by TLR5 signaling may also modify the distribution of antibiotic in lung tissues while the antibiotic, by damaging the pathogen, could also enhance the immune signaling. In addition, the pharmacokinetics of the antibiotic and the immunostimulator, i.e., a short-term dose-dependent effect for the antibiotic, and an immediate and long-lasting impact of the immunostimulator due to cell mobilization, are likely complementary. Finally, flagellin, by modulating innate immunity in the respiratory tract, has been shown to enhance the mucosal and systemic adaptive immunity (22, 23). Such property may be of interest to elicit anti-pathogen immune memory and prevent recurrent/relapse infections.

As an opportunistic bacterium, *S. pneumoniae* frequently colonizes the upper respiratory tract and thus represents

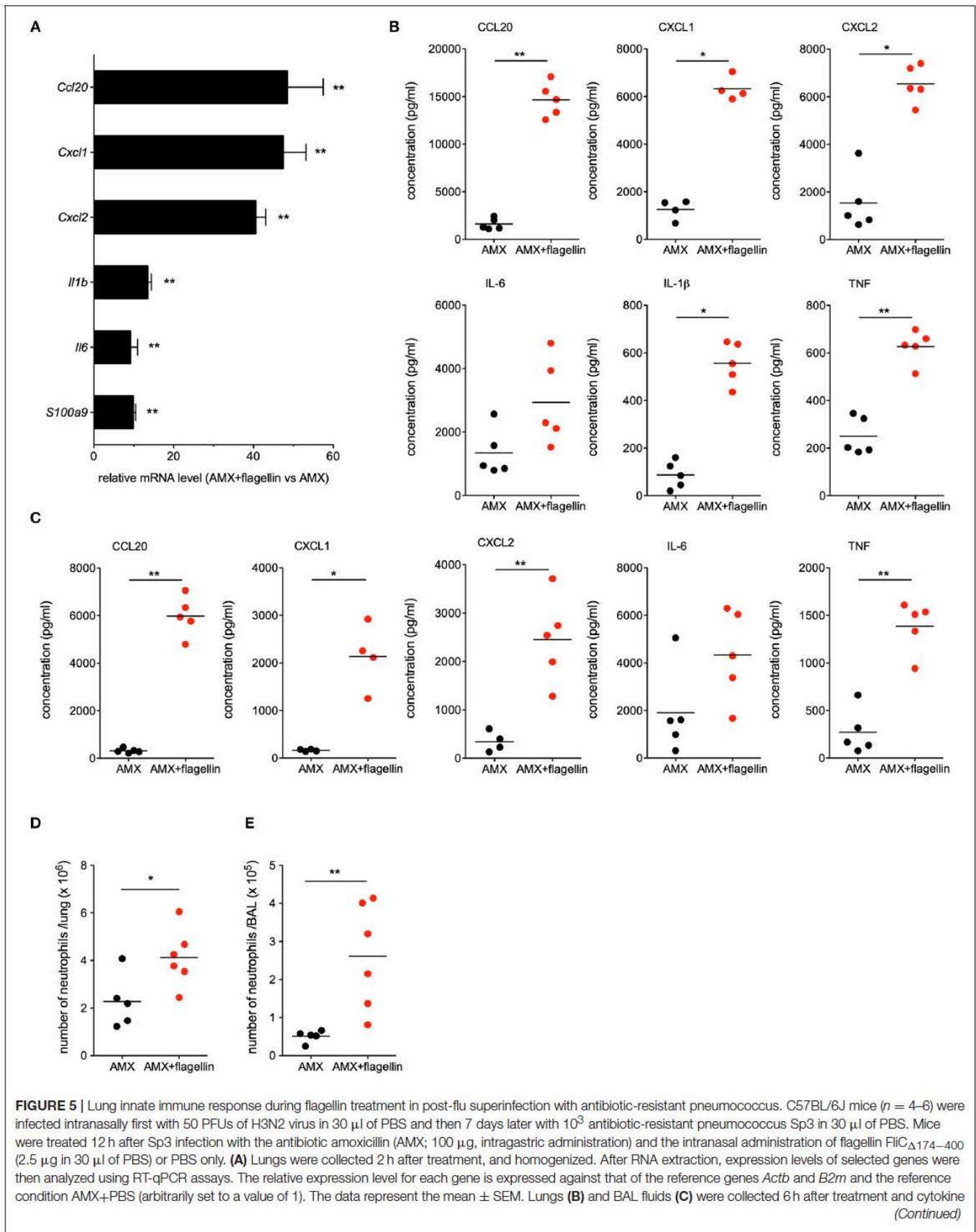


FIGURE 5 | and chemokine levels were measured by ELISA. Data from AMX+flagellin-treated and AMX+PBS-treated mice were compared in a Mann-Whitney test and are represented as individual values and mean. Lungs (**D**) and BALs (**E**) were collected 12 h after treatment. Lungs and BAL cell suspensions were stained using a mixture of antibodies specific for surface markers before flow cytometry analysis. Neutrophils were defined as CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ cells after exclusion of dead cells and alveolar macrophages (CD45⁺SiglecF⁺CD11c⁺ cells) from the analysis. Numbers of neutrophils in the lung parenchyma (**D**) and BAL fluids (**E**) are shown for individual animal and the line represents the mean. Data from AMX+flagellin group were compared to those of AMX+PBS group in a Mann-Whitney test. Statistical significance is indicated as follows: * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$.

the prime cause of bacterial-associated CAP (42). However, other microorganisms can cause CAP and healthcare-associated pneumonia; they include Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, Gram-negative bacteria like *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, mycoplasma (*M. pneumoniae*) and intracellular bacteria (*Legionella pneumophila*) (1). The diagnosis and treatment of CAP is complicated by the broad variety of causative agents, and the progression of antibacterial resistance. In this context, immunomodulators such as flagellin are of great interest because they activate a large number of antimicrobial immune mechanisms. Indeed, flagellin has already demonstrated its ability to protect against various pathogens including Gram-negative and Gram-positive bacteria (8, 12–16, 20). Furthermore, our present results showed that the therapeutic synergy between antibiotic and intranasal flagellin is independent of the antibiotic's mechanism of action—suggesting that flagellin can potentially be combined with various antibiotics for a wide range of clinical situations. The synergistic effects of the combined therapy have been determined to be independent of capsule antigenicity (serotype 1 or 3) of pneumococcus, suggesting that the general innate immune protecting mechanisms triggered by flagellin could potentially be effective against a large variety of serotypes.

Given the progression of antibiotic resistance, a model of infection by antibiotic-resistant bacteria would constitute an important tool for developing alternative anti-infectious approaches. We first attempted to develop such a model in immunocompetent animals. The multidrug-resistant clinical isolate of pneumococcus Sp3 was unable to induce a lethal infection, even at high doses. Acquisition of antibiotic resistance is often associated with a loss of bacterial fitness (43), which might explain the Sp3's very low virulence in naïve mice. It is now becoming clear that many cases of bacterial pneumonia result from co-infections or consecutive infections (especially influenza virus infections) (37). As shown by Figures 3D,E, 4, influenza virus infection creates a favorable environment for colonization and invasion by the low-virulence antibiotic-resistant pneumococcus Sp3 strain. Our data demonstrated that the flagellin+AMX combination treatment effectively reduces the bacterial burden caused by the Sp3 strain in the lung, and improves the survival rate among treated mice. Our proof-of-concept findings may be transposable to the clinic for patients with co-infections and superinfections, which are relevant physiopathological causes of hospitalization and complicated pneumonia.

Antibiotics constitute the current standard of care for bacterial pneumonia, and the growing threat of antibiotic resistance is a major public health concern. When defining the dosing regimens of antibiotics used to treat a patient, the physician

must take account of the antibiotic's pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics. The relationship between *in vivo* exposure to the drug and *in vitro* susceptibility of the bacteria conditions not only the treatment's clinical outcome (i.e., clearance of the infection) but also adverse effects or drug toxicity (44). Thus, the maximum dose of antibiotic that can be administered to a patient may not be enough to totally clear highly resistant bacteria. Our data suggest that the antibacterial efficacy of these antibiotic dose levels can be synergistically enhanced by the effect of flagellin on lung innate immunity.

Taken as a whole, the present results suggest that the selective boosting of innate lung immunity by flagellin improves the therapeutic outcome of antibiotic treatment. In humans, this approach might be a useful generic alternative to the treatment of bacterial pneumonia, thereby reducing the antibiotic dose and regimen as well as the emergence of antibiotic resistance. Moreover, such strategy promotes multitarget inhibition through multiple innate immune effectors that should be more resistant to the development of resistance and may restore some antibacterial activity to antibiotic in the context of antibiotic resistance. Characterization of flagellin's contribution to the lung antibacterial defenses at the molecular and cellular level and the protein's synergy with antibiotics is likely to open up new avenues for the immunotherapy of respiratory tract infections.

ETHICS STATEMENT

All experiments complied with institutional regulations and ethical guidelines (C59-350009, Institut Pasteur de Lille; Protocol Apafis #5164 - 2015121722429127). The protocols were validated by the ethical committee for animal experiments (Comité d'éthique en expérimentation animale—Nord-Pas-de-Calais CEEA 75).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LM performed all animal, RT-qPCR, and flow cytometry experiments. FC, RP, DC, and CF provided LM with technical assistance. FW analyzed the bacterial species and antibiotic resistance. LM, CC, and J-CS designed experiments and wrote the manuscript. J-CS and CC supervised the experimental work as a whole.

FUNDING

The study was funded by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, Inserm-Transfert (grant: CoPoC Innatebiotic R12041ES), and the Era-Net Joint Programming Initiative

on Antimicrobial Resistance and the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-15-JAMR-0001-01). LM is a fellow of the Innovation Pharmaceutique et Recherche program.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Aneesh Vijayan for technical assistance in the production and quality control of recombinant proteins. We also

thank the BICeL flow cytometry core facility and the animal facility at the Institut Pasteur de Lille for technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00723/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Ieven M, Coenen S, Loens K, Lammens C, Coenjaerts F, Vanderstraeten A, et al. Aetiology of lower respiratory tract infection in adults in primary care: a prospective study in 11 European countries. *Clin Microbiol Infect.* (2018) 24:1158–63. doi: 10.1016/j.cmi.2018.02.004
- Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N Engl J Med.* (2015) 373:415–27. doi: 10.1056/NEJMoa1500245
- Quinton LJ, Mizgerd JP. Dynamics of lung defense in pneumonia: resistance, resilience, and remodeling. *Annu Rev Physiol.* (2015) 77:407–30. doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071937
- Schäberle TF, Hack IM. Overcoming the current deadlock in antibiotic research. *Trends Microbiol.* (2014) 22:165–7. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.007
- WHO. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance [Internet]*. WHO. Available online at: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/> (accessed August 23, 2018).
- Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front Immunol.* (2013) 4:387. doi: 10.3389/fimmu.2013.00387
- Hancock REW, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol.* (2012) 10:243–54. doi: 10.1038/nrmicro2745
- Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J Infect Dis.* (2010) 201:534–43. doi: 10.1086/650203
- Brandl K, Plitas G, Mihu CN, Ubeda C, Jia T, Fleisher M, et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature.* (2008) 455:804–7. doi: 10.1038/nature07250
- Abt MC, Buffie CG, Sušac B, Becattini S, Carter RA, Leiner I, et al. TLR-7 activation enhances IL-22-mediated colonization resistance against vancomycin-resistant enterococcus. *Sci Transl Med.* (2016) 8:327ra25. doi: 10.1126/scitranslmed.aad6663
- Vijayan A, Rumbo M, Carnoy C, Sirard J-C. Compartmentalized antimicrobial defenses in response to flagellin. *Trends Microbiol.* (2018) 26:423–35. doi: 10.1016/j.tim.2017.10.008
- Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, Frias A, Sloane VM, Xu J, et al. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol.* (2008) 180:8280–5. doi: 10.4049/jimmunol.180.12.8280
- Jarchum I, Liu M, Lipuma L, Pamer EG. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infect Immun.* (2011) 79:1498–503. doi: 10.1128/IAI.01196-10
- Andersen-Nissen E, Hawn TR, Smith KD, Nachman A, Lampano AE, Uematsu S, et al. Cutting edge: Tlr5-/- mice are more susceptible to *Escherichia coli* urinary tract infection. *J Immunol.* (2007) 178:4717–20. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.4717
- Muñoz N, Van Maele L, Marqués JM, Rial A, Sirard J-C, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun.* (2010) 78:4226–33. doi: 10.1128/IAI.00224-10
- Yu F, Cornicelli MD, Kovach MA, Newstead MW, Zeng X, Kumar A, et al. Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide. *J Immunol.* (2010) 185:1142–9. doi: 10.4049/jimmunol.1000509
- Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, Denning TL, et al. Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science.* (2014) 346:861–5. doi: 10.1126/science.1256999
- Hossain MS, Ramachandiran S, Gewirtz AT, Waller EK. Recombinant TLR5 agonist CBLB502 promotes NK cell-mediated anti-CMV immunity in mice. *PLoS ONE.* (2014) 9:e96165. doi: 10.1371/journal.pone.0096165
- Liu X, Gao N, Dong C, Zhou L, Mi Q-S, Standiford TJ, et al. Flagellin-induced expression of CXCL10 mediates direct fungal killing and recruitment of NK cells to the cornea in response to *Candida albicans* infection. *Eur J Immunol.* (2014) 44:2667–79. doi: 10.1002/eji.201444490
- Porte R, Fougereon D, Muñoz-Wolf N, Tabareau J, Georget A-F, Wallet F, et al. A toll-like receptor 5 agonist improves the efficacy of antibiotics in treatment of primary and influenza virus-associated pneumococcal mouse infections. *Antimicrob Agents Chemother.* (2015) 59:6064–72. doi: 10.1128/AAC.01210-15
- Janot L, Sirard J-C, Secher T, Noulin N, Fick L, Akira S, et al. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur J Immunol.* (2009) 39:1587–96. doi: 10.1002/eji.200838907
- Van Maele L, Fougereon D, Janot L, Didierlaurent A, Cayet D, Tabareau J, et al. Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. *Mucosal Immunol.* (2014) 7:489–500. doi: 10.1038/mi.2013.66
- Fougereon D, Van Maele L, Songhet P, Cayet D, Hot D, Van Rooijen N, et al. Indirect Toll-like receptor 5-mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract. *Vaccine.* (2015) 33:3331–41. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.05.022
- Fouquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect.* (2015) 3:e00149. doi: 10.1002/prp2.149
- Rao GG, Li J, Garonzik SM, Nation RL, Forrest A. Assessment and modelling of antibacterial combination regimens. *Clin Microbiol Infect.* (2017) 24:689–96. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.004
- Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol.* (2014) 52:4124–8. doi: 10.1128/JCM.01121-14
- Norden CW, Wentzel H, Keleti E. Comparison of techniques for measurement of *in vitro* antibiotic synergism. *J Infect Dis.* (1979) 140:629–33. doi: 10.1093/infdis/140.4.629
- Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov S, Porte R, Deruy E, et al. Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Infect Dis.* (2014) 210:493–503. doi: 10.1093/infdis/jiu106
- Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Renneson J, Blanc F, Pichavant M, et al. Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: potential role in protection against lung epithelial damages. *J Biol Chem.* (2012) 287:8816–29. doi: 10.1074/jbc.M111.304758
- Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Blanc F, Pichavant M, Renneson J, et al. Potential role of invariant NKT cells in the control of pulmonary inflammation and CD8+ T cell response during acute influenza A virus H3N2 pneumonia. *J Immunol.* (2011) 186:5590–602. doi: 10.4049/jimmunol.1002348
- De Santo C, Arscott R, Booth S, Karydis I, Jones M, Asher R, et al. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol.* (2010) 11:1039–46. doi: 10.1038/ni.1942
- Nempoint C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard J-C. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization

- and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol.* (2008) 181:2036–43. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.2036
33. Planer JD, Hulverson MA, Arif JA, Ranade RM, Don R, Buckner FS. Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* (2014) 8:e2977. doi: 10.1371/journal.pntd.0002977
34. McNamee LA, Harmsen AG. Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun.* (2006) 74:6707–21. doi: 10.1128/IAI.00789-06
35. Kudva A, Scheller EV, Robinson KM, Crowe CR, Choi SM, Slight SR, et al. Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice. *J Immunol.* (2011) 186:1666–74. doi: 10.4049/jimmunol.10.02194
36. Rynda-Apple A, Robinson KM, Alcorn JF. Influenza and bacterial superinfection: illuminating the immunologic mechanisms of disease. *Infect Immun.* (2015) 83:3764–70. doi: 10.1128/IAI.00298-15
37. McCullers JA. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol.* (2014) 12:252–62. doi: 10.1038/nrmicro3231
38. Honko AN, Mizel SB. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect Immun.* (2004) 72:6676–9. doi: 10.1128/IAI.72.11.6676-6679.2004
39. Didierlaurent A, Ferrero I, Otten LA, Dubois B, Reinhardt M, Carlsen H, et al. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol.* (2004) 172:6922–30. doi: 10.4049/jimmunol.172.11.6922
40. Leiva-Juárez MM, Kolls JK, Evans SE. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunol.* (2018) 11:21–34. doi: 10.1038/mi.2017.71
41. Anas AA, van Lieshout MHP, Claushuis TAM, de Vos AF, Florquin S, de Boer OJ, et al. Lung epithelial MyD88 drives early pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by a flagellin dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2016) 311:L219–228. doi: 10.1152/ajplung.00078.2016
42. Donkor ES. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front Cell Infect Microbiol.* (2013) 3:7. doi: 10.3389/fcimb.2013.00007
43. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* (2010) 8:260–71. doi: 10.1038/nrmicro2319
44. de Velde F, Mouton JW, de Winter BCM, van Gelder T, Koch BCP. Clinical applications of population pharmacokinetic models of antibiotics: challenges and perspectives. *Pharmacol Res.* (2018) 134:280–8. doi: 10.1016/j.phrs.2018.07.005

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Matarazzo, Casilag, Porte, Wallet, Cayet, Faveeuw, Carnoy and Sirard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe II : Publications et communications scientifiques

Autres publications :

PORTE R., **MATARAZZO L.**, GEORGEL AF., SIRARD J-C, CARNOY C. Les *Toll-like receptors* : des cibles thérapeutiques anti-infectieuses. Feuilles de Biologie, 2017, 335, 19-27

Communications :

MATARAZZO L., CASILAG F. PORTE R., CAYET D., WALLET F., SIRARD J-C, CARNOY C. Anti-infectious properties of TLR5 agonist Flagellin in association with antibiotic. Annual joint meetings for the French Society for Immunology and the French society association, 7-9 Novembre 2017, Reims (**Poster**)

MATARAZZO L. PORTE R., CASILAG F., CAYET D., SIRARD J-C, CARNOY C. Therapeutic synergy between recombinant flagellin and antibiotics in bacterial pneumonia. 18ème journée André Verbert (colloque des doctorants), 13 Septembre 2018, Lille (**poster**)

MATARAZZO L., CASILAG F. PORTE R., CAYET D., WALLET F., SIRARD J-C, CARNOY C. Boosting antibiotics with an intranasal TLR5 agonist to fight antibiotic-resistant pneumonia. 16th International Conference on Innate Immunity, 7-12 Juin 2019, Rhodes – Grèce (**poster**)

Etude des propriétés anti-infectieuses des agonistes de Toll-like receptors en association avec des antibiotiques dans le traitement des infections respiratoires

Résumé : Les pneumonies bactériennes, notamment à *Streptococcus pneumoniae*, représentent la troisième cause de mortalité au niveau mondiale et la progression constante de la résistance aux antibiotiques complique la prise en charge des patients. La stimulation de l'immunité innée, de par sa rapidité d'activation et la grande variété des mécanismes de défense mis en jeu, est une approche intéressante pour le développement d'alternatives thérapeutiques anti-infectieuses. Notre laboratoire a montré précédemment que l'administration intra-nasale de flagelline, agoniste du récepteur de l'immunité innée Toll-like receptor 5, en association avec l'antibiothérapie, était plus efficace que l'antibiothérapie seule contre l'infection pulmonaire à *S. pneumoniae* chez la souris.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré que l'association antibiotique – flagelline était synergique dans ce modèle, avec deux antibiotiques différents, l'amoxicilline et le cotrimoxazole. Nous avons également montré la synergie du traitement combiné amoxicilline – flagelline dans un modèle murin de surinfection bactérienne post-grippale par une souche de *S. pneumoniae* résistante à l'amoxicilline. En parallèle, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de défense immunitaires cellulaires et moléculaires responsables de l'efficacité anti-infectieuse de la flagelline en association avec les antibiotiques contre l'infection à *S. pneumoniae*. Des études de transcriptomique et protéomique sur le poumon et le liquide de lavage broncho-alvéolaire nous ont permis de mettre en évidence une activation par la flagelline des voies de signalisation associées au recrutement, à l'activation et aux capacités antimicrobiennes des cellules immunitaires innées, notamment des neutrophiles. Un recrutement significatif, rapide et transitoire de neutrophiles dans le parenchyme pulmonaire et le LBA a été observé par cytométrie en flux chez les souris infectées par *S. pneumoniae* et traitées par l'association amoxicilline – flagelline par rapport aux souris traitées par amoxicilline seule. L'étude de l'effet protecteur du traitement combiné amoxicilline – flagelline dans un modèle murin de déplétion sélective des neutrophiles et chez des souris chimères *Cxcr2*^{-/-} présentant un défaut de recrutement des neutrophiles nous a permis de confirmer le rôle essentiel de ces cellules pour l'efficacité de la flagelline contre l'infection pneumococcique. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de différence phénotypique ou fonctionnelle des neutrophiles pulmonaires recrutés dans le contexte de l'infection pneumococcique en présence ou en l'absence de flagelline, suggérant que le rôle essentiel des neutrophiles dans l'efficacité de la flagelline contre l'infection à *S. pneumoniae* serait lié à une augmentation de leur nombre, mais pas de leurs capacités fonctionnelles.

Ces résultats démontrent l'intérêt de la stimulation de l'immunité innée par la flagelline en tant que stratégie thérapeutique anti-infectieuse innovante pour le traitement des pneumonies, permettant de renforcer l'efficacité de l'antibiothérapie contre des souches résistantes, de diminuer les doses d'antibiotiques utilisées et de limiter l'apparition de résistances.

Mots-clés : flagelline, Toll-like receptor 5, antibiotique, *Streptococcus pneumoniae*, pneumonie, résistance