Université de Lille

École Doctorale Biologie Santé

THESE

Pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Charlotte COSTA

Le 6 septembre 2024

Immunothérapie des pneumonies bactériennes résistantes aux antibiotiques

Devant le jury composé de :

M. Le Professeur **Benoît FOLIGNE**	Président du jury
Mme Le Docteur **Maha Zohra LADJEMI**	Rapporteur
M. Le Docteur **Benoit MARTEYN**	Rapporteur
Mme Le Docteur **Emmanuelle VARON**	Examinateur
M. Le Docteur **Jean-Claude SIRARD**	Directeur de thèse
Mme Le Docteur **Mara BALDRY**	Encadrant de thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille,

INSERM U1019, CNRS UMR9017, Université de Lille

Équipe « Bactéries, Antibiotiques et Immunité »

Remerciements

Je tiens à remercier le **Professeur Benoît Foligné**, de me faire l'honneur de présider ma soutenance de thèse.

Ma gratitude va aux **Docteurs Maha Zohra Ladjemi** et **Benoit Marteyn** pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Merci au **Docteur Emmanuelle Varon** d'avoir accepté d'être examinateur de ces travaux.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, le **Docteur Florence Niedergang** et le **Docteur Jan-Willem Veening**, pour nos échanges qui ont contribués à l'avancée de ce projet de thèse.

Tous mes remerciements vont à mon directeur de thèse, le **Docteur Jean-Claude Sirard**. Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire, et pour la confiance que vous m'avez accordée. Merci pour votre encadrement et votre soutien durant ces quatre années, et pour nos échanges qui m'ont fait grandir scientifiquement.

Je n'ai pas de mots pour exprimer ma gratitude à mon encadrante de thèse, le **Docteur Mara Baldry**, qui est très rapidement devenue une grande amie. A big thank for everything, both scientifically and even more personally. We've done this project together, as Marlotte, mainly really early in the morning and late in the evening, wasn't it fun ? This thesis project but also my life these last years wouldn't have been the same without you. Thank you for your unwavering daily support, through good times and bad, and all the adventures we've had together, and here's to future ones !

Merci à l'ensemble de l'équipe BAI, les membres actuels comme ceux qui sont partis depuis, pour m'avoir si bien accueilli dans cette équipe. **Daphnée**, **Delphine**, **Laurye**, **Christelle**, **Anne**, **Christophe**, **Farouk**, **Jo**, **Lisa**, **Meha**, **Xing**, **Mélanie**, **Yasmine**, **Laura**, **Margot** et tous les autres, je vous remercie pour votre soutien et votre bonne humeur, qui m'ont été précieux durant ce parcours. Votre expertise scientifique a grandement contribué à l'avancée de ce projet. Un merci particulier à **Yasmine**, avec qui j'ai partagé un bureau, les galères de la thèse mais aussi beaucoup de bons moments. **Daphnée**, ton sourire constant, ton aide et ton amour des pâtisseries m'ont souvent permis de garder le moral et d'avancer (faites que l'impertinente réouvre au plus vite !). **Mélanie**, merci pour avoir supporté mes questions

inlassables sur le FACS, mais surtout pour ton soutien et tous les bons moments. **Xing**, merci d'être mon amie et pour tout ce qu'on a partagé au cours de ces années.

Merci à mes rencontres et amis lillois, qui m'ont permis de m'échapper de la thèse grâce à beaucoup de moments de partage qui m'ont été précieux. Je remercie particulièrement **Oriane**, pour tout ce qu'on a vécu et nos moments d'escapade loin de Lille. Je remercie chaleureusement **Laura**, **Esther**, **Aless**, **Guillaume** et **Quentin** pour ce qu'on a partagé.

Merci à ma bande d'amis de la Fac, **Morgane**, **Manon**, **Tom** et **Julien**, vous m'êtes tous très précieux. Les moments où on est tous réunis, même si ça n'arrive pas aussi souvent que je le voudrais, me rendent très heureuse. Merci d'avance d'avoir fait ce voyage jusqu'à Lille pour la soutenance, et à demain dans le Tarn ;)

Tout cela n'aurait pas été possible sans **ma famille**, qui a été le plus grand des soutiens. Merci à **mes parents** d'avoir toujours été là, peu importe ce que j'entreprends. Vos encouragements, vos conseils et votre fierté m'ont toujours poussé à avancer.

Enfin mais non des moindres, un grand merci à **mon frère** et à **Bérénice**, sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Je vais éviter la redite de votre discours de mariage et rester simple, mais gardez le en tête. Toute ma gratitude pour votre contribution à cette thèse, de manière directe ou indirecte. Vos conseils, votre écoute, votre soutien et votre présence m'ont été précieux. Merci pour les repas chauds quand je rentrais tard le soir après des manips, soyez sûrs que ça a été grandement apprécié ;) Sur ce, bon courage pour la tienne Max !

Merci à la Commission européenne à travers le projet FAIR pour le financement de ce projet de thèse.



Résumé

Streptococcus pneumoniae, ou pneumocoque, est la principale cause de pneumonie communautaire, entraînant une morbidité et une mortalité importantes, en particulier chez les enfants de moins de cinq ans et les personnes âgées. L'amoxicilline est le traitement de première intention ; cependant, la résistance croissante à l'amoxicilline complique le traitement de ces infections et les positionnent donc comme un problème majeur de santé publique. L'immunité innée mobilise divers mécanismes de défense antimicrobienne et son ciblage représente une stratégie prometteuse pour résoudre ce problème. Une immunothérapie combinant l'amoxicilline à l'inhalation de flagelline, un agoniste du récepteur de l'immunité innée Toll-like receptor 5, a été développée. La preuve de concept de ce traitement combiné a été montrée dans un modèle murin de pneumonie. La combinaison amoxicilline et flagelline s'est montrée plus efficace que l'antibiotique seul car elle cause une réduction plus importante de la charge bactérienne dans les poumons et de la dissémination systémique et elle augmente la survie. L'efficacité de cette thérapie a été observée dans des modèles de pneumonie primaire ou de surinfection grippale, en utilisant des souches sensibles ou résistantes à l'amoxicilline. La thérapie combinée renforce la réponse immunitaire innée en augmentant de manière significative le recrutement de neutrophiles dans les voies respiratoires et en stimulant la production de médiateurs immunitaires.

Le premier objectif de ma thèse était d'étudier l'impact de la thérapie combinée sur la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques. Dans ce contexte, un modèle murin de co-infection utilisant des souches isogéniques sensibles et résistantes à l'amoxicilline a été établi. Ce travail a montré que la flagelline permet de diminuer 200 fois la dose d'antibiotique tout en conservant la même efficacité que l'antibiotique seul. En outre, l'adaptation de ce modèle, qui reproduit la sélection de résistance aux antibiotiques à la suite d'une antibiothérapie, a montré que le traitement adjuvant réduit et retarde l'émergence de bactéries résistantes par rapport à l'antibiotique seul. Ces résultats suggèrent que l'association de l'amoxicilline et de la flagelline permet non seulement d'améliorer l'efficacité thérapeutique, mais aussi de diminuer le développement de résistance aux antibiotiques. De plus, un modèle mathématique a été développé pour capturer la dynamique des populations au cours de l'infection pulmonaire et a estimé que l'effet immunomodulateur de la flagelline multiplie 20 fois la clairance bactérienne.

Le deuxième objectif de ma thèse était d'explorer les mécanismes immunitaires responsables de l'effet protecteur induit par la thérapie. L'analyse transcriptomique du poumon a révélé que les voies associées à l'infiltration des cellules myéloïdes et aux fonctions antimicrobiennes sont induites par la flagelline. Mes résultats montrent également que l'efficacité thérapeutique repose sur les neutrophiles, qui sont mobilisés de manière précoce et transitoire dans les voies respiratoires. Ces neutrophiles sont spécifiquement localisés à la périphérie des bronches, des alvéoles et des vaisseaux pulmonaires et présentent une activité phagocytaire accrue. Enfin, l'analyse par séquençage de l'ARN en cellule individuelle a mis en évidence six sous-populations distinctes de neutrophiles. La flagelline semble reprogrammer les neutrophiles recrutés vers un profil antibactérien, contribuant ainsi à l'efficacité du traitement.

En conclusion, ce travail a permis d'identifier les neutrophiles comme des effecteurs clés de la protection et des cibles potentielles pour une thérapie dirigée vers l'hôte, étant donné leur plasticité en réponse au traitement.

Mots-clés : Toll-like receptor 5, antibiotique, flagelline, pneumonie, résistance, neutrophiles

Titre en anglais : Immunotherapy of antibiotic-resistant bacterial pneumonia

Résumé en anglais

Streptococcus pneumoniae, or pneumococcus, is the primary cause of community-acquired pneumonia, leading to significant morbidity and mortality, especially in children under five and elderly. Amoxicillin is the first-line treatment; however, increasing resistance to amoxicillin complicates the treatment of these infections and exacerbates this public health issue. Boosting innate immunity, which mobilizes various antimicrobial defense mechanisms and is rapidly activated, is a promising strategy to overcome this issue. An immunotherapy has been developed that combines the standard of care amoxicillin treatment with inhaled flagellin, an agonist of Toll-like receptor 5, which stimulates innate immunity. This combination treatment has proven superior efficacy in mouse pneumonia model compared to antibiotic alone, by reducing bacterial load in the lungs, limiting systemic dissemination and increasing survival rate. The efficacy of the combined therapy with amoxicillin and flagellin was observed in primary pneumonia or superinfection of flu, using either amoxicillin-sensitive or -resistant strains. The combination therapy enhances the innate immune response by significantly increasing neutrophil recruitment into the airways and boosting the production of immune mediators compared to amoxicillin alone.

The first objective of my thesis was to investigate the impact of the combination therapy on the selection of antibiotic resistance. For this purpose, a mouse coinfection model using isogenic amoxicillin-sensitive and -resistant strains was established. The study shows that flagellin allows for a 200-fold reduction in the required antibiotic dose while maintaining the same efficacy as the antibiotic alone. Furthermore, the adapted mouse coinfection model mimicking antibiotic resistance selection following antibiotic therapy showed that adjunct flagellin treatment reduces and delays the emergence of antibiotic-resistant bacteria compared to antibiotic treatment alone. These findings suggest that combining amoxicillin with flagellin not only enhances therapeutic efficacy but also mitigates the development of antibiotic resistance. In addition, a mathematical model was developed that captured the lung infection population dynamics, estimating a 20-fold enhancement in the immunomodulatory effect of flagellin on bacterial clearance.

The second objective of my thesis was to explore the immune mechanisms underlying the therapy-induced protective effects. Transcriptomic analysis of infected lung tissue revealed that flagellin treatment enhances pathways related to myeloid cell infiltration and antimicrobial functions in the airways. My findings also show that the therapeutic efficacy relies significantly on neutrophils, which are mobilized early and transiently into the airways. These neutrophils were specifically localized at the periphery of bronchi, alveoli, and lung vessels and displayed an increased phagocytic activity. Finally, single-cell RNA sequencing analysis revealed high heterogeneity in neutrophil population with six distinct subsets. Flagellin appears to reprogram recruited neutrophils towards antibacterial profile, contributing to the treatment's efficacy.

In conclusion, this work identified the neutrophils as key effectors of protection and potential targets for host-directed therapy, given their plasticity and reprogramming in response to treatment.

Keywords : Toll-like receptor 5, antibiotic, flagellin, pneumonia, resistance, neutrophils

Table des matières

Remerciements ***3***

Résumé ***5***

Table des matières ***7***

Liste des abréviations ***9***

Introduction ***13***

I. Infections pulmonaires à *Streptococcus pneumoniae* **13**

A. Généralités 13

B. Pneumonies à pneumocoques 13

a) Pneumonies, symptômes et étiologie 13

b) Épidémiologie et facteurs de risque des pneumonies à pneumocoque 14

c) Physiopathologie des pneumonies à pneumocoque 15

d) L'agent pathogène *Streptococcus pneumoniae* et ses facteurs de virulence 16

II. Réponse immunitaire innée aux pneumocoques **20**

A. Généralités 20

B. Défense physique : la barrière épithéliale 20

C. Reconnaissance de *S. pneumoniae* par les récepteurs de l'immunité innée 21

a) Les Toll-like receptors 22

b) Les autres PRRs 25

D. Défenses moléculaires et cellulaires lors des pneumonies à pneumocoque 26

a) Défenses moléculaires 26

b) Défenses cellulaires 28

i. Les macrophages alvéolaires 28

ii. Les monocytes inflammatoires 30

iii. Les neutrophiles 30

E. Pathologies associées aux déficiences immunitaires innées 35

III. Prévention et traitement des infections respiratoires à pneumocoque **38**

A. Prévention vaccinale 38

B. Traitements antibiotiques 40

a) Mécanisme d'action de l'amoxicilline 40

b) Paramètres pharmacologiques de l'amoxicilline 42

c) Résistance aux antibiotiques 44

i. Émergence et sélection de la résistance aux antibiotiques 44

ii. Mécanismes de résistance aux antibiotiques 46

IV. Vers de nouvelles thérapies : les immunothérapies **49**

A. De l'antibiothérapie aux immunothérapies 49

B. Modulation de l'immunité innée 50

C. La flagelline et son rôle immunomodulateur 51

a) Rôle du flagelle bactérien 51

b) Structure de la flagelline 53

c) Propriétés immunomodulatrices de la flagelline 54

i. Voie TLR5 54

ii. Voie NLRC4 55

d) Utilisation de la flagelline en thérapie 56

Objectifs *59*

Résultats *61*

Article I : La signalisation via le récepteur Toll-Like receptor 5 pendant la pneumonie à pneumocoques empêche la sélection de la résistance aux antibiotiques **61**

Travaux complémentaires **91**

Article II : Différentes populations de neutrophiles renforcent l'efficacité d'une thérapie dirigée vers l'hôte dans la pneumonie à pneumocoques **95**

Travaux complémentaires **129**

Discussion générale et perspectives *133*

Références bibliographiques *141*

Annexes *163*

Annexe I : Article III **163**

Annexe II : Publications et communications scientifiques **197**

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALR : AIM2-like receptors

AMX : Amoxicilline

ANOVA : Analyse de la variance

AP : Protéine activatrice

ARNc : Acide ribonucléique complémentaire

ARNm : ARN messager

ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain

BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive

CCL : C-C motif chemokine ligand

CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand

DAMP : Damage-associated molecular patterns

DEG : Gènes différentiellement exprimés

DIP : Déficits immunitaires primitifs

DR5 : Death receptor 5

DTT : Dithiothréitol

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

Eno : Enolase

FLAMOD/FliC : Flagelline

fPR1 : Récepteurs aux peptides formylés

GO : Gene ontology

HE : Hématoxyline/éosine

HTO : Hashtag cellulaire

HSV : Virus herpes simplex

Hyl : Hyaluronidase

GMP : Granulocyte-monocytes progenitors

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

IFN : Interferon

IFNAR : IFNα/β receptor

IKK : IκB kinases

IL : Interleukine

IL-1RA : IL-1 receptor antagonist

IN : Intranasal

IG : Intragastrique

IRAK : Interleukine-1 receptor-associated kinase

IRF : Interferon-regulatory factor

ISG : IFN-stimulated genes

LBA : Lavages broncho-alvéolaires

LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

LPS : Lipopolysaccharides

LRR : Leucine-rich repeats

LTA : Acides lipotéichoïques

LytA : Autolysine

MALP : Macrophage-activating lipopeptide

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

Mcl : Myeloid cell leukemia

MFI : Intensité médiane de fluorescence

MPLA : Monophosphoryl lipid A

MPO : Myéloperoxidase

Myd88 : Myeloid differentiation primary response 88

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène

NAG : N-acétylglucosamine

NAIP : NLR family apoptosis inhibitory protein

NAM : N-acétylmuramique

NET : Neutrophil extracellular traps

NF-κB : Nuclear factor-kappa B

NLR : Nod-like receptors

NLRC : NLR family CARD domain-containing protein

NLRP : NLR pyrin domain containing

NO : Oxyde nitrique

Nod : Nucleotide oligomerization domain

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PAMP : Pathogen-associated molecular patterns

PavA : Pneumococcal adherence and virulence factor A

PBS : Phosphate-buffered saline

PCho : Phosphorylcholine

PCR : Polymerase chain reaction

PD : Pharmacodynamique

PD-1 : Programmed cell death protein-1

PiaA : Pneumococcal iron acquisition A

PiuA : Pneumococcal iron uptake A

PK : Pharmacocinétique

PLP : Protéines de liaison aux pénicillines

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

PMN : Polynucléaires neutrophiles

PRR : Pattern recognition receptors

PsaA : Pneumococcal surface adhesin A

Psp : Protéines de surface pneumococciques

RNS : Espèces réactives de l'azote

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

RT-qPCR : Quantitative reverse transcription PCR

SAA : Protéine sérum amyloïde A

scRNA-seq : Single cell RNA-sequencing

SDS-PAGE : Électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium

SEM : Erreur standard de la moyenne

STING : Stimulator of interferon genes

SVF : Sérum de veau fœtal

TA : Acides téichoïques

TGF-β : Transforming growth factor-beta

THYB : Todd Hewitt Yeast Broth

TIR : Toll/IL-1 receptor

TNF : Tumor necrosis factor

TRAF : TNFR-associated factor

TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand

TRAM : TRIF-related adapor molecule

TRIF : TIR domain-containing adaptor-inducing IFN-β

UFC : Unités formant des colonies

UMAP : Uniform Manifold Approximation and Projection

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Introduction

I. Infections pulmonaires à *Streptococcus pneumoniae*

A. Généralités

Le système respiratoire est à l'interface entre le corps et l'environnement extérieur, formant une barrière naturelle qui participe aux échanges gazeux et à l'oxygénation du sang. Il se compose d'une part des voies respiratoires supérieures, comprenant les fosses nasales, le pharynx et le larynx. Ensemble, ils représentent une zone de conduction permettant la filtration et l'humidification de l'air inspiré. Ils se poursuivent par les voies respiratoires inférieures qui sont composées de la trachée puis des bronches qui se subdivisent ensuite au sein des poumons jusqu'aux alvéoles (Mettelman et al., 2022). Les alvéoles pulmonaires assurent les échanges gazeux avec les capillaires sanguins au sein du parenchyme : absorption d'oxygène par le sang, et expulsion de dioxyde de carbone dans les voies aériennes.

De par sa fonction et sa large surface à l'interface avec l'air, le système respiratoire est exposé à une multitude de particules toxiques, polluantes ou allergènes, et sert de voie d'entrée à de nombreux pathogènes. Les microorganismes pathogènes induisent des infections respiratoires que l'on nomme, selon la zone atteinte. Les infections hautes comprennent notamment la sinusite aiguë, la rhinopharyngite et l'angine aiguë. Les infections basses comprennent quant à elles des pathologies telles que la bronchite et la pneumonie (Demoré and Charmillon, 2018). Les infections respiratoires basses sont une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde. Elles représentent la sixième cause de décès mondiale avec plus de 2,3 millions de morts en 2016 et la première cause de décès par maladie infectieuse dans les pays industrialisés (GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators, 2018).

B. Pneumonies à pneumocoques

a) Pneumonies, symptômes et étiologie

Les pneumonies sont la première cause de mortalité parmi les infections respiratoires basses (GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators, 2018), et se caractérisent par une infection partielle ou totale du parenchyme pulmonaire. Elles se distinguent en 3 types selon le

mode d'infection et de contamination : les pneumonies aiguës communautaires ; les pneumonies associées aux soins, acquises en milieu hospitalier ; et les pneumonies par inhalation, qui découlent de l'aspiration de grands volumes de particules non évacués des poumons, plus fréquent chez des personnes dont le réflexe de déglutition est diminué comme après un accident vasculaire cérébral.

Les personnes atteintes de pneumonies présentent des symptômes respiratoires tels que la toux, la dyspnée et l'augmentation des expectorations, associés à de la fièvre, des douleurs thoraciques et un malaise général (Demoré and Charmillon, 2018; Lanks et al., 2019). En plus de ces signes cliniques, une radiographie thoracique démontrant une accumulation de liquide dans les poumons valide le diagnostic. De plus, l'analyse de la formule sanguine de patients avec une pneumonie révèle une hyperleucocytose.

L'étiologies des pneumonies est complexe de par la multitude de pathogènes pouvant les causer. Les agents étiologiques sont des bactéries telles que *Mycoplasma pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, des virus tels que les rhinovirus et les virus Influenza, et plus rarement des champignons et des parasites (Demoré and Charmillon, 2018; Ieven et al., 2018; Quinton et al., 2018). *Streptococcus pneumoniae*, ou pneumocoque, est l'agent infectieux bactérien le plus fréquemment en cause dans les pneumonies aiguës communautaires (Demoré and Charmillon, 2018).

b) Épidémiologie et facteurs de risque des pneumonies à pneumocoque

S. pneumoniae est un agent pathogène dit opportuniste, qui induit des infections préférentiellement chez des personnes dont le système immunitaire est affaibli ou déficient (Brooks and Mias, 2018; Quinton et al., 2018; van der Poll and Opal, 2009). De ce fait, l'âge est un facteur de risque important dû à l'immaturité du système immunitaire dans les premières années de vie et à l'immunosénescence qui se développe à un âge plus tardif. En effet les personnes particulièrement infectées par le pneumocoque sont les enfants de moins de 5 ans, dont les pneumonies sont la première cause mondiale de mortalité avec plus de 700 000 décès chaque année, l'incidence la plus élevée étant en Asie du Sud et en Afrique de l'Ouest et Centrale (Unicef, 2023). La seconde population à risque est constituée par les individus de plus de 65 ans qui présentent le plus souvent des facteurs de comorbidités. Les terrains pathologiques propice aux infections à pneumocoque sont les maladies respiratoires chroniques telles que la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), les maladies

cardiovasculaires, rénales ou hépatiques, le diabète ou encore les immunodépressions par exemple dues au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Demoré and Charmillon, 2018; Lanks et al., 2019). Les infections respiratoires causées par des virus tels qu'Influenza sont également des facteurs de risque prédominants. En effet, *S. pneumoniae* est la première cause de surinfection post-grippale, aggravant la sévérité et la mortalité de la maladie (Joseph et al., 2013). Chaque grande pandémie de grippe à travers l'histoire a été associé à des surinfections bactériennes. L'alcoolisme, le tabagisme, ou la prise récente d'antibiotiques sont d'autres facteurs de risques aux infections pneumococciques.

c) Physiopathologie des pneumonies à pneumocoque

Le pneumocoque est une bactérie opportuniste qui a la capacité de coloniser les voies respiratoires supérieures de l'homme, plus précisément le nasopharynx, de manière asymptomatique. Le portage asymptomatique peut néanmoins causer par aspiration des infections respiratoires basses si le terrain immunitaire y est favorable, comme chez les personnes à risques. Une transmission inter-individu par contact direct ou via des surfaces contaminées avec des sécrétions nasopharyngées contenant le pathogène cause la propagation de l'infection (Zafar et al., 2017). La fréquence de portage de *S. pneumoniae* est plus importante chez les enfants avec environ 20 à 50%, comparé à seulement 5 à 20% chez les adultes (Brooks and Mias, 2018). Le plus souvent, un individu est porteur d'un seul sérotype à la fois, dû à des phénomènes de compétition entre bactéries. Le temps de portage varie de plusieurs semaines à plusieurs mois, et dépend du sérotype et de la virulence de la souche bactérienne (Lees et al., 2017). En effet certaines souches de pneumocoques, dites persistantes, seront associées à une longue colonisation le plus souvent asymptomatique, alors que d'autres dites invasives seront associées à des infections après une courte durée de portage (van der Poll and Opal, 2009).

Après avoir établi une colonisation dans le nasopharynx, le pneumocoque présent à la surface ou dans le mucus se retrouve dans certains cas dans les poumons par des phénomènes d'aspiration, induisant une pneumonie (Brooks and Mias, 2018). Les bactéries adhèrent ensuite aux cellules épithéliales sous-jacentes au mucus. S'en suit une phase d'invasion lors de laquelle les bactéries traversent la barrière épithéliale et endothéliale, pénètrent la circulation sanguine causant une bactériémie et disséminent vers différents tissus, établissant ainsi une infection systémique voire une septicémie, i.e., une bactériémie avec un syndrome inflammatoire aigu. Les bactéries peuvent également disséminer localement vers l'oreille moyenne ou les sinus,

causant respectivement des otites moyennes aiguës ou des sinusites aiguës. A partir de la circulation sanguine, les pneumocoques sont aussi en mesure de traverser la barrière hémato-encéphalique, et d'atteindre par ce biais les méninges entourant le cerveau et la moelle épinière, causant une méningite aiguë. Les pneumocoques sont ainsi la cause majeure de méningites bactériennes dans les pays développés.

Le pneumocoque a une multitude de déterminants moléculaires qui participent à la pathogénèse de ses infections, notamment afin de résister à la réponse immunitaire mise en place par l'hôte pour induire sa clairance mais aussi afin de pénétrer dans les tissus. Néanmoins, la colonisation et l'infection par ces bactéries sont également facilitées par l'altération de l'intégrité de la barrière épithéliale et par le contexte inflammatoire d'une infection virale préexistante ou de la réponse immunitaire de l'hôte lui-même qui dans certains cas est délétère (McCullers, 2014; Weiser et al., 2018).

d) L'agent pathogène *Streptococcus pneumoniae* et ses facteurs de virulence

S. pneumoniae est une bactérie à Gram positif extracellulaire, qui peut s'associer sous forme de diplocoques ou de courtes chainettes. En plus de sa paroi cellulaire composée de peptidoglycanes, la majorité des souches bactériennes est entourée d'une couche de polysaccharides formant la capsule (Paton and Trappetti, 2019). Les différences structurales des capsules définissent le sérotype d'une souche ; une centaine ont été identifiés jusqu'à aujourd'hui (Ganaie et al., 2023). *S. pneumoniae* possède une multitude de facteurs de virulence essentiels à sa pathogénèse, incluant les étapes de colonisation, d'invasion et de persistance par l'échappement au système immunitaire (Brooks and Mias, 2018; Kadioglu et al., 2008) (**Figure 1**). De plus, le pneumocoque a une grande plasticité génomique dû à sa capacité de transformation, qui lui permet d'acquérir et d'intégrer de l'ADN d'autres bactéries dans son génome. Le pneumocoque a un génome contenant plus de 2000 gènes, mais ce chiffre varie d'une souche à l'autre. Des études génomiques comparatives ont permis de calculer un core génome comprenant 1400 gènes conservés, alors qu'une grande variabilité est observée pour le reste des gènes. Cette plasticité permet à *S. pneumoniae* de faire varier l'arsenal des gènes de virulence et leur expression en fonction de l'environnement (Mitchell and Mitchell, 2010).

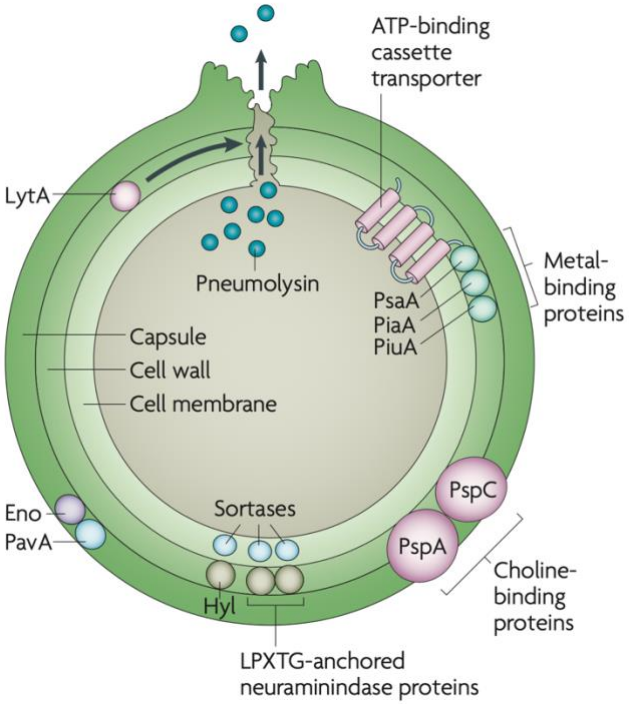


Figure 1. Principaux facteurs de virulence de *S. pneumoniae*. Les facteurs de virulence représentés sont: la capsule polysaccharidique, la paroi cellulaire composée de peptydoglycanes et d'acides téichoïques et lipotéichoïques, les protéines de surface pneumococciques A et C (PspA et PspC), l'autolysine LytA, la pneumolysine, le pneumococcal adherence and virulence factor A (PavA), des enzymes dont les hyaluronidases (Hyl), les sortases, les enolases (Eno) et les neuraminidases, des lipoprotéines telles que pneumococcal surface adhesin A (PsaA), pneumococcal iron acquisition A (PiaA) et pneumococcal iron uptake A (PiuA). D'après (Kadioglu et al., 2008).

Le facteur de virulence majeur du pneumocoque est sa capsule, qui joue un rôle dès la phase de colonisation du nasopharynx. En effet, la capsule chargée négativement permet à la bactérie d'échapper à la séquestration dans le mucus et à la clairance associée par des effets de répulsion électrostatique, et favorise ainsi son attachement aux cellules épithéliales (Nelson et al., 2007). La capsule contribue aussi à protéger la bactérie contre les défenses immunitaires de l'hôte. Sa présence altère la fixation d'immunoglobulines et de facteurs du complément ainsi que leur liaison avec des récepteurs immunitaires, ce qui *in fine* inhibe l'opsonisation de la bactérie et son élimination par le complément et la phagocytose (Hyams et al., 2010). La capsule inhibe également l'élimination de la bactérie par des phénomènes de NETose (NET pour neutrophil extracellular traps), une fonction antibactérienne des neutrophiles (Wartha et al., 2007). De plus, la taille de la capsule semble réguler la virulence. Les sérotypes ayant une capsule plus fine ont été suggérés comme préférentiellement impliqués dans la colonisation et ceux avec

une capsule plus épaisse dans les infections invasives. Néanmoins, cette caractéristique ne suffit pas à expliquer la différence de virulence entre sérotypes, qui repose sur l'ensemble des propriétés biologiques de la capsule et des autres facteurs de virulence (Kadioglu et al., 2008).

La paroi cellulaire du pneumocoque joue également un rôle dans sa virulence. Cette dernière est composée de peptidoglycanes, d'acides téichoïques et de protéines (Kadioglu et al., 2008). Le peptidoglycane donne sa forme à la bactérie et lui confère une résistance mécanique. Il est formé de l'alternance de deux sucres, le N-acétylglucosamine (NAG) et le N-acétylmuramique (NAM), liés par des ponts polypeptidiques grâce à l'action d'enzymes appelées protéines de liaison aux pénicillines (PLP). Le NAG et le NAM peuvent subir des substitutions secondaires modifiant leur structure (Bui et al., 2012). Certaines substitutions confèrent une résistance au lysozyme, une enzyme bactériolytique exprimée par les cellules épithéliales et les neutrophiles (Cole et al., 2002; Davis et al., 2008). Les acides téichoïques (TA) et lipotéichoïques (LTA) ont aussi une contribution dans la virulence. L'absence de LTA induit une atténuation de virulence dans des modèles de pneumonies et d'infections systémiques chez la souris (Heß et al., 2017). Les TA et LTA arborent des résidus phosphorylcholine (PCho) qui servent notamment d'ancre aux choline-binding proteins, des protéines de surface importantes dans les interactions hôte-pathogène. Parmi ces protéines de surface, les facteurs de virulence PspA et PspC interagissent avec plusieurs composants de l'hôte tels que les facteurs du complément (Haleem et al., 2019), le plasminogène (Meinel et al., 2018) ou encore la lactoferrine (Shaper et al., 2004), et participent ainsi à l'échappement immunitaire du pneumocoque et à sa pathogénicité (Vilhena et al., 2023). L'autolysine LytA induit la lyse de la bactérie en dégradant le peptidoglycane et libère les composants de la paroi cellulaire ainsi que des toxines, contribuant ainsi à la virulence.

La pneumolysine, une protéine libérée lors de l'autolyse des cellules bactériennes, est un des facteurs de virulence majeur de *S. pneumoniae* (Kadioglu et al., 2008). C'est une toxine cytoplasmique qui une fois libérée, se fixe à des membranes contenant du cholestérol pour y former des pores, induisant ainsi la perméabilisation partielle ou la lyse totale des cellules. La pneumolysine est impliquée dans de nombreux autres mécanismes, tous liés à la pathogénèse de la bactérie. La pneumolysine (1) réduit la clairance mucociliaire régulée par les cellules épithéliales, (2) participe à la formation de biofilms bactériens (Shak et al., 2013), et (3) induit des dommages à l'ADN via des cassures double-brin (Rai et al., 2016). L'inflammation induite

suite à la libération de pneumolysine sur les cellules de l'hôte augmente l'excrétion de bactéries et donc la transmission inter-individuelle dans un modèle de souriceaux (Zafar et al., 2017).

II. Réponse immunitaire innée aux pneumocoques

A. Généralités

Les voies respiratoires représentent une interface avec l'environnement extérieur et une voie d'entrée de choix pour les pathogènes. La nécessité de garantir un bon fonctionnement du système respiratoire demande le maintien de l'homéostasie pulmonaire et donc une balance entre les phénomènes de résistance aux pathogènes et de résilience des tissus (Medzhitov et al., 2012; Quinton and Mizgerd, 2015). La résistance définit les mécanismes qui vont jouer un rôle direct ou indirect dans l'élimination des pathogènes. La résilience détermine les mécanismes impliqués dans le maintien de l'intégrité des tissus et la diminution de la physiopathologie provoquée par les pathogènes. En effet, bien que la réponse immunitaire de l'hôte et l'inflammation associée participent à la clairance microbienne, un processus inflammatoire aigüe ou prolongé cause au contraire des dommages cellulaires et tissulaires et devient délétère. Différents acteurs sont impliqués dans le maintien de cette balance. Tout d'abord, l'architecture des voies respiratoires et la barrière épithéliale, participent comme barrière mécanique à la résistance contre l'invasion des pathogènes et à la résilience des tissus. Les composantes immunitaires, innée dans un premier temps puis adaptative, sont induites suite à la détection des pathogènes et contribuent également. La réponse immunitaire innée est mise en place rapidement et fait appel à différentes populations cellulaires, résidentes ou non des voies respiratoires, qui engendrent de nombreux mécanismes impliqués dans l'élimination des pathogènes et la protection des tissus (Mettelman et al., 2022; Quinton et al., 2018). La réponse immunitaire est complexe et multifactorielle. Cette introduction présente ensuite la détection du pathogène par les récepteurs de l'immunité innée et la mise en place de la réponse immunitaire innée lors des pneumonies à pneumocoque, initiée par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires, et dont les neutrophiles et les monocytes inflammatoires sont des effecteurs importants.

B. Défense physique : la barrière épithéliale

L'anatomie des voies respiratoires, depuis les poils nasaux, en passant par le mucus, la barrière épithéliale (Whitsett and Alenghat, 2014), jusqu'au rétrécissement des conduits aériens, sert de barrière physique à l'entrée des microbes. Tout au long de ces voies, l'épithélium respiratoire, composé de différentes populations de cellules épithéliales que sont les cellules basales,

sécrétrices et ciliées, forme une barrière dont l'intégrité est maintenue par des protéines de jonctions inter-cellulaires telles que les claudines et les connexines (LaFemina et al., 2014). Dans l'épithélium ainsi que les glandes sous-muqueuses, les principales cellules productrices du mucus sont les cellules caliciformes (goblet cells) et les cellules club. Le mucus respiratoire est principalement constitué de glycoprotéines appelées mucines (dont MUC5AC et MUC5B). Cette matrice extracellulaire héberge également des cytokines, des facteurs du complément et des peptides antimicrobiens. Le mucus recouvre l'épithélium respiratoire et forme une couche protectrice qui piège les pathogènes et empêche leur fixation directe aux cellules épithéliales. Le mucus est excrété des voies respiratoires par les cellules épithéliales ciliées dont le battement assure la clairance mucociliaire. *In fine,* le mucus est éliminé par la toux ou la déglutition. La clairance mucociliaire est un phénomène de première importance, comme le souligne les atteintes respiratoires et infections récurrentes induites par une déficience de mouvement de ces cils (Knowles et al., 2013). Les alvéoles pulmonaires sont formés de deux types cellulaires : les pneumocytes de type I et de type II. Les pneumocytes de type II sécrètent du surfactant protéique et lipidique, qui forme un film protecteur recouvrant toute la surface alvéolaire. Les surfactants réduisent les tensions de surface à l'interface air-liquide au sein des alvéoles.

Au-delà de leur rôle de barrière physique, les cellules épithéliales jouent un rôle central dans la réponse immunitaire innée (Whitsett and Alenghat, 2014). Elles peuvent être activées par des cellules immunitaires ou directement détecter les pathogènes grâce à l'expression de récepteurs de l'immunité. Elles participent aussi au recrutement et à l'activation d'autres cellules de l'immunité sur le lieu de l'infection, mais également à la clairance bactérienne, à travers la production de médiateurs moléculaires (cytokines, chimiokines, ou molécules antibactériennes).

C. Reconnaissance de *S. pneumoniae* par les récepteurs de l'immunité innée

La première alerte immunitaire suite à une infection est la détection du pathogène. Lors des pneumonies à *S. pneumoniae,* ce sont les cellules résidentes des voies aériennes telles que les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires qui sont en charge de détecter le danger microbien. La détection opère via des récepteurs de l'immunité innée, appelés « pattern recognition receptors » (PRR), qui sont exprimés à la fois par des cellules structurales telles que les cellules épithéliales, et par les cellules immunitaires (Takeuchi and Akira, 2010). Les

récepteurs PRR reconnaissent des motifs microbiens conservés appelés « pathogen-associated molecular patterns » (PAMP). *S. pneumoniae* est une bactérie qui autolyse spontanément durant son cycle, ce qui provoque la libération de PAMP dans le milieu, tels que les TA et LTA, le peptydoglycane, la pneumolysine ou les motifs CpG non méthylés de l'ADN génomique de la bactérie. Les PRR détectent les microorganismes mais également des motifs du soi, qui sont exposés ou modifiés suite à des lésions cellulaires, appelés « damage-associated molecular patterns » (DAMP). Il existe différentes familles de PRR, qui diffèrent par leur structure et leur localisation au sein de la cellule. Leur activation stimule des voies de signalisation aboutissant à l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Par la suite, les classes de PRR impliquées dans la détection des pneumocoques sont présentées.

a) Les Toll-like receptors

Les Toll-like receptors (TLR) sont des protéines transmembranaires exprimées à la membrane plasmique de la cellule, ou dans des compartiments intracellulaires (Takeuchi and Akira, 2010). Les cellules immunitaires comprenant les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles, ainsi que les cellules structurales telles que les cellules épithéliales expriment les TLR. Ces récepteurs se composent d'un domaine extracellulaire formé de régions riches en leucine ou leucine-rich repeats (LRR), qui interagissent avec le ligand d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique constitué d'une région appelée Toll/IL-1 receptor (TIR) de par son homologie avec le récepteur à l'interleukine 1 (IL-1), essentiel à la transduction du signal.

Selon leur localisation et les motifs moléculaires qu'ils reconnaissent, 12 TLR ont été identifiés chez la souris et 10 TLR chez l'homme. Les récepteurs TLR interagissent avec un ou plusieurs ligands (appelés également agonistes). Alors que la plupart des TLR sont fonctionnels sous la forme d'homodimères, certains TLR s'associent sous forme d'hétérodimères ce qui augmente le spectre d'agonistes détectés. Les récepteurs TLR 1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimés au niveau de la membrane plasmique des cellules et reconnaissent des protéines ou lipoprotéines exprimées à la surface des pathogènes ou libérées dans le milieu. Les récepteurs TLR 3, 7, 8 et 9 sont exprimés le plus souvent au niveau endosomal, et ont pour ligands des acides nucléiques, issus de la lyse bactérienne. Lors des infections à *S. pneumoniae*, TLR 2, 4 et 9 sont particulièrement impliqués dans la reconnaissance de la bactérie et la mise en place de la réponse immunitaire innée (Koppe et al., 2012b) (**Figure 2**). Le récepteur TLR2 lorsqu'il s'associe avec TLR6

détecte des éléments de la paroi bactérienne tels que les composants du LTA (Tomlinson et al., 2014). Le récepteur TLR4 est connu pour reconnaitre une variété de ligands dont les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif et les protéines d'enveloppes virales. Des études ont montré que TLR4 reconnait également la pneumolysine du pneumocoque (Srivastava et al., 2005). Le récepteur TLR9 quant à lui fixe les motifs CpG non méthylés de l'ADN d'origine bactérienne, dont celui de *S. pneumoniae* (Hemmi et al., 2000; Latz et al., 2004). Des souris déficientes en TLR9 ont une sensibilité accrue aux infections respiratoires causées par le pneumocoque, associée à une diminution de l'internalisation et de l'élimination des bactéries par les macrophages (Albiger et al., 2007).

La fixation du ligand provoque un changement conformationnel de l'homodimère ou l'hétérodimère TLR qui favorise le recrutement de protéines adaptatrices au domaine TIR cytoplasmique des TLR, et stimule la cascade de signalisation (Takeuchi and Akira, 2010). Il existe deux voies majeures de signalisation, une voie dépendante de la protéine adaptatrice Myd88 (myeloid differentiation primary response 88) et une voie indépendante de MyD88.

La voie MyD88-dépendante est spécifique à tous les TLR, sauf TLR3, et est donc essentielle dans la réponse aux infections à pneumocoque (Takeuchi and Akira, 2010). En effet il a été montré que des souris déficientes en MyD88 (*Myd88*$^{-/-}$) ont une réponse immunitaire altérée, associée à une diminution des cytokines pro-inflammatoires et des cellules immunitaires recrutées, induisant ainsi une sensibilité accrue au pneumocoque (Albiger et al., 2005). Il en va de même lorsque *Myd88* est délété spécifiquement dans certaines cellules immunitaires (macrophages alvéolaires, cellules dendritiques, neutrophiles) ou épithéliales, montrant l'importance de cet adaptateur dans ces cellules (Dudek et al., 2016). Le recrutement de la protéine MyD88 provoque une cascade d'interaction avec des protéines de la famille IRAK (interleukine-1 receptor-associated kinase) et TRAF6 (TNFR-associated factor 6). La formation de ce complexe protéique active un autre complexe qui active les IκB kinases (IKK) et les mitogen-activated protein kinases (MAPK), permettant la translocation dans le noyau des facteurs de transcription NF-κB (nuclear factor-kappa B) et AP-1 (protéine activatrice 1). Les facteurs NF-κB et AP-1 stimulent la transcription de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou TNF (tumor necrosis factor) (Koppe et al., 2012b). TLR 7 et 9 activent également l'expression de gènes d'interféron (IFN) de type 1, via l'interferon-regulatory factor 7 (IRF7), un autre facteur de transcription.

La voie indépendante de MyD88 est exclusivement utilisée par TLR3 et TLR4 et mobilise la protéine adaptatrice TRIF (TIR domain-containing adaptor-inducing IFN-β) en association ou non à TRAM (TRIF-related adapor molecule) (Takeuchi and Akira, 2010). TRIF interagit avec les protéines de la famille des TRAF, notamment TRAF3, qui va permettre à travers le recrutement de différentes protéines la phosphorylation d'IRF3 et *in fine* l'expression d'IFN de type 1.

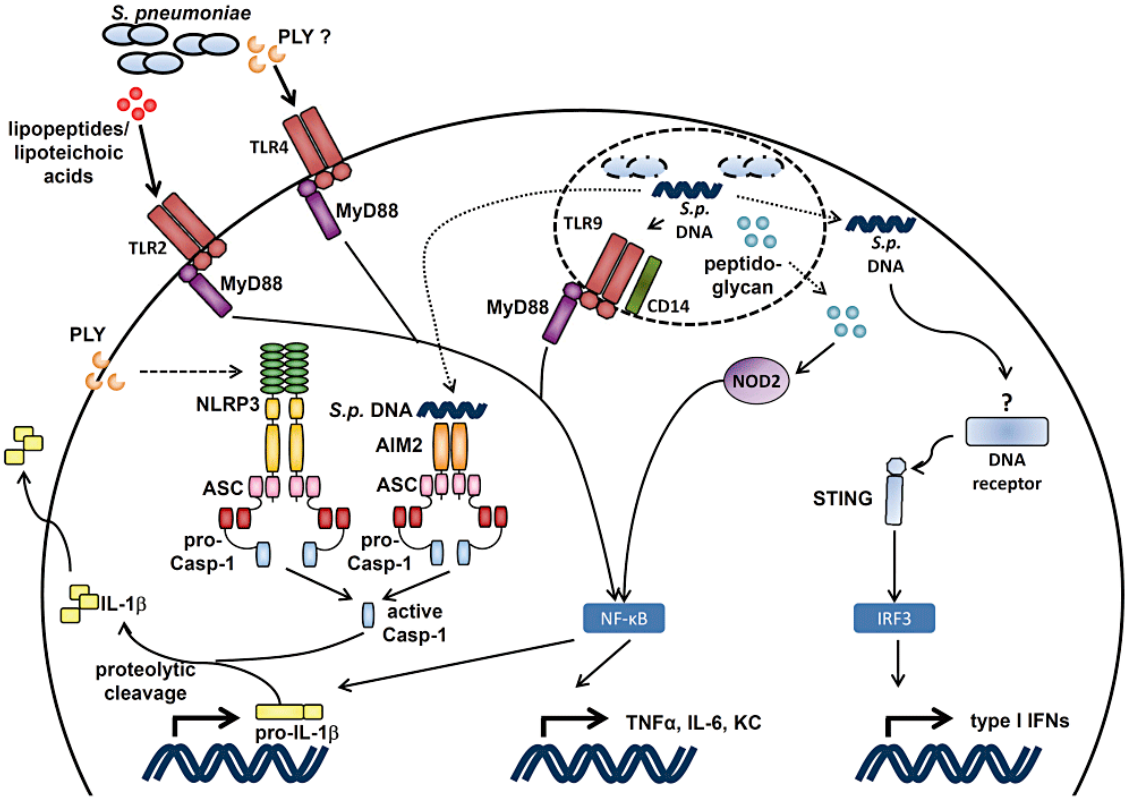


Figure 2. Principaux PRR impliqués dans la reconnaissance de *S. pneumoniae*. Au niveau de la membrane plasmique, les récepteurs TLR2 et TLR4 reconnaissent respectivement l'acide lipotéichoïque et la pneumolysine de *S. pneumoniae*. Le récepteur TLR9, situé au niveau endosomal, fixe les motifs CpG non méthylés de l'ADN génomique des pneumocoques libérés suite à la phagocytose et à la lyse bactérienne. NOD2, présent dans le compartiment cytoplasmique, détecte le peptidoglycane issu de bactéries lysées. La reconnaissance par les récepteurs TLR2, TLR4, TLR9 et NOD2 de leurs ligands respectifs induit le recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 et active la voie de signalisation de NF-κB. Cette signalisation conduit à l'expression et la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF et CXCL1. Les récepteurs NLRP3 et AIM-2, présents au niveau cytoplasmique, fixent respectivement la pneumolysine et l'ADN génomique bactérien, ce qui induit la formation de l'inflammasome par le recrutement de la protéine adaptatrice ASC et l'activation protéolytique de de la pro-caspase-1 en caspase-1. Cette dernière clive la pro-IL-1β en IL-1β qui est alors sécrétée. D'autres senseurs cytosoliques de l'ADN recrutent la protéine adaptatrice STING et activent la voie IRF3 qui aboutit à la production d'interféron de type 1. D'après (Koppe et al., 2012b).

b) Les autres PRR

D'autres récepteurs PRR sont impliqués dans la détection de *S. pneumoniae* et l'immunité anti-pneumococcique. La famille des NLR (pour Nod [nucleotide oligomerization domain]-like receptors), est représentée par des protéines cytoplasmiques composées de trois domaines fonctionnels : un domaine C-terminal riche en leucines (LRR), un domaine central de liaison aux nucléotides, et un domaine N-terminal d'interaction spécifique qui détermine la fonction du récepteur (Chen et al., 2009; Takeuchi and Akira, 2010). La localisation cytoplasmique implique une détection des bactéries ou des PAMP dans le cytoplasme. Une vingtaine de NLR ont été identifiés chez l'homme et une trentaine chez la souris. Les récepteurs NOD1 et NOD2, de manière similaire aux TLR, stimulent la transcription des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires via NF-κB. NOD2 reconnait spécifiquement un composé du peptidoglycane, le muramyl-dipeptide (**Figure 2**). Il a été montré que des fragments du peptidoglycane de *S. pneumoniae*, suite à sa phagocytose par les macrophages alvéolaires, stimule NOD2 et la production de la chimiokine CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2), participant ainsi au recrutement de macrophages et monocytes (Davis et al., 2011). D'autre part, les récepteurs de la famille NLR sont impliqués dans la formation de complexes protéiques, appelés inflammasomes, qui participent à la réponse inflammatoire. Le récepteur NLRP3 (NLR pyrin domain containing 3) détecte la pneumolysine du pneumocoque, s'associe avec la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain) et à la procaspase-1, formant ainsi l'inflammasome (**Figure 2**). La pro-caspase 1 activée en caspase 1 clive les précurseurs de pro-IL-1β et pro-IL-18 en leur forme active l'IL-1β et l'IL-18 qui sont alors sécrétées et participent à l'activation immunitaire (Surabhi et al., 2020). L'infection de cellules par des bactéries déficientes en pneumolysine (*ply*$^{-/-}$) montre une diminution de la production d'IL-1β, qui est dépendante de NLRP3. De plus, des souris déficientes en NLRP3 sont plus sensibles aux pneumonies induites par *S. pneumoniae* (McNeela et al., 2010).

D'autres récepteurs impliqués dans la réponse au pneumocoque sont les senseurs cytosoliques de l'ADN, ou AIM2-like receptors (ALR), qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine d'interaction avec des adaptateurs. Le récepteur AIM2, de la même façon que NLRP3, forme un inflammasome et participe à la production d'IL-1β lors des infections à *S. pneumoniae* (Fang et al., 2011) (**Figure 2**). Une grande partie des récepteurs de la famille ALR contribuent à la production d'IFN de type 1, à travers la voie impliquant la molécule adaptatrice

STING (stimulator of interferon genes) ainsi que les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (Barber, 2011). L'IFN de type 1 se fixe ensuite au récepteur IFNAR (IFNα/β receptor) et induit l'expression des IFN-stimulated genes (ISG). Ainsi, une infection par le pneumocoque induit la production d'IFN de type 1, par la voie des ALR (Koppe et al., 2012a; Parker et al., 2011). Même si l'IFN de type 1 est généralement associé à des réponses antivirales, il a également été identifié dans des infections bactériennes dans lesquelles son rôle reste à être clairement établi (Koppe et al., 2012b).

D. Défenses moléculaires et cellulaires lors des pneumonies à pneumocoque

Les cellules résidentes des voies aériennes sont garantes de l'homéostasie pulmonaire. Elles sont les premières exposées aux pneumocoques lors des infections respiratoires et jouent un rôle sentinelle. En réponse aux bactéries, grâce à leur expression d'un grand nombre de PRR, les cellules résidentes produisent différents médiateurs afin d'activer les autres cellules résidentes et de mobiliser les cellules immunitaires circulantes sur le site de l'infection. La coopération entre ces différentes cellules est essentielle pour la clairance du pathogène, au travers de la production de molécules antibactériennes, de cellules phagocytaires et de l'activation des fonctions effectrices de ces cellules, mais également pour la phase de résolution de l'inflammation.

a) Défenses moléculaires

Parmi les cellules résidentes des poumons, les cellules épithéliales respiratoires et les macrophages alvéolaires sont en première ligne face à *S. pneumoniae* (Leiva-Juárez et al., 2018). Les cellules épithéliales produisent des peptides antimicrobiens tels que les béta-défensines et les cathélicidines (LL37), des peptides cationiques (chargés positivement) qui interagissent avec les membranes plasmiques bactériennes chargées négativement, provoquant la perméabilisation et la lyse des bactéries (Tecle et al., 2010). Ces peptides ont aussi la capacité de moduler la réponse immunitaire, en ayant un rôle chimioattractant sur différentes cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T (De Yang et al., 2000; Zhang et al., 2009). Les cellules épithéliales sécrètent le lysozyme, une enzyme qui hydrolyse le peptidoglycane (Cole et al., 2002; Davis et al., 2008), et la lactoferrine, une glycoprotéine cationique qui lie le fer, indispensable à la croissance bactérienne. La lactoferrine fixe aussi des éléments de la paroi bactérienne tels que les composants du LTA (Lecaille et al., 2016). Certains peptides

antibactériens sont également produits par des cellules immunitaires tels que les neutrophiles au sein de granules.

Au niveau alvéolaire, les protéines du surfactant A et D sécrétées par les pneumocytes de type II participent à la clairance bactérienne et à la modulation de la réponse immunitaire. Ces surfactants ont une capacité d'opsonisation des bactéries via le peptidoglycane, stimulant ainsi la phagocytose par les macrophages alvéolaires, et aussi une fonction antibactérienne directe en favorisant la perméabilisation de la membrane bactérienne (Han and Mallampalli, 2015). De façon remarquable, la déficience en surfactant D est associée à la survenue récurrente de pneumonies et autres infections respiratoires (Griese et al., 2008).

En réponse au pneumocoque, les macrophages alvéolaires sécrètent les cytokines de la famille IL-1 (IL-α et IL-1β) et du TNF, qui transactivent d'autres macrophages et les cellules épithéliales adjacentes (Gómez and Prince, 2008; Opitz et al., 2010; Quinton and Mizgerd, 2015). Ces dernières en retour produisent des chimiokines spécifiques des neutrophiles, telles que CXCL1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1) et CXCL2. Les cytokines de la famille IL-1 et TNF sont importantes pour établir la réponse inflammatoire et antibactérienne, comme cela a été montré avec des souris déficientes pour les récepteurs au TNF (TNFR1 et TNFR2) et à la famille des IL-1 (IL-1R1), qui présentent une capacité diminuée de clairance bactérienne. Cette déficience a été associée à une baisse de la production de CXCL1/2 et du recrutement de neutrophiles (Jones et al., 2005). En réponse au pneumocoque, les cellules épithéliales peuvent produire de l'IL-1β et de l'IL-6, des cytokines de la réponse inflammatoire aigüe, ainsi que des chimiokines telles que CXCL5, CCL20 et CCL2 spécifiques des neutrophiles et des monocytes inflammatoires. Le pneumocoque stimule également les cellules épithéliales à produire des facteurs de croissance tels que le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) et le G-CSF. Ces facteurs contribuent à la différenciation, la prolifération et l'activation des monocytes et macrophages ainsi que des neutrophiles.

La réponse inflammatoire orchestre la production de médiateurs immunitaires impliqués dans la modération de l'inflammation afin d'empêcher des dommages cellulaires (Medzhitov et al., 2012). Par exemple, l'IL-6 stimule la sécrétion des cytokines IL-10 et IL-22 qui participent à une réponse anti-inflammatoire. L'IL-10 conditionne les macrophages alvéolaires d'un phénotype pro-inflammatoire à un phénotype anti-inflammatoire important dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire (Hussell and Bell, 2014). Ces macrophages conditionnés ont une capacité accrue à produire des cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-

10, le TGF-β (transforming growth factor-beta) et l'IL-1RA (IL-1 receptor antagonist) (Aujla et al., 2008). L'IL-22 est quant à elle associée à un renforcement de la barrière épithéliale et à sa réparation suite à une infection (Alcorn, 2020). L'administration d'IL-22 a permis de diminuer l'œdème pulmonaire et d'augmenter la survie dans un modèle de lésions pulmonaires induites par ventilation mécanique chez le rat, en augmentant l'intégrité et la résistance de la barrière épithéliale (Hoegl et al., 2011).

b) Défenses cellulaires

i. Les macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires sont des cellules immunitaires d'origine myéloïde qui sont positionnées au niveau des alvéoles des voies aériennes. Ces cellules sentinelles sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie du poumon (Bissonnette et al., 2020; Mettelman et al., 2022; Quinton et al., 2018). Les macrophages alvéolaires ont pour origine le sac vitellin de l'embryon et les cellules hépatiques fœtales (Yona et al., 2013). Dans le tissu pulmonaire, les macrophages alvéolaires ont une longue durée de vie (plusieurs mois) et sont capables de proliférer afin de maintenir leur pool en condition d'homéostasie (Hashimoto et al., 2013). En condition inflammatoire ou infectieuse, les macrophages alvéolaires peuvent être éliminés ; un nouveau pool de cellules va alors émerger suite au recrutement et à la différenciation de monocytes inflammatoires, qui acquièrent des caractéristiques des macrophages (Ng et al., 2023).

Les macrophages alvéolaires ont une grande plasticité fonctionnelle et s'adaptent à leur microenvironnement en adoptant un phénotype pro-inflammatoire dit M1 ou anti-inflammatoire dit M2 par un processus appelé polarisation. En condition infectieuse, en plus de leur rôle pro-inflammatoire à travers la production de médiateurs immunitaires, ces cellules participent activement à la clairance bactérienne. Leur principal mécanisme d'action est la phagocytose, qui consiste en l'internalisation de particules au sein d'une vésicule qui dérive de la membrane plasmique appelée phagosome (Flannagan et al., 2009). Cela est possible grâce à une interaction directe entre les macrophages et les bactéries via les PRR, qui fixent des lipoprotéines et des éléments de la paroi bactérienne. Les macrophages interagissent aussi de manière indirecte avec les bactéries via la reconnaissance par des récepteurs aux opsonines (Fcγ receptors, complement receptor 3) afin d'induire leur phagocytose. Les cascades de signalisation stimulées par les PAMP/PRR couplées à celles des récepteurs aux opsonines

contribuent au remodelage du cytosquelette d'actine aboutissant à l'internalisation des bactéries au sein du phagosome. Ce dernier mature en phagolysosome à travers la fusion avec le lysosome qui contient diverses molécules antibactériennes. La maturation du phagosome est associée à une acidification du pH, qui altère le métabolisme de certaines bactéries et favorise l'activité d'enzymes telles que les hydrolases. Au sein du phagolysosome, les ions superoxides ($O_2^{\bullet -}$) produits par la NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène) oxidase ainsi que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dérivées induisent un stress oxydant au sein des pathogènes et participent ainsi à leur élimination. La réaction entre les ROS et l'oxyde nitrique (NO) produit des espèces réactives de l'azote (RNS), des effecteurs antimicrobiens importants chez les macrophages (Flannagan et al., 2009). Lors d'infections, les macrophages alvéolaires phagocytent les bactéries et les éliminent grâce à l'action combinée de ses différents effecteurs. Ce processus peut être suivi d'apoptose, induite par deux mécanismes : la diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1) par les macrophages alvéolaires (Marriott et al., 2005), et la reconnaissance de la cytokine pro-apoptotique TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) par le récepteur DR5 (death receptor 5) (Steinwede et al., 2012). Chez des souris déficientes en cathepsine D, enzyme de dégradation de Mcl-1, une baisse de l'apoptose des macrophages est associée à une diminution de la clairance bactérienne lors d'infections à *S. pneumoniae* (Bewley et al., 2011). Il en va de même pour des souris déficientes pour TRAIL, chez qui une diminution de l'apoptose, de l'élimination des bactéries et de la survie est également observée (Steinwede et al., 2012).

Si les macrophages alvéolaires ont un rôle central dans la réponse inflammatoire et antibactérienne, ils sont tout autant essentiels dans la résolution de ces processus immunitaires (Aegerter et al., 2022). Les macrophages alvéolaires ont un phénotype anti-inflammatoire permettant de maintenir l'homéostasie pulmonaire à l'état basal, et aussi de limiter les dommages cellulaires induits par une inflammation aigüe prolongée. Les macrophages alvéolaires participent à la production des cytokines anti-inflammatoires IL-10, TGF-β et IL-1RA qui vont agir sur les cellules environnantes et permettre la diminution de la réponse immunitaire et inflammatoire ainsi que des dommages pulmonaires associés. Il a par exemple été montré que la production d'IL-1RA inhibe l'inflammation de la barrière épithéliale, préserve son intégrité et améliore la survie des souris dans un modèle de pneumonie bactérienne (Herold et al., 2011). Par ailleurs, la déficience en IL-10 induit une exacerbation de la production de cytokines pro-inflammatoires et l'infiltration de neutrophiles dans les

poumons associée à une mortalité élevée dans un modèle de pneumonie à pneumocoque (Peñaloza et al., 2015). A l'homéostasie, les macrophages alvéolaires sont spécialisés dans l'élimination des débris présents dans le microenvironnement (particules fines, pollen). Cette fonction de « nettoyage » permet aussi de dégrader les cellules mortes (par nécrose ou apoptose) qui expriment des signaux spécifiques, par le biais d'un mécanisme de phagocytose appelé efférocytose (Henson, 2017; Henson and Tuder, 2008). L'efférocytose stimule la production de cytokines anti-inflammatoires (Huynh et al., 2002) et de médiateurs lipidiques pro-résolutifs tels que les résolvines et lipoxines (Basil and Levy, 2016). Ces médiateurs lipidiques vont, par une boucle de rétroaction positive, stimuler les processus de réparation tissulaire indispensables à l'homéostasie ou au retour à l'homéostasie en contexte infectieux. Ainsi, les macrophages alvéolaires favorisent la prolifération des cellules épithéliales et la réparation des dommages tissulaires induits par l'inflammation (Hung et al., 2019).

ii. Les monocytes inflammatoires

Les monocytes inflammatoires sont des cellules immunitaires circulantes originaire d'un précurseur commun myéloïde (Guilliams et al., 2018). Ils représentent environ 4% des cellules circulantes chez la souris et 10% chez l'homme, et ont une durée de vie d'environ une journée (Yona et al., 2013). A l'homéostasie, une fraction des monocytes inflammatoires se différencie en monocytes résidents ou patrolling qui participent au maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire (Ng et al., 2023). Les monocytes inflammatoires sont rapidement recrutés au sein des tissus en condition inflammatoire sous l'action des chimiokines CCL2 et CCL7 produites par les cellules résidentes pulmonaires, notamment les cellules épithéliales (Shi and Pamer, 2011). Une fois sur le site de l'infection, les monocytes inflammatoires participent directement à l'élimination bactérienne notamment par le mécanisme de phagocytose. Ces cellules ont aussi un rôle dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire à travers la production d'IL-10 et de VEGF (vascular endothelial growth factor) (Guilliams et al., 2018). Les monocytes inflammatoires peuvent également se différencier en macrophages alvéolaires dérivés de monocytes ou en cellules dendritiques dérivés de monocytes sous l'influence de différents signaux afin de reconstituer ces pools cellulaires (Ng et al., 2023).

iii. Les neutrophiles

Les neutrophiles ou « PMN » (polynucléaires neutrophiles) sont également des cellules immunitaires circulantes d'origine myéloïde. Dans la moelle, les précurseurs se différencient

en neutrophiles dans un processus appelé granulopoïèse (**Figure 3**). Une fois matures, les neutrophiles rejoignent la circulation dans laquelle elles patrouillent, représentant 20 à 30% des cellules circulantes chez la souris et 50 à 70% chez l'homme. Ces cellules ont une courte durée de vie, entre 10 et 18 heures dans la circulation en moyenne, mais peuvent persister jusqu'à quelques jours dans les tissus (Ballesteros et al., 2020). Les neutrophiles sont aussi capables d'infiltrer certains tissus en condition d'homéostasie (Casanova-Acebes et al., 2018). Dans la circulation, une partie des neutrophiles expriment plus fortement le marqueur CXCR4, qui augmente au cours du vieillissement et ramènera *in fine* les cellules dans la moelle osseuse pour y entrer en apoptose et être phagocytées par les macrophages résidents (Casanova-Acebes et al., 2013). Les neutrophiles peuvent également être éliminés par les macrophages au niveau du foie et de la rate. Le pool de ces cellules est continuellement renouvelé. Lorsqu'une infection est détectée, les neutrophiles migrent à travers les capillaires sanguins par extravasation et infiltrent alors le tissu concerné afin d'éliminer le pathogène (Ng et al., 2023).

Contrairement à ce qui a longtemps été pensé, les neutrophiles ne représentent pas une population homogène. Les neutrophiles présentent une grande plasticité et hétérogénéité fonctionnelle. Malgré une courte demi-vie ces cellules acquièrent très rapidement des signatures spécifiques aux tissus qu'elles infiltrent, tant au niveau phénotypique que fonctionnel (Ballesteros et al., 2020). En effet, Ballesteros *et al.* ont montré que des neutrophiles issus de différents tissus ont des profils transcriptomiques distincts des neutrophiles circulants. Un autre élément contribuant à l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle est la capacité des précurseurs immatures de neutrophiles présents dans la moelle osseuse à rejoindre la circulation puis les tissus afin de participer à la réponse immunitaire en cas d'inflammation (Evrard et al., 2018; Ng et al., 2023) (**Figure 3**). Récemment des études de séquençage ARN en cellules individuelles (scRNAseq) ont validé la grande variété de populations de neutrophiles avec des profils transcriptomiques bien distincts ; cette variété s'exprime à l'homéostasie et dans des contextes de cancer et d'infection (Montaldo et al., 2022; Xie et al., 2020; Zilionis et al., 2019). Wigerblad *et al.* a identifié chez l'homme quatre populations au sein des neutrophiles circulants formant un continuum depuis une relative immaturité jusqu'à un état de faible activité transcriptionnelle ou de forte expression de gènes inductibles par l'IFN de type 1 (Wigerblad et al., 2022). Les études de Xie *et al.* ont défini dans la moelle osseuse, le sang et la rate, huit populations transcriptionnellement distinctes de neutrophiles, retraçant les différents stades de différenciation et d'activation. De plus, une infection bactérienne modifie la dynamique de transition entre ces populations et augmente les

capacités fonctionnelles des neutrophiles (Xie et al., 2020). En général, ces études montrent l'hétérogénéité des neutrophiles et interroge sur l'influence du microenvironnement dans la régulation des populations.

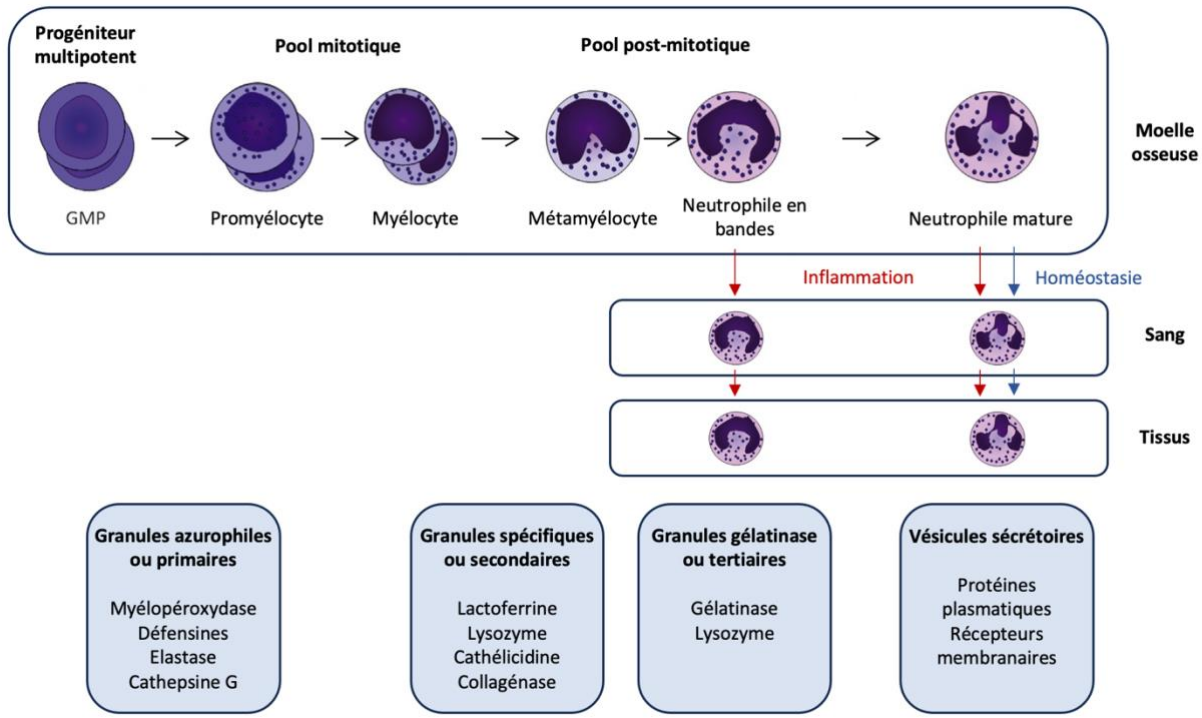


Figure 3. Granulopoïèse et formation des granules des neutrophiles. Au sein de la moelle osseuse, les granulocyte-monocytes progenitors (GMP) se différencient en promyélocytes et myélocytes, formant le pool mitotique. La différenciation se poursuit en métamyélocytes et neutrophiles en bande, formant le pool post-mitotique, puis en neutrophiles segmentés matures. Les granules azurophiles se forment entre les stades GMP et promyélocyte. Les granules spécifiques apparaissent dans les myélocytes et les métamyélocytes. Les granules gélatinase sont présents dès le stade de neutrophiles en bandes, alors que les vésicules sécrétoires apparaissent dans les neutrophiles matures. En condition d'homéostasie seuls les neutrophiles matures rejoignent la circulation puis les tissus, alors qu'en condition inflammatoire les neutrophiles en bande en sont également capables. Adapté de (Evrard et al., 2018; Hidalgo et al., 2019; Lawrence et al., 2018).

Lors d'une infection à *S. pneumoniae*, les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires recrutées en abondance dans les voies aériennes. Au niveau pulmonaire, les neutrophiles sont circulants dans les vaisseaux ou séquestrés dans l'espace intravasculaire sous forme de cellules marginées (Craig et al., 2009; Kuebler and Goetz, 2002). Les neutrophiles ont un rôle prépondérant lors de la réponse immunitaire, tant par leurs fonctions d'élimination bactérienne que de modulation de l'inflammation. En effet il a été montré dans différents modèles animaux

que l'absence de neutrophiles (par déplétion ou blocage de leur recrutement), induisait une grande susceptibilité aux infections respiratoires dont celles induites par *S. pneumoniae* (Herbold et al., 2010; Xiong et al., 2015). En contexte clinique, la neutropénie ou la déficience primaire en neutrophiles est un terrain de susceptibilité aux infections bactériennes récurrentes (Spoor et al., 2019).

Les neutrophiles sont mobilisés en un court laps de temps sur le lieu de l'infection et immédiatement effectifs grâce à leurs granules (**Figure 3**). Les neutrophiles hébergent quatre types de granules qui diffèrent de par leur contenu et leur fonction : les granules azurophiles ou primaires, les granules spécifiques ou secondaires, les granules gélatinases ou tertiaires et les vésicules sécrétoires (Yin and Heit, 2018). Les vésicules sécrétoires sont les premières sécrétées à la membrane plasmique, suite à la signalisation induite par les chimiokines afin d'amorcer la migration des neutrophiles vers le tissu infecté. Ces vésicules contiennent des protéines transmembranaires, qui sont incorporées à la membrane de la cellule. Ces protéines sont nécessaires pour l'adhésion et l'extravasation à travers l'endothélium vasculaire, ainsi que pour la reconnaissance des pathogènes et leur phagocytose telles que des intégrines, des récepteurs aux peptides formylés (fPR1), ainsi que des récepteurs de phagocytose, de cytokines et de chimiokines particulières (Rørvig et al., 2013; Uriarte et al., 2008). Les granules spécifiques et gélatinases ont un contenu similaire et forment un continuum d'expression de protéines. Ils contiennent, en quantité variable, des molécules nécessaires à l'extravasation, à la dégradation de la matrice cellulaire (gélatinase et collagénase) et des molécules antibactériennes (lactoferrine, lysozyme, cathélicidine). Les granules gélatinases sont plus impliqués dans l'extravasation et seront donc libérés en premier, suivi des granules spécifiques enrichis en molécules antibactériennes qui seront libérés au plus proche de l'infection (Rørvig et al., 2013). Enfin les granules azurophiles sont les derniers sécrétés une fois sur le lieu de l'infection, soit à la membrane plasmique du neutrophile soit au sein d'un phagosome. Ils contiennent la myélopéroxidase (MPO) impliquée dans la production d'ions hypochlorite au fort pouvoir microbicide, des protéases (cathepsine G, élastase), et du lysozyme (Rørvig et al., 2013; Yin and Heit, 2018).

Les neutrophiles éliminent les bactéries à travers différents mécanismes, certains utilisant les granules (Effah et al., 2021) (**Figure 4**). La phagocytose est un mécanisme primordial dans lequel les bactéries sont internalisées au sein du phagolysosome, et qui requiert la fusion avec les granules azurophiles ou spécifiques (Flannagan et al., 2009). Les bactéries sont alors tuées

puis dégradées par les ROS produits (via le complexe de la NADPH oxydase) et les différentes molécules antibactériennes associées au pH acide. La libération des granules peut aussi se faire dans l'espace extracellulaire, par un mécanisme à part entière nommé dégranulation, afin d'éliminer les bactéries présentes dans le microenvironnement.

Le neutrophile a recours à un autre mécanisme appelé NETose (Papayannopoulos, 2018). Cela consiste en la libération dans le milieu extracellulaire de structures en forme de toile composées de protéines cytosoliques et de protéines issues des granules azurophiles, assemblées sur de la chromatine décondensée. Les bactéries piégées au sein des NET sont éliminées par les molécules antibactériennes qui composent les NET. Des souris déficientes en élastase ou en cathepsine G ont ainsi une susceptibilité accrue à l'infection à *S. pneumoniae* (Hahn et al., 2011), ce qui souligne l'importance de ce mécanisme dans la réponse immunitaire. Deux voies de NETose ont été définies : une voie lytique de mort cellulaire au cours de laquelle les NET se forment au sein de la cellule dont la membrane plasmique se désintègre, et une voie non-lytique combinant expulsion de chromatine et dégranulation (Papayannopoulos, 2018; Yipp et al., 2012). La NETose est néanmoins un mécanisme qui exacerbe l'inflammation et doit donc être spécifiquement régulée (Yang et al., 2016).

Les neutrophiles participent également à la modulation de la réponse immunitaire à travers la sécrétion de médiateurs immunitaires. Ils produisent la cytokine TRAIL dont ils sont la principale source, qui stimule l'apoptose des cellules incluant les macrophages alvéolaires ayant phagocyté des bactéries (Steinwede et al., 2012). Certains de ces médiateurs ont une activité autocrine. En effet les neutrophiles recrutés sur le lieu d'une infection produisent de l'IFN-γ, qui semble favoriser la formation de NET et donc l'élimination des bactéries, comme cela a été montré dans un modèle de pneumonie à pneumocoque (Yamada et al., 2011). Ces cellules peuvent aussi auto-réguler leur recrutement dans les voies aériennes en produisant des chimiokines telles que CXCL10 et CXCL2, ce qui exacerbe l'inflammation et participe à la clairance bactérienne, mais peut aussi devenir délétère en cas de réponse trop forte (Brandes et al., 2013; Ichikawa et al., 2013). En effet, un recrutement excessif ou prolongé de neutrophiles induit des dommages tissulaires qui aggravent la pathologie (Domon and Terao, 2021). Les macrophages alvéolaires ont par ailleurs un rôle majeur, à travers la production de différents médiateurs anti-inflammatoires et la phagocytose des neutrophiles apoptotiques hautement inflammatoires (Greenlee-Wacker, 2016).

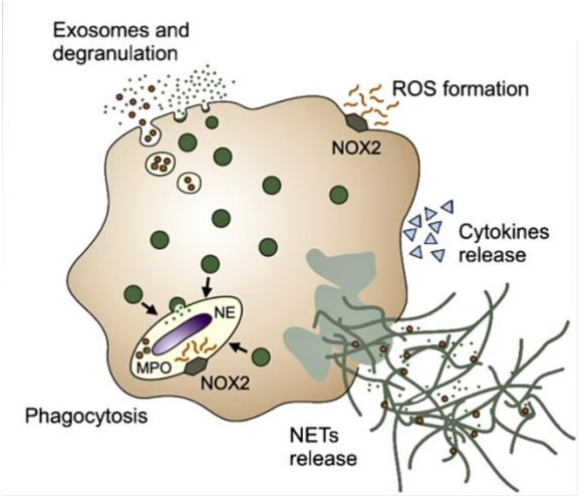


Figure 4. Fonctions effectrices des neutrophiles. Les neutrophiles après détection d'un pathogène l'internalisent au sein d'une vésicule dans un mécanisme de phagocytose. Ce processus s'accompagne de la fusion phago-lysosomale qui enrichit la vésicule en différents composés antibactériens et provoque la lyse et la mort de la bactérie. Les granules du neutrophile contenant différents types de protéines antibactériennes fusionnent également avec le phagosome afin d'y libérer leur contenu à fort potentiel bactéricide. Les granules sont aussi libérés dans l'espace extracellulaire par dégranulation, afin de participer à l'élimination des bactéries extracellulaires. Les neutrophiles par un phénomène de NETose libèrent des structures de chromatine décondensée et de protéines issues des granules, afin de piéger et lyser les bactéries. Des ROS sont produits par les neutrophiles, induisant un stress oxydatif. Les neutrophiles sécrètent des médiateurs immunitaires (cytokines, chimiokines) participant à la réponse immunitaire. D'après (Burn et al., 2021).

E. Pathologies associées aux déficiences immunitaires innées

Les déficits immunitaires primitifs (DIP) regroupent une multitude de troubles liés à des mutations génétiques qui impliquent des composants du système immunitaire, qui sont absents ou altérés dans leur fonctionnement (Duchamp et al., 2016). Les DIP sont des maladies rares, dont il existe plus de 400 types à ce jour, qui sont liés au système immunitaire innée ou adaptatif. Parmi les DIP associés à l'immunité innée, on retrouve ceux impliquant les cellules phagocytaires, qui vont produire des ROS afin d'aider à l'élimination des pathogènes qu'ils phagocytent. Un déficit pour le complexe NADPH oxydase, impliqué dans la production de ROS, altère la capacité des phagocytes à éliminer les pathogènes. Ce trouble, appelé granulomatose septique chronique, se caractérise notamment par des infections bactériennes sévères et récurrentes (Segal et al., 2000). Le système du complément est un autre élément

majeur de l'immunité innée à travers son rôle dans l'opsonisation et la lyse des pathogènes (Holers, 2014). Parmi la trentaine de facteurs qui composent le complément, les déficits en facteurs C3, H et I sont associés à des infections récurrentes par des bactéries capsulées telles que *S. pneumoniae* ou *Haemophilus influenza* type b (Rosain et al., 2014). Des déficits en MyD88 ou IRAK4, des éléments impliqués dans les voies de signalisation des PRR, diminuent non seulement la production de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1β, IL-6 et TNF, mais augmente la susceptibilité aux infections invasives par des bactéries telles que *S. pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Duchamp et al., 2016; Picard et al., 2010; von Bernuth et al., 2008).

Les fonctions du système immunitaire sont par ailleurs corrélées avec l'âge : l'immunité n'est pas complètement fonctionnelle aux jeunes âges et elle est altérée chez les personnes âgées. La croissance d'un pathogène sur un terrain immunitaire faible ou déficient est ainsi exacerbée, ce qui explique que les personnes les plus à risque de présenter des infections pneumococciques sont les jeunes enfants et les personnes âgées. Durant la jeune enfance, le système immunitaire est partiellement immature, car les cellules immunitaires ne sont pas pleinement fonctionnelles. Concernant l'immunité innée, les neutrophiles ont des réponses atténuées aux stimuli inflammatoires et une capacité d'adhésion aux cellules endothéliales moins importante que chez un adulte (Nussbaum et al., 2013). Il en va de même pour les monocytes et les macrophages, dont les voies de signalisation sont altérées avec une diminution de l'expression de MyD88 et de la production de cytokines pro-inflammatoires (Sadeghi et al., 2007). Le système du complément est également moins actif, avec des concentrations sériques des différents facteurs bien plus faibles chez le nouveau-né que chez l'adulte (McGreal et al., 2012). Le système immunitaire mature et atteint son pic de fonctionnalité à l'âge adulte, avant de subir un remodelage et un déclin fonctionnel. Si les différents effecteurs de l'immunité adaptative sont les plus impactés par l'âge et l'immunosénescence, ceux de l'immunité innée sont également modifiés (Nikolich-Žugich, 2018). En effet, l'expression des TLR est diminuée avec l'âge dans différentes populations cellulaires telles que les monocytes et les neutrophiles (Qian et al., 2014). Les fonctions antibactériennes des neutrophiles ainsi que leur capacité de chimiotactisme sont réduites (Hazeldine et al., 2014; Tseng and Liu, 2014), ce qui est associé à une susceptibilité accrue aux infection bactériennes (Simell et al., 2011). Dans le même temps, une inflammation chronique à bas bruit, appelée « inflammaging », est établie chez de nombreux sujets âgés. Le statut immunitaire correspond à des taux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum. Ce phénomène n'est pas encore totalement expliqué même

s'il pourrait être en partie dû à l'accumulation de cellules sénescentes (He and Sharpless, 2017; Montgomery and Shaw, 2015; Nikolich-Žugich, 2018). Ces différents éléments, bien que nécessitant de plus amples recherches, participent au dérèglement du système immunitaire et à la sensibilité accrue aux infections.

III. Prévention et traitement des infections respiratoires à pneumocoque

A. Prévention vaccinale

Afin de prévenir les infections à *S. pneumoniae*, des vaccins ciblant les polysaccharides qui composent la capsule de la bactérie ont été développés (Brooks and Mias, 2018). Ces vaccins induisent une protection sérotype-dépendante et sont dirigés contre les sérotypes majeurs impliqués dans les infections invasives du pneumocoque. Deux types de vaccins sont utilisés en santé humaine, le premier est le vaccin exclusivement polyosidique Pneumovax®, qui est constitué de 23 polysaccharides capsulaires spécifiques des sérotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, et 33F. Les polysaccharides sont intrinsèquement des antigènes induisant une réponse en anticorps indépendante des lymphocytes T (Jackson et al., 2003; Watson et al., 2002). En conséquence, la commutation isotypique et l'affinité des anticorps ne peuvent être pleinement maturées et la réponse mémoire demeure limitée, ce qui rend cette réponse vaccinale peu immunogène chez les enfants et les personnes âgées, qui sont pourtant la cible prioritaire de ces vaccins (Westerink et al., 2011). Le vaccin Pneumovax® est indiqué chez les adultes à risque élevé de développer une infection pneumococcique, mais nécessite une injection de rappel tous les 5 ans, dû à l'immunité protectrice peu durable. Afin d'augmenter l'immunogénicité vaccinale, les polysaccharides ont été conjugués à une protéine antigénique (forme inactivée de la toxine diphtérique ou CRM197) qui permet d'induire une réponse dépendante des lymphocytes T (Westerink et al., 2011). Les vaccins conjugués actuellement disponibles portent 13 à 20 valences et induisent une réponse immunitaire de longue durée et de très bonne affinité. Ces vaccins sont indiqués pour l'entièreté des populations à risque.

En France, la vaccination contre le pneumocoque est devenue obligatoire pour tous les nourrissons depuis janvier 2018 (Ministère de la Santé, 2024). Le schéma vaccinal se décompose en 3 injections : une primo-vaccination à l'âge de deux mois, suivie d'un rappel à 4 et 11 mois. Jusqu'à aujourd'hui, le vaccin Prevenar®13 à 13 valences (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F et 23F) était utilisé. Pour les autres personnes à risque, le schéma vaccinal associe une primo-vaccination avec le vaccin conjugué Prevenar®13, suivie deux mois plus tard d'un rappel avec le vaccin Pneumovax®. Deux nouveaux vaccins conjugués sont arrivés sur le marché français en 2024. Le Vaxneuvance® qui possède 15 valences (celles du

Prevenar®13 associées avec les polysaccharides 22F et 33F) est proposé pour la vaccination des nourrissons et des personnes de moins de 18 ans, et le vaccin Prevenar®20 avec 20 valences (incluant les nouvelles valences 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F, et 33F) qui a pour vocation à remplacer le précédent schéma vaccinal chez les adultes et les séniors. Le vaccin Prevenar®20 nécessite une seule injection, et vise à augmenter le taux de vaccination des personnes à risque et à accroître la couverture sérotypique. En France en 2021, les sérotypes couverts par le vaccin Prevenar®13 ne représentaient que 11% des infections invasives chez les enfants de moins de deux ans, et 31% chez les personnes de plus de 64 ans (Centre National de Référence des Pneumocoques, 2021). Les vaccins Vaxneuvance® et Prevenar®20 permettront d'augmenter la couverture sérotypique pour les souches invasives respectivement à 18% chez les enfants et à 64% chez les personnes âgées.

Les vaccins ont réduit l'incidence des infections pneumococciques invasives causées par les sérotypes inclus dans la composition vaccinale, ainsi que le portage asymptomatique de ces sérotypes au niveau nasopharyngé, chez les enfants vaccinés (Dagan et al., 2013; De Wals et al., 2018; Galanis et al., 2016). En France, entre la période pré-vaccinale 1998-2002 et l'année 2021, l'incidence des infections invasives a globalement diminuée de 43% chez les enfants de moins de deux ans, associée à une baisse significative des sérotypes vaccinaux dans l'étiologie (Centre National de Référence des Pneumocoques, 2021). La même tendance a été observée dans le reste de la population. Néanmoins, une hausse du portage et de l'incidence des infections causées par des sérotypes non-vaccinaux est apparue, particulièrement chez les enfants (De Wals et al., 2018; Hanquet et al., 2022). L'introduction de nouveaux vaccins semble donc favoriser le remplacement des sérotypes associés aux infections à pneumocoque, au lieu de diminuer drastiquement l'incidence de ces dernières. Il n'est pas envisageable d'inclure tous les sérotypes dans un même vaccin en raison du coût et de l'antigénicité potentiellement altérée d'un tel mélange. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches vaccinales pour le pneumocoque. Une des plus prometteuse est le ciblage d'antigènes protéiques ayant la fonction de facteur de virulence pour la bactérie, impliqués dans les phases de colonisation et d'invasion, et qui sont communs et conservés chez tous les sérotypes. De nombreuses études pré-cliniques ont été conduites sur de telles protéines de *S. pneumoniae*, certaines ayant progressé sur des essais cliniques (Aceil and Avci, 2022). Parmi les antigènes cibles, la pneumolysine, une toxine formant des pores dans les membranes cellulaires, est un antigène de choix. Un vaccin candidat contenant la pneumolysine sous une forme recombinante détoxifiée génétiquement, induit une réponse en anticorps IgG et protège

les souris contre une multitude de sérotypes (Thanawastien et al., 2021). La protéine de surface pneumococcique A (PspA) formulée dans un vaccin stimule chez des macaques une forte production d'IgG et une protection associée à une diminution de l'inflammation et de la charge bactérienne pulmonaire (Nakahashi-Ouchida et al., 2021).

B. Traitements antibiotiques

Le traitement de référence des pneumonies communautaires est l'antibiothérapie, qui est administrée au plus tôt après le diagnostic afin de maximiser le pronostic (Demoré and Charmillon, 2018). Comme l'examen microbiologique afin d'identifier l'étiologie de la pneumonie n'est pas systématique, le traitement se fait de manière probabiliste en prenant en compte la fréquence et la gravité des pathogènes impliqués. *S. pneumoniae* étant l'agent bactérien le plus fréquent dans ce type d'infection, le traitement de première intention est donc celui de référence pour cette bactérie, à savoir l'amoxicilline. Le traitement est réévalué deux à trois jours après initiation ; si aucune amélioration n'est observée ou s'il y a aggravation de l'état général du patient, signe de l'échec thérapeutique, l'alternative est alors l'administration de macrolides (azithromycine ou érythromycine) ou de fluoroquinolones (lévofloxacine). Le choix du traitement antibiotique est également adapté à l'âge du patient et à la présence de comorbidités. L'amoxicilline associée à l'acide clavulanique, un inhibiteur de β-lactamases, est souvent administrée en première intention chez les sujets âgés ou présentant des comorbidités.

a) Mécanisme d'action de l'amoxicilline

L'amoxicilline appartient à la famille des β-lactamines. Cette famille d'antibiotique, dont fait partie le premier antibiotique découvert en 1928 par Fleming à savoir la pénicilline, reste aujourd'hui parmi les plus prescrites et est essentielle à l'arsenal thérapeutique contre les infections bactériennes (Tooke et al., 2019). Les β-lactamines comprennent quatre classes : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames, qui ont tous un cycle ou noyau β-lactame à l'origine de leur activité antibactérienne. Depuis la découverte du composé originel de chaque classe, de nombreux dérivés ont été synthétisés dans le but d'améliorer leurs caractéristiques, notamment leur stabilité, leur biodisponibilité par diverses voies d'administration, leur demi-vie et leur spectre d'activité.

L'amoxicilline est un dérivé semi-synthétique de la pénicilline disponible en clinique depuis 1972. Cet antibiotique a une activité bactéricide contre un grand nombre de bactéries comprenant la plupart des bactéries à Gram positif telles que les streptocoques, *Clostridium* et *Listeria*, et des bactéries à Gram négatif telles que le gonocoque et le méningocoque. L'amoxicilline a une structure bicyclique composée d'un cycle β-lactame fusionné à un cycle thiazolidine (Sawa et al., 2020). Son mécanisme d'action, qui est commun à toutes les β-lactamines, consiste en l'interruption de la synthèse du peptidoglycane, un composant de la paroi cellulaire des bactéries (**Figure 5A**). Les β-lactamines ciblent spécifiquement l'étape de transpeptidation et plus particulièrement les transpeptidases aussi appelées protéines de liaison aux pénicillines (PLP). Les PLP assurent la réticulation des polymères de peptidoglycane, consolidant ainsi la paroi essentielle à l'intégrité de la bactérie. Les β-lactamines présentent une analogie structurale avec le dipeptide D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) des chaines de peptidoglycane (**Figure 5B**). La fixation de l'antibiotique dans le site actif des PLP induit l'ouverture du cycle β-lactame et l'acylation résultant en l'inactivation irréversible de l'activité transpeptidase des PLP. La structure de la paroi cellulaire est alors fragilisée et induit l'arrêt de la division cellulaire ou la lyse de la bactérie. S'il est le composant principal de la paroi des bactéries à Gram positif, le peptidoglycane est également présent en moins grande quantité et recouvert d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, expliquant le spectre large d'action des β-lactamines.

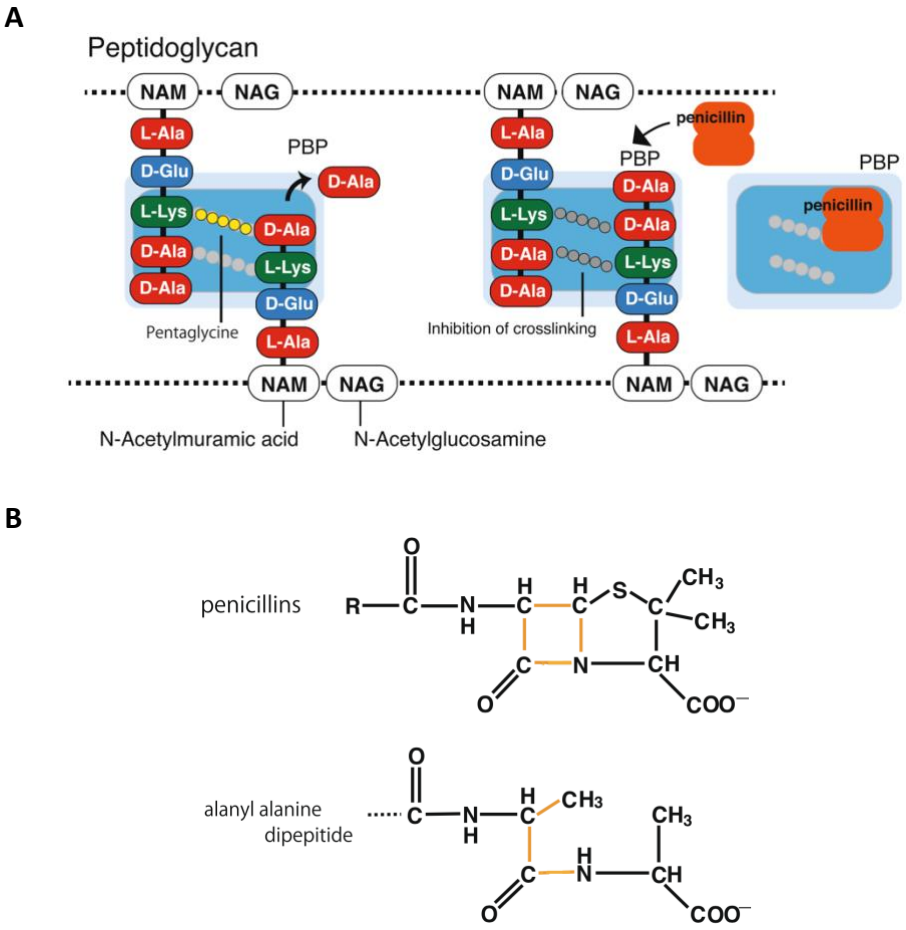


Figure 5. Mécanisme d'action des β-lactamines sur la synthèse du peptidoglycane. (A) Le peptidoglycane est composé de polymères polyosidiques alternant deux sucres, le N-acetylglucosamine (NAG) et le N-acetylmuramique (NAM), et de ponts penta-peptidiques transversaux branchés sur le NAM. Ces ponts peptidiques sont composés de L-alanine (L-Ala), d'acide D-glutamique (D-Glu), de L-lysine (L-Lys) et de D-alanine (D-Ala). Les protéines de liaison aux pénicillines (PLP ou PBP) exercent leur activité de transpeptidase par la reconnaissance du dipeptide D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala), l'hydrolyse du D-Ala en partie terminale du pont et la liaison à la L-Lys du pont peptidique adjacent. Cette réticulation apporte toute la stabilité et la rigidité du peptidoglycane. **(B)** Les β-lactamines et le dipeptide D-Ala-D-Ala du pont peptidique du peptidoglycane ont une analogie de structure, permettant à l'antibiotique de se fixer de façon covalente au site actif des PLP et d'empêcher irréversiblement la transpeptidation (Sawa et al., 2020).

b) Paramètres pharmacologiques de l'amoxicilline

Différents facteurs pharmacologiques régulent l'activité et l'efficacité antibactérienne des antibiotiques, plus particulièrement les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamique (Drusano, 2004). La pharmacocinétique regroupe les différentes étapes relatives au devenir du médicament dans l'organisme, depuis son administration jusqu'à son élimination. Elle intègre l'absorption de l'antibiotique, sa biodisponibilité, sa distribution, ainsi

que son métabolisme et son excrétion. Différents facteurs physiologiques inter-individuels affectent ces paramètres, tels que le sexe, l'âge, le poids ou encore un contexte physiopathologique spécifique, et influent sur la concentration de l'antibiotique dans le sérum ou le plasma et dans le tissu ciblé. L'amoxicilline est généralement administrée par voie orale sous forme de comprimés ou capsules, y compris dans le cas de pneumonies à pneumocoque (Demoré and Charmillon, 2018). L'amoxicilline a une forte biodisponibilité par cette voie chez l'homme (70 à 90% d'absorption gastrointestinale), et atteint une concentration maximale dans le sérum 60 à 90 minutes post-administration. Cet antibiotique présente une demi-vie courte d'environ une heure, et une bonne distribution dans les tissus, principalement sous forme libre et active (environ 20% de fixation aux protéines) (Salvo et al., 2009). Chez la souris de laboratoire, l'absorption de l'amoxicilline en solution après administration orale est très rapide et la concentration sérique maximale est atteinte en 10 à 30 minutes (Franck et al., 2019).

La pharmacodynamique étudie l'effet de l'exposition à l'antibiotique sur le patient et la cible, i.e., les bactéries. Les paramètres que sont la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) sont essentiels à l'analyse pharmacodynamique. La CMI est la concentration minimale inhibant la croissance bactérienne alors que la CMB est la concentration nécessaire à l'élimination de 99,9% des bactéries. Les valeurs de CMI et CMB sont similaires pour les antibiotiques bactéricides, comme les β-lactamines. Les CMI et CMB sont définies à l'aide de tests *in vitro* sur culture bactérienne en présence d'antibiotiques. En pratique clinique, les isolats bactériens sont analysés sur des géloses sur lesquelles sont déposés des disques d'antibiotiques. Le diamètre d'inhibition de croissance est un indicateur de la CMI. Ces tests sont essentiels afin d'établir le degré de sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques, et donc d'employer le traitement adapté. Les valeurs standards de CMI de l'amoxicilline sont une CMI $\leq$ 0,5 µg/mL pour des bactéries sensibles, une CMI > 0,5 µg/mL pour des bactéries de sensibilité diminuée et une CMI > 2 µg/mL pour des bactéries résistantes (Centre National de Référence des Pneumocoques, 2021). Si une souche est sensible à l'antibiotique, le traitement par ce dernier semble adapté, mais dès lors qu'il y a diminution de la sensibilité ou résistance, le remplacement ou l'association avec un autre antibiotique sont envisagés.

Les valeurs pharmacocinétiques et pharmacodynamiques déterminent les paramètres qui conditionnent l'activité antimicrobienne d'un antibiotique. Dans le cas de l'amoxicilline et des β-lactamines plus globalement, c'est la durée pendant laquelle la concentration sérique dépasse

la CMI de la souche bactérienne (T>CMI) qui détermine l'effet antimicrobien (**Figure 6**). En effet, l'activité des β-lactamines dépend du temps d'exposition plutôt que de la concentration (Drusano, 2004). Dans le cas des pneumonies à pneumocoque, dont le traitement de première intention est l'amoxicilline, il est important d'administrer l'antibiotique à intervalle régulier pour augmenter la durée T>CMI. La posologie usuelle est l'administration orale d'un gramme d'amoxicilline trois fois par jour, pendant sept jours (Demoré and Charmillon, 2018).

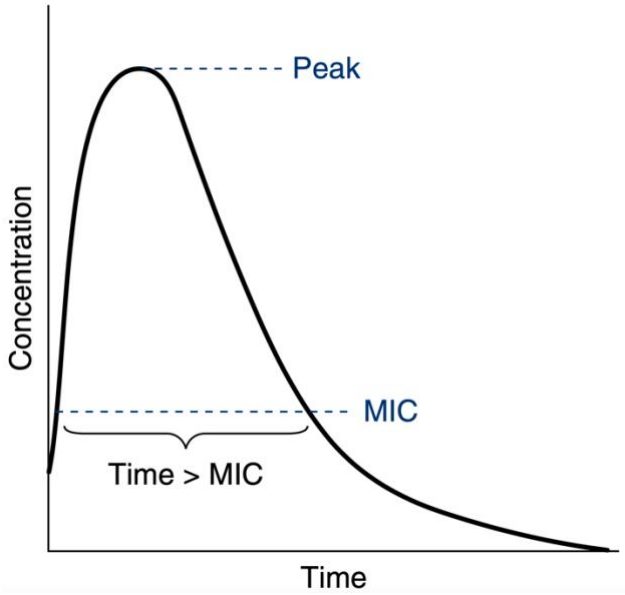


Figure 6. L'activité antibactérienne dépendante du temps des β-lactamines. L'élimination bactérienne par les β-lactamines dépend de la durée d'exposition à des concentrations en antibiotique dépassant la CMI de la souche bactérienne. D'après (Eyler and Shvets, 2019).

c) Résistance aux antibiotiques

i. Émergence et sélection de la résistance aux antibiotiques

Depuis l'introduction des sulfamides en 1935 puis de la pénicilline G en 1941 en clinique, plus de 15 familles d'antibiotiques ont été découvertes et synthétisées avec des structures, des modes d'actions et des spectres d'activité spécifiques. Les antibiotiques ont révolutionné le traitement des infections bactériennes et sauvé une multitude de vies. En effet des infections sévères, telles que les pneumonies ou les bactériémies, qui ont un taux de mortalité très élevé, sont guéries. Le traitement antibiotique d'infections « bénignes » conduit à une évolution systématiquement favorable et à une réduction de l'impact en santé publique. Finalement, le

développement et le succès de la médecine moderne incluant les chirurgies, les traitements anti-cancéreux et l'immunosuppression thérapeutique s'appuient sur les antibiotiques pour minimiser ou exclure le risque infectieux. De façon quasi-concomitante à l'utilisation des antibiotiques, les résistances aux antibiotiques ont émergé chez les bactéries (Aslam et al., 2018). Ainsi, une souche de *Staphylococcus* résistante à la pénicilline a été identifiée en 1940, avant même sa commercialisation, et une souche résistante à la méticilline en 1960, seulement un an après l'introduction de cet antibiotique (Sengupta et al., 2013). Si la découverte constante de nouveaux antibiotiques réussissait à pallier l'apparition de résistance aux antibiotiques, ce n'est plus le cas de nos jours. Deux raisons expliquent cet appauvrissement d'innovation : (1) un désintérêt des industriels et du monde académique à investir dans la recherche de nouveaux antibiotiques et (2) une certaine saturation des cibles bactériennes par les différentes générations d'antibiotiques. L'émergence de résistance aux antibiotiques s'est de plus accentuée en raison de la surconsommation d'antibiotiques, la mauvaise utilisation des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, et la libération d'antibiotiques dans l'environnement (Aslam et al., 2018). Une étude a montré que la consommation globale d'antibiotique dans 70 pays a augmenté de 36% entre 2000 et 2010 (Van Boeckel et al., 2014).

L'antibiorésistance est aujourd'hui un grave problème de santé publique (Aslam et al., 2018). En effet, la pression de sélection pour des souches résistantes aux antibiotiques est devenue énorme, et des bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques de la même classe, à plusieurs classes d'antibiotiques, voir même à tous les antibiotiques utilisés en médecine humaine émergent, menant à des impasses thérapeutiques. En 2019, une étude rétrospective a montré que 1.27 millions de décès étaient imputables à des souches résistantes aux antibiotiques dans le monde (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). Un rapport commandé par le gouvernement britannique en 2014 alerte que la résistance aux antimicrobiens pourrait être directement responsable à l'horizon 2050 de plus de dix millions de décès par an (O'Neil, 2014). Cette prise de conscience a mené à de multiples campagnes de prévention à travers le monde pour une meilleure utilisation des antibiotiques, mais également à des plans d'actions nationaux et internationaux pour relancer la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques ainsi que de stratégies thérapeutiques ou prophylactiques alternatives (Harbarth et al., 2015).

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a classé *S. pneumoniae* sur la liste des agents pathogènes prioritaires pour lesquels il est important de développer de nouveaux traitements,

dû à la résistance aux antibiotiques (OMS, 2024). Les souches de *S. pneumoniae* développent notamment des résistances aux pénicillines (sensibilité diminuée) et aux macrolides. La résistance des pneumocoques aux antibiotiques varie selon le pays concerné, le type d'infection, le sérotype de la souche ou l'âge du patient et ses facteurs de comorbidité. Une étude sur des prélèvements nasopharyngés réalisés entre 2010 et 2011 montre une proportion de souches résistantes aux pénicillines, aux macrolides ou aux tétracyclines, de 2 à 4% en Suède, et de 30% en Espagne (Yahiaoui et al., 2016). En France en 2021, 56% des pneumocoques isolés de prélèvements respiratoires chez l'adulte présentent une sensibilité diminuée aux pénicillines (Centre National de Référence des Pneumocoques, 2021). Dans le contexte d'infections invasives, 32% des pneumocoques isolés sont de sensibilité diminuée à la pénicilline, 13% sont résistants à l'amoxicilline et plus de 20% aux macrolides. D'autres résistances sont également associées à ces isolats cliniques tels que la résistance à la tétracycline ou au cotrimoxazole.

ii. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les bactéries acquièrent des résistances aux antibiotiques selon deux grands modes : les mutations spontanées dans le génome ou le transfert horizontal de matériel génétique depuis une source extérieure (Christaki et al., 2020). Trois mécanismes sont impliqués dans le transfert horizontal : (1) la transformation qui consiste en l'internalisation de fragments d'ADN exogènes de bactéries lysées suivi de leur intégration dans le génome de la bactérie receveuse, (2) la transduction dans laquelle un bactériophage transfère l'ADN d'une bactérie donneuse après infection d'une bactérie receveuse, et (3) la conjugaison qui opère le transfert d'ADN (souvent d'origine plasmidique) à travers un pilus en contact direct entre la bactérie donneuse et receveuse.

S. pneumoniae est une bactérie avec une grande plasticité génomique, qui a recours au transfert horizontal de gènes et plus particulièrement au mécanisme de transformation pour modifier son génome (Straume et al., 2015). *S. pneumoniae* est naturellement compétente ; elle sécrète une phéromone (« competence stimulating peptide » ou CSP) dont une concentration seuil induit la compétence dans un mécanisme de « quorum sensing ». La compétence est effective durant 20 à 40 minutes, i.e., la machinerie cellulaire impliquée dans la régulation des déterminants nécessaires à l'internalisation d'ADN exogène et à l'intégration par recombinaison homologue est activée. De façon concomitante, les gènes régulateurs de lyse des bactéries non-compétentes

du même microenvironnement sont exprimés. Ce mécanisme de fratricidie impacte aussi bien *S. pneumoniae* que d'autres streptocoques présents dans les compartiments naso-oro-pharyngés, tels que *S. mitis*, *S. oralis* et *S. pseudopneumoniae*, et conduit à la libération d'ADN génomique dans le milieu. La diversité microbiologique au sein du naso-oro-pharynx est propice aux échanges de matériel génétique et permet au pneumocoque d'acquérir de nombreux gènes, dont certains impliqués dans la virulence et la résistance aux antibiotiques (Dowson et al., 1993; Salvadori et al., 2019).

La pression de sélection induite par la vaccination et l'antibiothérapie favorise vraisemblablement l'adaptation par évolution génomique de *S. pneumoniae* à travers l'acquisition de gènes. Il a déjà été établi que le vaccin conjugué induit une diminution du portage et de l'incidence des infections causées par les sérotypes inclus dans les vaccins, au détriment de colonisations par des sérotypes non-vaccinaux (Dagan et al., 2013; De Wals et al., 2018; Galanis et al., 2016). L'immunité vaccinale est ainsi associée à l'émergence de souches de pneumocoques ayant un génome similaire aux souches de sérotype vaccinal à l'exception du locus codant la capsule provenant d'un sérotype non-vaccinal. L'hypothèse privilégiée est le remplacement du locus originel par le nouveau locus par transformation et recombinaison homologue. Ce phénomène de « capsular switching » a été observé après l'introduction des différents vaccins, dont le Prevenar®13. Dans ce contexte, la prévalence d'isolats de pneumocoques de sérotype 15A a augmentée ; un isolat multirésistant possédant un génome quasi-identique aux souches du sérotype vaccinal 19A a par exemple été détecté (Savinova et al., 2020). *S. pneumoniae* acquiert des gènes de résistance aux antibiotiques, et notamment à l'amoxicilline et aux β-lactamines plus généralement. Un des principaux mécanismes de résistance est la mutation des PLP, et plus précisément de leur site actif, qui diminue leur affinité pour l'antibiotique. Alors que les PLP sont très conservées à travers les souches sensibles aux antibiotiques, une grande variabilité avec plus de 10% de changement en acides aminés est observée chez les souches résistantes (Hakenbeck et al., 2012). La transformation par l'ADN de *S. mitis* est à l'origine de ces mutations (Kalizang'oma et al., 2021). Des mutations combinées dans les gènes *pbp1a*, *pbp2b* et *pbp2x* (PLP) et *murM* sont nécessaires afin d'acquérir une résistance à l'amoxicilline (Gibson et al., 2022; Stanhope et al., 2008). Les modifications de *murM* contribuent à la production d'une grande quantité de muropeptides ramifiés dans la paroi cellulaire, un mécanisme de compensation pour les mutations dans les PLP (Smith and Klugman, 2001). L'acquisition de gènes de résistance est souvent associée à une perte de la capacité des bactéries à exprimer pleinement leur virulence,

ce qui limite leur propagation. Ce phénomène de « fitness cost » est généralement compensé par l'acquisition d'autres mutations. Néanmoins la maintien et l'expansion d'une souche résistante au sein d'une population sera toujours conditionnée par une forte pression de sélection (Mahrt et al., 2021).

IV. Vers de nouvelles thérapies : les immunothérapies

A. De l'antibiothérapie aux immunothérapies

Afin de contrer le problème majeur qu'est devenue la résistance aux antibiotiques, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est essentiel. En effet, la plupart des molécules mises dernièrement sur le marché appartiennent à des familles d'antibiotiques existantes : une apparition rapide de résistance est donc à craindre. Plusieurs stratégies sont en plein développement. Une première stratégie est la combinaison de plusieurs antibiotiques qui agissent de manière additionnelle ou synergique, à l'instar des traitements antiviraux, ce qui augmente l'efficacité thérapeutique et diminue la probabilité d'apparition de résistance (Tyers and Wright, 2019). La seconde stratégie combine des antibiotiques avec des molécules capables de contrer le mécanisme de résistance qui leur est associé, tel que l'association de β-lactamines avec des inhibiteurs de β-lactamases (Tooke et al., 2019). Par ailleurs, certaines stratégies visent à améliorer l'efficacité des antibiotiques en augmentant leur biodisponibilité ou leur concentration au plus près de la cible, via des systèmes de délivrance tels que les nanoparticules ou via un couplage leur permettant d'entrer par les transporteurs membranaires bactériens (Portsmouth et al., 2018; Van Giau et al., 2019). Ces stratégies, dont certaines ont prouvé leur efficacité et d'autres sont encore en développement, ne sont toutefois pas applicables à toutes les familles d'antibiotiques.

Une approche prometteuse est la modulation du système immunitaire, aussi connue sous le nom d'immunothérapie ou de thérapie dirigée vers l'hôte. Cibler la réponse immunitaire innée et adaptative permet de promouvoir la réponse antibactérienne, ou d'inhiber les effets délétères de l'infection tel qu'un état inflammatoire aigu (Wallis et al., 2023). Les immunothérapies ont l'avantage d'activer de multiples mécanismes antimicrobiens. Ainsi, la probabilité de sélectionner des résistances à ces multiples effecteurs antibactériens est faible au contraire des antibiotiques qui ont une cible spécifique. De plus, ces thérapies sont par principe insensibles au profil de résistance aux antibiotiques, à la nature de l'isolat clinique ou au sérotype des bactéries. Les immunothérapies pourraient être utilisées en tant qu'alternative thérapeutique seule ou en combinaison avec l'antibiothérapie.

Les immunothérapies font déjà partie de l'arsenal thérapeutique contre le cancer, et sont utilisées avec succès en clinique. Certaines immunothérapies pourraient être appliquées aux

maladies infectieuses du fait de l'immunosuppression induite par certains pathogènes, similaire au cancer (McCulloch et al., 2022). Le ciblage des « checkpoints » immunitaires, qui sont des voies de signalisation inhibitrices que possèdent les cellules immunitaires afin de réguler la durée et l'intensité de leur réponse, est une stratégie largement utilisée en clinique (Abril-Rodriguez and Ribas, 2017; Pardoll, 2012). Différentes protéines sont impliquées dans ces voies de signalisation, telles que le récepteur PD-1 (Programmed cell death protein 1) et son ligand PD-L1, dont l'activation va inhiber la réponse immunitaire. Certaines bactéries telles que *Burkholderia pseudomallei* ou *Helicobacter pylori* régulent positivement l'expression des protéines PD-1 et PD-L1 par les cellules immunitaires afin de limiter la réponse antibactérienne et échapper au système immunitaire (Pose et al., 2021; See et al., 2017). L'utilisation d'inhibiteurs de checkpoints immunitaires, tels que des anticorps ciblant les protéines PD-1 et PD-L1, pourrait empêcher l'inhibition de la réponse immunitaire et promouvoir la clairance bactérienne (Wykes and Lewin, 2018). La modulation des cytokines par immunothérapie est également une approche intéressante. Ainsi, l'administration d'IL-7 contrebalance la lymphopénie induite dans des modèles de sepsis post-infectieux (Francois et al., 2018). La thérapie cellulaire consiste en l'administration de cellules immunitaires conditionnées ou modifiées afin qu'elles induisent un effet protecteur. Le transfert adoptif de cellules T naïves modifiées afin d'exprimer un récepteur (TCR) reconnaissant spécifiquement un antigène de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a par exemple permis d'augmenter la clairance bactérienne dans un modèle infectieux murin (Kalinina et al., 2020). Même si certaines de ces stratégies sont déjà utilisées en clinique dans d'autres domaines, elles restent encore pour la plupart en phase exploratoire dans le contexte des maladies infectieuses.

B. Modulation de l'immunité innée

Parmi les immunothérapies, celles qui modulent spécifiquement l'immunité innée ont un intérêt particulier dans les infections (Anwar et al., 2019). En effet, l'immunité innée est constituée de mécanismes de défenses anti-infectieuses multiples ayant un spectre d'activité large contre de nombreux agents infectieux et opérationnels en absence d'exposition préalable à ces agents. Les récepteurs PRR, au travers de leur rôle central dans les défenses immunitaires de l'hôte, sont une cible de choix pour ces thérapies. Les agonistes de PRR ont initialement été développés en tant qu'adjuvant pour la vaccination, puis pour le traitement de cancers ou de maladies infectieuses. L'inhibition de l'immunité innée est également intéressante dans le cas de maladies inflammatoires ou auto-immunes.

De nombreux agonistes de PRR sont en essais précliniques et cliniques (Alving et al., 2012). Le monophosphoryl lipid A (MPLA), un ligand du récepteur TLR4, est utilisé en combinaison avec d'autres molécules comme adjuvant dans les vaccins Fendrix contre l'Hépatite B, Cervarix contre le papillomavirus ou Shingrix contre le virus du zona. Dans des modèles murins, l'administration intrapéritonéale ou intraveineuse de MPLA confère une protection contre des pathogènes tels que *P. aeruginosa* ou *S. aureus* en stimulant le recrutement de neutrophiles et la reprogrammation du métabolisme des macrophages (Bohannon et al., 2016; Fensterheim et al., 2018). L'imiquimod, un agoniste de TLR7, est utilisé en application locale chez l'homme pour son activité antivirale contre les poxvirus et les papillomavirus (Sauder et al., 2003). L'imiquimod induit également une protection dans un modèle murin d'infection par le virus Influenza A en diminuant la réplication virale et l'inflammation pulmonaire associée (To et al., 2019). Des agonistes de TLR2, les composés Pam_2Cys et MALP-2 (macrophage-activating lipopeptide-2), ont également montré un effet protecteur dans des modèles d'infections au virus Influenza ou de surinfection par *S. pneumoniae* (Reppe et al., 2015; Tan et al., 2012). L'administration par voie intratrachéale, intrapéritonéale et intravaginale d'oligodeoxynucleotides CpG qui mime l'ADN bactérien et active TLR9, a montré un effet protecteur dans des modèles d'infections bactériennes et virales comme *Klebsiella pneumoniae* (Deng et al., 2004), *S. aureus* (Kim et al., 2018) ou le virus herpes simplex (HSV) (Gill et al., 2006). Les oligodeoxynucleotides CpG ont été approuvés pour une utilisation chez l'homme en tant qu'adjuvant d'un vaccin contre l'hépatite B, efficace chez des personnes âgées diabétiques normalement peu réactives à la vaccination (Hyer and Janssen, 2019).

C. La flagelline et son rôle immunomodulateur

L'utilisation de la flagelline, qui est un composé du flagelle bactérien et l'agoniste de TLR5, a été étudié au laboratoire dans le cadre d'immunothérapies.

a) Rôle du flagelle bactérien

Le flagelle bactérien est un filament de surface qui contribue à la mobilité des bactéries et à leur virulence (Chaban et al., 2015). Le flagelle peut atteindre une longueur de 10 µm pour un diamètre de 60 nm. La production du flagelle nécessite plus de 30 protéines mais le filament est constitué principalement de la protéine structurale appelée flagelline. Le flagelle se divise en trois parties : un corps basal qui contient un moteur rotatif réversible et ancre la structure au niveau membranaire, un crochet qui s'étend en extracellulaire et sert de jonction, et un long

filament qui forme une hélice hélicoïdale, composé de plus de 20 000 sous-unités de flagelline (**Figure 7**). La formation du flagelle débute par l'assemblage coordonné d'un système de sécrétion de type III et des anneaux formant le corps basal, permettant le recrutement et l'exportation des différentes protéines structurales dans le creux de la structure pour permettre son élongation. La rotation du flagelle est induite par une force protomotrice, qui génère des changements conformationnels à la structure et induit le mouvement. La force générée permet un déplacement de 25 à 160 μm/s selon la bactérie.

Le flagelle est un élément essentiel dans la pathogénicité de nombreuses bactéries telles que *Escherichia coli, Salmonella* spp., *P. aeruginosa, Bordetella* spp. ou encore *Legionella pneumophila* (Ramos et al., 2004). Il participe à différentes étapes de l'infection incluant la colonisation, l'invasion, la croissance, le maintien et la dispersion. Le flagelle est tout d'abord utilisé par la bactérie pour se déplacer et s'orienter dans l'environnement grâce à un système de chimiotactisme (Stecher et al., 2004). Dans certains contextes, le flagelle contribue à l'adhésion des bactéries aux cellules, notamment par son interaction avec les mucines (Lillehoj et al., 2002). Il est aussi impliqué dans la formation de biofilms (Guttenplan and Kearns, 2013). Chez *Bacillus thuringiensis*, le système de sécrétion du flagelle sécrète des facteurs de virulence tels que les phospholipases ou les hémolysines (Ghelardi et al., 2002). Le flagelle joue un rôle dans l'invasion des tissus en permettant le franchissement des jonctions intercellulaires (Comstock and Thomas, 1991), mais également dans l'invasion cellulaire en activant ou facilitant la phagocytose par des cellules immunitaires (Dietrich et al., 2001; Lovewell et al., 2014). Certaines bactéries ont en effet une réplication intracellulaire au sein d'une vacuole ou du cytoplasme des cellules de l'hôte, comme *Salmonella* ou *Listeria* (Cossart and Sansonetti, 2004). Si les bactéries utilisent la reconnaissance du flagelle à leur avantage, elles ont également des stratégies pour que la flagelline échappe au système immunitaire. Ainsi, *E. coli* réduit l'expression de son flagelle (Gauger et al., 2007), alors que *Campylobacter jejuni* masque la détection de son flagelle au travers de mutations dans la séquence de sa flagelline ou de modifications post-traductionnelles (Andersen-Nissen et al., 2005; Thibault et al., 2001). Alterner l'expression de différentes flagellines, un mécanisme appelé variation de phase, ou la faire exprimer seulement par une partie de leur population sont d'autres mécanismes d'échappement (Bonifield and Hughes, 2003; Koirala et al., 2014). Dans une étape de dissémination ou de transmission vers un nouvel hôte, certaines bactéries réactivent l'expression de leur flagelle afin de retrouver leur mobilité (Chaban et al., 2015).

b) Structure de la flagelline

La flagelline est une protéine structurale composée de 250 à 1250 acides aminés selon l'espèce bactérienne (Vijayan et al., 2018). Celle de *S.* Typhimurium, nommée FliC et sur laquelle le laboratoire travaille est constituée de 495 résidus. La flagelline FliC est organisée en quatre domaines connectés : les domaines D0 et D1 forment la partie terminale de la protéine et sont très conservés entre les bactéries, et les domaines hypervariables D2 et D3 forment la partie centrale (**Figure 7**). Dans le filament, les domaines D0 et D1 sont situés dans la partie interne du flagelle et sont organisés principalement en hélices α condensées importantes pour la structure d'hélice hélicoïdale du filament. Les domaines D2 et D3 sont constitués de feuillets β et sont exposés à l'extérieur du filament. Ces domaines D2 et D3, de par leur exposition, sont immunogènes et la cible majoritaire d'anticorps produits par l'hôte. Lorsque la flagelline est sous forme de monomère, en solution, tous les domaines restent compactés sauf le domaine D0, qui lui est désordonné. C'est uniquement sous cette forme monomérique que le site de reconnaissance du récepteur TLR5 est accessible. Deux régions du domaine D1 sont importantes pour l'interaction entre la flagelline et le récepteur TLR5 : les hélices α de la partie C-terminale du domaine et un motif constitué des acides aminés 89 à 96 (Andersen-Nissen et al., 2005; Yoon et al., 2012). Un mécanisme d'échappement immunitaire utilisé par certaines bactéries est la mutation du motif 89-96, qui ne permet plus la reconnaissance par le récepteur TLR5 (Andersen-Nissen et al., 2005; Clasen et al., 2023). Le domaine D0 est également important dans l'activation de ce récepteur, vraisemblablement en stabilisant la liaison entre les deux récepteurs TLR5 formant un dimère (Clasen et al., 2023; Forstnerič et al., 2017). La détection de la flagelline par le système immunitaire innée ne repose pas sur la reconnaissance du flagelle bactérien mais sur la forme monomérique de la flagelline (Vijayan et al., 2018).

Deux flagellines recombinantes issues de celle de *S.* Typhimurium ont été développées au laboratoire. La flagelline $FliC_{\Delta 174\text{-}400}$ est dépourvue des domaines immunogènes D2 et D3 incluant les acides aminés 174 à 400 et porte un motif de liaison GAAG au niveau de la délétion. La flagelline FLAMOD est en tout point similaire à la protéine $FliC_{\Delta 174\text{-}400}$ à l'exception d'une lysine introduite après la méthionine N-terminale. Ces deux flagellines ont été utilisées respectivement pour les expériences de la première et de la seconde partie des résultats de ce manuscrit.

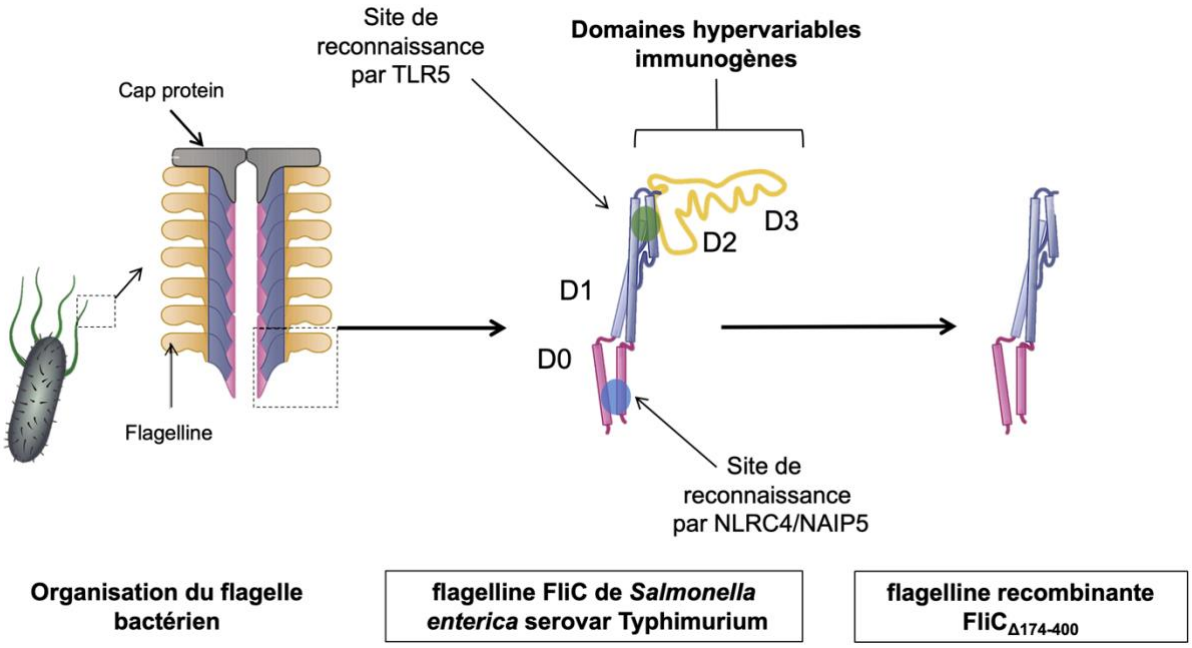


Figure 7. Structure de la flagelline et organisation au sein du flagelle bactérien. Le filament du flagelle bactérien est composé de nombreuses sous-unités de flagelline. La flagelline de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium est composée de quatre domaines : les domaines D0 et D1 formant la partie terminale de la protéine et situés au centre du filament, et les domaines D2 et D3 formant la partie centrale de la protéine, qui est hypervariable et immunogène dû à sa localisation sur la face externe du filament. La flagelline est détectée par deux récepteurs de l'immunité innée, le récepteur TLR5 en surface et le récepteur NAIP5/NLRC4 dans le compartiment cytosolique. L'interaction de TLR5 avec la flagelline mobilise des motifs définis du domaine D1 mais aussi le domaine D0 même si les points de contact ne sont pas définis à ce jour. Le site de reconnaissance pour NAIP5/NLRC4 est localisé sur le domaine D0. La flagelline recombinante $FliC_{\Delta 174-400}$ est délétée pour les domaines D2 et D3 (Vijayan et al., 2018).

c) Propriétés immunomodulatrices de la flagelline

i. Voie TLR5

Le récepteur TLR5 est exprimé de manière ubiquitaire et se retrouve à la surface de nombreuses cellules telles que les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les lymphocytes et les cellules épithéliales. L'interaction de la flagelline avec TLR5 active la voie de signalisation dépendante de la protéine adaptatrice MyD88, qui *in fine* stimule la production de multiples médiateurs immunitaires**.** De manière remarquable, l'immunité innée induite par la flagelline est fortement compartimentée et mobilise des cellules sentinelles, des cellules effectrices et des cytokines distinctes (Ramos et al., 2004; Vijayan et al., 2018). Cette compartimentation est particulièrement sensible au niveau des muqueuses de l'hôte.

La détection de la flagelline dans la lumière des muqueuses s'opère au travers des cellules épithéliales qui expriment TLR5 (Janot et al., 2009; Ramos et al., 2004). Ce processus a particulièrement été analysé dans la muqueuse respiratoire après administration intranasale ou orogastrique de flagelline. Après stimulation de TLR5, les cellules épithéliales respiratoires ou intestinales produisent (1) des chimiokines telles que CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL20 et CCL2 qui favorisent le recrutement de neutrophiles, de monocytes et de cellules dendritiques, (2) des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance tels qu'IL-1β, IL-6 et G-CSF qui induisent l'activation et la survie des cellules résidentes et recrutées, et (3) des molécules antimicrobiennes telles que les β-défensines, les cathélicidines ou le lysozyme qui participent directement à l'élimination du pathogène (Janot et al., 2009; Yu et al., 2010). Au-delà de la réponse immunitaire innée, la signalisation épithéliale favorise l'émergence de l'immunité adaptative (Van Maele et al., 2014b). En effet, les cellules épithéliales activent la maturation fonctionnelle des cellules dendritiques respiratoires dans un processus dépendant du GM-CSF qui migrent alors dans les tissus lymphoïdes, ou elles induisent une réponse adaptive avec un adressage locale et systémique (Fougeron et al., 2015; Vijayan et al., 2020). Cette réponse adjuvante de la flagelline sur des antigènes co-administrés par voie intranasale est notamment caractérisée par l'émergence de lymphocytes Th2 et Th17 et la production d'anticorps de type IgA et IgG1 (Liu et al., 2024; Vijayan et al., 2020).

Au niveau systémique, la flagelline est rapidement détectée par les cellules dendritiques équipées du récepteur TLR5, particulièrement les cellules de type cDC2 (Flores-Langarica et al., 2018; Kinnebrew et al., 2012). Ces cellules dendritiques sécrètent alors l'IL-23 qui transactive des cellules immunitaires innées telles que les cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3) ou les lymphocytes Tγδ, à produire les interleukines IL-17A et IL-22 (Van Maele et al., 2014a). Ces cytokines ciblent quasi-spécifiquement les cellules épithéliales qui favorisent le recrutement de cellules phagocytaires, la production de molécules antimicrobiennes ainsi que la réparation tissulaire. Dans un contexte de réponse secondaire, les cellules dendritiques promeuvent la différenciation de cellules B en cellules productrices d'IgA sécrétoires, ainsi que de lymphocytes T helper 17 (Liu et al., 2016; Uematsu et al., 2008).

ii. Voie NLRC4

Alors que les flagellines extracellulaires sont détectées par le récepteur transmembranaire TLR5 en surface, les récepteurs NAIP (NLR family apoptosis inhibitory protein) chez l'homme

et NAIP5 chez la souris sont capables de reconnaître les flagellines délivrées dans le cytoplasme cellulaire via la région C-terminale du domaine D0 (Lightfield et al., 2008; Zhao and Shao, 2015). La reconnaissance de la flagelline par le récepteur NAIP/NAIP5 induit le recrutement du récepteur NLRC4 (NLR family CARD domain-containing protein 4) et son oligomérisation. La formation de l'inflammasome associé au récepteur NLRC4 conduit à la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18. Elle conduit également à la pyroptose, une forme de mort cellulaire programmée qui peut être induite afin d'empêcher la réplication intracellulaire de bactéries.

d) Utilisation de la flagelline en thérapie

Depuis l'identification de la flagelline comme agoniste des PRR, ses capacités immunomodulatrices ont été exploitées pour de nombreuses applications (Hajam et al., 2017). Ainsi, la flagelline a été développée comme adjuvant vaccinal, à la fois pour des vaccinations systémiques et muqueuses. Dans ce contexte, la flagelline est soit administrée avec l'antigène vaccinal sous une formulation saline ou incorporée dans un vecteur, soit fusionnée à l'antigène sous forme de protéine de fusion. La vaccination est réalisée par voie sous-cutanée, intramusculaire, orale ou nasale. L'immunogénicité et l'efficacité en tant qu'adjuvant ont été montrées pour différents antigènes de pathogènes bactériens (*S. pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *P. aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*), viraux (virus Influenza, West Nile virus, VIH), ou parasitaires (*Plasmodium*, malaria).

La flagelline est également utilisée pour ses propriétés anti-infectieuses contre de nombreux pathogènes grâce aux mécanismes de défenses immunitaires innées qu'elle induit suite à son administration. La plupart des études portent sur une intervention prophylactique effectuée en amont ou en même temps que l'infection. Un effet protecteur par injection intrapéritonéale de flagelline est observé dans les infections intestinales à *Clostridium difficile*, à entérocoque résistant à la vancomycine ou à *Yersinia pseudotuberculosis* (Jarchum et al., 2011; Kinnebrew et al., 2010; Porte et al., 2017). La flagelline, appliquée sur la cornée, diminue la charge bactérienne et les symptômes cliniques lors d'infections oculaires à *P. aeruginosa* (Kumar et al., 2010). L'inhalation de flagelline protège d'infections respiratoires à *Burkholderia cepacia*, *P. aeruginosa* sensible et résistant aux antibiotiques et *S. pneumoniae* (infection primaire ou surinfection grippale) (Maia et al., 2024; Muñoz et al., 2010; Porte et al., 2015; Yu et al., 2010; Zgair, 2012). De même, un traitement sublingual induit une protection similaire contre *S.*

pneumoniae (Muñoz-Wolf et al., 2016). L'administration intrabronchique de flagelline chez le porc infecté par *P. aeruginosa* diminue la sévérité de l'inflammation infectieuse (López-Gálvez et al., 2021). Un effet protecteur de la flagelline administrée par voie intranasale ou intrapéritonéale est également observé dans des modèles d'infections virales (Georgel et al., 2019; Zhang et al., 2014).

A l'instar d'autres agonistes TLR, l'effet thérapeutique, i.e., une fois que l'infection est établie, est peu concluant pour la flagelline comme seule « drogue ». Au sein du laboratoire, la preuve de concept thérapeutique de la combinaison d'antibiotique, traitement de référence, et de flagelline a été établie dans des pneumonies à pneumocoques. Ainsi, il a été montré dans un modèle murin d'infection respiratoire à *S. pneumoniae* qu'un traitement combinant un antibiotique à l'administration intranasale de flagelline induit un effet protecteur, avec une supériorité thérapeutique par rapport à l'antibiotique seul. Cette bi-thérapie est un processus synergique et est associée à une diminution du nombre de bactéries pulmonaires, de la dissémination systémique ainsi qu'à une meilleure survie. La combinaison synergique est effective avec deux classes distinctes d'antibiotiques et différentes voies d'administration de ces antibiotiques. L'inhalation de flagelline combinée au cotrimoxazole injecté par voie systémique ou l'amoxicilline administrée par voie orale sont tous deux thérapeutiques contre les pneumonies primaires ou les surinfections grippales à pneumocoques. Pour la preuve de concept, une posologie subthérapeutique d'antibiotique a été utilisée pour mettre en évidence l'effet synergique de l'inhalation de flagelline et s'est montrée efficace contre des infections respiratoires avec des souches sensibles aux antibiotiques ou des souches de sensibilité diminuée aux antibiotiques. Dans le contexte d'une infection et d'une réponse inflammatoire établies, la thérapie combinée est tout de même capable de stimuler l'immunité innée respiratoire, i.e., le recrutement de phagocytes dans les voies respiratoires ou la production de cytokines et chimiokines tels que CXCL1, CXCL2, CCL20, IL-6, IL-1β et TNF. L'effet protecteur des antibiotiques combinés à la flagelline inhalée est effectivement dépendant de la signalisation via le récepteur TLR5 (Porte et al., 2015). De plus, les analyses histologiques des poumons de souris infectées et traitées démontrent que la stimulation de l'immunité innée respiratoire n'induit pas d'exacerbation de l'inflammation, suggérant que la signalisation TLR5 est transitoire et régule les mécanismes de résolution inflammatoire (Matarazzo et al., 2019; Porte et al., 2015). Ces résultats soulignent le potentiel thérapeutique de la flagelline utilisée en combinaison avec un antibiotique dans le contexte de pneumonies à pneumocoques.

Objectifs

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique, qui complique le traitement des infections bactériennes et mène à des échecs thérapeutiques. Ce phénomène prend de l'ampleur et va continuer à s'aggraver à l'avenir si de nouvelles alternatives thérapeutiques ne sont pas proposées. L'activation des mécanismes de défense de l'immunité innée à travers l'utilisation d'agonistes des PRR semble être une alternative prometteuse.

Dans le contexte des pneumonies à *S. pneumoniae*, un pathogène concerné par la résistance aux antibiotiques, une immunothérapie a été mise au point. L'association de l'amoxicilline à la flagelline, un agoniste du récepteur TLR5 exprimé par les cellules épithéliales et immunitaires, a montré un effet protecteur supérieur à celui de l'antibiotique seul dans des modèles murins de pneumonies, et ce avec des souches sensibles et résistantes aux antibiotiques. Cette efficacité thérapeutique a été associée au recrutement accru de neutrophiles dans les voies aériennes et à une augmentation de la production de médiateurs immunitaires.

Le premier objectif de ma thèse a été d'étudier l'impact de la thérapie combinée amoxicilline plus flagelline sur la sélection de la résistance aux antibiotiques. Cela a nécessité la mise en place d'un modèle de coinfection *in vivo* chez la souris, utilisant une souche sensible et une souche résistante à l'amoxicilline, dans lequel nous avons pu analyser la sélection de bactéries résistantes en réponse aux traitements. La dynamique des populations bactériennes dans ce contexte a été capturée par un modèle mathématique. Nous nous sommes également intéressés à l'émergence de résistance aux antibiotiques au travers du mécanisme de transformation.

Dans un second temps, nous avons exploré plus en détails les mécanismes immunitaires responsables de l'effet protecteur induit par la thérapie associant l'amoxicilline et la flagelline. Des approches de transcriptomique et de protéomique ont été utilisées afin de mieux caractériser la réponse immunitaire pulmonaire induite par la flagelline. D'autres techniques de cytométrie en flux, d'immunohistochimie et de transcriptomique en cellule individuelle ont permis à la fois de préciser le rôle des neutrophiles dans cette protection et d'analyser l'effet de la flagelline sur cette population. Le compartiment cellulaire impliqué dans la signalisation du récepteur TLR5, duquel dépend l'effet de la flagelline, a aussi été étudié.

Résultats

Article I : La signalisation via le récepteur Toll-Like receptor 5 pendant la pneumonie à pneumocoques empêche la sélection de la résistance aux antibiotiques

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans The Journal of Infectious Diseases :

Triggering Toll-Like Receptor 5 signaling during pneumococcal pneumonia prevents the selection of antibiotic resistance

Charlotte Costa, Jean-Claude Sirard, Paddy S. Gibson, Jan-Willem Veening, Erida Gjini, Mara Baldry

J Infect Dis. 2024 May 8:jiae239. doi: 10.1093/infdis/jiae239

Introduction

Les infections des voies respiratoires inférieures sont une cause majeure de mortalité dans le monde, contribuant à plus de 2 millions de décès par an [1]. Parmi elles, la pneumonie causée par des virus ou des bactéries est une cause majeure de morbidité et de mortalité [2]. *S. pneumoniae*, une bactérie opportuniste, est le principal agent causal de la pneumonie communautaire, capable également de provoquer des maladies invasives telles que la bactériémie ou la méningite [3,4]. Le traitement de première intention est l'amoxicilline (AMX), un antibiotique de la famille des bêta-lactamines. Cependant, les échecs thérapeutiques sont de plus en plus fréquents en raison de l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques [5]. La résistance aux antibiotiques est aujourd'hui un problème de santé majeur, soulignant la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour surmonter ce fardeau.

L'activation de l'immunité innée pour éliminer efficacement les bactéries est nécessaire au cours de la pneumonie à pneumocoques [6,7]. La réponse immunitaire innée des voies respiratoires implique l'activation des macrophages alvéolaires, des cellules épithéliales et des neutrophiles [8,9]. L'exploitation du pouvoir de l'immunité innée pour vaincre les infections résistantes aux antibiotiques, connue sous le nom de thérapie dirigée vers l'hôte ou immunothérapie, est une alternative prometteuse ou un complément à l'antibiothérapie [10]. Cibler l'immunité pour induire des mécanismes de défense antimicrobiens spécifiques de l'hôte et moduler l'inflammation présente un intérêt majeur, car les immunothérapies déclenchent des défenses multiples et, par conséquent, le développement et la sélection de la résistance sont moins probables que pour les médicaments antimicrobiens. En outre, les immunothérapies sont supposées être efficaces quel que soit le profil de résistance aux médicaments, la souche, le sérotype ou la complexité de l'infection (co-infection, surinfection par exemple). Les récepteurs de type Toll (TLR) ont été largement étudiés en tant que cibles médicamenteuses dans les immunothérapies [11,12], car ils sont exprimés de manière ubiquitaire et jouent un rôle crucial dans la détection des agents pathogènes et la génération de réponses immunitaires [13]. La flagelline, le composant structurel des flagelles bactériens, agit comme un agoniste naturel du TLR5. Il est important de noter que le récepteur TLR5 est exprimé sur différents types de cellules, y compris les cellules épithéliales des voies respiratoires et les cellules immunitaires [14]. L'activité immunostimulante de la flagelline a été démontrée dans des modèles murins d'infection à pneumocoques, la flagelline déclenchant l'activation des réponses immunitaires innées locales de manière dépendante de TLR5 par le biais d'une signalisation dans l'épithélium

des voies respiratoires [15]. Nous avons précédemment mis au point une immunothérapie pour lutter contre la pneumonie à pneumocoque, associant la flagelline inhalée à l'AMX, le traitement de référence [16,17]. La thérapie combinée a des effets thérapeutiques supérieurs à ceux de l'antibiotique seul, réduisant la charge bactérienne dans les poumons, limitant la dissémination systémique et améliorant le taux de survie dans des modèles murins, même contre des souches résistantes aux antibiotiques [17]. L'efficacité de l'immunothérapie afin de réduire la sélection de la résistance aux antibiotiques au cours de l'infection est néanmoins à déterminer.

La résistance aux antibiotiques peut résulter de mutations *de novo* ou d'un transfert horizontal de gènes [18], comme dans le cas de *S. pneumoniae,* qui peut échanger du matériel génétique avec d'autres pneumocoques et d'autres espèces par transformation naturelle [19,20]. La sélection de résistance au sein d'une population bactérienne nécessite une pression antibiotique prolongée, faute de quoi la population résistante ne serait pas maintenue en raison du fitness cost associé. L'utilisation abusive et excessive des antibiotiques a largement contribué à l'accélération de la sélection de résistances. En 2019, 1,27 million de décès ont été attribués à la résistance bactérienne aux antimicrobiens [21]. La modélisation mathématique, en tant qu'outil prédictif des effets thérapeutiques, a pris de l'ampleur afin d'examiner la dynamique de sélection au cours de l'infection [22-26]. Des études théoriques ont exploré différents schémas thérapeutiques tels que la dose d'antibiotique, la fréquence d'administration et la durée du traitement afin d'établir des critères pour une élimination efficace de l'infection et la prévention du développement de résistances, en tenant compte de la contribution de la réponse immunitaire de l'hôte [26,27]. Nous avons émis l'hypothèse que le traitement par la flagelline associé à l'AMX peut réduire la sélection de bactéries résistantes à l'AMX au cours de la pneumonie à pneumocoque en renforçant les défenses immunitaires antibactériennes, ce qui conduit *in fine* à une efficacité accrue du traitement. Dans cette étude, nous avons établi un modèle de co-infection chez la souris avec des souches de pneumocoques résistantes et sensibles à l'AMX afin d'analyser la dynamique de la population mixte de pneumocoques sous immunothérapie. Les données générées ont ensuite été intégrées dans un modèle mathématique pour prédire les résultats du traitement.

Matériels et Méthodes

Souches et cultures bactériennes

Les souches de *S. pneumoniae* sont isogéniques et dérivées de la souche de laboratoire de sérotype 2 D39V [28]. Les modifications génomiques ont été introduites par transformation de produits PCR linéaires suivie d'une recombinaison homologue. Les constructions ont été amplifiées à partir du locus *hlpA* des souches VL2678 [29] et VL2226 [30] avec les amorces OVL43 (AACAAGTCAGCCACCTGTAG) et OVL46 (CGTGGCTGACGATAATGAGG). VL3198 est dérivé de la souche AMR53 résistante à l'AMX [CMI_{AMX} =2 µg/ml] [19], qui a été transformée avec *hlpA::hlpA-mKate-ery*^{R}, ce qui lui confère une résistance à l'érythromycine. VL3199 a été clonée en insérant le *hlpA::hlpA-gfp-chl*^{R} dans D39V et, en tant que tel, est sensible à l'AMX (CMI_{AMX} =0,016 µg/ml) mais résistante au chloramphénicol. Pour l'infection, des stocks ont été préparés comme décrit précédemment, dans une solution saline stérile de Dulbecco tamponnée au phosphate (PBS, Gibco, Grand Island, NY) [15]. Le nombre de bactéries (en unités formant des colonies [UFC]) a été confirmé par l'étalement de dilutions sériées sur des géloses au sang de mouton à 5 % et par leur incubation à 37 °C pendant 18 heures avec 5 % de CO_2.

Modèles d'infection chez la souris

Toutes les expériences étaient conformes aux réglementations institutionnelles et aux directives éthiques, ont été approuvées par le Comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux (E59-350009, Institut Pasteur de Lille ; Protocole APAFIS#16966 201805311410769_v3) et ont été menées par du personnel qualifié. Les souris mâles C57BL/6JRj (âgées de 6 à 8 semaines) (Laboratoires Janvier, Saint Berthevin, France) ont été maintenues dans des cages ventilées (Innorack® IVC Mouse 3.5) et manipulées dans une enceinte de biosécurité à flux laminaire (Classe II Biohazard, Tecniplast). Avant l'infection intranasale (i.n.), les souris ont été anesthésiées par l'injection intrapéritonéale de 1,25 mg (50 mg/kg) de kétamine plus 0,25 mg (10 mg/kg) de xylazine dans 250 µl de PBS. Pour le modèle de surinfection pneumococcique, les souris ont été sensibilisées par une infection i.n. avec 50 unités formatrices de plages de lyse de la souche Scotland/20/74 du virus de la grippe A H3N2 adaptée aux souris dans 30 µl de PBS. Sept jours plus tard, une infection i.n. par *S. pneumoniae* a été induite avec 5×10^4 UFC dans 30 µl de PBS [31,32]. Pour les coinfections, les bactéries

VL3199 et VL3198 ont été mélangées dans des proportions de 1:1, 100:1 et 1000:1. À des moments choisis, les souris ont été sacrifiées par l'injection intrapéritonéale de 5,47 mg de pentobarbital sodique dans 100 µl de PBS. Les poumons ont été prélevés et homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur UltraTurrax (IKA-Werke, Staufen, Allemagne), et le nombre de bactéries viables a été déterminé sur des géloses au sang contenant un antibiotique sélectif [érythromycine ou chloramphénicol à 5 µg/ml (Sigma-Aldrich)].

Flagelline et administration d'antibiotiques

La flagelline FLAMOD (flagelline recombinante FliC $_{\Delta 174\text{-}400}$ (Nempont et al., 2008) hébergeant un acide aminé supplémentaire à l'extrémité N-terminale) dérivée de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FliC, a été produite dans des corps d'inclusion dans *E. coli* par le département de développement des vaccins du Statens Serum Institut, au Danemark. La flagelline a été purifiée par filtration et chromatographie et remise en suspension dans 10 mM de phosphate, 145 mM de NaCl, 0,02 % de polysorbate 80 (p/v) pH 6,5. L'activité immunostimulante a été validée à l'aide du test sur cellules HEK-Dual™ hTLR5 (Invivogen). La teneur en endotoxines de la préparation protéique a été évaluée à l'aide d'un test de *Limulus* (Pyrochrome, test LAL cinétique de Associates of Cape Cod Inc.). La flagelline (2,5 µg dans 30 µl de PBS) a été administrée par voie i.n. sous anesthésie légère par inhalation d'isoflurane (Axience, Pantin, France). Les souris ont été traitées par voie intragastrique (i.g.) avec de l'AMX [5 µg - 1 mg d'amoxicilline sodique (Clamoxyl, GlaxoSmithKline) dans 200 µl d'eau]. Les animaux contrôle (mock) ont reçu du PBS par voie i.n. et/ou de l'eau par voie i.g. Les traitements ont toujours suivi 12 h après l'infection pneumococcique.

Modélisation mathématique

Le modèle a été adapté à partir d'une étude théorique antérieure [27] et décrit l'interaction entre les bactéries sensibles aux antibiotiques B_s, les bactéries résistantes aux antibiotiques B_r, les défenses immunitaires inductibles de l'hôte I et le traitement antibiotique. La structure complète et les hypothèses du modèle sont détaillées dans **Matériel supplémentaire - Supplément 1**. En bref, la dynamique de l'infection dans le poumon a été capturée par les équations différentielles 1-3 :

$$\frac{dB_s}{dt} = rB_s\left(1-\frac{B}{C}\right) - dIB_s - \delta\frac{B_s}{1+hB} - A_m B_s \eta(t), \quad (1)$$

$$\frac{dB_r}{dt} = r(1-c)B_r\left(1-\frac{B}{C}\right) - dIB_r - \delta\frac{B_r}{1+hB} - sA_m B_r \eta(t) \quad (2)$$

$$\frac{dI}{dt} = \sigma I\frac{B}{B+k}, \quad (3)$$

où *B* est la charge bactérienne totale (somme de B_s et B_r) et $\eta(t)$ est une fonction en escalier comprise entre 0 et 1, représentant la fenêtre temporelle du traitement entre le début et la fin de l'antibiothérapie. Lorsque la flagelline a été administrée en complément de l'antibiotique, le taux de clairance induit par l'immunité a été modifié comme décrit dans l'équation 4 :

$$d_{flagellin} = d(1+f\,\eta(t)) \quad (4)$$

Le tableau 1 présente la définition des paramètres et les valeurs associées. Les paramètres du modèle ont été établis en combinant des considérations théoriques (comme indiqué dans [27]), des connaissances tirées des expériences décrites et des estimations détaillées dans le **Supplément 1**, où les équations sont ajustées aux expériences. Les données expérimentales utilisées pour l'ajustement du modèle comprennent la dynamique des populations bactériennes en réponse à l'infection et i) à l'absence de traitement (contrôle), ii) au traitement AMX (150 µg/animal) et iii) au traitement combiné AMX+flagelline. Les données ajustées se composent de 22 points représentant les moyennes géométriques sur plusieurs individus. Les paramètres liés à la dynamique de l'infection sont partagés entre les traitements (**Tableau 1**). Le paramètre (A_m) associé à l'effet de l'antibiotique a été considéré comme égal pour les scénarios de traitement AMX et AMX+flagelline, tandis que le facteur f qui décrit l'effet immunomodulateur de la flagelline n'a été inclus que dans le traitement AMX+flagelline. Le modèle a supposé que la stimulation de l'immunité et la clairance associée sont similaires pour les bactéries sensibles ou résistantes aux antibiotiques, tandis que la clairance médiée par l'antibiotique a été définie comme plus élevée pour les bactéries sensibles aux antibiotiques que pour les bactéries résistantes aux antibiotiques. Les conditions initiales ont été affinées en fonction de l'inoculum, en tenant compte de la charge bactérienne totale et des densités relatives de B_s et B_r. Une optimisation non linéaire par moindres carrés a été réalisée dans MATLAB (The MathWorks Inc., 2022, version 9.13.0 (R2022b), Natick, Massachusetts) afin de trouver les valeurs de paramètres les mieux adaptées à l'ensemble de données actuel, qui minimisent la somme des erreurs quadratiques (SSE). Des processus d'ajustement itératifs ont été menés pour déterminer des intervalles de confiance et établir une plage d'incertitude pour nos prédictions.

Tableau 1. Paramètres du modèle relatifs à l'infection et au traitement.

Paramètre	Interprétation	Unité	Valeur
C	Charge bactérienne maximale dans l'hôte	UFC/poumons	10^8
k	Constante de demi-saturation pour la stimulation immunitaire	UFC/poumons	$10^{7.5}$
d	Taux de clairance induite par l'immunité	$h^{-1}(UFC/poumons)^{-1}$	$10^{-6.5}$
δ	Taux de clairance constant médiée par l'immunité	h^{-1}	0.72
h	Paramètre d'échelle pour la réponse immunitaire constante	$(UFC/poumons)^{-1}$	0.0005
σ	Taux d'activation d l'immunité inductible	h^{-1}	0.1
r	Taux de croissance des bactéries sensibles	h^{-1}	Ajusté : 0.33
c	Fitness cost des bactéries résistantes	constante $\in [0,1]$	Ajusté : 0.06
s	Facteur de sensibilité aux antibiotiques des bactéries résistantes	constante $\in [0,1]$	Ajusté : 0.09
Am	Taux d'élimination maximal de l'antibiotique	h^{-1}	Ajusté : 1.18
f	Facteur d'immunomodulation de la flagelline	constante	Ajusté : 20.1

Analyse statistique

Les résultats ont été représentés sous forme de moyennes géométriques. Les différences entre les groupes ont été analysées à l'aide du test de Mann-Whitney, du test ANOVA unidirectionnel de Kruskal-Wallis et de l'ANOVA bidirectionnelle avec post-test LSD de Fisher non corrigé. Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel Prism (GraphPad Prism version 10.1.0, La Jolla, CA). La signification statistique a été fixée à $p < 0,05$.

Résultats

L'administration respiratoire de flagelline associé à de l'amoxicilline augmente l'efficacité du traitement de la pneumonie causée par des souches de *S. pneumoniae* sensibles et résistantes à l'amoxicilline

Pour déterminer l'impact du traitement combiné amoxicilline et flagelline sur la sélection de la résistance aux antibiotiques au cours de la pneumonie, des modèles de coinfection ont été développés à l'aide d'une population bactérienne mixte combinant une souche de *S. pneumoniae* sensible à l'AMX (AMX^S, CMI=0,016 µg/ml) et une résistante à l'AMX (AMX^R, CMI=2 µg/ml) (**Figure 1A**). Le modèle de coinfection a été établi sur des souris sensibilisées au virus de la grippe par une infection i.n. 7 jours avant l'inoculation pneumococcique, i.e., une surinfection. Après co-infection avec les souches pneumococciques AMX^S et AMX^R dans un ratio de 1:1, les souris ont été traitées 12 heures plus tard par une administration i.g. unique d'AMX ou par une combinaison d'AMX et de l'administration i.n. unique de flagelline. Deux doses d'AMX ont été utilisées : 5µ g (0,2 mg/Kg) et 1 mg (40 mg/Kg), une dose 200 fois plus élevée. Sur la base de données pharmacocinétiques antérieures [34], les concentrations sériques d'AMX devaient atteindre 0,05 µg/ml pour la dose de 5µg, correspondant à 3× la CMI de la souche AMX^S, et 10 µg/ml pour la dose de 1 mg, correspondant à 5× la CMI de la souche AMX^R. Les numérations bactériennes pulmonaires ont été déterminées 12 heures après le traitement (**Figure 1B-C**). Il est important de noter que les deux souches avaient un fitness similaire dans le groupe contrôle. En traitant ave 5 µg d'AMX seul, le nombre de bactéries de la souche AMX^S était 6 fois inférieur à celui du groupe contrôle, tandis que le nombre de bactéries AMX^R n'était pas modifié. Lorsque la flagelline a été administrée avec l'AMX, le nombre de bactéries a été plus faible pour les souches AMX^S et AMX^R que dans le groupe contrôle (4000 et 10 fois, respectivement). L'administration de 1 mg d'AMX a permis d'éliminer complètement la population d'AMX^S, tandis que le nombre de bactéries AMX^R a été divisé par 5 par rapport au groupe contrôle et presque éliminé par l'ajout de flagelline. Il est intéressant de noter que la quantité de bactéries AMX^R chez les animaux traités avec 5 µg d'AMX et de flagelline ou avec 1 mg d'AMX seul était très similaire, ce qui démontre que la combinaison de flagelline et d'AMX est tout aussi efficace que l'AMX utilisé à une dose 200 fois plus élevée. En conclusion, l'immunothérapie combinant flagelline et antibiotiques apporte une valeur ajoutée quel que soit le profil de résistance aux antibiotiques, peut réduire le régime

antibiotique et, par conséquent, diminuer la sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques.

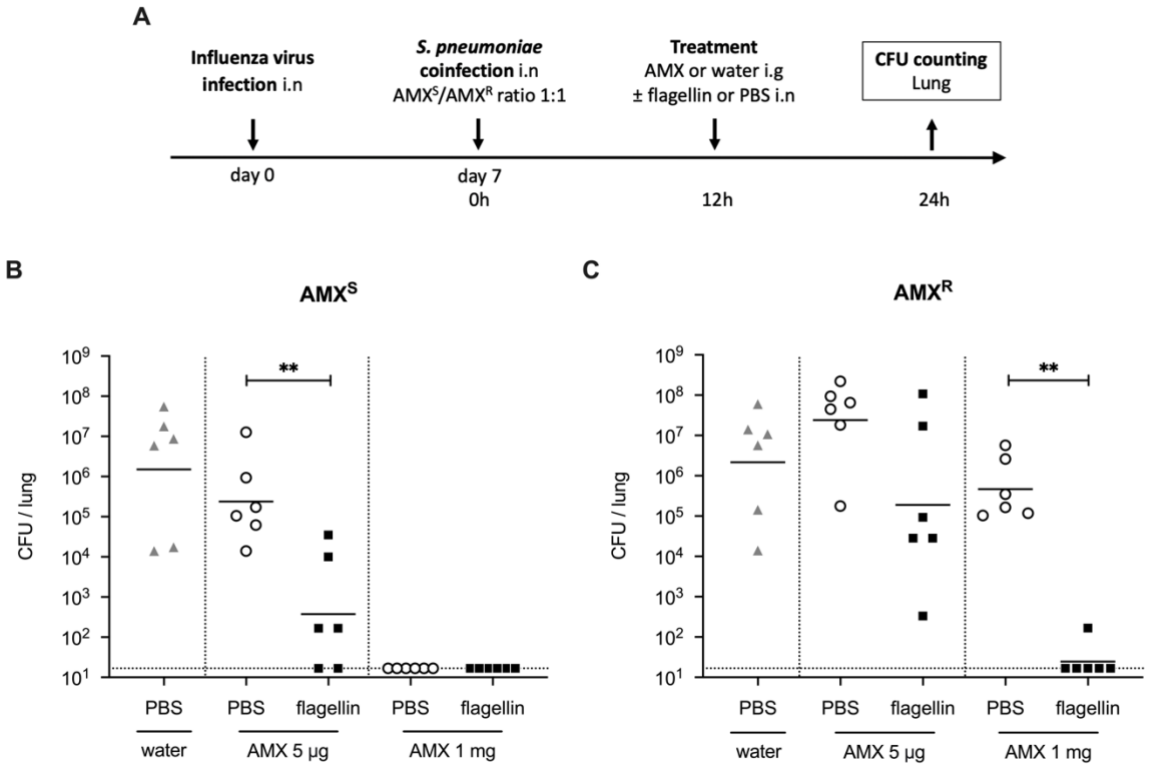


Figure 1. Efficacité de la flagelline combinée à l'amoxicilline dans un modèle de co-infection de souris avec des pneumocoques sensibles et résistants à l'amoxicilline. (A) Des souris C57BL/6 (n=6 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par le virus H3N2, suivi 7 jours plus tard par l'inoculation i.n. de 2,5× 10^4 *S. pneumoniae* AMX^S et 2,5× 10^4 AMX^R (ratio 1:1). Les animaux ont été traités 12 heures plus tard par administration i.g. d'AMX (5µ g ou 1 mg) ou d'eau pour le groupe contrôle, et par administration i.n. de flagelline (2,5µ g) ou de PBS. Les poumons ont été prélevés 12 heures après le traitement et des comptages bactériens ont été effectués pour la souche AMX^S **(B)** et AMX^R **(C).** Chaque symbole représente un animal individuel, les valeurs de la moyenne géométrique et la limite inférieure de détection sont indiquées par des lignes pleines et pointillées, respectivement. Les données des souris traitées au PBS et des souris traitées à la flagelline ont été comparées par le test de Mann-Whitney : (**p<0,01).

Le traitement antibiotique induit la sélection de *S. pneumoniae* résistants à l'amoxicilline

Nous avons ensuite étudié l'effet de la thérapie combinée sur la sélection de la résistance aux antibiotiques. À cette fin, nous avons mis en place un modèle de coinfection qui reproduit la manière dont les souches résistantes aux antibiotiques peuvent être sélectionnées *in vivo*

(**Supplément 2 - Figure 1**). Des souris ont été surinfectées avec un ratio de 1000:1 de *S. pneumoniae* AMX^S et AMX^R (**Figure 2A**). Un retard de croissance de 3 logs a été observé pour la souche AMX^R en l'absence de traitement (**Figure 2B**) par rapport au traitement AMX (**Figure 2C**). Bien que la quantité de bactéries AMX^S soit significativement plus élevée que la quantité de bactéries AMX^R dans le groupe contrôle, une seule administration d'AMX a suffi à promouvoir la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques, qui ont acquis un avantage compétitif par rapport à la population sensible après le traitement. Cinq traitements ont été nécessaires pour éliminer complètement les bactéries AMX^S et augmenter de manière significative la population AMX^R. Ce schéma a persisté pendant 24 heures après le dernier traitement, ce qui signifie que seuls quelques jours de traitement antibiotique ont suffi pour sélectionner durablement des bactéries résistantes aux antibiotiques. En conclusion, ce travail a permis d'établir un modèle qui reproduit la sélection de la résistance au cours d'une antibiothérapie.

Le traitement par immunothérapie retarde et réduit la sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques

Nous avons ensuite évalué l'efficacité de l'immunothérapie combinant la flagelline et l'amoxicilline dans la prévention de la sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques. Deux administrations consécutives d'AMX seul ont suffi pour sélectionner de manière significative la croissance de la souche résistante et atteindre la charge pulmonaire maximale tout en réduisant le nombre de bactéries AMX^S (**Figure 3A)**. 24 heures après l'infection, l'ajout de flagelline à l'AMX a annulé la sélection des bactéries AMX^R et les a presque entièrement éliminé en plus d'avoir fortement réduit (de 3 log) le nombre total de bactéries dans les poumons par rapport au traitement par l'AMX seul (**Figure 3B**). Les bactéries résistantes qui n'ont pas été éliminées 12 heures après le traitement se sont multipliées jusqu'à 10^4-10^5 UFC/poumon, mais à une charge nettement inférieure à celle du traitement par AMX seul (~10^8 UFC/poumon) (**Supplément 2 - Tableau 1**), alors que les bactéries sensibles aux antibiotiques ont été totalement éliminées. Ces données montrent que l'immunothérapie combinant flagelline et amoxicilline non seulement retarde mais aussi réduit la sélection de la résistance. Cependant, certaines souris ont mal répondu au traitement combiné, avec des bactéries résistantes atteignant 10^8 UFC/poumon, conduisant à la mort (33% de non-répondeurs). Malgré ces non-répondeurs, la combinaison de l'AMX et de la flagelline a montré une meilleure efficacité

thérapeutique que l'antibiothérapie seule et a inhibé la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques *in vivo*.

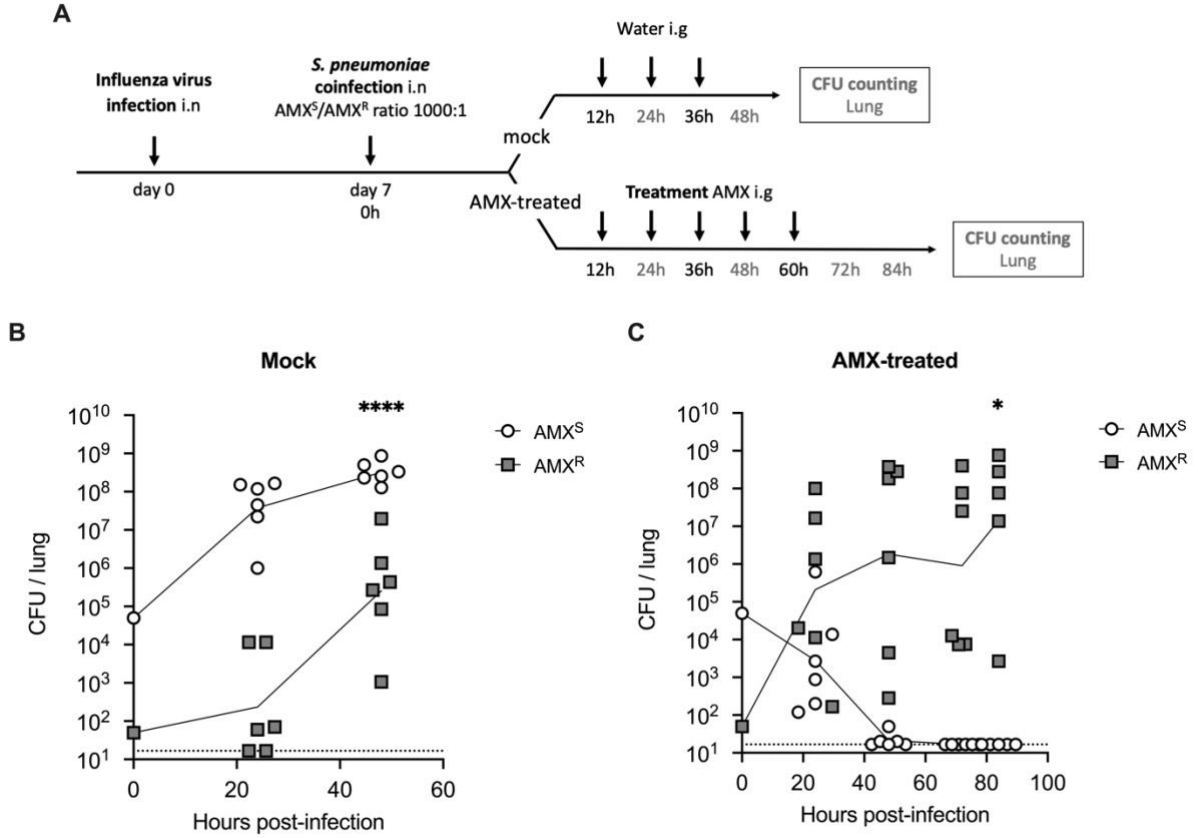


Figure 2. Sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques chez la souris pendant le traitement antibiotique. (A) Des souris C57BL/6 (n=6 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par le virus H3N2, suivi 7 jours plus tard par l'inoculation i.n. de 5× 10^4 *S. pneumoniae* AMX^S et 50 AMX^R (ratio 1000:1). Les animaux ont été traités toutes les 12 heures par administration i.g. d'AMX (50 µg) ou ont reçu de l'eau pour le groupe contrôle. Les poumons ont été prélevés à 24 h, 48 h, 72 h et 84 h après l'infection et des numérations bactériennes ont été effectuées sur les souris du groupe contrôle **(B)** ou traitées à l'AMX **(C).** Chaque symbole représente un animal individuel. Les moyennes géométriques et la limite inférieure de détection sont indiquées par des lignes pleines et pointillées, respectivement. Un test ANOVA à deux facteurs a été appliqué pour comparer les souches, les temps et les traitements : (*p<0,05 ; ****p<0,0001).

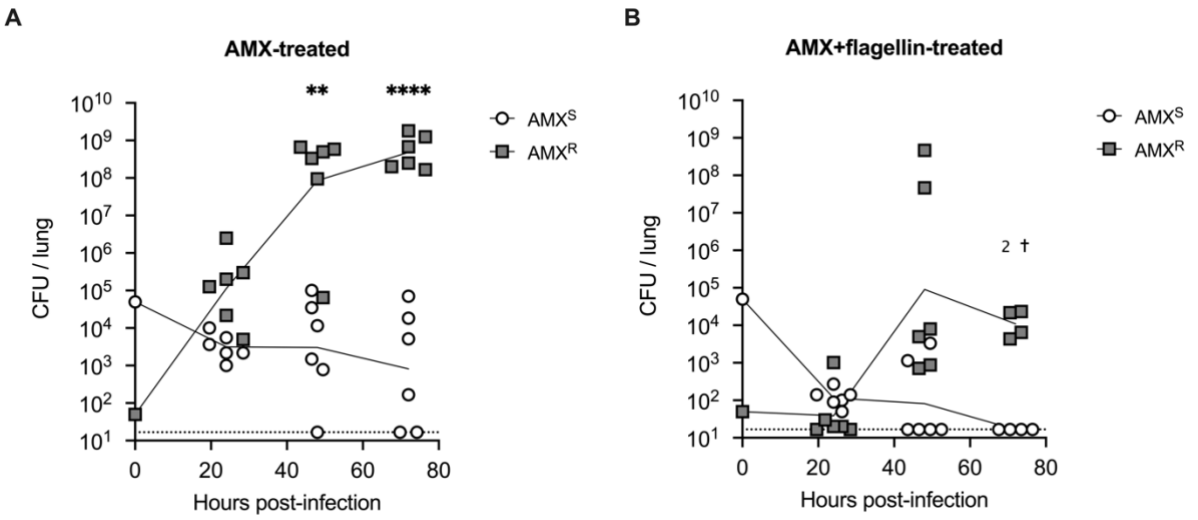


Figure 3. Réduction de la sélection de la résistance aux antibiotiques grâce à l'immunothérapie combinant flagelline et amoxicilline. Des souris C57BL/6 (n=6 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par le virus H3N2 suivi 7 jours plus tard par l'inoculation i.n. de 5× 10^4 *S. pneumoniae* AMX^S et 50 AMX^R (ratio 1000:1). Les animaux ont été traités 12 heures plus tard par un traitement combiné : administration i.g. d'AMX (150 µg) et administration i.n. de flagelline (2,5 µg) ou de PBS, suivie d'une seconde administration d'AMX à 24 h. Les poumons ont été prélevés à 24 h, 48 h et 72 h après l'infection et les numérations bactériennes des souris traitées par AMX **(A)** ou par AMX+flagelline **(B)** ont été réalisées. Chaque symbole représente un animal individuel. Les moyennes géométriques et la limite inférieure de détection sont indiquées par des lignes pleines et pointillées, respectivement. Les croix représentent les souris qui sont mortes au cours de l'expérience en raison de la sévérité de l'infection. Les résultats d'une expérience représentative de deux sont présentés. Un test ANOVA à deux facteurs a été appliqué pour comparer les souches, les temps et les traitements : (**p<0,01 ; ****p<0,0001).

Modélisation de l'effet de la thérapie combinée sur la sélection de la résistance

Pour mieux caractériser l'effet des traitements, nous avons développé un modèle mathématique qui caractérise l'infection bactérienne comme suit : l'agent pathogène se développe, stimule l'immunité de l'hôte et est finalement contrôlé par les réponses immunitaires comme décrit précédemment [27] (**Supplément 1 - Figure 1**). En outre, le modèle considère que l'infection est initiée par un mélange de bactéries sensibles aux antibiotiques (B_s), qui se développent exponentiellement à un taux *r*, et de bactéries résistantes aux antibiotiques (B_r), qui ont un fitness cost associé à la résistance *c*, les deux populations subissant une limitation dépendante de la densité via une charge bactérienne pulmonaire maximale *C* (**équations 1-3** et **Tableau 1**). En faisant varier cinq paramètres, différentes valeurs ont été testées par optimisation non linéaire dans MATLAB afin de déterminer la combinaison la mieux adaptée pour les

expériences de traitement combiné et de sélection de la résistance aux antibiotiques (**Figure 4** et **Supplément 1 - Figures 2 et 3**). Le modèle a capturé efficacement la dynamique de la population post-traitement et l'issue thérapeutique, correspondant aux observations en réponse à l'AMX ou à l'AMX+flagelline. Notamment, le modèle a estimé un effet immunomodulateur de la flagelline sur le taux d'élimination des bactéries avec une augmentation d'un facteur 20 (*95 % IC : 19-29*) (**Tableau 1** et **Supplément 1 - Tableau 1**), ce qui correspond à la diminution de 3 logs des UFC/poumon observée dans la **Figure 3**. En outre, le modèle a estimé un faible fitness cost et un faible facteur de sensibilité aux antibiotiques pour les bactéries résistantes (*c=0,06 et s=0,09*), et a prédit que le traitement par AMX seul induit la sélection d'un grand nombre de bactéries AMX^R, en accord avec les données (**Figure 4**). Le modèle a été utilisé pour générer des simulations de trajectoires d'infection et pour obtenir et affiner une plage d'incertitude pour les prédictions du modèle (**Supplément 1 - Figure 3**). Certaines prédictions indiquaient la possibilité d'un rebond des souches sensibles et résistantes aux antibiotiques à des moments ultérieurs (c.-à-d. 84 heures après l'infection), mais ont montré que lorsque la flagelline est administrée de manière combinée avec l'AMX, ce rebond devrait se produire plus tard et à un niveau réduit par rapport à l'AMX seul. En outre, nous avons cherché à affiner le modèle pour améliorer l'erreur d'ajustement SSE en étendant l'effet de l'AMX ainsi que l'effet de la flagelline au-delà de la fenêtre de 24 heures. Ce modèle a permis de réduire l'erreur initiale de 20 %, ce qui suggère que la durée de l'effet thérapeutique est une piste importante à étudier (**Supplément 1 - Figure 4)**. Ainsi, notre modèle mathématique capture la dynamique de la population bactérienne au cours de l'infection pulmonaire et les issues thérapeutiques, soulignant le potentiel du traitement combiné à la flagelline.

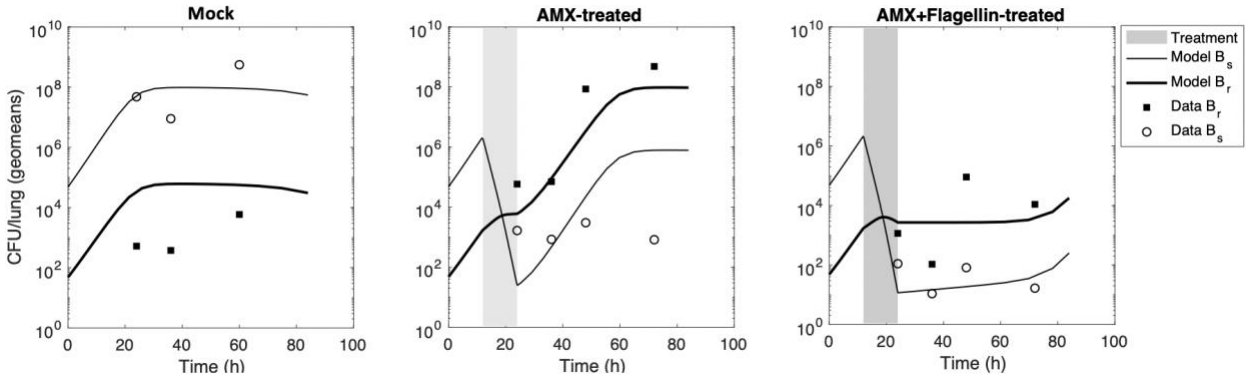


Figure 4. Modélisation de la sélection tardive de la résistance aux antibiotiques à la suite d'un traitement combiné à la flagelline. Un modèle mathématique capturant la dynamique de l'infection a été adapté aux données expérimentales des UFC sur le traitement combiné et la sélection de la résistance, ce qui a permis d'obtenir les estimations des paramètres les mieux ajustés. Les lignes et les symboles représentent, respectivement, les prévisions du modèle le mieux ajusté pour chaque sous-population (SSE=0,37) et les moyennes géométriques expérimentales des UFC. Les régions ombrées indiquent la fenêtre de l'effet du traitement, i.e., de 12 à 24 heures.

Matériel supplémentaire

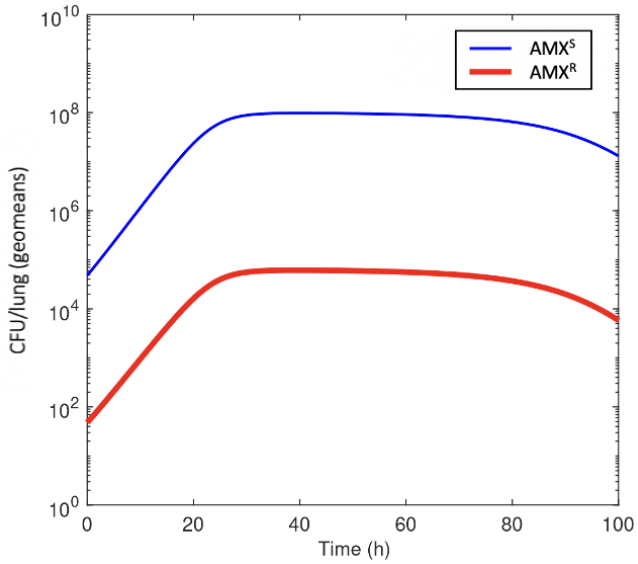
Supplément 1 - Modélisation

Description du modèle mathématique de la dynamique de l'infection

Le modèle (adapté de [27]) est représenté par les équations 1-4 dans la section matériel et méthodes du manuscrit principal. Les paramètres sont décrits dans le **Tableau 1 du manuscrit principal**. Le modèle définit deux modes principaux de contrôle des bactéries médié par l'immunité pendant l'infection : i) une réponse immunitaire préexistante, efficace à un nombre faible de pathogènes et présumée constante (troisième terme négatif dans les **équations 1-2 du manuscrit principal**) ; et ii) une réponse immunitaire inductible I qui présente une cinétique liée à l'infection et est déclenchée à des charges de pathogènes plus élevées (deuxième terme négatif dans les **équations 1-2 du manuscrit principal**). Les mécanismes immunitaires préexistants et inductibles exercent tous deux une rétroaction négative sur l'infection, bien qu'ils opèrent dans une dynamique différente. Pour la réponse immunitaire préexistante, une hypothèse fondamentale est que le taux d'élimination des agents pathogènes diminue avec le nombre total d'agents pathogènes $B=B_s+B_r$. Le taux d'élimination constant médié par l'immunité, désigné par δ, se produit par unité de bactérie et par unité de réponse préexistante, en particulier lorsque le nombre d'agents pathogènes est très faible. En ce qui concerne la réponse immunitaire inductible I (définie par l'**équation 3 dans le manuscrit principal**), la densité bactérienne à laquelle cette réponse croît à la moitié de son taux maximal est donnée par le paramètre k (constante de demi-saturation pour la stimulation immunitaire), qui a une valeur intermédiaire inférieure à la charge bactérienne pulmonaire maximale C. Au fur et à mesure que la densité bactérienne augmente, l'immunité inductible augmente à partir du niveau initial I_0 à un taux σ jusqu'à ce qu'elle atteigne des niveaux suffisants pour déclencher la clairance de l'infection. La destruction des bactéries par l'immunité inductible est supposée se produire à un rythme proportionnel à l'ampleur de la réponse immunitaire, caractérisée par un taux de destruction constant, d, égal pour les bactéries sensibles et résistantes aux antibiotiques. Enfin, le modèle tient compte de deux effets du traitement : i) le taux d'élimination médié par l'immunité inductible modifié par la flagelline, qui devient $_{dflagellin}$ (**équation 4 du manuscrit principal**) et ii) le taux d'élimination des bactéries médié par l'antibiotique (A_m), en supposant une sensibilité partielle aux antibiotiques de la souche résistante (facteur d'échelle s).

Les résultats biologiques prédits par le modèle en l'absence de traitement englobent différents scénarios : à un faible inoculum, l'infection est évitée car les bactéries sont efficacement contrôlées par l'immunité préexistante. Pour un inoculum plus élevé, l'infection peut être évitée si la réponse initiale I_0 est suffisamment forte. Dans les cas où I_0 n'est pas assez forte et où $k<C$ est généralement atteint, une infection aiguë est probable. La persistance de l'infection devient plausible lorsque $I \approx 0$ ou si $k>C$, les bactéries sensibles et résistantes aux antibiotiques présentant une croissance jusqu'à la charge bactérienne pulmonaire maximale C où B_s et une minorité de B_r peuvent coexister.

En raison du nombre limité de données, nous nous sommes concentrés sur cinq paramètres principaux : le taux de croissance des bactéries sensibles (r), le coût d'adaptation relatif des bactéries résistantes (c), le facteur de sensibilité relatif aux antibiotiques des bactéries résistantes (s), le taux d'élimination des antibiotiques (A_m) et le facteur d'immunomodulation de la flagelline (f). Les paramètres de base ont été fixés dans toutes les conditions expérimentales et la réponse immunitaire initiale a été définie comme très faible, loin du seuil nécessaire pour initier le déclin bactérien $I_0 = 0{,}005 \times r/d$ (beaucoup plus petit que r/d), avec un inoculum $B_0 = 5 \times 10^4$ UFC contenant 99,9 % de bactéries sensibles aux antibiotiques.
Supplément 1 - Figure 1 illustre la dynamique des populations sans traitement.



Supplément 1 - Figure 1. Illustration de la dynamique des populations en l'absence de traitement issue du modèle. Les paramètres utilisés sont $r=0{,}33$, $c=0{,}06$, et le niveau initial d'immunité I_0 est fixé à $0{,}005 \times r/d$ - une valeur nettement inférieure au seuil nécessaire pour amorcer un déclin de la population bactérienne. Les lignes représentent les prévisions du modèle.

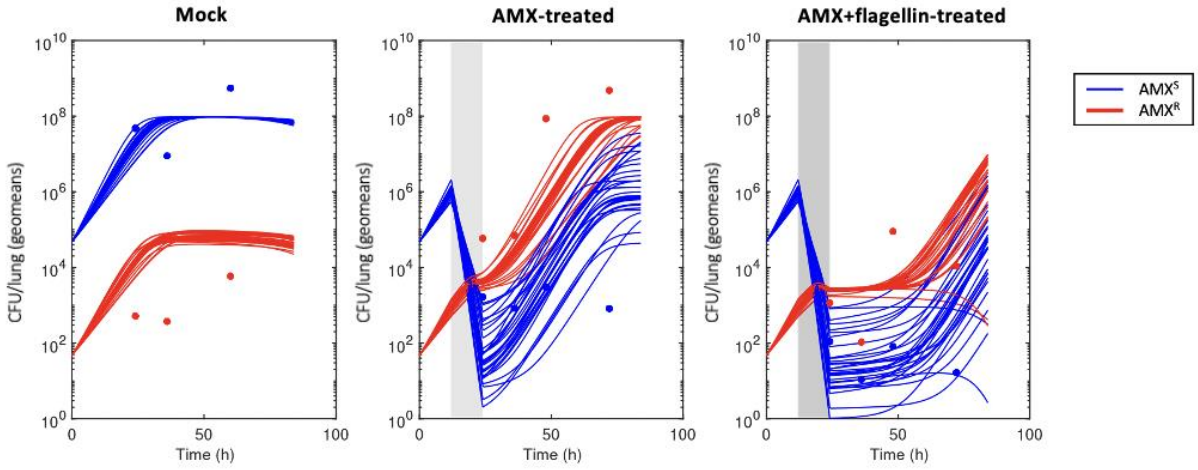
Procédure d'estimation des paramètres

Nous avons défini l'erreur entre les moyennes géométriques (UFC/poumon) dans les données expérimentales et les variables du modèle, comme la somme des erreurs quadratiques (SSE) comme suit :

$$SSE = \sum_{i=1}^{n_1}[\log(d^i) - log(m^i)]^2 + \sum_{i=1}^{n_2}[\log(d^i) - log(m^i)]^2 + \sum_{i=1}^{n_3}[\log(d^i) - log(m^i)]^2$$

où $d=(B_s,B_r)$ désigne ici les données, et $m=(B_s, B_r)$ désigne les prédictions du modèle, et n_i désigne le nombre de timepoints (moyennes géométriques) analysés dans chaque expérience. Dans la pratique, le vecteur d'erreur a été mis à l'échelle par le nombre de points ($n=n_1+n_2+n_3=22$ d'après la **Figure 3** et le **Supplément 2 - Figure 2**), ce qui a effectivement conduit à une SSE mise à l'échelle par n^2. Les prédictions du modèle ont été dérivées de simulations englobant trois scénarios : pas de traitement (contrôle), traitement antibiotique seul (AMX), et traitement combiné comprenant l'antibiotique et la flagelline (AMX+flagelline). Les solutions à des temps précis ont été extraites pour l'analyse.

Les estimations des paramètres ont été obtenues en appliquant à la fonction d'erreur une routine d'optimisation non linéaire des moindres carrés dans MATLAB (*lsqnonlin*, avec l'algorithme "trust-region-reflective"). Pour établir une plage d'incertitude autour de nos estimations de paramètres, nous avons utilisé une approche de simulation, en reconnaissant que la routine d'optimisation non linéaire fournit un minimum local en tant qu'estimation d'un point singulier. En partant de différentes estimations initiales, toujours assez proches de l'estimation ponctuelle la mieux ajustée (*r,c,s,Am,f* dans le **Tableau 1 du manuscrit principal**), nous avons répété la procédure d'ajustement 500 fois (voir **Supplément 1 - Figure 2**), en acceptant également des ajustements de moindre qualité (fourchette d'erreur plus large). Les autres paramètres ont été fixés comme dans le **Tableau 1 du manuscrit principal**.

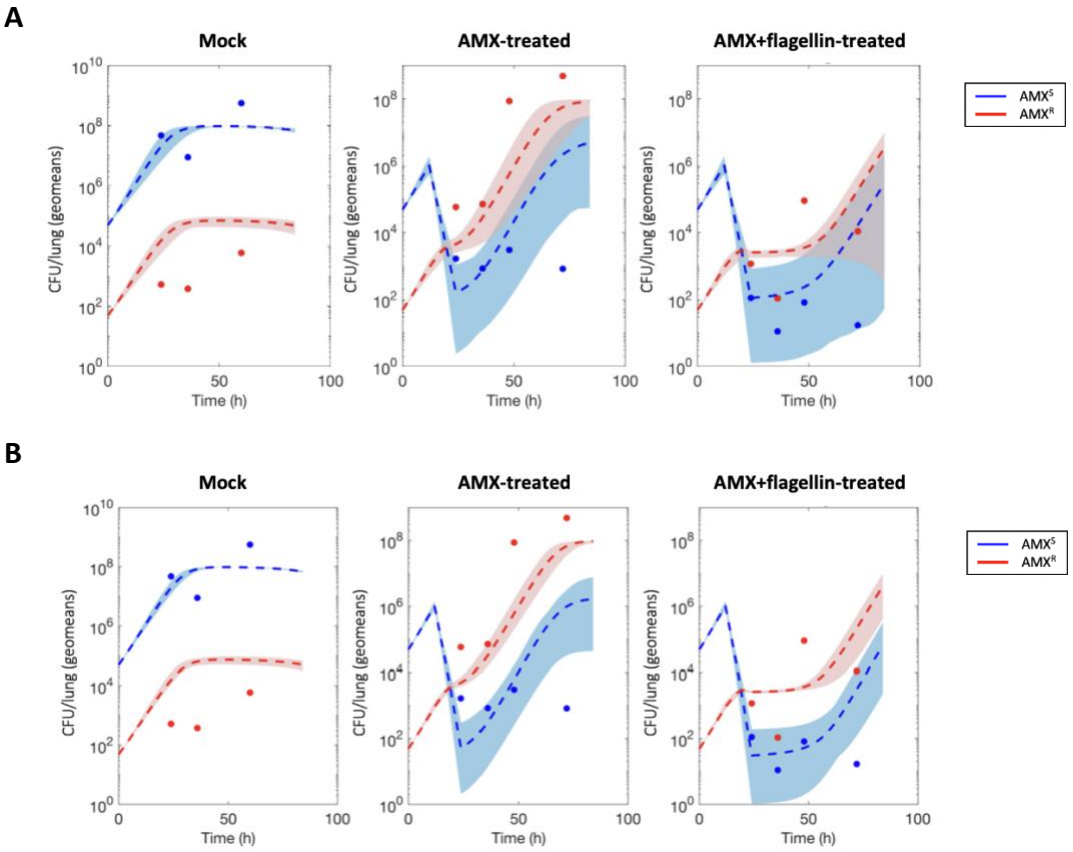


Supplément 1 - Figure 2. Visualisation des dynamiques d'infection et de traitement prédites par le modèle. Les moyennes géométriques expérimentales des UFC sont représentées par les symboles, et chaque ligne correspond à une trajectoire possible dans l'intervalle de l'erreur SSE acceptée, ici [0,38,0,85]. Les régions ombrées représentent la fenêtre de l'effet du traitement.

En filtrant davantage les ajustements du modèle qui préservaient certains critères tels que : i) $B_r > B_s$ dans les scénarios de traitement AMX et AMX+flagelline au dernier timepoint, comme le suggèrent les données, et ii) B_r dans $[10^2,10^7]$ prédit par le modèle dans le traitement AMX+flagelline, nous avons cherché à identifier des estimations de paramètres qui correspondent mieux aux données tout en maintenant un bon alignement avec les paramètres d'ajustement originaux les plus performants. Cela a donné lieu à des intervalles spécifiques pour les paramètres cibles *r,c,s,Am,f* résumés dans le **Supplément 1 - Tableau 1**. En particulier, ce processus a permis d'obtenir 31 ajustements de paramètres distincts pour la plus grande tolérance d'erreur, et 16 combinaisons de paramètres dans la plus petite tolérance d'erreur (les simulations de modèles avec ces paramètres sont illustrées dans le **Supplément 1 - Figure 3**).

Supplément 1 - Tableau 1. Valeurs estimées des paramètres dérivées des ajustements répétés du modèle aux données sur l'infection et le traitement.

Paramètres	**Résultats de l'estimation** Interprétation	**Erreur plus importante** Moyenne [IC 95 %]	**Erreur plus faible** Moyenne [IC 95 %]
r	Taux de croissance des bactéries sensibles	0.27 [0.21,0.32]	0.26 [0.24,0.29]
c	Fitness cost des bactéries résistantes	0.04 [0.006,0.11]	0.04 [0.0038,0.084]
s	Facteur de sensibilité aux antibiotiques des bactéries résistantes	0.05 [0.0015,0.087]	0.02 [0.0012,0.09]
A_m	Taux d'élimination maximal de l'antibiotique (dose de 150 µg/ml)	1.12 [0.68,1.22]	1.05 [0.83,1.23]
f	Facteur d'immunomodulation de la flagelline	19.93 [4.0,27.7]	20.5 [18.66,28.9]
Qualité de l'ajustement	SSE (somme des erreurs quadratiques)	0.55 [0.38,0.85]	0.46 [0.38,0.55]

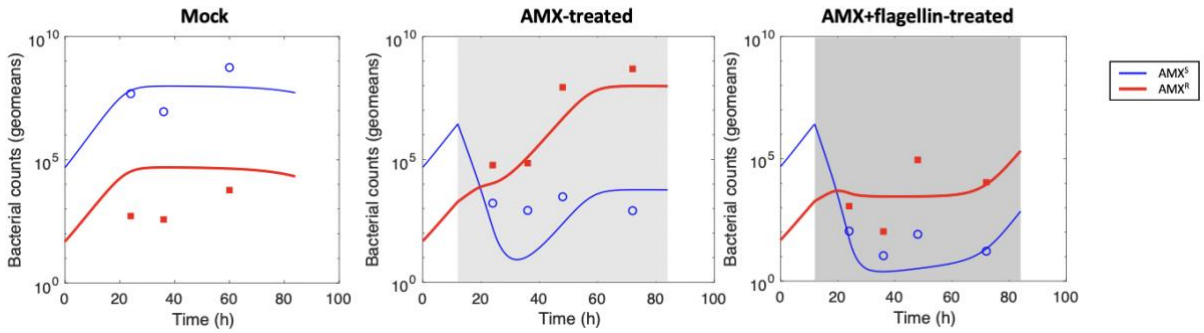


Supplément 1 - Figure 3. Gamme des prédictions du modèle avec une tolérance d'erreur grande ou petite et des variations dans les combinaisons de paramètres. Le modèle a été utilisé pour générer des prédictions pour la gamme possible des effets du traitement, où d'autres trajectoires d'infection plausibles avec des valeurs de paramètres similaires conduisant à des erreurs de qualité d'ajustement légèrement plus grandes (SSE 0,55 [0,38,0,85]) (**A**) ou plus petites (SSE 0,46 [0,38,0,55]) (**B)** sont représentées. Les régions ombrées et les symboles représentent respectivement les simulations du modèle (95% IC) et les moyennes géométriques expérimentales des UFC. Les lignes en pointillé représentent les moyennes des simulations.

Affiner le modèle

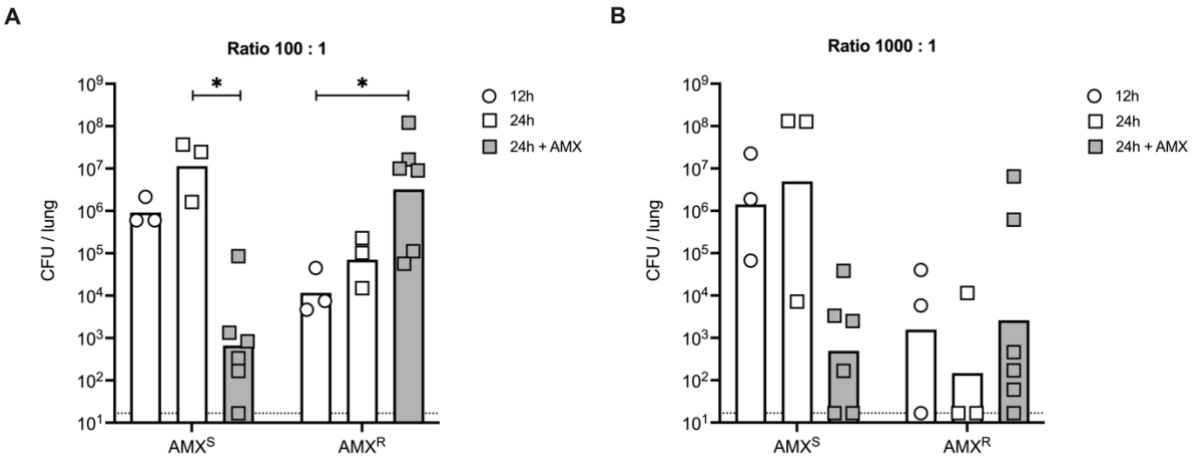
Certains aspects du modèle pourraient être détaillés davantage. L'un d'entre eux est la possibilité que l'effet des antibiotiques et de la flagelline s'étende au-delà de la fenêtre temporelle de 12 h - 24 h. Si cela est autorisé, la qualité de l'ajustement du modèle s'améliore légèrement. À cette fin, des tests numériques ont été réalisés avec les paramètres les mieux ajustés pour r, c, s, A_m et f, estimés respectivement à 0.35, 0.09, 0.10, 1.10 et 24.45, et en supposant un effet continu mais décroissant de l'antibiotique et de la flagelline (taux de décroissance de 0.15 et 0.30 par heure pour l'antibiotique et la flagelline respectivement) après 24 h. Nous avons constaté que cela améliorait la qualité du modèle. Nous constatons que cela

améliore la qualité de l'ajustement du modèle (SSE=0,29), en particulier en ce qui concerne le faible nombre de bactéries sensibles après le traitement antibiotique, tandis que l'effet immunomodulateur de la flagelline sur le taux d'élimination des bactéries avec une augmentation d'un facteur 20 persiste (**Supplément 1 - Figure 4**). Cette analyse montre qu'il est possible d'affiner le modèle pour capturer plus finement les dynamiques observées expérimentalement.



Supplément 1 - Figure 4. Ajustement du modèle pour une activité thérapeutique prolongée de l'amoxicilline et de la flagelline. La durée de l'activité thérapeutique a été prolongée au-delà de 24 heures, en supposant un taux de décroissance de 0,15 par heure et de 0,30 par heure pour l'AMX et la flagelline respectivement. Les régions ombrées représentent la fenêtre supposée de l'effet du traitement (12-84 heures, où une décroissance exponentielle commence après 24 heures). Les lignes et les symboles représentent respectivement la prédiction du modèle et les moyennes géométriques expérimentales des UFC.

Supplément 2 - Données expérimentales sur le traitement des animaux co-infectés

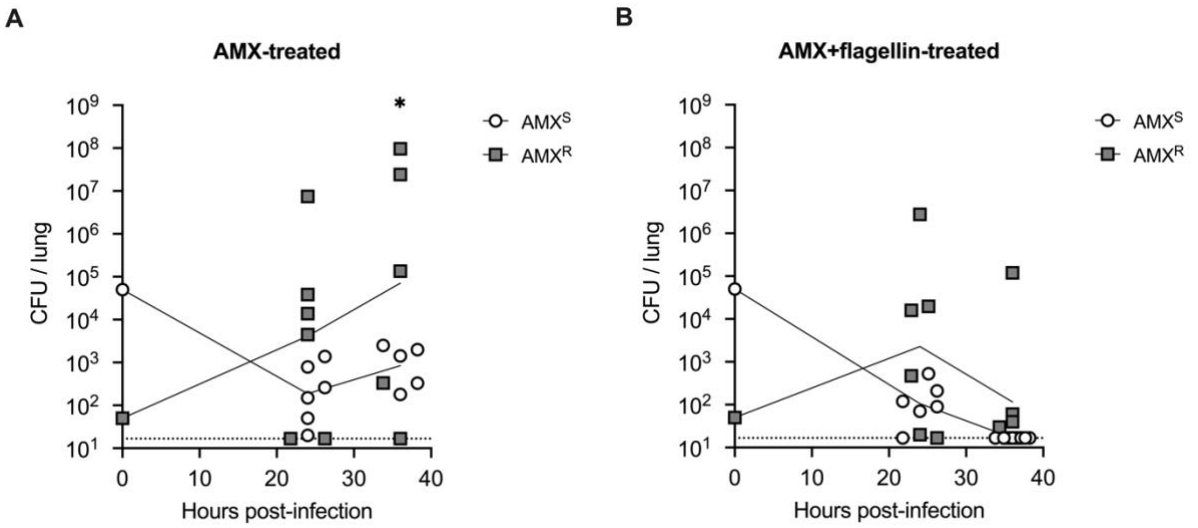


Supplément 2 - Figure 1. Modèle de sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques par traitement antibiotique chez la souris. Des souris C57BL/6 (n=3-6 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par le virus H3N2 suivi 7 jours plus tard par l'inoculation i.n. de *S. pneumoniae* AMX^S et AMX^R à un ratio de 100:1 ($4{,}95\times 10^4$ AMX^S et 500 AMX^R**) (A)** ou 1000:1 (5×10^4 AMX^S et 50 AMX^R**) (B)**. Les animaux ont été traités 12 heures plus tard par administration i.g. d'amoxicilline (50 μg) ou ont de l'eau pour le groupe contrôle. Les poumons ont été prélevés 12 h et 24 h après l'infection et des numérations bactériennes ont été effectuées. Les symboles représentent des animaux individuels, les barres représentent les moyennes géométriques et la limite inférieure de détection est indiquée par des lignes pointillées. Les données ont été comparées par le test de Kruskal-Wallis : (*$p<0{,}05$).

Supplément 2 - Tableau 1. Analyse statistique de l'effet des traitements sur la sélection de la résistance aux antibiotiques

		p-value		
Comparaison des traitements	**Population bactérienne analysée**	24 heures après l'infection	48 h après l'infection	72 h après l'infection
AMX *vs* AMX+flagelline	AMX^S	>0.9999	0.9999	>0.9999
	AMX^R	0.9968	0.0356	<0.0001

* Les données des souris traitées à l'AMX et à l'AMX+flagelline ont été comparées pour chaque population bactérienne (AMX^S et AMX^R) au cours du temps (24 h, 48 h et 72 h après l'infection) à l'aide d'un test ANOVA à deux facteurs avec post-test LSD de Fisher non corrigé.



Supplément 2 - Figure 2. Réduction de la sélection de la résistance aux antibiotiques grâce à l'immunothérapie combinant amoxicilline et flagelline. Des souris C57BL/6 (n=6 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par le virus H3N2 suivi 7 jours plus tard par l'inoculation i.n. de 5×10^4 *S. pneumoniae* AMX^S et 50 AMX^R (ratio 1000:1). Les animaux ont été traités 12 heures plus tard par administration i.g. d'AMX (150 μg) et administration i.n. de flagelline (2,5 μg) ou de PBS, suivie d'une seconde administration d'AMX à 24 h. Les poumons ont été prélevés 24 h et 36 h après l'infection et les numérations bactériennes des souris traitées par AMX **(A)** ou par AMX+flagelline **(B)** ont été effectuées. Les symboles représentent des animaux individuels, les moyennes géométriques et la limite inférieure de détection sont indiquées par des lignes pleines et pointillées, respectivement. Un test ANOVA à deux facteurs avec post-test LSD de Fisher non corrigé a été appliqué pour comparer les souches (bactéries AMX^S et AMX^R), les temps (24 h et 36 h après l'infection) et les traitements (traités par AMX vs traités par AMX+flagelline) : (*$p<0.05$).

Discussion

Cette étude a examiné l'effet de l'administration par voie respiratoire d'un stimulateur de l'immunité innée, la flagelline, en association avec l'AMX, sur l'efficacité du traitement contre les pneumonies à *S. pneumoniae* causées par des infections mixtes avec des souches AMX^S et AMX^R. Les résultats indiquent que l'ajout de flagelline a réduit de manière significative le nombre de bactéries des souches AMX^S et AMX^R par rapport au traitement par AMX seul, soulignant le potentiel de l'immunothérapie dans la lutte contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. Notamment, le traitement combiné amoxicilline et flagelline présente une efficacité similaire à celle de l'antibiotique seul utilisé à une dose 200 fois plus élevée. Un modèle de coinfection a été établi pour imiter la sélection de la résistance aux antibiotiques observée en clinique pendant l'antibiothérapie, révélant que le traitement antibiotique favorisait la sélection et l'expansion des populations bactériennes résistantes. Cependant, le traitement combiné à la flagelline a non seulement retardé mais aussi réduit la sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques. Cela suggère des applications cliniques prometteuses pour la flagelline en raison de sa capacité à réduire la dose d'antibiotiques et à atténuer la pression sélective à l'origine de l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques.

Les boosters ciblant l'immunité innée ont montré leur efficacité contre les souches résistantes aux antibiotiques [17,35-38] mais leur capacité à prévenir l'émergence de la résistance aux antibiotiques reste incertaine. L'étude de l'émergence *de novo* de la résistance par le biais de mutations *in vivo* pose des défis importants, principalement en raison du fitness cost qui y est associé [39]. Ici, un examen *in vivo* de la sélection de la résistance aux antibiotiques a été mené, en se concentrant sur deux souches caractérisées par leur sensibilité et leur résistance aux antibiotiques. Ces souches ont montré des niveaux de fitness comparables après des séries successives de mutations ou l'acquisition d'une résistance par transformation [19,39]. Ce modèle innovant de coinfection pose les bases de futures recherches sur l'efficacité des traitements contre les souches résistantes aux antibiotiques et sur la dynamique de ces bactéries au cours de la pneumonie à pneumocoques. Une étude récente a rapporté l'analyse de la transformation pneumococcique chez la souris [40], soulignant le potentiel d'exploration des effets de la flagelline comme traitement combiné aux antibiotiques sur ce mécanisme, un moteur essentiel de l'émergence.

Comme la modélisation mathématique permet de quantifier, de prédire et d'affiner les traitements, nous avons intégré les données dans un modèle mimant l'hôte [27], qui intègre la coinfection bactérienne avec des bactéries sensibles et résistantes aux antibiotiques, l'immunité naturelle à l'infection, l'induction d'une réponse immunitaire innée par la flagelline et la clairance médiée par les antibiotiques. Le modèle prédit des densités mieux contrôlées de bactéries AMX^S et AMX^R après le traitement combiné avec la flagelline, par un mécanisme d'augmentation de la clairance médiée par l'immunité (facteur *f)*, estimé à un facteur 20 environ, et un rebond possible plus tard dans l'évolution de l'infection. L'administration inappropriée d'antibiotiques est le principal catalyseur du développement de la résistance, précipitant ainsi les échecs thérapeutiques [2,41]. La modélisation mathématique offre un outil précieux pour prédire les résultats du traitement en évaluant divers schémas impliquants à la fois l'AMX et la flagelline. Une seule administration de flagelline s'avère insuffisante pour éliminer l'infection. Porte et al. [16] ont montré que deux à trois traitements consécutifs de flagelline, associés à l'AMX ou au triméthoprime-sulfaméthoxazole, étaient efficaces contre les infections pneumococciques primaires. Toutefois, la question de savoir si l'on peut s'attendre à des résultats similaires dans le contexte de la sélection de clones bactériens résistants au cours de la surinfection nécessite des recherches plus approfondies.

Les mécanismes qui sous-tendent la protection antibactérienne avec un traitement combiné impliquent une combinaison d'effecteurs de l'hôte et d'antibiotiques. L'administration respiratoire de flagelline est connue pour activer les défenses immunitaires innées du poumon dépendant du TLR5 [42-45]. Des études récentes ont démontré la supériorité de l'effet thérapeutique de l'administration combinée d'AMX et d'un agoniste immunomodulateur du récepteur TLR4 au cours d'une infection par *S. pneumoniae* chez la souris, par rapport au traitement par AMX [46,47]. La protection accrue n'était pas seulement associée au renforcement des défenses immunitaires médiées par le récepteur TLR4, mais aussi à la modification de la pharmacocinétique de l'AMX, avec un déclin plus lent de la concentration d'AMX dans le sérum. Cela suggère des interactions potentielles entre la flagelline et la dynamique des antibiotiques. Inversement, les antibiotiques peuvent modifier la dynamique de la réponse immunitaire dépendante du récepteur TLR5. Une intégration complète des paramètres pharmacocinétiques de la flagelline et de l'antibiotique, de la pharmacodynamique et de la dynamique de recrutement des effecteurs immunitaires sera essentielle pour développer des traitements complémentaires.

En conclusion, le potentiel thérapeutique du traitement combiné amoxicilline et flagelline va au-delà de celui du traitement de référence antibiotique, puisqu'il dépasse la valeur cumulée des composants individuels administrés séparément. Cette preuve renforce l'argument en faveur de l'importance de l'étude et de la modélisation des mécanismes responsables de l'efficacité remarquable de la combinaison flagelline-antibiotique.

Références

1. GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. Lancet Infect Dis. **2018** ; 18(11):1191-1210.

2. Ieven M, Coenen S, Loens K, 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(11):1158-1163.

3. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. Lancet. **2009** ; 374(9700):1543-1556.

4. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae* : transmission, colonization and invasion. Nat Rev Microbiol. **2018** ; 16(6):355-367.

5. Yahiaoui RY, den Heijer C, van Bijnen EM, et al. Prevalence and antibiotic resistance of commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine European countries. Future Microbiol. **2016** ; 11:737-744.

6. Kadioglu A, Andrew PW. The innate immune response to pneumococcal lung infection : the untold story. Trends Immunol. **2004** ; 25(3):143-149.

7. von Bernuth H, Picard C, Jin Z, et al. Pyogenic Bacterial Infections in Humans with MyD88 Deficiency. Science. **2008** ; 321(5889):691-696.

8. Yamamoto K, Ahyi AN, Pepper-Cunningham ZA, et al. Roles of lung epithelium in neutrophil recruitment during pneumococcal pneumonia. Am J Respir Cell Mol Biol. **2014** ; 50(2):253-262.

9. Famà A, Midiri A, Mancuso G, et al. Nucleic Acid-Sensing Toll-Like Receptors Play a Dominant Role in Innate Immune Recognition of Pneumococci. mBio. **2020** ; 11(2):e00415-20.

10. Wallis RS, O'Garra A, Sher A, Wack A. Host-directed immunotherapy of viral and bacterial infections : past, present and future. Nat Rev Immunol. **2023** ; 23(2):121-133.

11. Tan ACL, Mifsud EJ, Zeng W, et al. Intranasal administration of the TLR2 agonist Pam2Cys provides rapid protection against influenza in mice. Mol Pharm. **2012** ; 9(9):2710-2718.

12. Fensterheim BA, Young JD, Luan L, et al. The TLR4 Agonist Monophosphoryl Lipid A Drives Broad Resistance to Infection via Dynamic Reprogramming of Macrophage Metabolism. J Immunol. **2018** ; 200(11):3777-3789.

13. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases : Past, present, and future. Int Immunopharmacol. **2018** ; 59:391-412.

14. Vijayan A, Rumbo M, Carnoy C, Sirard JC. Compartmentalized Antimicrobial Defenses in Response to Flagellin. Trends Microbiol. **2018** ; 26(5):423-435.

15. Muñoz N, Van Maele L, Marqués JM, Rial A, Sirard JC, Chabalgoity JA. Mucosal Administration of Flagellin Protects Mice from *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection. Infect Immun. **2010** ; 78(10):4226-4233.

16. Porte R, Fougeron D, Muñoz-Wolf N, 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(10):6064-6072.

17. Matarazzo L, Casilag F, Porte R, et al. Therapeutic Synergy Between Antibiotics and Pulmonary Toll-Like Receptor 5 Stimulation in Antibiotic-Sensitive or -Resistant Pneumonia. Front Immunol. **2019** ; 10:723.

18. Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. **2018** ; 42(1):fux053.

19. Gibson PS, Bexkens E, Zuber S, Cowley LA, Veening JW. The acquisition of clinically relevant amoxicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires ordered horizontal gene transfer of four loci. PLoS Pathog. **2022** ; 18(7):e1010727.

20. Salvadori G, Junges R, Morrison DA, Petersen FC. Competence in *Streptococcus pneumoniae* and Close Commensal Relatives : Mechanisms and Implications. Front Cell Infect Microbiol. **2019** ; 9:94.

21. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet. **2022** ; 399(10325):629-655.

22. Day T, Read AF. Does High-Dose Antimicrobial Chemotherapy Prevent the Evolution of Resistance? PLoS Comput Biol. **2016** ; 12(1):e1004689.

23. Handel A, Margolis E, Levin BR. Exploring the role of the immune response in preventing antibiotic resistance. J Theor Biol. **2009** ; 256(4):655-662.

24. Geli P, Laxminarayan R, Dunne M, Smith DL. "One-size-fits-all ? Optimizing treatment duration for bacterial infections. PLoS One. **2012** ; 7(1):e29838.

25. Gjini E, Brito PH. Integrating Antimicrobial Therapy with Host Immunity to Fight Drug-Resistant Infections: Classical vs. Adaptive Treatment. PLoS Comput Biol. **2016** ; 12(4):e1004857.

26. Ankomah P, Levin BR. Exploring the collaboration between antibiotics and the immune response in the treatment of acute, self-limiting infections. Proc Natl Acad Sci U S A. **2014** ; 111(23):8331-8338.

27. Gjini E, Paupério FFS, Ganusov VV. Treatment timing shifts the benefits of short and long antibiotic treatment over infection. Evol Med Public Health. **2020** ; 2020(1):249-263.

28. Slager J, Aprianto R, Veening JW. Deep genome annotation of the opportunistic human pathogen Streptococcus pneumoniae D39. Nucleic Acids Res. **2018** ; 46(19):9971-9989.

29. Kurushima J, Campo N, van Raaphorst R, Cerckel G, Polard P, Veening JW. Unbiased homeologous recombination during pneumococcal transformation allows for multiple chromosomal integration events. eLife. **2020** ; 9:e58771.

30. Kjos M, Veening JW. Tracking of chromosome dynamics in live Streptococcus pneumoniae reveals that transcription promotes chromosome segregation. Mol Microbiol. **2014** ; 91(6):1088-1105.

31. De Santo C, Arscott R, Booth S, et al. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of Serum Amyloid A-differentiated IL-10-secreting neutrophils. Nat Immunol. **2010** ; 11(11):1039-1046.

32. Paget C, Ivanov S, Fontaine 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(10):5590-5602.

33. Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard JC. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. J Immunol. **2008** ; 181(3):2036-2043.

34. Mondemé M, Zeroual Y, Soulard D, et al. Amoxicillin treatment of pneumococcal pneumonia impacts bone marrow neutrophil maturation and function. J Leukoc Biol. **2023** ; :qiad125.

35. Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG. Bacterial flagellin stimulates TLR5-dependent defense against vancomycin-resistant Enterococcus infection. J Infect Dis. **2010** ; 201(4):534-543.

36. Abt MC, Buffie CG, Sušac B, et al. TLR-7 activation enhances IL-22-mediated colonization resistance against vancomycin-resistant enterococcus. Science translational medicine. Sci Transl Med. **2016** ; 8(327):327ra25.

37. Lee YJ, Kim JK, Jung CH, et al. Chemical modulation of SQSTM1/p62-mediated xenophagy that targets a broad range of pathogenic bacteria. Autophagy. **2022** ; 18(12):2926-2945.

38. Alphonse MP, Rubens JH, Ortines RV, et al. Pan-caspase inhibition as a potential host-directed immunotherapy against MRSA and other bacterial skin infections. Sci Transl Med. **2021** ; 13(601):eabe9887.

39. Nishimoto AT, Dao TH, Jia Q, et al. Interspecies recombination, not de novo mutation, maintains virulence after β-lactam resistance acquisition in *Streptococcus pneumoniae*. Cell Rep. **2022** ; 41(11):111835.

40. Echlin H, Iverson A, Sardo U, Rosch JW. Airway proteolytic control of pneumococcal competence. PLoS Pathog. **2023** ; 19(5):e1011421.

41. Aslam B, Wang W, Arshad MI, et al. Antibiotic resistance : a rundown of a global crisis. Infect Drug Resist. **2018** ; 11:1645-1658.

42. Van Maele L, Fougeron D, Janot L, et al. Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. Mucosal Immunology. Mucosal Immunol. **2014** ; 7(3):489-500.

43. Fougeron D, Van Maele L, Songhet P, 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(29):3331-3341.

44. Yu F, Cornicelli MD, Kovach MA, et al. Flagellin Stimulates Protective Lung Mucosal Immunity : Role of Cathelicidin Related Antimicrobial Peptide (CRAMP). J Immunol. **2010** ; 185(2):1142-1149.

45. Janot L, Sirard JC, Secher T, et al. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. Eur J Immunol. **2009** ; 39(6):1587-1596.

46. Franck S, Fuhrmann-Selter T, Joseph JF, et al. A rapid, simple and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to determine amoxicillin concentrations in biological matrix of little volume. Talanta. **2019** ; 201:253-258.

47. Casilag F, Matarazzo L, Franck S, et al. The Biosynthetic Monophosphoryl Lipid A Enhances the Therapeutic Outcome of Antibiotic Therapy in Pneumococcal Pneumonia. ACS Infect Dis. **2021** ; 7(8):2164-2175.

Travaux complémentaires

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au mécanisme de transformation bactérienne à l'origine de l'émergence de résistance chez *S. pneumoniae*. Dans ce contexte, la capacité de la thérapie combinée amoxicilline et flagelline à prévenir l'émergence de résistance par transformation a été étudiée. Dans ce but, un modèle qui reproduit l'acquisition de résistance aux antibiotiques a été développé. Des souches bactériennes de sérotype 2 isogéniques sur fond D39V ont été utilisées (fournies par le Dr Jan-Willem Veening, Lausanne) :

- la souche receveuse possède trois mutations conférant une certaine résistance à l'amoxicilline dans les gènes *pbp2b*, *pbp2x* et *murM* (CMI_{AMX} = 0,25 µg/ml) et elle héberge un gène de résistance à la spectinomycine, et
- la souche donneuse a une mutation dans *pbp1a* mais est très sensible à l'AMX (CMI_{AMX} = 0,016 µg/ml). De plus, elle héberge un gène de résistance à la spectinomycine.

La souche donneuse étant délétée de *comCDE*, elle ne peut pas activer la compétence : la transformation est ainsi unidirectionnelle de la donneuse vers la receveuse. Si la souche receveuse acquière la mutation *pbp1a* de la souche donneuse par transformation, sa résistance à l'AMX est fortement augmentée par rapport aux souches donneuses et receveuses (CMI_{AMX} = 2 µg/ml). Ce modèle de transformation a d'abord été validé *in vitro* (données non montrées) avant d'être testé *in vivo*. Des souris infectées avec un mélange de bactéries donneuses et receveuses à un ratio de 1:9 ont été traitées à 10 h et 12 h post-infection par une administration intranasale de CSP-1 (peptide activant la compétence chez *S. pneumoniae*) ou de PBS pour le groupe contrôle (**Figure 8A**). La numération bactérienne dans les poumons a ensuite été réalisée après 24 h d'infection sur des géloses au sang sélectives afin d'identifier les différentes populations : sans antibiotique pour les bactéries totales, avec érythromycine pour les bactéries donneuses, avec spectinomycine pour les bactéries receveuses et avec amoxicilline (0,4 µg/ml) pour sélectionner les transformants. Un nombre équivalent de bactéries donneuses et receveuses a été identifié 24 h post-infection dans les poumons de souris contrôle ou traitées avec CSP-1, soit environ 10^5 CFU (**Figure 8B**). Chez les souris contrôle, une transformation naturelle est observée, avec environ 10^3 CFU de bactéries transformantes pleinement résistantes à l'AMX (**Figure 8C**), pour une fréquence de recombinaison entre 10^{-2} et 10^{-3} (**Figure 8D**). On peut noter que le nombre de transformants et la fréquence de recombinaison sont similaires pour le groupe traité au CSP-1, suggérant qu'il n'y a pas eu d'effet notable de CSP-1 sur la

transformation. Plusieurs expériences ont été réalisées, qui ont révélées que ce modèle de transformation est difficilement reproductible, avec une fréquence de recombinaison variable d'une expérience à l'autre. Ce modèle devra être amélioré afin d'apprécier les effets de l'antibiothérapie et de la thérapie combinée amoxicilline et flagelline sur la transformation bactérienne.

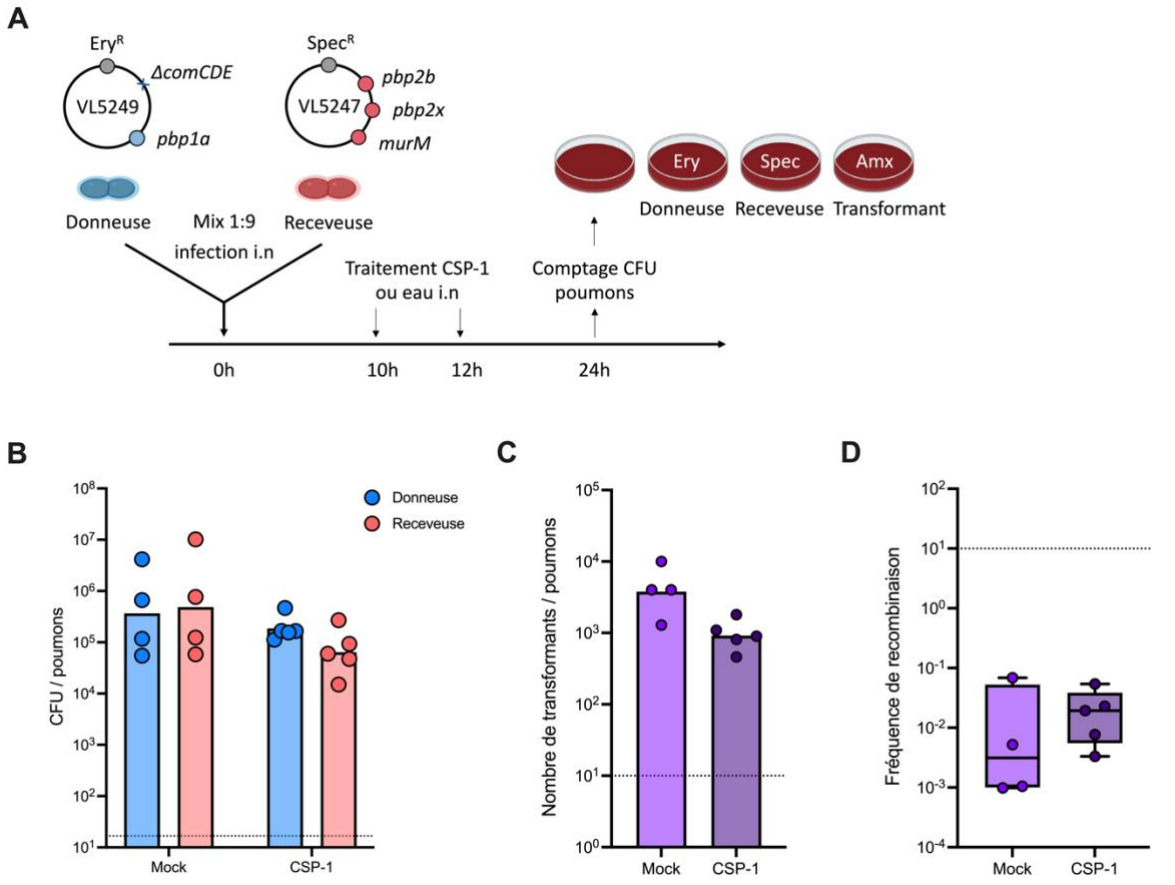


Figure 8. Émergence de souches résistantes à l'amoxicilline par transformation de *S. pneumoniae in vivo*. **(A)** Des souris BALB/c (n=4-5 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par 10^6 bactéries de la souche donneuse et 9× 10^6 bactéries de la souche receveuse de *S. pneumoniae* (ratio 1:9). Les animaux ont été traités 10 h et 12 h plus tard par administration i.n. de CPS-1 (100 ng) ou de PBS. Les poumons ont été prélevés 24 heures post-infection et des comptages bactériens ont été effectués pour les souches donneuses et receveuses **(B)** et les transformants **(C)**. **(D)** La fréquence de recombinaison a été calculée comme le nombre de transformants divisé par le nombre de receveuses. Chaque symbole représente un animal individuel, les moyennes géométriques et la limite inférieure de détection sont indiquées par des lignes pleines et pointillées, respectivement.

Ce modèle de transformation a initialement été testé dans un contexte de surinfection grippale, similaire à celui utilisé dans l'**article I**. Le but était d'obtenir une forte charge bactérienne pulmonaire et d'ainsi maximiser les chances d'observer de la recombinaison, mais aucune

transformation n'a été observée. Echlin *et al.* ont montré que la forte inflammation associée à l'infection par le virus Influenza réduit la compétence de *S. pneumoniae* et la fréquence de recombinaison (Echlin et al., 2023). Dans ce même article, Echlin *et al.* ont décrit la transformation *in vivo* dans un modèle d'infection primaire. Dans nos expériences utilisant le même modèle infectieux, nous avons aussi observé la transformation naturelle (**Figure 8**). Cependant, la charge bactérienne et la fréquence de recombinaison définies dans notre étude est plus faible que dans les travaux d'Echlin *et al.* Par ailleurs, ce modèle ne reproduit pas fidèlement l'évolution de la pneumonie à pneumocoque, car malgré la concentration bactérienne importante de l'inoculum, une clairance spontanée des pneumocoques opère au sein du tissu pulmonaire dès 9 h post-infection. Cela s'explique par l'utilisation de bactéries issues de la souche de laboratoire D39V sur des souris BALB/c, qui y sont peu sensibles. Une piste à envisager pour poursuivre ces investigations serait l'utilisation de bactéries d'un autre sérotype, pour lequel un modèle d'infection primaire est bien établi au laboratoire, comme la souche E1586 de sérotype 1 (Muñoz et al., 2010; Porte et al., 2015; Van Maele et al., 2014a). Des outils génétiques seront nécessaires pour achever un tel objectif.

Lin *et al.* ont montré dans un modèle de sepsis dérivé de pneumonie que l'activation de la compétence naturelle chez *S. pneumoniae* demande un temps d'adaptation à la bactérie à l'hôte et est effective dans une dynamique strictement régulée, i.e., 20 h post-inoculation pendant plusieurs heures. Cette étude a également rapporté que l'administration de CSP-1 exogène ne modifie pas la cinétique de la compétence et la fréquence de transformation. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la thérapie antibiotique + flagelline sur la transformation naturelle décrite dans ce modèle et sur l'acquisition de résistance aux antibiotiques, c'est à dire un traitement à un temps plus tardif d'infection.

Article II : Différentes populations de neutrophiles renforcent l'efficacité d'une thérapie dirigée vers l'hôte dans la pneumonie à pneumocoques

Ce travail a été soumis le 28/06/24 à Mucosal Immunology :

Neutrophil Subsets Enhance the Efficacy of Host-Directed Therapy in Pneumococcal Pneumonia

Laura Matarazzo, Charlotte Costa, Rémi Porte, Jean-Michel Saliou, Martin Figeac, Fabien Delahaye, Amélie Bonnefond, Benoit Kloeckner, Aymeric Silvin, Florent Ginhoux, Christelle Faveeuw, Mara Baldry, Christophe Carnoy, and Jean-Claude Sirard

Introduction

L'immunité innée constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes et repose sur la détection de motifs moléculaires conservés associés aux microbes par des récepteurs tels que les récepteurs de type Toll (TLR). Les TLR sont largement exprimés et déclenchent rapidement une réponse immunitaire innée caractérisée par des activités antimicrobiennes à large spectre, telles que la production de cytokines et de chimiokines qui renforcent la fonction des cellules immunitaires ou des facteurs qui stimulent l'opsonisation et la phagocytose[1]. Les surfaces muqueuses, telles que les voies respiratoires, sont particulièrement dépendantes de l'immunité innée car elles sont continuellement exposées aux micro-organismes de l'environnement [2].

Dans le contexte de la propagation incontrôlée de la résistance aux antibiotiques, la modulation de l'immunité innée est considérée comme une alternative ou un complément potentiel au traitement antibiotique standard [3, 4]. La flagelline, une protéine présente dans les flagelles des bactéries mobiles, est reconnue par le récepteur TLR5 à la surface des cellules, ce qui entraîne l'activation de gènes immunitaires par le biais d'une activation transcriptionnelle dépendante de NF-κB [5]. Il a été démontré que l'administration de flagelline, par voie locale ou systémique, prévient divers types d'infections dans des modèles animaux, telles que les infections intestinales, respiratoires, oculaires ou systémiques [6-11]. L'administration respiratoire de flagelline par voie intranasale (i.n.) active spécifiquement l'épithélium des voies respiratoires via TLR5, entraînant la production de chimiokines, de cytokines et de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales [12, 13]. Ces facteurs favorisent le recrutement et l'activation des phagocytes, y compris les neutrophiles, les monocytes et les cellules dendritiques, dans le parenchyme pulmonaire et les voies aériennes [5, 11, 12, 14].

S. pneumoniae, également connu sous le nom de pneumocoque, est le principal agent causal de la pneumonie bactérienne communautaire et est lié à un taux élevé de mortalité et de morbidité, en particulier chez les jeunes enfants et les personnes âgées [15]. L'administration prophylactique i.n. de flagelline a montré un effet protecteur contre la pneumonie à pneumocoque dans un processus dépendant des neutrophiles [9, 11]. Plus récemment, une approche thérapeutique combinant un antibiotique (tel que l'amoxicilline ou le cotrimoxazole) et l'administration i.n. de flagelline s'est avérée 100 fois plus efficace dans le traitement de la pneumonie que l'utilisation de l'antibiotique ou de la flagelline seuls [16-18]. La supériorité du traitement combiné

réside dans sa capacité à réduire considérablement la charge bactérienne dans les poumons et la dissémination, et à augmenter le taux de survie. Cette combinaison s'est révélée synergique non seulement dans les infections primaires, mais aussi dans le contexte des surinfections post-grippales [17]. Dans ces modèles, l'administration du traitement combiné a entraîné une signature immunitaire innée locale, caractérisée par une augmentation de la transcription des gènes et de la production de chimiokines et de cytokines, ainsi qu'une augmentation du nombre de neutrophiles dans les voies respiratoires [17, 18]. Cependant, les mécanismes immunitaires spécifiques contribuant aux effets synergiques n'ont pas encore été identifiés. Cette étude visait à analyser de manière exhaustive le poumon afin de déterminer les mécanismes immunitaires spécifiques responsables de l'efficacité thérapeutique de la combinaison flagelline-antibiotique lors du traitement intranasal des infections respiratoires.

Matériels et Méthodes

Souches et cultures bactériennes

La souche de *S. pneumoniae* de sérotype 1 (isolat clinique E1586) a été obtenu auprès du laboratoire national de référence du ministère de la santé de l'Uruguay [9]. Les cultures bactériennes ont été réalisées à 37°C et 5% de CO_2 dans du milieu Todd-Hewitt complémenté par 0,2% d'extrait de levure (THYB, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) ou sur des géloses au sang de mouton à 5%. Les stocks ont été préparés comme suit : le THYB a été inoculé avec des colonies provenant de gélose au sang et incubé jusqu'à ce que le A_{600} atteigne 0,7-0,9 unités. Les cultures ont été conservées à -80°C dans du THYB + glycérol 12% (vol./vol.) jusqu'à 3 mois. Pour l'infection, les stocks ont été lavés avec de la solution saline stérile de Dulbecco (PBS, Gibco, Grand Island, NY) et dilués dans du PBS jusqu'à la concentration appropriée. Le nombre de bactéries (exprimé en UFC) a été confirmé par l'ensemencement de dilutions sériées sur des géloses au sang.

Modèle d'infection chez la souris

Toutes les expérimentations animales étaient conformes aux réglementations nationales et européennes en vigueur et aux directives éthiques (accord d'animalerie E59-350009, Institut Pasteur de Lille ; protocoles APAFIS#5164_2015121722429127_v4 et APAFIS#16966_ 201805311410769_v3 ; accords OGM, DUO6818 et 6820) et ont été menées par du personnel qualifié. Les animaux ont été maintenus dans des cages ventilées individuellement et ont été manipulés dans une enceinte à flux laminaire vertical (niveau de biosécurité 2). Les souris femelles BALB/cJRj (âgées de 6 à 8 semaines ; Laboratoires Janvier, Saint Berthevin, France) ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de 1,25 mg (50 mg/kg) de kétamine plus 0,25 mg (10 mg/kg) de xylazine dans 250 µl de PBS. Pour les infections, 2×10^6 UFC dans 30 µl de PBS ont été inoculés par voie i.n. comme décrit précédemment [17, 18]. À différents temps, les souris ont été sacrifiées par l'injection intrapéritonéale de 5,47 mg de pentobarbital sodique dans 100 µl de PBS. Les poumons et la rate ont été prélevés et homogénéisés dans 1 ml de PBS à l'aide d'un homogénéisateur UltraTurrax (IKA-Werke, Staufen, Allemagne), et les numérations ont été déterminées par ensemencement de dilutions sériées sur des géloses au sang. Les lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été obtenus par trois injections intratrachéales de 1 ml de PBS contenant des inhibiteurs de protéase (cOmplete™, Sigma-Aldrich). Le sang a

été prélevé par ponction rétro-orbitale dans des microtubes Z-Gel (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) pour préparer le sérum.

Les neutrophiles ont été éliminés par injection intrapéritonéale d'un anticorps anti-Ly6G (IgG2b de rat, clone NIMPR14, 100 µg dans 200 µL de PBS), 6 heures après l'infection des souris par *S. pneumoniae*. Les souris témoins ont reçu un anticorps isotype (IgG2b de rat spécifique de HLA Bw6 clone HB-152).

Administration des traitements

La flagelline recombinante $FliC_{\Delta 174–400}$ avec un tag histidine à l'extrémité C-terminale [18, 19], un dérivé de la flagelline FliC de *S.* Typhimurium, a été utilisée tout au long de cette étude. La protéine $FliC_{\Delta 174–400}$ est faiblement immunogène mais stimule la signalisation du récepteur TLR5, comme cela a été évalué sur des lignées cellulaires rapporteuses et dans des modèles de souris. La concentration résiduelle de lipopolysaccharide a été déterminée comme étant < 20 pg par µg de flagelline. Pour le traitement des souris, $FliC_{\Delta 174–400}$ (2,5 µg dans 30 µl PBS) a été administrée par voie i.n. sous anesthésie légère par inhalation d'isoflurane (Axience, Pantin, France). Les animaux témoins ont reçu du PBS seul par voie i.n. L'amoxicilline trihydrate (AMX, Sigma-Aldrich) a été préparée sous forme d'une solution mère de 1,75 mg/ml dans de l'eau stérile, puis ajustée à une dose finale de 5 µg/souris (i.e., 0,25 mg/kg) dans de l'eau avant l'administration intragastrique (i.g.) de 200 µl. Les animaux témoins ont reçu de l'eau par voie i.g. seule.

Quantification de l'expression des gènes et puces à ADN

L'ARN total du poumon a été extrait à l'aide du kit Nucleospin RNA II (Macherey Nagel, Düren, Allemagne) et retro-transcrit avec le High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis). L'ADNc a été amplifié par PCR en temps réel en utilisant du SYBR-Green sur un système Quantstudio™ 12K (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Les amorces spécifiques utilisées sont énumérées dans le **Tableau supplémentaire 1**. Les niveaux relatifs d'ARNm ont été déterminés en comparant le seuil de cycle (Ct) de la PCR pour le gène d'intérêt au gène de référence *Actb* (ΔCt), puis les valeurs ΔCt pour les groupes traités par AMX+flagelline par rapport aux groupes traités par AMX (ΔΔCt).

Pour l'analyse des puces à ADN, le rendement et la qualité de l'ARN total ont été évalués sur le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Des puces à oligonucléotides unicolores 8x60k v2 (Agilent Technologies) ont été utilisées pour analyser l'expression génique de la souris entière (lames 084809_D_F_20150624). Les étapes de marquage, d'hybridation et de détection des ARNc ont été réalisées selon les instructions du fournisseur (Agilent Technologies). Pour chaque puce, un ARNc marqué à la cyanine-3 a été synthétisé à partir de 50 ng d'ARN total à l'aide du kit de marquage QuickAmp à faible débit. Du RNA Spike-In a été ajouté à tous les tubes et utilisé comme contrôle positif dans les étapes de marquage et d'amplification. Ensuite, 600 ng de chaque ARNc marqué et purifié ont été hybridés et lavés selon les instructions du fabricant. Les microréseaux ont été scannés sur un scanner Agilent G2505C et les données ont été extraites à l'aide du logiciel Agilent Feature Extraction Software (version 10.7.3.1, Agilent Technologies). Les données des microréseaux ont été déposées dans la base de données Gene Expression Omnibus (GEO) (numéro d'accès : GSE118860). Les comparaisons statistiques et le filtrage ont été effectués à l'aide du package Limma R avec une normalisation au 75e centile. Les gènes différentiellement exprimés ont été considérés lorsque la valeur p ajustée était inférieure à 0,05 après que le taux de fausse découverte ait été vérifié par la procédure Benjamini-Hochberg. Les voies ont été étudiées à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA).

Cytométrie en flux

Les poumons ont été perfusés avec du PBS, excisés, finement hachés puis digérés dans une solution de milieu RPMI 1640 (Gibco) contenant 1 mg/ml de collagénase VIII et 40 µg/ml de DNase I (Sigma-Aldrich) pendant 20 min à 37°C. Après les lavages, les globules rouges ont été éliminés à l'aide d'une solution de lyse (Pharmlyse, BD Bioscience). Les cellules pulmonaires ont ensuite été suspendues dans un gradient de Percoll (GE Healthcare) à 20% et centrifugées à 2000 rpm sans frein à température ambiante pendant 10 min. Les cellules hématopoïétiques ont été récupérées à partir du culot et lavées avec du PBS supplémenté avec 2% de sérum de veau fœtal (SVF) et les cellules ont été filtrées avant le marquage anticorps. Le LBA a été prélevé après 3 injections intratrachéales successives de 1 ml de PBS supplémenté avec 5% de SVF. Les cellules du LBA ont été récupérées après 5 minutes de centrifugation à 400 g. Les cellules du LBA et du poumon ont été colorées avec des anticorps fluorescents spécifiques des marqueurs de surface (**Tableau supplémentaire 2**) qui ont été achetés chez BD Biosciences (San Jose, CA) ou BioLegend (San Diego, CA).

Pour détecter les cellules associées à la vascularisation pulmonaire (cellules circulantes et marginées), les souris ont reçu par voie intraveineuse 5 min avant l'échantillonnage 5 µg d'anticorps monoclonal anti-CD45 couplé au fluorochrome APC. Après perfusion, les poumons ont été excisés et les suspensions cellulaires ont été marquées avec les anticorps monoclonaux appropriés et l'anticorps monoclonal anti-CD45 couplé au BV711 pour colorer tous les leucocytes.

Les données ont été collectées sur un BD LSR Fortessa et analysées avec le logiciel BD FACSDiva. Les cellules ont été sélectionnées en fonction de leur taille et de leur granularité et de l'iodure de propidium a été ajouté avant l'acquisition pour exclure les cellules mortes de l'analyse. Les neutrophiles, les monocytes inflammatoires et les macrophages alvéolaires ont été identifiés à partir des cellules viables $CD45^+$ (leucocytes) sur la base des caractéristiques suivantes : macrophages (Siglec-F^+ $CD11b^{neg}$ $CD11c^+$), neutrophiles (Siglec-F^{neg} $CD11b^+$ $Ly6G^+$) et monocytes inflammatoires (Siglec-F^{neg} $CD11b^+$ $Ly6C^+$ $CCR2^+$).

Production de cytokines et de chimiokines

Les concentrations de CCL20, CXCL2, IL-6 et TNF ont été déterminées dans les LBA et le sérum par dosage immuno-enzymatique (kit ELISA d'eBioscience, R&D Systems ou Becton Dickinson).

Histologie et immunohistochimie

Les poumons ont été fixés dans du formaldéhyde à 4 %. Les lobes gauches ont été inclus dans de la paraffine, et des coupes de tissus de 3 à 5 µm ont été colorées avec du réactif d'hématoxyline et d'éosine ou traitées pour l'immunohistochimie (Althisia, Troyes, France). L'immunohistochimie des neutrophiles a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin anti-Ly6G (clone EPR22909-135). Les images colorées au Ly6G ont été évaluées en aveugle pour l'infiltration des neutrophiles dans les zones périvasculaires, péribronchiques, alvéolaires ainsi que dans les bronchioles sur une échelle à 5 niveaux, où 1 correspond à une infiltration peu prononcée, et 2 à 5 à une infiltration légère, modérée, marquée et sévère.

Tests de phagocytose

Les BioParticules pHrodo™ Red *E. coli* inactivées® (Thermo Fisher Scientific) ont été reconstituées à une concentration de 1 mg/ml (3×10^8 particules/ml) dans du PBS. Pour les tests *ex vivo*, 3×10^6 particules ont été ajoutées à 2×10^5 cellules de LBA dans un milieu RPMI complet dans une plaque de 96 puits à fond plat et incubées pendant 1 heure à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS, marquées avec des anticorps fluorescents et analysées par cytométrie en flux. Pour les tests *in vivo*, 9×10^6 particules dans 30 µl de PBS ont été administrées par voie i.n. sous anesthésie légère à l'isoflurane 4 h après l'administration des traitements. Les poumons et le LBA ont été prélevés 1 h plus tard, traités et colorés pour la cytométrie en flux. La fluorescence des particules pHrodo (maxima d'excitation/émission : 560/585 nm) a été acquise sur un cytomètre en flux Attune NxT 2020 (Thermo Fisher Scientific) et les données ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo (LLC, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Séquençage ARN en cellules individuelles (scRNA-seq), démultiplexage, traitement et analyse

Les cellules du LBA de 4 souris par traitement ont été regroupées. Après comptage des cellules et évaluation de la viabilité, la coloration par hashtag cellulaire (HTO) (Biolegend, San Diego, CA, USA) a été utilisée en suivant le protocole de cell-hashing (TotalSeq™-A Antibodies and Cell Hashing with 10× Single Cell 3' Reagent Kit v3 3.1 Protocol) [20]. Les cellules ont ensuite été chargées dans le contrôleur Chromium (10× Genomics, Pleasanton, CA, USA) et la bibliothèque a été générée en utilisant le kit chromium single-cell v3.1 chemistery en suivant les recommandations du fabricant. La bibliothèque d'expression génique a été séquencée selon le protocole 10× Genomics sur le système Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA, USA).

Les codes-barres du cell-hashing et les matrices de comptage de l'ARN ont été chargés dans un objet Seurat [21]. Les matrices ont d'abord été normalisées à l'aide de la fonction NormalizeData avec le paramètre normalization.method = 'CLR', puis démultiplexées à l'aide de la fonction HTODemux avec les paramètres par défaut. Les cellules non assignées ou assignées aux deux codes-barres ont été éliminées. En ce qui concerne la matrice de comptage de l'ARN, les cellules ont été filtrées sur la base des paramètres suivants : nFeature_RNA > 100 & nCount_RNA > 500 & percent.mt <30. Les doublets ont ensuite été éliminés sur la base d'une

fonction interne dérivée de l'algorithme DoubletFinder [22]. L'objet Seurat résultant a été normalisé et mis à l'échelle à l'aide de SCTransform [23] avec method = "glmGamPoi" et variable.features.n = 8000 paramètres, avant d'appliquer le flux de travail standard de Seurat (RunPCA, RunUMAP, FindNeighbors et FindClusters). La résolution la plus stable pour le clustering a été choisie à l'aide de l'algorithme Clustree [24] et sur la base des connaissances biologiques. Les gènes différentiellement exprimés (DEG) par groupe ont été calculés à l'aide des fonctions PrepSCTFindMarkers et FindAllMarkers (min.pct = 0.3, only.pos = TRUE) et les 5 premiers ont été affichés à l'aide de la fonction DotPlot pour faciliter l'annotation. Pour affiner l'analyse, seuls les clusters de neutrophiles ont été sélectionnés et utilisés pour lancer une nouvelle UMAP. Les mêmes fonctions et paramètres que précédemment ont été utilisés pour calculer les DEG entre les clusters ou entre les conditions, à l'intérieur de chaque cluster de neutrophiles ou non. Le volcano plot a été créé à l'aide du package EnhancedVolcano (https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano). L'analyse de l'enrichissement de termes d'ontologie génétique a été réalisée à l'aide de Metascape [25] avec les paramètres par défaut et les voies GO Biological Processes. Les voies de signalisation qui n'étaient pas communes aux deux conditions de traitement ont été conservées pour l'analyse. Les données de séquençage ont été déposées sur GEO (numéro d'accès : GSE269163).

Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en valeurs individuelles et en médiane [intervalle interquartile] ou en moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM). Les groupes ont été comparés à l'aide du test de Mann-Whitney (pour deux groupes indépendants), d'une analyse de variance (ANOVA) à un facteur de Kruskal-Wallis avec post-test de Dunn (pour trois groupes ou plus), d'une ANOVA à deux facteurs avec comparaisons multiples de Sidak pour l'analyse des traitements en fonction du temps. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8.2, GraphPad Software Inc., San Diego, CA), et le seuil de signification statistique a été fixé à $p<0,05$.

Résultats

L'administration intranasale de flagelline accélère la réponse immunitaire innée chez les souris infectées par *S. pneumoniae*

Pour étudier la dynamique de la réponse immunitaire induite par un traitement combiné à la flagelline, des souris ont été inoculées par voie i.n. avec *S. pneumoniae* et traitées 12 heures plus tard avec une combinaison d'amoxicilline administrée par voie intragastrique et de flagelline $FliC_{\Delta 174\text{-}400}$ administrée en i.n. (AMX+flagelline) ou d'AMX et de PBS par voie i.n. (appelé AMX) en tant que traitement de référence. Comme attendu, par rapport au groupe traité par l'AMX, la transcription des gènes des médiateurs immunitaires *Ccl20, Cxcl2, Il6* et *S100a9* chez les animaux recevant AMX+flagelline a atteint un pic entre 2 et 4 heures après le traitement, puis a progressivement diminué au fil du temps (**Figure 1A**).

La production des médiateurs immunitaires CCL20, CXCL2, IL-6 et TNF a augmenté de manière significative dans le LBA 2 h et 4 h après le traitement, puis a diminué jusqu'à atteindre des niveaux faibles ou indétectables entre 12 et 24 heures (**Figure 1B**). Les taux sériques de CCL20 et de CXCL2 présentaient une cinétique similaire, tandis que le taux sérique d'IL-6 était peu affecté par les traitements (**Figure 1C**). Ces résultats démontrent qu'une seule administration du traitement combiné AMX+flagelline provoque une réponse immunitaire innée immédiate et transitoire à la fois dans les voies respiratoires et dans le sang.

La réponse transcriptionnelle du poumon à la thérapie combinée révèle l'implication des phagocytes dans l'efficacité du traitement

Pour mieux identifier les effecteurs immunitaires liés à l'efficacité du traitement, une analyse transcriptomique non-biaisée du poumon a été réalisée 2 h et 4 h après le traitement (**Figure 2 et Tableau complémentaire 3)**.

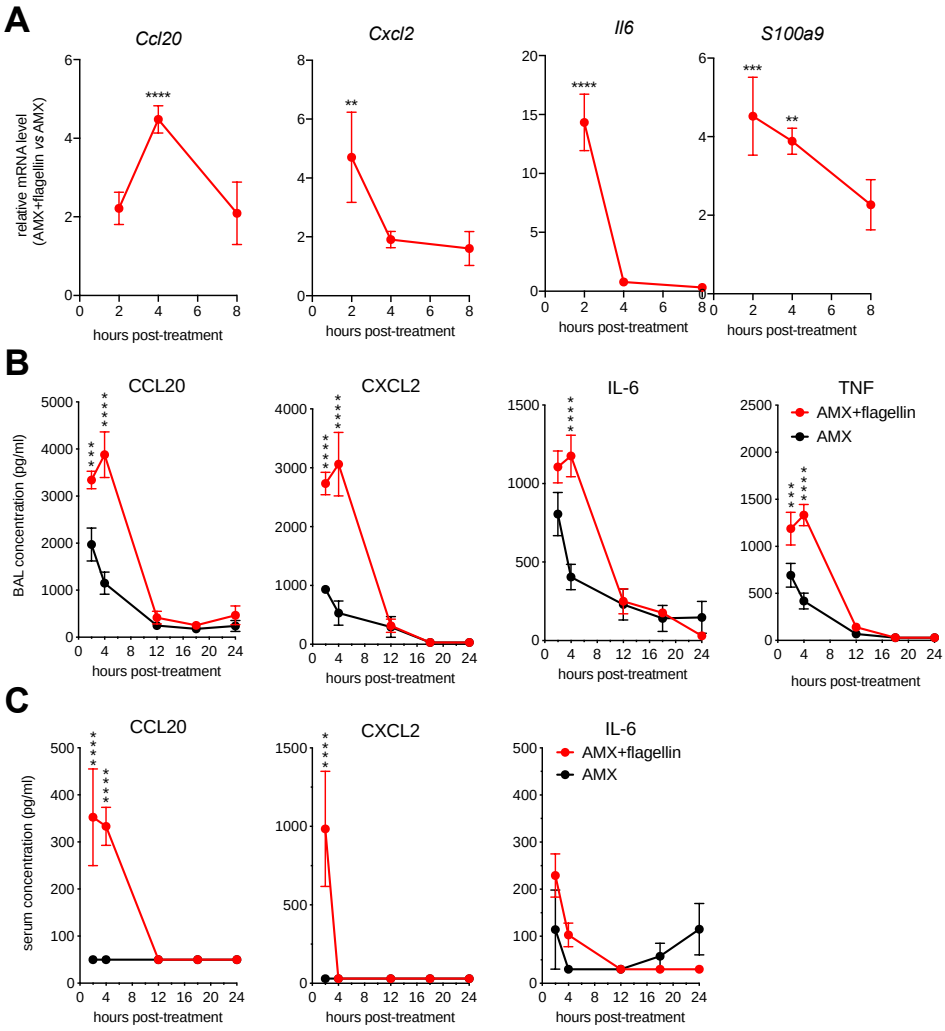


Figure 1. Réponse immunitaire respiratoire et systémique induite par la thérapie combinée AMX+flagelline au cours d'une pneumonie. Des souris BALB/c (n=4 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par 2×10^6 *S. pneumoniae* et traitées 12 heures plus tard par administration i.g. d'AMX combinée à l'administration i.n. de flagelline (AMX+flagelline) ou de PBS (AMX). Les poumons, les LBA et le sérum ont été prélevés aux temps indiqués après le traitement. **(A)** Expression génique dans les poumons mesurée par RT-qPCR. Les niveaux relatifs d'ARNm des gènes sélectionnés sont exprimés par rapport au gène de référence *Actb* et à la condition de référence AMX (fixée arbitrairement à une valeur de 1). **(B-C)** Concentration de cytokines et de chimiokines dans les LBA **(B)** et dans le sérum **(C).** Les différences statistiques ont été analysées par un test ANOVA à deux facteurs.

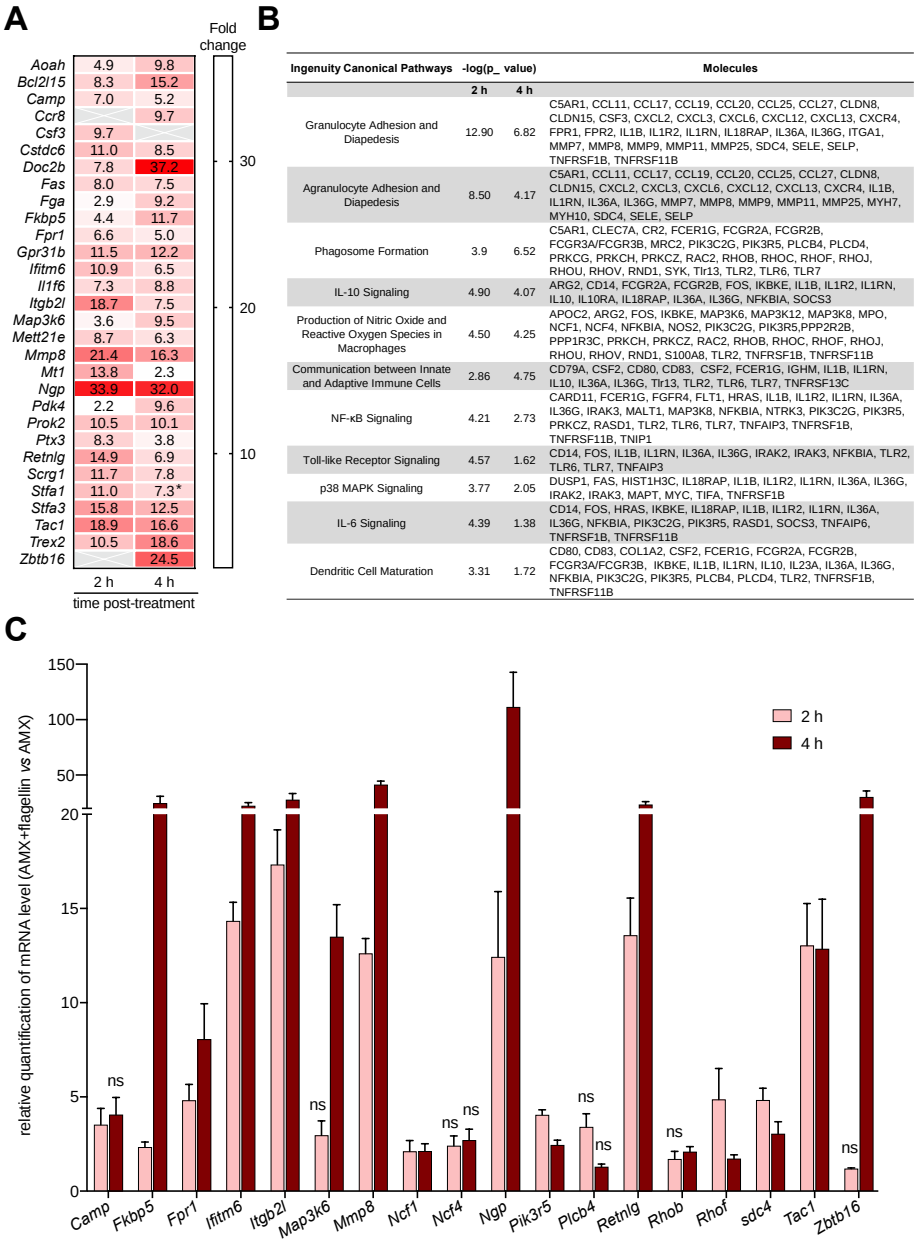


Figure 2. Analyse transcriptomique de la réponse pulmonaire induite par la flagelline dans la pneumonie à pneumocoques. Des souris BALB/c (n=3-4 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par 2×10^6 *S. pneumoniae* et traitées 12 h plus tard par administration i.g. d'AMX combinée à l'administration i.n. de flagelline (AMX+flagelline) ou de PBS (AMX). Les poumons ont été prélevés 2 h et 4 h après le traitement, puis l'ARN total a été extrait. Les niveaux de transcription ont été étudiés par puce à ADN **(A-B)** ou RT-qPCR **(C)**. **(A)** Heatmap des 30 premiers DEG entre les traitements AMX+flagelline vs AMX. **(B)** Enrichissement des voies canoniques, selon une analyse Ingenuity Pathway des DEG avec $|\log_2 FC|\geq 1$ et $p\leq 0{,}05$. **(C)** Validation des gènes signatures par RT-qPCR dans une expérience indépendante. Les différences statistiques entre les groupes AMX+flagelline et AMX ont été analysées par le test de Mann-Whitney à chaque temps. Les différences non significatives sont indiquées par "ns".

L'analyse a identifié 1205 et 1423 DEG qui ont été significativement régulés ($|\log_2 FC| \geq 1$ et $p \leq 0,05$) à 2 h et 4 h par AMX+flagelline par rapport à AMX, respectivement. De manière remarquable, les gènes régulés à la hausse étaient impliqués dans l'activation des cellules immunitaires ou le recrutement sur les sites inflammatoires (tels que les chimiokines, les métalloprotéases matricielles, les récepteurs de peptide formique) ainsi que dans les fonctions antibactériennes, notamment la pentraxine 3, la protéine du granule neutrophile, l'hydrolase acyloxyacide et le peptide antimicrobien cathélicidine (**Figure 2A**). L'analyse des voies de signalisation a révélé une modulation significative des voies associées à l'adhésion et la diapédèse des granulocytes et des agranulocytes, ainsi que des voies liées aux mécanismes antimicrobiens associés aux cellules, tels que la formation de phagosomes et la production d'oxyde nitrique et d'espèces réactives de l'oxygène (**Figure 2B**). L'expression des gènes sélectionnés a été validée par RT-qPCR dans une expérience indépendante (**Figure 2C**). En outre, l'analyse protéomique semi-quantitative des LBA a montré une augmentation des niveaux de protéines 2 h et 4 h après le traitement qui sont liées aux neutrophiles et à leurs fonctions antibactériennes, telles que la lactotransferrine, le lysozyme, la lipocaline 2, la protéine du granule neutrophile et la myéloperoxydase (**Figure supplémentaire 1A-B**). Des niveaux plus élevés de facteurs du système du complément et de facteurs associés à la physiologie des voies aériennes ont également été observés dans le groupe AMX+flagelline par rapport au groupe AMX. En conclusion, ces données soulignent la réponse immunitaire locale rapide et multifactorielle des voies aériennes induite par la flagelline dans le contexte d'une infection en cours, en mettant l'accent sur le rôle potentiel des phagocytes dans l'efficacité du traitement.

La flagelline augmente transitoirement le recrutement des phagocytes dans les voies respiratoires

Nous avons ensuite analysé les cellules phagocytaires, i.e., les neutrophiles, les monocytes inflammatoires et les macrophages alvéolaires après le traitement dans les poumons (**Figure 3)**.

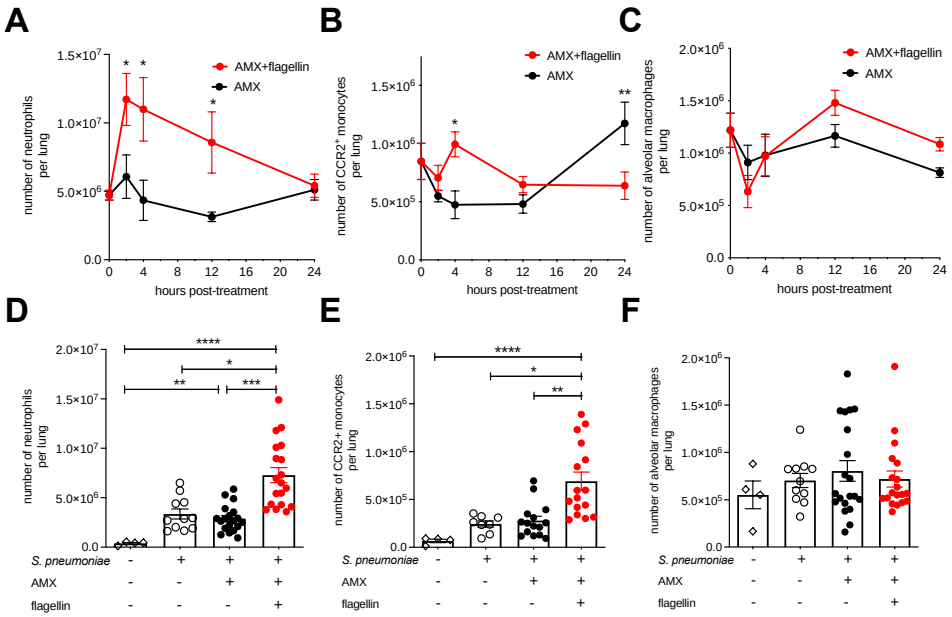


Figure 3. Dynamique des cellules phagocytaires pulmonaires pendant le traitement des souris infectées. Des souris BALB/c ont été infectées par voie i.n. par 2× 10^6 *S. pneumoniae* et traitées 12 heures plus tard par administration i.g. d'AMX combinée à l'administration i.n. de flagelline (AMX+flagelline) ou de PBS (AMX). Les poumons ont été prélevés après le traitement et les neutrophiles **(A, D)**, les monocytes inflammatoires $CCR2^+$ **(B, E)** et les macrophages alvéolaires **(C, F)** ont été analysés par cytométrie en flux. **(A-C)** Évolution cinétique du nombre de cellules (n=7-8 par groupe) après traitement. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. **(D-F)** Nombre de cellules 4 heures après le traitement par rapport aux souris non infectées et non traitées (mock) ou infectées mais non traitées (n= 4-20 souris par groupe, pool de 4 expériences). Les valeurs des souris individuelles et/ou la moyenne ± SEM sont indiquées. Les différences statistiques entre les groupes ont été analysées par des tests ANOVA à facteur unique ou à double facteurs.

Contrairement à l'AMX, l'administration d'AMX+flagelline a provoqué une augmentation significative du nombre de neutrophiles dès 2 h et 4 h, suivie d'une diminution au fil du temps (**Figure 3A**). Une augmentation significative des monocytes inflammatoires $CCR2^+$ a également été observée dans les poumons à 4 h en réponse à la flagelline (**Figure 3B**). La population de macrophages alvéolaires n'a pas été modifiée de manière significative, quel que soit le temps ou le traitement (**Figure 3C**). L'analyse a également montré que l'infection pneumococcique en elle-même stimulait le recrutement des neutrophiles et des monocytes dans les poumons par rapport aux animaux naïfs non infectés, mais n'affectait pas les macrophages alvéolaires (**Figure 3D-F**). Le traitement par AMX n'a pas modifié le nombre de neutrophiles et de monocytes dans les poumons, contrairement au traitement par AMX+flagelline. Des résultats similaires ont été observés en analysant le LBA en ce qui concerne les neutrophiles et

les macrophages alvéolaires, alors que les monocytes inflammatoires étaient presque absents (**Figure supplémentaire 2**). Ces données soulignent que, même dans le contexte d'une infiltration cellulaire causée par une infection, la flagelline induit un recrutement de neutrophiles et de monocytes inflammatoires dans les voies respiratoires. Ces expériences soulèvent l'hypothèse qu'un recrutement précoce de neutrophiles et de monocytes inflammatoires dans les poumons joue un rôle majeur dans l'effet thérapeutique de la combinaison AMX et flagelline.

Le recrutement des neutrophiles dans les voies respiratoires est crucial pour l'effet thérapeutique de l'antibiotique et la flagelline combinés

Pour étudier la contribution des neutrophiles, nous avons examiné l'efficacité du traitement AMX+flagelline après la déplétion cellulaire induite par l'anticorps anti-Ly6G (**Figure 4)**. Dans le contexte de l'infection, plus de 90 % des neutrophiles pulmonaires ont été éliminés par déplétion, comme le montre la **Figure 4A**. Comme attendu, le traitement combiné AMX+flagelline a entraîné une clairance bactérienne pulmonaire plus efficace que l'AMX lorsque les animaux recevaient un anticorps de contrôle isotype (**Figure 4B**). En revanche, l'effet thérapeutique de la combinaison AMX et flagelline a été aboli lorsque les neutrophiles ont été éliminés. En définitive, ces données montrent que l'infiltration des neutrophiles dans les voies respiratoires est essentielle pour l'efficacité thérapeutique de la flagelline combinée aux antibiotiques.

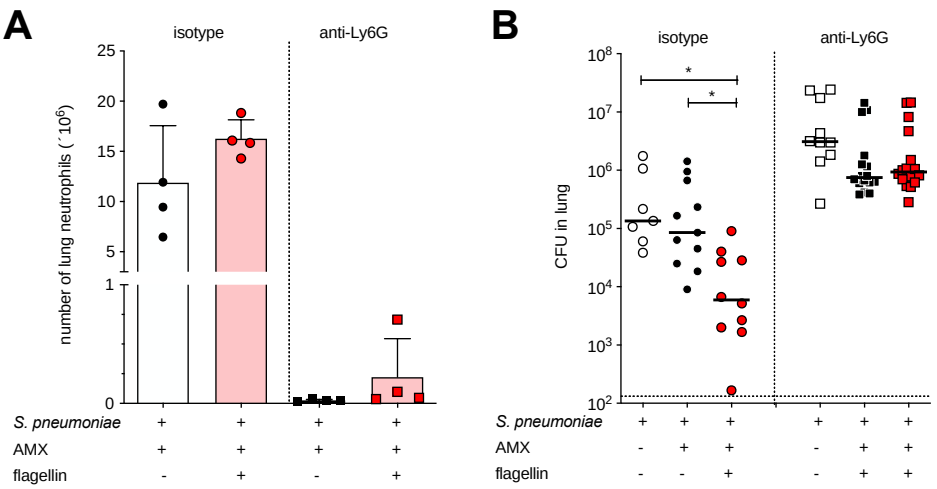


Figure 4. Rôle des neutrophiles dans l'efficacité du traitement combiné contre la pneumonie. Des souris BALB/c ont été infectées par voie i.n. par 2× 10^6 *S. pneumoniae*. Six heures plus tard, les animaux ont reçu une injection d'anticorps anti-Ly6G ou d'un isotype contrôle. Les souris ont été traitées 12 heures après l'infection par l'administration i.g. d'AMX combinée à l'administration i.n. de flagelline (AMX+flagelline) ou de PBS (AMX), ou n'ont pas été traitées. Les poumons ont été prélevés 12 heures après le traitement. **(A)** Le nombre de neutrophiles a été analysé par cytométrie en flux (n=4 par groupe). **(B)** Le nombre de bactéries a été déterminé en comptant les UFC des homogénats pulmonaires sur des géloses au sang (n= 7-17 par groupe, pool de deux expériences). Les différences statistiques entre les groupes ont été analysées par un test ANOVA à facteur unique.

Le traitement par la flagelline accélère la migration des neutrophiles dans le parenchyme pulmonaire et modifie leur localisation tissulaire

Pour déterminer la localisation des neutrophiles lors de l'infiltration pulmonaire, un anticorps anti-CD45 conjugué à l'APC a été injecté par voie intraveineuse avant le prélèvement des tissus pour marquer les leucocytes marginaux et circulants. Les cellules pulmonaires ont ensuite été colorées pour une analyse par cytométrie en flux avec un panel comprenant un anticorps anti-CD45 conjugué au BV711 (**Figure 5A**). En conséquence, chez les souris infectées non traitées ou traitées par AMX, 50 % des neutrophiles pulmonaires étaient marginés, alors que le traitement par AMX+flagelline réduisait cette fréquence à 30 %. Ces résultats suggèrent que le traitement à la flagelline accélère la migration des neutrophiles à travers l'endothélium vasculaire dans le tissu pulmonaire et les voies aériennes. Une évaluation histologique par coloration à l'hématoxyline/éosine (HE) et une immunochimie spécifique de Ly6G ont ensuite été réalisées sur des coupes de tissu pulmonaire (**Figure 5B-C**). L'infiltration et le positionnement des neutrophiles ont été scorés comme indiqué dans la **Figure 5D**. Le traitement par AMX+flagelline a modifié la proportion de neutrophiles ainsi que leur

positionnement dans le tissu, en particulier dans les régions périphériques des vaisseaux sanguins, des bronches, des alvéoles ainsi qu'à l'intérieur des bronches. Ces expériences suggèrent que la distribution spécifique des neutrophiles dans les voies respiratoires est liée à la protection.

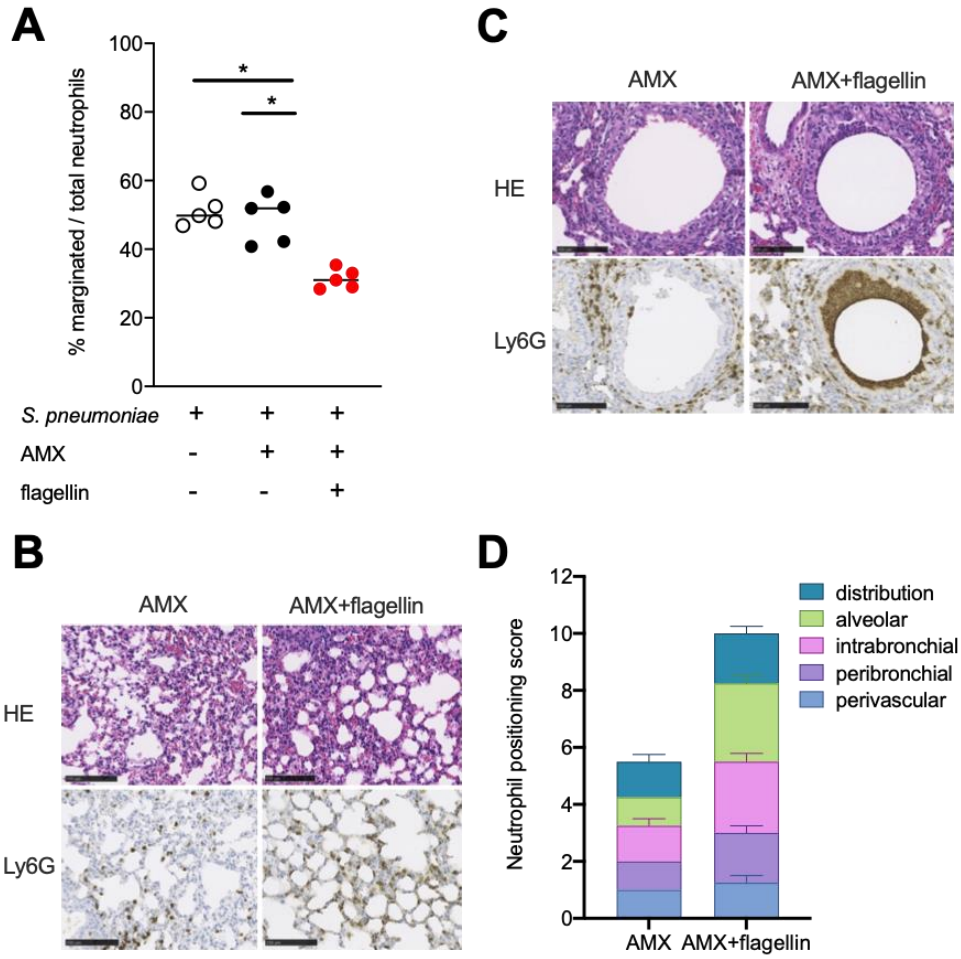


Figure 5. Le traitement par la flagelline augmente la transmigration des neutrophiles dans les poumons et influence la localisation des neutrophiles. Des souris BALB/c (n=5 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par 2× 10^6 *S. pneumoniae*, et traitées 12 heures après l'infection par l'administration i.g. d'AMX combinée à l'administration i.n. de flagelline (AMX+flagelline) ou de PBS (AMX), ou n'ont pas été traitées. Quatre heures après le traitement, la localisation vasculaire par rapport à la localisation au niveau du parenchyme des neutrophiles pulmonaires a été analysée en utilisant l'injection d'anticorps anti-CD45-APC avant le prélèvement, suivie par le marquage anticorps pour l'analyse par cytométrie en flux **(A)** ou les poumons (lobes gauches) ont été analysés par histochimie et immunochimie **(B-D)**. **(A)** Pourcentage de neutrophiles marginés**.** Les différences statistiques entre les groupes ont été analysées par un test ANOVA à facteur unique (* : $p < 0,05$). **(B-D)** Analyse histologique (H&E) et immunodétection des neutrophiles (Ly6G) dans les poumons des souris traitées (n=4 par groupe) dans les régions alvéolaires **(B)** et les bronches **(C)**. **(D)** L'infiltration des neutrophiles a été scorée en aveugle sur une échelle à 5 niveaux, où 1 correspond à une infiltration peu prononcée, et 2 à 5 à une infiltration légère, modérée, marquée et sévère. La distribution tissulaire des neutrophiles a été notée 1 comme focale ou 2 comme étendue.

Le traitement par la flagelline induit une augmentation de la phagocytose des neutrophiles

Nous avons ensuite évalué si les fonctions clés des neutrophiles, telles que la phagocytose et la production de ROS, étaient influencées par le traitement combiné AMX et flagelline dans des expériences *in vivo* et *ex vivo* (**Figure 6**). Pour étudier la phagocytose, des souris infectées par le pneumocoque et traitées par AMX seul ou AMX+flagelline ont reçu par voie i.n. des particules d'*E. coli* inactivées conjuguées à pHrodo 3 heures après le traitement, et les poumons ont été récupérés 1 heure plus tard (i.e., 4 heures après le traitement). La proportion de neutrophiles pHrodo$^+$ (c.-à-d. des cellules ayant phagocyté des particules bactériennes) variait de 3 à 12 % (**Figure 6A**), et aucune influence significative n'a été attribuée au traitement. Cependant, le nombre total de neutrophiles pHrodo$^+$ était plus élevé chez les souris traitées par AMX+flagelline que dans le groupe traité par AMX (**Figure 6B**). Par ailleurs, les cellules du LBA ont été récupérées 4 heures après le traitement et incubées *in vitro* pendant 1 heure avec des particules pHrodo (**Figure 6C**). L'analyse des neutrophiles a montré que le traitement par AMX+flagelline stimule une augmentation significative de la fluorescence pHrodo alors que la proportion de cellules pHrodo$^+$ n'est pas affectée. En revanche, nous n'avons pas observé d'effet significatif de la flagelline sur la production de ROS par les neutrophiles (**Figure supplémentaire 3**). En conclusion, ces résultats indiquent que la phagocytose associée aux neutrophiles, mais pas la production de ROS, est corrélée à l'efficacité du traitement combiné.

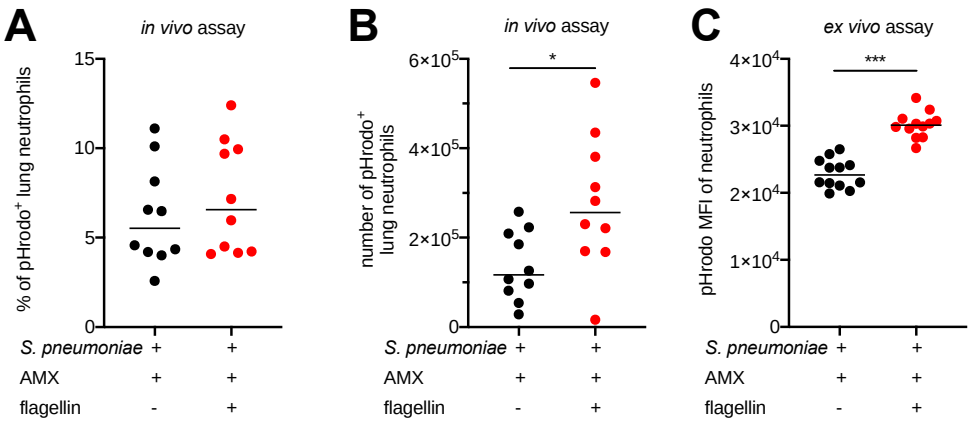


Figure 6. Le traitement par la flagelline augmente la capacité phagocytaire des phagocytes des voies respiratoires. Des souris BALB/c (n=10-12 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par 2× 10^6 *S. pneumoniae*, et traitées 12 h après l'infection par l'administration i.g. d'AMX combinée à l'administration i.n. de flagelline (AMX+flagelline) ou de PBS (AMX). **(A-B)** 4 heures après le traitement, les souris ont reçu une injection i.n. de ~ 9× 10^6 particules pHrodo *E. coli* inactivées dans 30 µl de PBS et les poumons perfusés ont été prélevés 1 heure plus tard. Les suspensions cellulaires ont ensuite été préparées et marquées pour la cytométrie en flux. Le pourcentage (**A**) et le nombre (**B)** de neutrophiles pHrodo$^+$ sont indiqués**.** (**C**) Les LBA ont été prélevés 4 heures après le traitement. 2× 10^5 cellules ont été incubées dans des microplaques avec 3× 10^6 particules pHrodo conjuguées pendant 1 h à 37°C, puis marquées pour l'analyse par cytométrie en flux. L'intensité moyenne de la fluorescence de pHrodo dans les neutrophiles est indiquée. Les différences statistiques entre les groupes AMX+flagelline et AMX ont été analysées par le test de Mann-Whitney (* : p<0,05, *** : p<0,001).

Les traitements régulent différemment les populations de neutrophiles des voies respiratoires

Pour mieux comprendre le comportement des neutrophiles, les cellules des LBA des animaux infectés et traités pendant 4 heures avec AMX ou AMX+flagelline ont été soumises à un scRNA-seq duplex pour capturer le spectre complet des cellules individuelles (**Figure 7**). L'analyse des DEG dans l'ensemble de la population de neutrophiles a révélé des profils d'expression distincts correspondant à chaque traitement (**Figure 7A**). L'analyse de l'enrichissement des gènes a révélé que les processus biologiques liés à la migration, à l'activation et à la phagocytose des neutrophiles sont significativement enrichis en réponse au traitement par AMX+flagelline (**Figure 7B**). D'autre part, les processus généraux tels que la régulation de la réponse immunitaire et la signalisation apoptotique étaient prédominants dans les cellules traitées par AMX. Comme le montre la **Figure 7C-D**, l'analyse de clustering a permis d'identifier 7 populations, annotés de Neutro_0 à Neutro_6, présentant des profils transcriptomiques distincts, en accord avec des études antérieures [26-29]. Au-delà du doublement

approximatif des neutrophiles du LBA (**Figure supplémentaire 2**), la proportion des populations de neutrophiles différait nettement entre les traitements (**Figure 7E**). Le traitement AMX+flagelline a entraîné une multiplication par 5 à 40 des populations Neutro_0 et Neutro_2. Neutro_0 était caractérisé par l'expression de gènes impliqués dans le recrutement et la migration des cellules (par exemple, *Cxcl3* et *Cass4*). Neutro_2 présentait un profil antibactérien avec une forte expression de gènes tels que *Retnlg*, codant pour le précurseur gamma de la résistine, et de gènes de granules tels que *Ngp* et *Mmp8* (**Tableau supplémentaire 4)**. Le nombre global de Neutro_1 avec une signature anti-inflammatoire et antioxydante (*Zc3h12c* et *Gclm*), de Neutro_3, qui est associé à la réponse à l'interféron de type I (*Ifit2*, *Ifit3, Ifit3b* et *Cmpk2*), et de Neutro_4 était légèrement modifié. Enfin, Neutro_6, qui est marqué par une forte expression du gène de la métallothionéine *Mt1*, s'est avéré hautement spécifique du traitement AMX+flagelline. Bien que les traitements aient modifié le ratio et le nombre de populations de neutrophiles, ils ont également été associés à des changements dans le profil transcriptionnel. En particulier, en réponse au traitement AMX+flagelline, les cellules Neutro_3 ont une expression augmentée des gènes impliqués dans la production de ROS et la phagocytose (**Figure 7F**). Ces résultats indiquent que la thérapie combinée AMX et flagelline n'augmente pas seulement l'expansion des populations spécifiques de neutrophiles, mais aussi les fonctions antibactériennes.

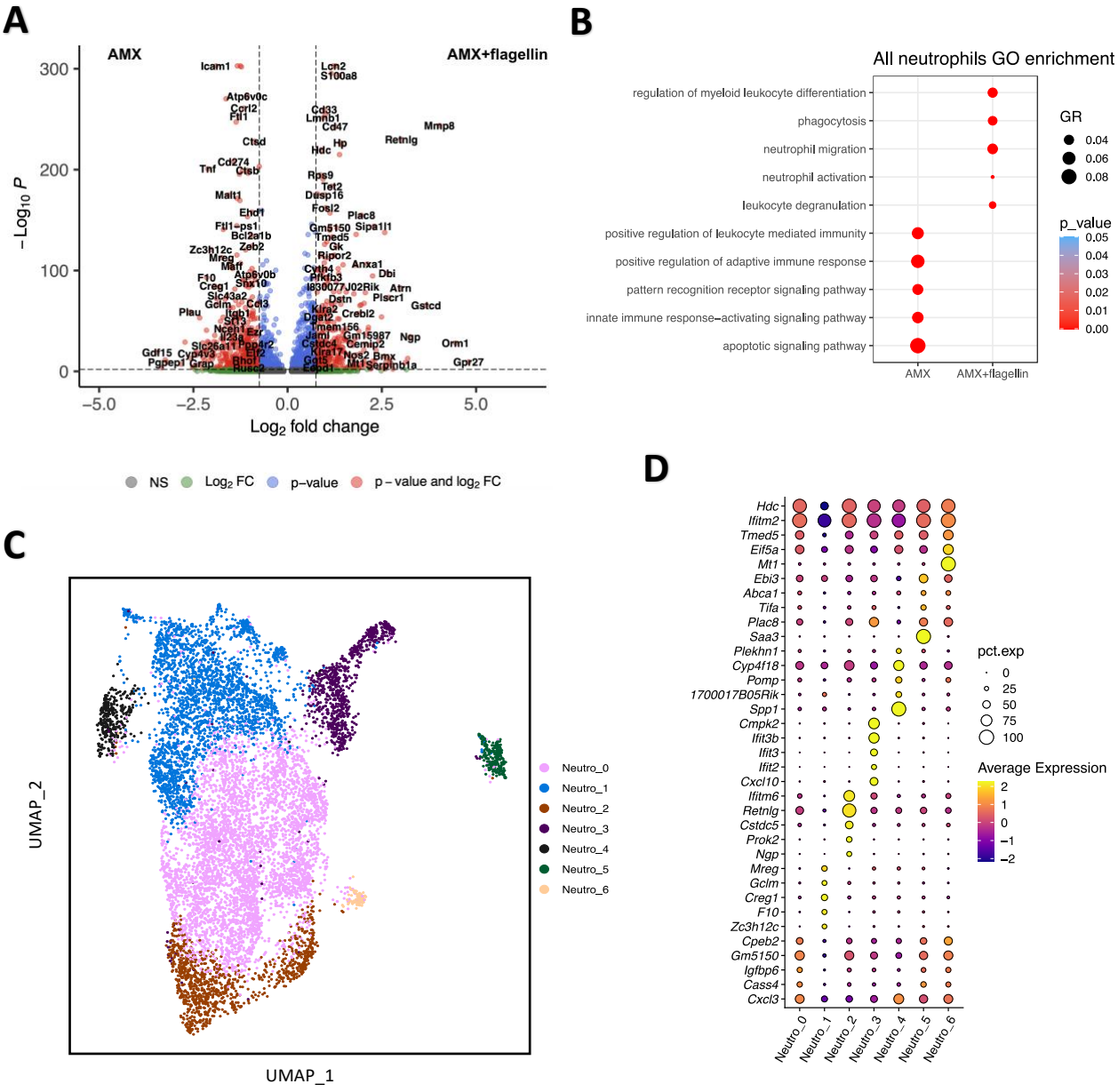

A
AMX
AMX+flagellin
−Log10 P
Log2 fold change
NS
Log2 FC
p−value
p − value and log2 FC
B
All neutrophils GO enrichment
regulation of myeloid leukocyte differentiation
phagocytosis
neutrophil migration
neutrophil activation
leukocyte degranulation
positive regulation of leukocyte mediated immunity
positive regulation of adaptive immune response
pattern recognition receptor signaling pathway
innate immune response−activating signaling pathway
apoptotic signaling pathway
GR
p_value
C
UMAP_2
UMAP_1
Neutro_0
Neutro_1
Neutro_2
Neutro_3
Neutro_4
Neutro_5
Neutro_6
D
pct.exp
Average Expression
E
Proportion of cells
F
Neutro_3 GO enrichment
regulation of reactive oxygen species biosynthetic process
positive regulation of phagocytosis
phagocytosis, engulfment
neutrophil migration
neutrophil activation
regulation of type I interferon production
positive regulation of innate immune response
positive regulation of inflammatory response to antigenic stimulus
innate immune response−activating signaling pathway
cellular response to interferon−beta

Figure 7. Les populations de neutrophiles sont mobilisées de manière différentielle lors du traitement de la pneumonie à pneumocoques. Des souris BALB/c (n=4 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par 2×10^6 *S. pneumoniae*, et traitées 12 h après l'infection par administration i.g. d'AMX combinée à l'administration i.n. de flagelline (AMX+flagelline) ou de PBS (AMX). Les cellules du LBA ont été prélevées 4h après le traitement et mélangées à un ratio de 1/1 pour le scRNA-seq duplex. **(A)** Volcano plot identifiant les DEG et **(B)** Dot plot montrant l'ontologie des gènes (GO) entre les conditions de traitement dans l'ensemble de la population de neutrophiles. **(C)** Représentation de l'analyse des populations de neutrophiles par l'approximation et la projection d'un manifold uniforme (UMAP). **(D)** Dot plot montrant l'expression des 5 principaux DEG pour chaque groupe de neutrophiles. **(E)** Proportions de chaque population de neutrophiles en fonction du traitement. **(F)** Dot plot montrant l'analyse GO du groupe Neutro_3.

Matériel supplémentaire

Préparation des échantillons pour l'analyse protéomique

Pour l'analyse protéomique, les LBA (n=3 par groupe et par temps) ont été obtenus par trois injections intratrachéales de 1 ml de PBS contenant des inhibiteurs de protéase (cOmpleteTM, Sigma-Aldrich) et conservés à -20°C. Le mucus a été digéré par l'addition de 1 µg/mL de DNase I et de 1 mM de dithiothréitol (DTT). La quantification des protéines totales a été déterminée par la méthode colorimétrique de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Les protéines du LBA ont ensuite été concentrées par précipitation avec de l'acide trichloracétique à 10% sur de la glace pendant 30 minutes, lavées deux fois avec 500 µL d'acétone puis remises en suspension dans un tampon d'électrophorèse (Laemmli, Sigma-Aldrich) + 10% DTT et stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

Analyse protéomique par spectrométrie de masse

Les échantillons de protéines ont été fractionnés sur un gel SDS-PAGE à 10 % d'acrylamide. Le gel a été brièvement coloré avec du bleu de Coomassie, et trois bandes couvrant l'ensemble de l'électrophorèse ont été coupées et digérées par la trypsine à un ratio 1/50 comme décrit précédemment [38]. La LC-MS/MS a été réalisée à l'aide du système UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) comme décrit précédemment [32, 39]. Les peptides ont été fractionnés sur une colonne C18 (PepMap100 RSLC, Thermo Fisher Scientific). Le piégeage a été réalisé pendant 4 min à 5 µL/min, avec le solvant A (98% H2O, 2% acétonitrile et 0,1% acide formique). Les peptides ont été élués à l'aide des solvants A (0,1% d'acide formique dans l'eau) et B (0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile) à un débit de 300 nL/min. Le gradient de séparation était de 3 min à 5% B, 40 min de 5 à 30% B, 5 min à 80% B. Les peptides élués de la colonne C18 ont été analysés par les instruments Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). La tension de l'électrospray était de 1,9 kV et la température du capillaire de 275 °C. Des scans MS complets ont été acquis dans l'analyseur de masse Orbitrap sur la gamme *m/z* 400-1200 avec une résolution de 70 000 (m/z 200). La valeur cible était de 3,00E+06. Quinze pics les plus intenses avec un état de charge entre 2 et 5 ont été fragmentés dans la cellule de dissociation activée par collision à plus haute énergie avec une énergie de collision normalisée de 27 %, et le spectre de masse en tandem a été acquis dans l'analyseur de masse Orbitrap avec une résolution de 17 500 (m/z 200). La valeur cible était de 1,00E+05. Le

seuil de sélection des ions était de 5,0E+04 comptes, et les temps d'accumulation d'ions maximums autorisés étaient de 250 ms pour les scans MS complets et de 100 ms pour le spectre de masse en tandem. L'exclusion dynamique a été fixée à 30 s. Les données brutes collectées pendant les analyses nanoLC-MS/MS ont été traitées et converties au format *.mgf peak list avec le logiciel Proteome Discoverer 1.4 (ThermoFisher Scientific). Les données MS/MS ont été interprétées à l'aide du moteur de recherche Mascot (version 2.4.0, Matrix Science, London, UK) installé sur un serveur local. Les recherches ont été effectuées avec une tolérance sur la mesure de masse de 0,2 Da pour les ions précurseurs et de 0,2 Da pour les ions fragments, par rapport à une base de données composite cible-leurre (80250*2 entrées totales) construite avec une base de données UniProtKB de *Mus musculus* (taxonomie 10090, février 2017, 79589 entrées) fusionnée avec les séquences de flagelline $FliC_{\Delta 174\text{-}400}$, de trypsine recombinante et de contaminants classiques (119 entrées). La carbamidométhylation de la cystéine, l'oxydation de la méthionine, l'acétylation N-terminale de la protéine et la propionamidation de la cystéine ont été recherchées comme modifications variables. Jusqu'à un clivage manqué par la trypsine a été autorisé.

Pour chaque échantillon, les peptides ont été filtrés en fonction du seuil fixé pour les occurrences de protéines avec 1 ou plusieurs peptides de plus de 7 résidus et des scores d'ions > 15. Seuls les peptides ayant un taux de fausse découverte < 2 % ont été pris en compte pour l'analyse (en utilisant le score Mascot Modified Mudpit). Les spectres ont été quantifiés avec Proline 2.0. Les données ont été déposées au ProteomeXchange Consortium via le dépôt PRIDE [40] avec l'identifiant du jeu de données (numéro en attente).

L'analyse a été effectuée en utilisant le nombre de spectres correspondant à des peptides spécifiques d'une protéine donnée, normalisé par rapport au nombre total de spectres de l'échantillon. Le nombre moyen de spectres normalisés n'a été calculé que lorsque des spectres ont été détectés dans deux ou trois réplicats sur trois. Lorsque des spectres spécifiques d'une protéine n'ont pas été détectés ou ont été détectés dans un des trois réplicats biologiques, ou si le nombre moyen de spectres était <1, la valeur a été fixée à 1 pour le calcul du rapport. Le rapport du facteur multiplicatif a été calculé pour chaque protéine comme le rapport entre les groupes traités par AMX+flagelline et AMX et les groupes infectés à chaque temps ou entre le groupe traité par flagelline aux différents temps et le groupe non traité pour les animaux naïfs.

Quantification de la production de ROS par les phagocytes

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été évaluée à l'aide du réactif CellROX Deep Red (Thermo Fisher Scientific) et de la cytométrie en flux conformément aux instructions du fabricant. Brièvement, 2×10^5 cellules du LBA ont été incubées dans du RPMI 1640 supplémenté avec 2% de SVF sans ou avec l'inducteur ROS tert-butyl hydroperoxyde (TBHP, 400 μM) à 37°C pendant 1 h. Ensuite, le réactif CellROX (500 nM) a été ajouté et les cellules ont été incubées à 37°C pendant 30 min. Après les lavages, les cellules ont été marquées avec des anticorps appropriés pour identifier les phagocytes. Comme contrôle de spécificité, les cellules ont été incubées avec l'inhibiteur N-acétyl-cystéine (1 mM) pendant 30 minutes à 37°C avant le traitement avec le TBHP. L'analyse de l'intensité médiane de fluorescence (MFI) fournit une évaluation semi-quantitative de la production de ROS. Le réactif SYTOX Blue a été ajouté aux échantillons 15 min avant la cytométrie en flux pour exclure les cellules mortes de l'analyse.

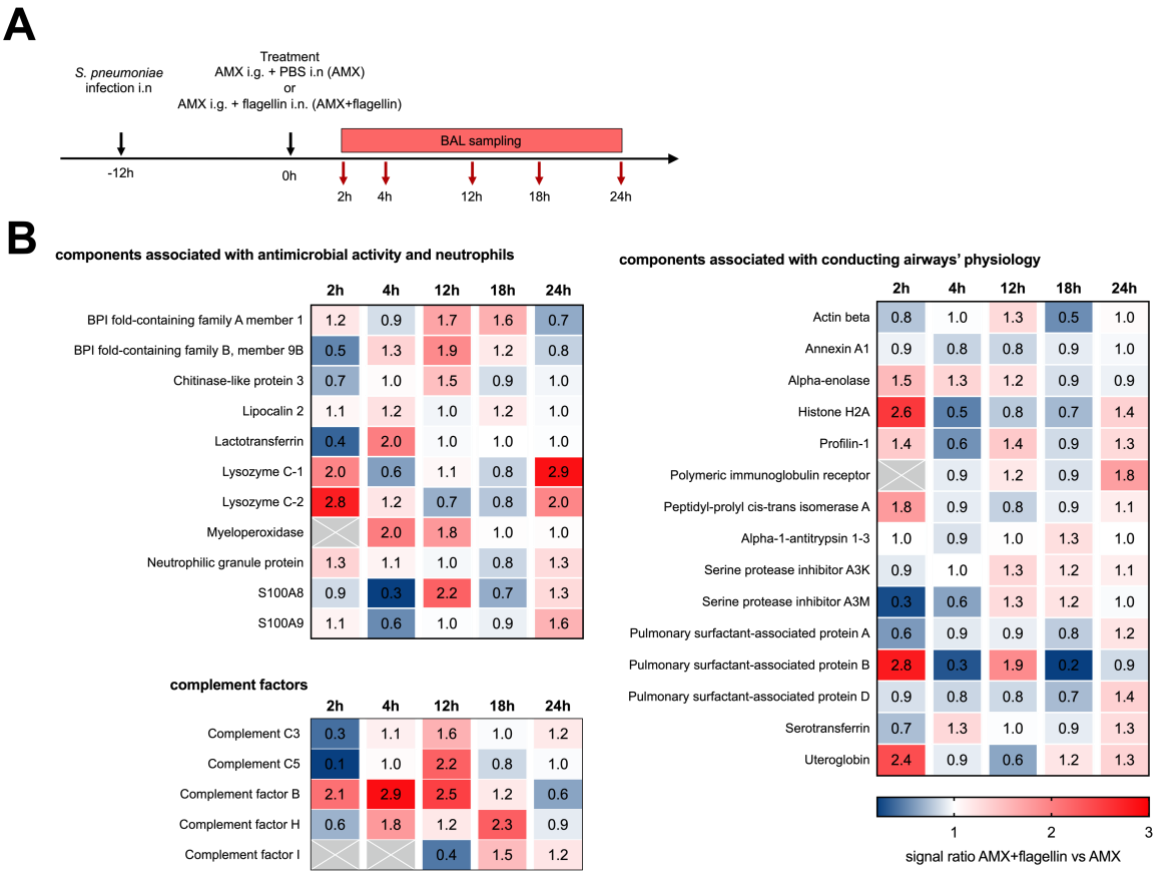


Figure supplémentaire 1. Analyse protéomique de la réponse pulmonaire induite par la flagelline des lavages des voies aériennes dans la pneumonie à pneumocoques et chez les animaux naïfs (A) Des souris BALB/c (n=3 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par 2×10^6 *S. pneumoniae*, et traitées 12 h après l'infection par l'administration i.g. d'AMX combinée à l'administration i.n. de flagelline (AMX+flagelline) ou de PBS (AMX). Des échantillons de LBA ont été prélevés 2, 4, 12, 18 et 24 heures après le traitement. Après concentration des protéines par l'acide trichloracétique, une analyse protéomique a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse pour la détection des peptides spécifiques des protéines. **(B)** Quantification relative des peptides liés à l'activité antimicrobienne et aux neutrophiles, aux facteurs du complément et à la physiologie des voies respiratoires. Les données sont exprimées sous forme de heatmap représentant le rapport de signal entre le nombre moyen de peptides spécifiques dans le groupe AMX+flagelline / nombre moyen de peptides spécifiques dans le groupe AMX à chaque temps. Les cases vides indiquent que la protéine n'a été détectée dans aucun ou un seul des 3 échantillons.

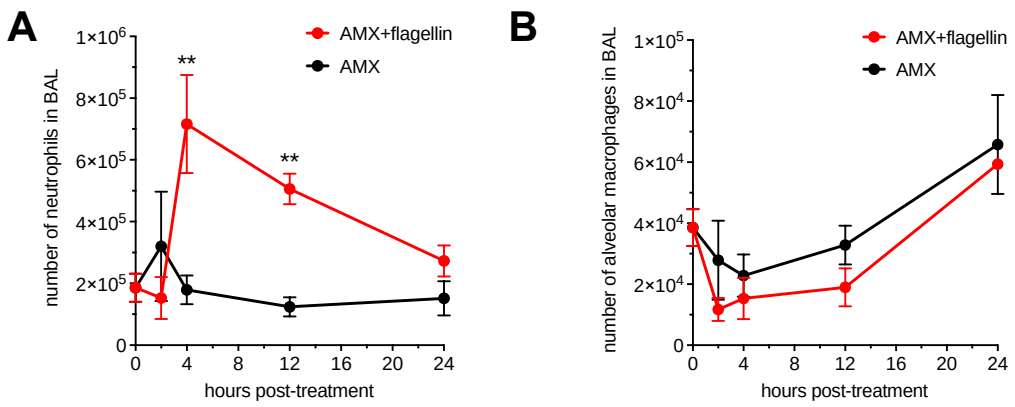


Figure supplémentaire 2. Dynamique de la population de cellules phagocytaires des voies aériennes de souris infectées après traitement par la flagelline. Des souris BALB/c (n=7-8 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par 2× 10^6 *S. pneumoniae*, et traitées 12 heures après l'infection par l'administration i.g. d'AMX combinée à l'administration i.n. de flagelline (AMX+flagelline) ou de PBS (AMX). Les LBA ont été prélevés à différents temps après le traitement, et les neutrophiles **(A)** et les macrophages alvéolaires **(B)** ont été analysés par cytométrie en flux. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. Veuillez noter que les monocytes inflammatoires n'ont pas été détectés. Les différences statistiques entre les groupes ont été analysées par un test ANOVA à deux facteurs *(** $p < 0,01$)*.

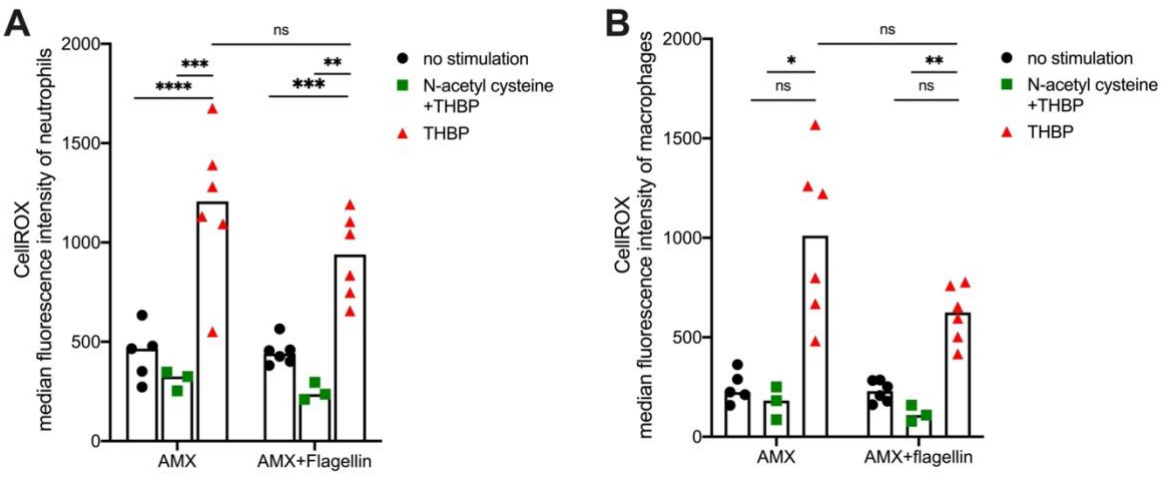


Figure supplémentaire 3. Production d'espèces réactives de l'oxygène par les neutrophiles et les macrophages alvéolaires. Des souris BALB/c (n=6 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par 2×10^6 *S. pneumoniae*, et traitées 12 h après l'infection par administration i.g. d'AMX combinée à l'administration i.n. de flagelline (AMX+flagelline) ou de PBS (AMX). Les cellules du LBA ont été prélevées 4 heures après le traitement, incubées pendant 1 heure à 37°C avec des réactifs spécifiques pour la détection des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et analysées par cytométrie en flux après coloration avec des marqueurs de surface spécifiques. Intensité médiane de fluorescence du réactif spécifique des ROS dans les neutrophiles **(A)** et les macrophages alvéolaires **(B)**. Les différences statistiques entre les groupes ont été analysées par un test ANOVA à facteur unique (test de Kruskal-Wallis avec post-test de Dunn pour les comparaisons multiples) (* : $p < 0,05$, **:$p<0,01$,***:$p<0,001$

Discussion

Dans cette étude, nous mettons en évidence le rôle principal des neutrophiles des voies respiratoires dans l'effet thérapeutique de la flagelline, un stimulant de l'immunité, combinée à des antibiotiques contre la pneumonie à pneumocoques. L'analyse à haut débit a démontré que la réponse immunitaire pulmonaire est associée à l'activation des phagocytes, i.e., des neutrophiles et des monocytes inflammatoires, et à leur infiltration dans les poumons. Cependant, les neutrophiles se sont avérés être les acteurs clés de la protection médiée par la flagelline. L'augmentation du nombre de neutrophiles des voies respiratoires ainsi que leur localisation focale dans les zones vasculaires, bronchiques et alvéolaires sont les principales caractéristiques du traitement combiné. Enfin, l'analyse scRNA-seq suggère que des groupes spécifiques de neutrophiles des voies respiratoires sont mobilisés de manière différentielle et orientés vers un profil transcriptomique de recrutement, d'activation et antibactérien, contribuant ainsi à l'efficacité du traitement par la flagelline.

Cette étude corrobore l'augmentation du nombre de neutrophiles après un traitement à la flagelline [17, 18] et vise à disséquer davantage les facteurs primaires contribuant à son efficacité. Nos analyses ont indiqué une augmentation des composants des granules des neutrophiles et des protéines du système du complément au niveau respiratoire, ainsi qu'une activation des fonctions antimicrobiennes dans les voies respiratoires après traitement par la flagelline. Nous avons également démontré une régulation significative des gènes et des voies de signalisation liés à l'activation et au recrutement des granulocytes dans les poumons, ainsi qu'à la maturation des phagosomes, comme l'a montré l'analyse par puce à ADN. Ce traitement est associé à une plus grande capacité phagocytaire des neutrophiles. Nous avons émis l'hypothèse que l'efficacité du traitement ne dépend pas uniquement du nombre de neutrophiles infiltrant le tissu respiratoire, mais également de l'émergence de populations spécifiques de neutrophiles. Le profilage du transcriptome en cellule individuelle a révélé que la flagelline favorise les fonctions antibactériennes des neutrophiles. Parmi les sept groupes, les populations de neutrophiles Neutro_0, Neutro_2 et Neutro_4, qui portent une telle signature, ont été élargies. La reprogrammation médiée par la flagelline était également évidente au sein de groupes spécifiques (tels que Neutro_3), soulignant son rôle dans le renforcement des fonctions antibactériennes des neutrophiles. Les investigations futures permettront de définir les contributions spécifiques à l'activité thérapeutique de chaque population de neutrophiles ; ceci

peut être réalisé en analysant étroitement des fonctions clés telles que la phagocytose ou la production de ROS.

L'hétérogénéité des neutrophiles a été démontrée dans divers contextes physiopathologiques, tant chez la souris que chez l'homme [27, 28, 30, 31]. Xie *et al.* ont précédemment identifié des populations de neutrophiles similaires, observant des transitions dynamiques entre ces populations dans divers tissus et lors de l'activation cellulaire déclenchée par une infection bactérienne, sans impact sur l'hétérogénéité globale [27]. Parmi ces populations, Neutro_0 est associé aux neutrophiles immatures, tandis que Neutro_2 et Neutro_5 sont liés aux neutrophiles matures, tels qu'on les trouve dans la moelle osseuse et le sang. Comme prévu, les neutrophiles matures présentent des niveaux d'expression élevés de gènes associés à des fonctions antibactériennes. L'impact d'un traitement combiné sur les neutrophiles est observé localement, mais il existe de nombreuses preuves que la granulopoïèse ou les progéniteurs de cellules hématopoïétiques sont altérés par des signaux environnementaux, des antibiotiques ou la flagelline [27, 29, 31-33]. Il est essentiel de noter que le profilage des neutrophiles s'est concentré sur les cellules des voies aériennes. Cependant, les neutrophiles associés aux tissus sont modifiés par le traitement combiné amoxicilline et flagelline. L'analyse transcriptomique spatiale pourrait être utile, comme l'ont montré Garrido-Trigo *et al.* pour dévoiler les réseaux d'interaction impliquant les neutrophiles des tissus, les bactéries et d'autres cellules structurelles et immunitaires [34]. En effet, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour définir les trajectoires des neutrophiles associés à la moelle osseuse et aux poumons.

La réponse pulmonaire à l'administration respiratoire de flagelline chez les animaux infectés est comparable aux études précédentes chez les animaux non infectés [14, 35]. La dynamique est immédiate et transitoire et est associée à une régulation par rétroaction négative qui permet de rétablir rapidement l'homéostasie. Ce schéma soutient l'idée que le renforcement de l'immunité innée respiratoire par l'intermédiaire du récepteur TLR5 pendant la pneumonie ne provoque pas d'inflammation respiratoire et systémique prolongée. En accord avec l'étude histologique de Porte *et al.* [18] les traitements n'ont pas exacerbé l'inflammation ni endommagé l'architecture pulmonaire. Des groupes de neutrophiles susceptibles de contribuer à la résolution du problème grâce à leurs profils antioxydants et anti-inflammatoires ont également été identifiés. Par exemple, le traitement par la flagelline a exclusivement favorisé l'émergence de la population Neutro_6 qui exprime des gènes ayant une activité antioxydante, comme le gène de la méthalothionéine *Mt1*. Il a été démontré que les ROS induisent la production de

métallothionéines afin d'éteindre l'activité des ROS et de protéger contre les dommages oxydatifs [36, 37]. L'ensemble de ces données suggère que la modulation de l'inflammation et de l'atténuation des dommages tissulaires est induite par la flagelline.

En conclusion, l'administration intranasale de flagelline combinée avec l'amoxicilline provoque une réponse immunitaire innée rapide et multifactorielle, impliquant les neutrophiles en tant qu'effecteurs clés de la protection. Notre étude suggère que le ciblage de l'expansion et de l'activation fonctionnelle de populations spécifiques de neutrophiles pourrait constituer une nouvelle stratégie immunothérapeutique. En outre, nos données enrichissent les connaissances actuelles sur les neutrophiles afin de promouvoir une meilleure compréhension de leur diversité et de leurs fonctions.

Références

1. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. Cell **2020**; 180(6): 1044-1066.

2. Iwasaki A, Foxman EF, Molony RD. Early local immune defences in the respiratory tract. Nat Rev Immunol **2017**; 17(1): 7-20.

3. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet **2022**; 399(10325): 629-655.

4. Owen AM, Fults JB, Patil NK, Hernandez A, Bohannon JK. TLR Agonists as Mediators of Trained Immunity: Mechanistic Insight and Immunotherapeutic Potential to Combat Infection. Front Immunol **2020**; 11: 622614.

5. Vijayan A, Rumbo M, Carnoy C, Sirard JC. Compartmentalized Antimicrobial Defenses in Response to Flagellin. Trends Microbiol **2018**; 26(5): 423-435.

6. Jarchum I, Liu M, Lipuma L, Pamer EG. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute Clostridium difficile colitis. Infect Immun **2011**; 79(4): 1498-1503.

7. 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(4): 534-543.

8. Kumar A, Gao N, Standiford TJ, Gallo RL, Yu FS. Topical flagellin protects the injured corneas from Pseudomonas aeruginosa infection. Microbes Infect **2010**; 12(12-13): 978-989.

9. Munoz N, Van Maele L, Marques JM, Rial A, Sirard JC, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection. Infect Immun **2010**; 78(10): 4226-4233.

10. 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(12): 8280-8285.

11. Yu FS, 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(2): 1142-1149.

12. Janot L, Sirard JC, 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(6): 1587-1596.

13. 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**; 7(3): 489-500.

14. 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**; 33(29): 3331-3341.

15. Quinton LJ, Walkey AJ, Mizgerd JP. Integrative Physiology of Pneumonia. Physiol Rev **2018**; 98(3): 1417-1464.

16. Costa C, Sirard JC, Gibson PS, Veening JW, Gjini E, Baldry M. Triggering Toll-Like Receptor 5 signaling during pneumococcal superinfection prevents the selection of antibiotic resistance. J Infect Dis **2024**; jiae239.

17. Matarazzo L, Casilag F, Porte R, Wallet F, Cayet D, Faveeuw C et al. Therapeutic Synergy Between Antibiotics and Pulmonary Toll-Like Receptor 5 Stimulation in Antibiotic-Sensitive or -Resistant Pneumonia. Front Immunol **2019**; 10: 723.

18. Porte R, Fougeron D, Munoz-Wolf N, Tabareau J, Georgel AF, 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(10): 6064-6072.

19. Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard JC. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. J Immunol **2008**; 181(3): 2036-2043.

20. Stoeckius M, Zheng S, Houck-Loomis B, Hao S, Yeung BZ, Mauck WM, 3rd et al. Cell Hashing with barcoded antibodies enables multiplexing and doublet detection for single cell genomics. Genome Biol **2018**; 19(1): 224.

21. Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, Satija R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. Nat Biotechnol **2018**; 36(5): 411-420.

22. McGinnis CS, Murrow LM, Gartner ZJ. DoubletFinder: Doublet Detection in Single-Cell RNA Sequencing Data Using Artificial Nearest Neighbors. Cell Syst **2019**; 8(4): 329-337 e324.

23. Hafemeister C, Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. Genome Biol **2019**; 20(1): 296.

24. Zappia L, Oshlack A. Clustering trees: a visualization for evaluating clusterings at multiple resolutions. Gigascience **2018**; 7(7).

25. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. Nat Commun **2019**; 10(1): 1523.

26. Siwicki M, Kubes P. Neutrophils in host defense, healing, and hypersensitivity: Dynamic cells within a dynamic host. J Allergy Clin Immunol **2023**; 151(3): 634-655.

27. Xie X, Shi Q, Wu P, Zhang X, Kambara H, Su J et al. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection. Nat Immunol **2020**; 21(9): 1119-1133.

28. Zilionis R, Engblom C, Pfirschke C, Savova V, Zemmour D, Saatcioglu HD et al. Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. Immunity **2019**; 50(5): 1317-1334 e1310.

29. Montaldo E, Lusito E, Bianchessi V, Caronni N, Scala S, Basso-Ricci L et al. Cellular and transcriptional dynamics of human neutrophils at steady state and upon stress. Nat Immunol **2022**; 23(10): 1470-1483.

30. Wigerblad G, Cao Q, Brooks S, Naz F, Gadkari M, Jiang K et al. Single-Cell Analysis Reveals the Range of Transcriptional States of Circulating Human Neutrophils. J Immunol **2022**; 209(4): 772-782.

31. Grieshaber-Bouyer R, Radtke FA, Cunin P, Stifano G, Levescot A, Vijaykumar B et al. The neutrotime transcriptional signature defines a single continuum of neutrophils across biological compartments. Nat Commun **2021**; 12(1): 2856.

32. Mondeme M, Zeroual Y, Soulard D, Hennart B, Beury D, Saliou JM et al. Amoxicillin treatment of pneumococcal pneumonia impacts bone marrow neutrophil maturation and function. J Leukoc Biol **2024**; 115(3): 463-475.

33. Zhang B, Oyewole-Said D, Zou J, Willliams IR, Gewirtz AT. TLR5 signaling in murine bone marrow induces hematopoietic progenitor cell proliferation and aids survival from radiation. Blood Adv **2017**; 1(21): 1796-1806.

34. Garrido-Trigo A, Corraliza AM, Veny M, Dotti I, Melon-Ardanaz E, Rill A et al. Macrophage and neutrophil heterogeneity at single-cell spatial resolution in human inflammatory bowel disease. Nat Commun **2023**; 14(1): 4506.

35. 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(3): 493-503.

36. Dai H, Wang L, Li L, Huang Z, Ye L. Metallothionein 1: A New Spotlight on Inflammatory Diseases. Front Immunol **2021**; 12: 739918.

37. Ghoshal K, Majumder S, Zhu Q, Hunzeker J, Datta J, Shah M et al. Influenza virus infection induces metallothionein gene expression in the mouse liver and lung by overlapping but distinct molecular mechanisms. Mol Cell Biol **2001**; 21(24): 8301-8317.

38. Miguet L, Bechade G, Fornecker L, Zink E, Felden C, Gervais C *et al.* Proteomic analysis of malignant B-cell derived microparticles reveals CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *J Proteome Res* **2009**; 8(7): 3346-3354.

39. Aruci E, Saliou JM, Ferveur JF, Briand L. Proteomic Characterization of Drosophila melanogaster Proboscis. *Biology (Basel)* **2022**; 11(11).

40. Perez-Riverol Y, Bai J, Bandla C, Garcia-Seisdedos D, Hewapathirana S, Kamatchinathan S *et al.* The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res* **2022**; 50(D1): D543-D552.

Travaux complémentaires

Ces travaux mettent en évidence les neutrophiles comme effecteurs principaux de la protection médiée par la thérapie combinée amoxicilline plus flagelline. La flagelline induit une mobilisation de différentes populations de neutrophiles à des localisations particulières du poumon, mais aussi une reprogrammation de ces cellules vers des profils transcriptomiques spécifiques. Ces profils ont été réalisés sur des neutrophiles des voies aériennes, i.e., isolés de lavages broncho-alvéolaires. Pour aligner ces observations avec les analyses immunohistologiques et ainsi avec les neutrophiles du parenchyme pulmonaire, une étude de transcriptomique spatiale a été engagée. L'objectif est encore de comparer le tissu pulmonaire de souris infectées par *S. pneumoniae* et traitées par AMX seule ou la thérapie combinée avec la flagelline. Cette étude devrait permettre de valider les populations de neutrophiles observées dans l'étude de scRNAseq et de déterminer si ces groupes sont associés à des localisations spécifiques dans le parenchyme pulmonaire.

Un autre axe de recherche concerne l'identification du compartiment cellulaire impliqué dans la signalisation TLR5 et l'effet protecteur induit par la flagelline. A l'homéostasie, les cellules épithéliales respiratoires sont importantes dans la détection et la réponse à la flagelline (Janot et al., 2009). La nature des cellules épithéliales engagées dans la réponse reste encore à préciser. De plus, d'autres cellules, telles que les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques et les neutrophiles expriment le récepteur TLR5 et peuvent participer à l'activité générale de la flagelline. Notre hypothèse de travail est qu'en contexte infectieux, l'effet de la flagelline opère principalement au travers des cellules épithéliales respiratoires. Pour explorer cette hypothèse, la contribution des différentes populations cellulaires a donc été étudiée. Des souris transgéniques chez lesquelles le gène *Tlr5* a été éliminé grâce au système Cre-Lox dans certaines populations cellulaires ont été générées :

- dans les souris $Tlr5^{\Delta DC/AM}$ ($Tlr5^{flox/flox}$ x CD11c-Cre), les cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires ne répondent plus à la flagelline
- dans les souris $Tlr5^{\Delta PMN/AM}$ ($Tlr5^{flox/flox}$ x LysM-Cre fournies par le Dr David Dombrowicz, Lille), *Tlr5* est inactivé dans les macrophages alvéolaires et les neutrophiles
- dans les souris $Tlr5^{\Delta EC}$ ($Tlr5^{flox/flox}$ x CC10-Cre fournies par le Dr Tom van der Poll, Amsterdam), les cellules épithéliales ne répondent plus à la flagelline.

Les souris contrôle sont les animaux *Tlr5*$^{flox/flox}$ qui n'expriment pas la recombinase Cre. Les différentes lignées de souris ont été infectées par *S. pneumoniae* dans le modèle de surinfection grippale précédemment décrit. Douze heures post-infection, une administration d'AMX par voie intragastrique associée à l'instillation intranasale de flagelline ou de PBS a été réalisée. Le nombre de bactéries colonisant les poumons est fortement diminué dans des souris traitées par la thérapie combinée amoxicilline plus flagelline, comparé au groupe amoxicilline seul. Cet effet thérapeutique de la flagelline a été observé à la fois pour les souris contrôle et les souris *Tlr5*$^{\Delta DC/AM}$ et *Tlr5*$^{\Delta PMN/AM}$ (**Figure 9A-B**). Ces résultats montent que la protection induite par la flagelline ne nécessite pas la signalisation TLR5 dans les cellules myéloïdes inactivées dans ces modèles transgéniques, à savoir les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Les travaux sur les souris *Tlr5*$^{\Delta EC}$ sont plus délicats à interpréter car l'expérience n'a pas encore été reproduite. Les résultats préliminaires suggèrent que le traitement AMX+flagelline n'est pas plus efficace que le traitement AMX seul dans les animaux où *Tlr5* est inactivé dans les cellules épithéliales respiratoires (**Figure 9C**).

On peut noter que le gène *CC10* qui contrôle l'expression de la recombinase Cre dans les souris *Tlr5*$^{\Delta EC}$ est exprimé par les cellules club, qui ne représentent qu'un type de cellule épithéliale respiratoire au sein du compartiment pulmonaire. L'implication d'autres cellules épithéliales dans la signalisation TLR5 ne peut pas encore être exclus. L'expérience de transcriptomique spatiale en cours pourrait permettre de mieux caractériser les cellules épithéliales et les cellules immunitaires impactées par le traitement flagelline et consolider les observations.

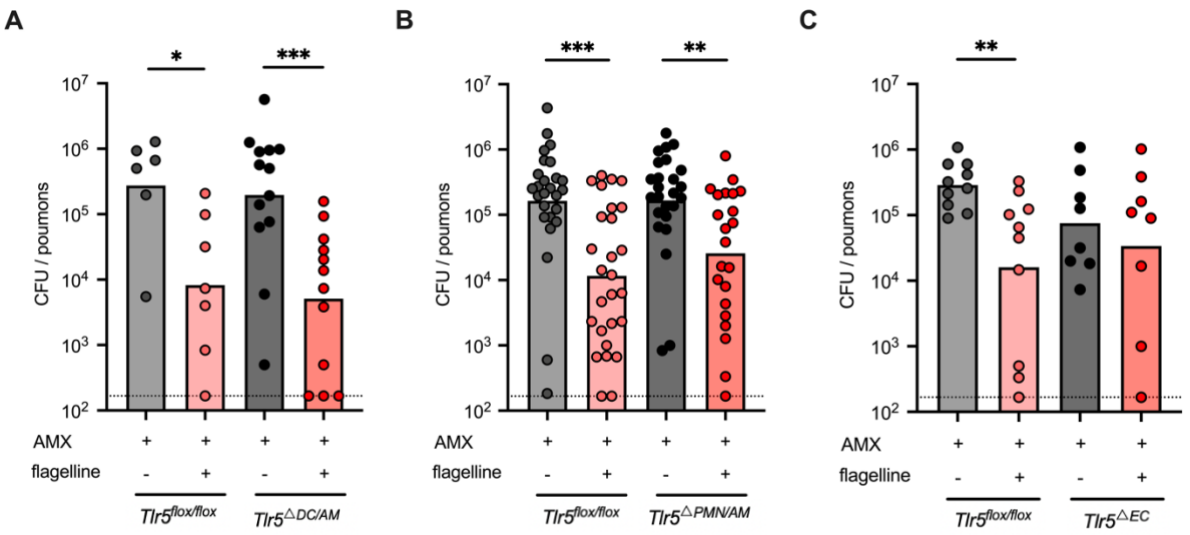


Figure 9. Analyse de la délétion spécifique de *Tlr5* dans les cellules myéloïdes et épithéliales dans l'effet thérapeutique de la flagelline sur la pneumonie à pneumocoque. Des souris transgéniques (n=6-27 par groupe) ont été infectées par voie i.n. par le virus H3N2 suivi 7 jours plus tard par l'inoculation i.n. de 10^5 *S. pneumoniae*, et traitées 12 h après infection par l'administration i.g. d'AMX combinée à l'administration i.n. de flagelline (AMX+flagelline) ou de PBS (-). Les poumons ont été prélevés 12 h après traitement pour dénombrer les bactéries **(A-C)**. Les souris contrôle *Tlr5*$^{flox/flox}$ ont été utilisées avec les souris *Tlr5*$^{\Delta DC/AM}$ **(A)**, les souris *Tlr5*$^{\Delta PMN/AM}$ **(B)** et les souris *Tlr5*$^{\Delta EC}$ **(C)**. Chaque symbole représente un animal, les moyennes géométriques et la limite inférieure de détection sont indiquées par des lignes pleines et pointillées, respectivement. Les différences statistiques entre les groupes AMX+flagelline et AMX ont été analysées par le test de Mann-Whitney (* : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0,001).

Discussion générale et perspectives

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique qui risque de s'aggraver si de nouvelles stratégies thérapeutiques ne sont pas développées. Une approche prometteuse est l'utilisation de composés immunomodulateurs utilisés en association avec des antibiotiques. Dans ce contexte, la stimulation de l'immunité innée par des agonistes de PRR présente différents avantages : (1) la multiplicité des mécanismes immunitaires mobilisés par les agonistes rend improbable le développement de résistance à l'immunité innée, (2) le spectre large d'activité antimicrobienne de l'immunité innée cible une grande variété de pathogènes indépendamment de leurs déterminants de virulence ou de leur résistance aux antibiotiques, (3) les agonistes de PRR sont capables d'augmenter l'efficacité thérapeutique en combinaison avec des antibiotiques.

L'efficacité de la thérapie combinant la flagelline, agoniste de TLR5, à un antibiotique a été montrée dans différents modèles d'infections respiratoires primaires ou de surinfections à pneumocoques, incluant divers sérotypes et des souches avec des résistances variables aux antibiotiques. Différentes hypothèses peuvent expliquer l'activité synergique de la flagelline et de l'antibiotique : (1) l'activité de la flagelline sensibilise les bactéries à l'action de l'antibiotique, (2) l'antibiotique potentialise l'effet antibactérien de l'immunité innée, ou (3) la réponse innée modifie la pharmacocinétique de l'antibiotique. L'action des deux composés peut être séquentielle ou simultanée. Dans le cas de l'amoxicilline, la fragilisation de la paroi bactérienne peut exacerber la dégradation par les effecteurs de l'immunité innée, tels l'opsonisation, la phagocytose ou l'attaque par des ROS, enzymes lytiques ou peptides antimicrobiens. A l'inverse, la déstabilisation des parois bactériennes par l'immunité peut augmenter et accélérer l'entrée des antibiotiques. La flagelline peut aussi modifier la PK/PD, en augmentant la quantité d'antibiotiques biodisponibles, la concentration ou encore la durée d'exposition à des concentrations supérieures à la CMI (T>CMI). De façon notable, l'agoniste immunomodulateur de TLR4, MPLA, modifie la PK de l'AMX, en retardant le pic de concentration et en augmentant la demi-vie de l'antibiotique (Casilag et al., 2021). Dans un modèle d'infection à *S. pneumoniae*, cette observation corrèle avec l'effet thérapeutique supérieur de la combinaison MPLA + AMX à celui de l'antibiotique seul. L'étude comparative de la PK de l'amoxicilline et du cotrimoxazole seuls ou en combinaison avec la flagelline aurait le mérite de déterminer si la signalisation TLR5 épithéliale augmente l'exposition à l'antibiotique et la valeur T>CMI ce qui contribuerait à la protection dans des modèles de

pneumonies à pneumocoques (Matarazzo et al., 2019). De plus, l'utilisation d'antibiotiques dont l'activité repose sur la valeur Cmax de PK permettrait de raffiner les composantes de la thérapie responsables de l'efficacité. Récemment, un effet synergique a été observé entre la gentamicine, un antibiotique concentration-dépendent, et la flagelline administrée en prophylaxie dans un modèle d'infection à *P. aeruginosa* résistant à la gentamicine (Maia et al., 2024). Cela suggère que la flagelline peut avoir un effet synergique sur des antibiotiques aux mécanismes d'action très distincts et dont l'efficacité dépend de facteurs de PK différents. Cela reste néanmoins à valider dans notre modèle d'infection avec l'azithromycine (famille des macrolides) ou une fluoroquinolone, à l'origine de résistances importantes chez les pneumocoques et dont l'efficacité thérapeutique est concentration-dépendante (Eyler and Shvets, 2019).

L'analyse PK/PD des antibiotiques et de la flagelline est un levier majeur pour raffiner le modèle mathématique décrivant la dynamique des populations bactériennes en réponse aux traitements. Les paramètres de PK/PD de l'amoxicilline et de la flagelline du modèle actuel sont considérés comme concomitants. Cependant, ces paramètres sont différents : le pic de concentration sérique de l'amoxicilline est atteint en 10 à 30 minutes après administration, puis décroit très rapidement (demi-vie d'environ 10 min) pour ne plus être détectable après 8 h (Franck et al., 2019; Mondemé et al., 2023). Dans les conditions de notre modèle de co-infection (en surinfection grippale) et avec l'administration de 150 µg d'AMX, le T>CMI est estimée à 6 h pour une souche sensible (CMI_{AMX} = 0,016 µg/ml) et à 1h pour une souche résistante (CMI_{AMX} = 2 µg/ml) (Mondemé et al., 2023). La flagelline après administration intranasale est immédiatement détectée dans les voies aériennes (lavages broncho-alvéolaires) puis sa concentration décline au cours du temps (**article III en annexe**). La flagelline est ainsi totalement dégradée après 24h. De façon remarquable, aucun passage de la flagelline des voies aériennes vers le sérum n'est observé. L'activité immunomodulatrice est en revanche observée durant plus de 24 heures. Les cytokines CCL20 et CXCL2 sont détectées jusqu'à 72 h post administration dans les LBA, tout comme la protéine sérum amyloïde A (SAA) dans le sérum, marqueur de la phase aigüe de l'inflammation. La mesure PK dans le compartiment respiratoire et sanguin de l'amoxicilline en présence de flagelline couplée à l'étude du recrutement des cellules immunitaires et de la production de cytokines/chimiokines, permettra de réviser la nature des paramètres de modélisation et de générer un modèle plus fidèle au traitement.

Le traitement combiné amoxicilline et flagelline montre un effet protecteur lors d'infections avec des souches sensibles ou résistantes à l'amoxicilline et de différents sérotypes (Matarazzo et al., 2019). Il serait intéressant d'étudier l'efficacité de la flagelline sur des bactéries possédant des résistances à d'autres antibiotiques. Au sein du laboratoire nous nous sommes intéressés aux macrolides, une famille d'antibiotiques utilisée en clinique en tant qu'alternative thérapeutique lors de pneumonies à *S. pneumoniae* (Demoré and Charmillon, 2018). Nous avons testé l'effet protecteur de la flagelline en combinaison avec l'érythromycine ou l'azythromycine sur une souche de *S. pneumoniae* résistante. Nous avons néanmoins rencontré des problèmes expérimentaux, la voie d'administration et la solubilité des deux formulations d'antibiotiques ne nous ont pas permis d'atteindre la CMI de la souche bactérienne chez la souris. Ces tests pourraient être poursuivis sur d'autres souches ou avec d'autres formulations.

La combinaison amoxicilline et flagelline permet de diminuer de 200 fois la dose d'antibiotique pour un effet thérapeutique similaire à l'antibiotique seul. Ce résultat est particulièrement intéressant d'un point de vue clinique. Dans nos expériences, des doses sub-thérapeutiques d'antibiotiques sont utilisées, qui miment la mauvaise observance des traitements conduisant à la sélection de souches résistantes ou le traitement d'infections avec une souche résistante. La thérapie combinée dans le modèle de co-infection permet de diminuer la sélection des quelques clones résistants aux antibiotiques présents au sein de la population bactérienne au moment de l'infection. Au contraire, l'antibiotique seul étant sub-thérapeutique pour ces clones favorise leur expansion. Il serait très intéressant de définir la capacité de l'immunité innée à bloquer le mécanisme de transformation qui est à l'origine de l'émergence de résistance chez *S. pneumoniae*. Si le développement de la compétence et la transformation ont été bien étudiés *in vitro* (Gibson et al., 2022; Kurushima et al., 2020; Nishimoto et al., 2022), ce n'est pas le cas *in vivo*. Des études *in vivo* se sont intéressées à l'induction de compétence naturelle chez *S. pneumoniae* (Jim et al., 2022; Lin et al., 2020; Oh et al., 2024), mais peu de modèles de transformation ont été rapportés (Echlin et al., 2023). Un modèle d'infection respiratoire primaire a été mis en place au laboratoire dans le but d'étudier l'effet de la co-thérapie sur le mécanisme de transformation. La transformation naturelle a été observée mais à une fréquence faible. De plus, le modèle d'infection ne cause pas une pneumonie progressive. Pour ces raisons, ces travaux n'ont pas abouti à démontrer une preuve de concept. Il demeure cependant pertinent d'un point de vue clinique d'explorer l'effet des thérapies innovantes sur l'émergence *de novo* des résistances par transformation et recombinaison génétique.

Les traitements antibiotiques sont connus pour éliminer les bactéries pathogènes. Ils induisent cependant des effets indésirables, en particulier sur le microbiote intestinal. Les antibiotiques réduisent dramatiquement certains taxa bactériens, entrainent une baisse de la diversité microbienne, et participent ainsi à la diminution de la résistance à la colonisation par des pathogènes (Levy et al., 2017). Le système immunitaire interagit continuellement avec le microbiote intestinal et vice versa, et contribue ainsi à la maturation, l'équilibre et la résilience de l'immunité et du microbiote. Une dysbiose, une altération du microbiote, est associée au développement de pathologies inflammatoires ou infectieuses telles que des infections de l'intestin ou d'organes distants comme le poumon (Lange et al., 2016; Sencio et al., 2020). Les traitements à base de β-lactamines dont l'amoxicilline induisent une forte dysbiose intestinale (Cox et al., 2014; Muñoz et al., 2024). Le recours à la thérapie combinée amoxicilline et flagelline, qui réduit près de 200 fois la dose d'antibiotique à effet thérapeutique égal, pourrait potentiellement diminuer les perturbations du microbiote intestinal tout en soignant les pneumonies. Il serait intéressant de réaliser une étude métagénomique sur les fèces de souris dans notre modèle afin d'étudier le microbiote intestinal et l'impact du traitement combiné sur ce dernier. Le microbiote nasopharyngé joue un rôle clé dans la protection microbiologique et l'immunité des voies respiratoires (Kumpitsch et al., 2019). Des altérations du microbiote nasopharyngé représentent donc un risque accru de susceptibilité à la colonisation et l'invasion par des bactéries pathogènes ou opportunistes. L'effet de la thérapie combinée sur le microbiote nasopharyngé mérite une attention particulière. Tout d'abord, un antibiotique quelle que soit sa voie d'administration est potentiellement distribué dans les fluides épithéliaux du compartiment nasopharyngé et ainsi peut éliminer des bactéries. La flagelline administrée par voie intranasale stimule l'épithélium respiratoire du compartiment nasal au poumon à produire des médiateurs immunitaires (**article III en annexe**). En retour, ces médiateurs ont la capacité de moduler le microbiote. Dans de futures expériences, l'impact du traitement combiné sur une modification transitoire ou permanente de la flore nasopharyngée reste à évaluer.

Les neutrophiles ont été identifiés comme les effecteurs clé de la protection induite par la thérapie combinée amoxicilline et flagelline en contexte infectieux. L'effet thérapeutique est non seulement associé à un recrutement accru de neutrophiles mais également à des localisations spécifiques dans le tissu pulmonaire. De plus, une reprogrammation vers un profil associé au recrutement, à l'activation cellulaire et aux fonctions antibactériennes a été démontrée. L'analyse de transcriptomique spatiale devrait déterminer si les populations de neutrophiles identifiées dans les voies aériennes ont leur équivalent dans le tissu pulmonaire.

De plus, une corrélation entre chaque population de neutrophile (au travers du profil transcriptomique) et les diverses localisations dans le tissu, i.e., spécifiquement la localisation péribronchique, périvasculaire et alvéolaire pourra être explorée. La co-localisation des bactéries et des neutrophiles dans le tissu pulmonaire est également à caractériser de façon à identifier les populations de neutrophiles potentiellement impliquées dans l'élimination bactérienne. Cette étude pourrait être réalisée à l'aide de bactéries fluorescentes que j'ai caractérisé au laboratoire.

Plusieurs études ont révélé l'hétérogénéité des neutrophiles dans divers tissus et contextes grâce à leur profil transcriptionnel (Grieshaber-Bouyer et al., 2021; Wigerblad et al., 2022; Zilionis et al., 2019). Plus rarement, ces populations ont été phénotypées car des marqueurs spécifiques n'ont pu être définis. De façon remarquable, les travaux de Xie *et al.* ont réussi à discriminer par cytométrie en flux à l'aide des marqueurs de surface CXCR2 ou CXCR4, les différentes populations de neutrophiles identifiées lors de leur analyse scRNAseq (Xie et al., 2020).. L'outil « sc2marker » définit des marqueurs de surface spécifiques aux populations détectées dans des analyses de scRNAseq pour une potentielle utilisation en cytométrie en flux (Li et al., 2022). Le recours à cet outil devrait nous permettre d'identifier des marqueurs spécifiques et de phénotyper les populations de neutrophiles des voies aériennes identifiées lors de notre analyse. Le phénotypage des populations de neutrophiles serait également un levier pour les trier et les isoler afin de réaliser des tests fonctionnels. Par exemple, des expériences seraient réalisées pour corréler le profil transcriptomique, liés à la phagocytose ou la production de ROS, à des populations spécifiques. Nous avons montré que les neutrophiles ont une plus grande capacité phagocytaire induite par le traitement combiné à la flagelline, en accord avec les analyses transcriptionnelles des poumons et protéomiques des lavages broncho-alvéolaires montrant une activation des fonctions antimicrobiennes de ces cellules. Dans ce but, des particules pHrodo, dont la fluorescence augmente avec l'acidité du milieu ont été utilisées pour suivre tout le processus de l'internalisation par phagocytose à la fusion phagolysosomale. Des analyses par microscopie sont néanmoins indispensables afin de mieux capturer les étapes et les mécanismes responsables de l'effet thérapeutique. Entre autres, il faudrait déterminer si l'augmentation de la fluorescence pHrodo des neutrophiles est associée à une acidification plus forte du compartiment phagolysosomal ou à un nombre accru de particules internalisées par neutrophile. Des tests par microscopie confocale ont été initiés au laboratoire, afin de quantifier le nombre de particules internalisées par les neutrophiles des LBA de souris infectées et traitées par l'amoxicilline seule ou la thérapie combinée. Des mises au point sont encore nécessaires

afin de déterminer les meilleurs paramètres (temps d'incubation, ratio cellules : particules). Des tests d'opsonophagocytose seraient un bon moyen d'étudier l'élimination des bactéries par la phagocytose (Dalia et al., 2010). Pour cela des neutrophiles isolés peuvent être incubés *ex vivo* avec des bactéries pré-opsonisées, avant un dénombrement bactérien par dilutions sériées. D'autres mécanismes fonctionnels pourraient être étudiés, tels que la NETose et la dégranulation. La NETose peut être caractérisée par microscopie confocale et la quantification de la MPO ou des histones après isolation et stimulation de neutrophiles *ex vivo* par des composés tels que le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Dumont et al., 2024; Münzer et al., 2021). La dégranulation est le plus souvent évaluée par mesure de la MPO et de l'élastase (Wu et al., 2023). Ces études fonctionnelles déclinées aux populations isolées de neutrophiles seront essentielles pour définir les contributions spécifiques à l'activité thérapeutique de chaque population.

Les neutrophiles maturent dans la moelle osseuse avant de rejoindre la circulation sanguine, où ils patrouillent avant d'être recrutés dans les tissus le plus souvent lors d'inflammation ou d'infection. Notre étude s'est concentrée sur les neutrophiles recrutés dans les voies aériennes, qui sont mobilisés de manière différentielle selon le traitement administré et orientés vers des profils transcriptomiques distincts lors de pneumonies à pneumocoques. Si en condition d'homéostasie, les neutrophiles acquièrent un phénotype et des fonctions spécifiques au sein des tissus (Ballesteros et al., 2020), les stimuli tels que des infections ou des traitements modifient l'ontogénèse au niveau de la moelle osseuse (Montaldo et al., 2022; Xie et al., 2020). Evrard *et al.* ont montré qu'un modèle de sepsis favorise la granulopoïèse avec une prolifération accrue de précurseurs de neutrophiles (Evrard et al., 2018). Le traitement par l'amoxicilline en contexte de pneumonie modifie le profil transcriptomique et protéomique des neutrophiles matures dans la moelle osseuse, en plus d'accroitre leur nombre (Mondemé et al., 2023). Dans notre étude, il serait intéressant de déterminer si le profil distinct des populations de neutrophiles des voies aériennes suite au traitement par la thérapie combinée est acquis dans les tissus ou à une étape en amont. Un phénotypage des neutrophiles présents dans la moelle osseuse et la circulation ainsi que des analyses transcriptomiques par scRNAseq sont des approches à envisager pour capturer le profil et la dynamique de ces cellules.

Ce travail est réalisé dans le contexte du projet européen FAIR, dont le but est de développer une thérapie combinant l'administration par aérosol de flagelline et le traitement antibiotique pour combattre les pneumonies bactériennes. Ce projet translationnel a pour objectif d'évaluer

la flagelline dans une étude clinique de phase I chez l'homme afin de tester son innocuité. Dans ce but, différentes études ont été menées afin d'étudier l'activité, l'efficacité et la tolérance de l'administration respiratoire de flagelline associée à un antibiotique. En plus de notre travail sur les pneumocoques, la thérapie combinant la flagelline à un antibiotique a montré une efficacité accrue par rapport à l'antibiotique seul dans d'autres modèles d'infections respiratoires : (1) lors d'une infection à *P. aeruginosa* multi-résistant aux antibiotiques, la flagelline combinée à la gentamicine permet de réduire la charge bactérienne pulmonaire et d'augmenter la survie des animaux (Maia et al., 2024) et (2) l'association de ceftriaxone et de flagelline induit une augmentation du recrutement de neutrophiles dans les poumons et une baisse de la dissémination systémique de *Klebsiella pneumoniae* multi-résistant aux antibiotiques. De plus, l'administration intranasale et la nébulisation ont été comparées chez la souris car une administration par aérosol est envisagée chez l'homme. La nébulisation de flagelline induit une activation transitoire de l'immunité innée similaire à celle observée par voie intranasale, malgré un faible dépôt de flagelline dans les poumons (**article III en annexe**). Afin de consolider ces données, l'activité et la tolérance de la flagelline a été analysée dans d'autres espèces. La nébulisation de flagelline chez le porc induit une signalisation dans différents compartiments respiratoires associée à (1) l'infiltration de cellules immunitaires au niveau pulmonaire, (2) la production de médiateurs et (3) la régulation de la réponse immunitaire (résultats non publiés). La combinaison de flagelline et d'antibiotique augmente également la clairance bactérienne pulmonaire dans un modèle d'infection à *Actinobacillus pleuropneumoniae* chez le porc par rapport à l'antibiotique seul (résultats non publiés). Des études similaires réalisées chez le macaque montrent que la nébulisation de flagelline induit une activation de l'immunité innée dans le compartiment respiratoire (résultats non publiés). Une bonne tolérance de la flagelline a été observée chez ces différentes espèces, sans effets secondaires. De plus, l'administration de flagelline sur des cellules épithéliales bronchiques primaires humaines infectées par *K. pneumoniae* augmente l'expression de gènes impliqués dans les défenses antibactériennes et la production de médiateurs immunitaires (van Linge et al., 2023). Ces études démontrent l'activité, l'efficacité et la tolérance de l'administration respiratoire de flagelline à travers différentes espèces et dans divers modèles infectieux, et appuient la faisabilité d'une transposition à l'homme.

Références bibliographiques

Abril-Rodriguez, G., Ribas, A., 2017. SnapShot: Immune Checkpoint Inhibitors. Cancer Cell 31, 848-848.e1. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.010

Aceil, J., Avci, F.Y., 2022. Pneumococcal Surface Proteins as Virulence Factors, Immunogens, and Conserved Vaccine Targets. Front. Cell. Infect. Microbiol. 12, 832254. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.832254

Aegerter, H., Lambrecht, B.N., Jakubzick, C.V., 2022. Biology of lung macrophages in health and disease. Immunity 55, 1564–1580. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.08.010

Albiger, B., Dahlberg, S., Sandgren, A., Wartha, F., Beiter, K., Katsuragi, H., Akira, S., Normark, S., Henriques-Normark, B., 2007. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. Cell. Microbiol. 9, 633–644. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00814.x

Albiger, B., Sandgren, A., Katsuragi, H., Meyer-Hoffert, U., Beiter, K., Wartha, F., Hornef, M., Normark, S., Normark, B.H., 2005. Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. Cell. Microbiol. 7, 1603–1615. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00578.x

Alcorn, J.F., 2020. IL-22 Plays a Critical Role in Maintaining Epithelial Integrity During Pulmonary Infection. Front. Immunol. 11, 1160. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01160

Alving, C.R., Peachman, K.K., Rao, M., Reed, S.G., 2012. Adjuvants for human vaccines. Curr. Opin. Immunol. 24, 310–315. https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.03.008

Andersen-Nissen, E., Smith, K.D., Strobe, K.L., Barrett, S.L.R., Cookson, B.T., Logan, S.M., Aderem, A., 2005. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 9247–9252. https://doi.org/10.1073/pnas.0502040102

Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet Lond. Engl. 399, 629–655. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0

Anwar, M.A., Shah, M., Kim, J., Choi, S., 2019. Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics. Med. Res. Rev. 39, 1053–1090. https://doi.org/10.1002/med.21553

Aslam, B., Wang, W., Arshad, M.I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M.H., Nisar, M.A., Alvi, R.F., Aslam, M.A., Qamar, M.U., Salamat, M.K.F., Baloch, Z., 2018. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infect. Drug Resist. 11, 1645–1658. https://doi.org/10.2147/IDR.S173867

Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J.L., Dubin, P.J., Pilewski, J.M., Myerburg, M.M., Mason, C.A., Iwakura, Y., Kolls, J.K., 2008. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. Nat. Med. 14, 275–281. https://doi.org/10.1038/nm1710

Ballesteros, I., Rubio-Ponce, A., Genua, M., Lusito, E., Kwok, I., Fernández-Calvo, G., Khoyratty, T.E., van Grinsven, E., González-Hernández, S., Nicolás-Ávila, J.Á., Vicanolo, T., Maccataio, A., Benguría, A., Li, J.L., Adrover, J.M., Aroca-Crevillen, A., Quintana, J.A., Martín-Salamanca, S., Mayo, F., Ascher, S., Barbiera, G., Soehnlein, O., Gunzer, M., Ginhoux, F., Sánchez-Cabo, F., Nistal-Villán, E., Schulz, C., Dopazo, A., Reinhardt, C., Udalova, I.A., Ng, L.G., Ostuni, R., Hidalgo, A., 2020. Co-option of Neutrophil Fates by

Tissue Environments. Cell 183, 1282-1297.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.003

Barber, G.N., 2011. Cytoplasmic DNA innate immune pathways. Immunol. Rev. 243, 99–108. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01051.x

Basil, M.C., Levy, B.D., 2016. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. Nat. Rev. Immunol. 16, 51–67. https://doi.org/10.1038/nri.2015.4

Bewley, M.A., Marriott, H.M., Tulone, C., Francis, S.E., Mitchell, T.J., Read, R.C., Chain, B., Kroemer, G., Whyte, M.K.B., Dockrell, D.H., 2011. A cardinal role for cathepsin d in co-ordinating the host-mediated apoptosis of macrophages and killing of pneumococci. PLoS Pathog. 7, e1001262. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001262

Bissonnette, E.Y., Lauzon-Joset, J.-F., Debley, J.S., Ziegler, S.F., 2020. Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells is Essential to Maintain Lung Homeostasis. Front. Immunol. 11, 583042. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583042

Bohannon, J.K., Luan, L., Hernandez, A., Afzal, A., Guo, Y., Patil, N.K., Fensterheim, B., Sherwood, E.R., 2016. Role of G-CSF in monophosphoryl lipid A-mediated augmentation of neutrophil functions after burn injury. J. Leukoc. Biol. 99, 629–640. https://doi.org/10.1189/jlb.4A0815-362R

Bonifield, H.R., Hughes, K.T., 2003. Flagellar phase variation in Salmonella enterica is mediated by a posttranscriptional control mechanism. J. Bacteriol. 185, 3567–3574. https://doi.org/10.1128/JB.185.12.3567-3574.2003

Brandes, M., Klauschen, F., Kuchen, S., Germain, R.N., 2013. A systems analysis identifies a feedforward inflammatory circuit leading to lethal influenza infection. Cell 154, 197–212. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.013

Brooks, L.R.K., Mias, G.I., 2018. Streptococcus pneumoniae's Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. Front. Immunol. 9, 1366. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01366

Bui, N.K., Eberhardt, A., Vollmer, D., Kern, T., Bougault, C., Tomasz, A., Simorre, J.-P., Vollmer, W., 2012. Isolation and analysis of cell wall components from Streptococcus pneumoniae. Anal. Biochem. 421, 657–666. https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.11.026

Burn, G.L., Foti, A., Marsman, G., Patel, D.F., Zychlinsky, A., 2021. The Neutrophil. Immunity 54, 1377–1391. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006

Casanova-Acebes, M., Nicolás-Ávila, J.A., Li, J.L., García-Silva, S., Balachander, A., Rubio-Ponce, A., Weiss, L.A., Adrover, J.M., Burrows, K., A-González, N., Ballesteros, I., Devi, S., Quintana, J.A., Crainiciuc, G., Leiva, M., Gunzer, M., Weber, C., Nagasawa, T., Soehnlein, O., Merad, M., Mortha, A., Ng, L.G., Peinado, H., Hidalgo, A., 2018. Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues. J. Exp. Med. 215, 2778–2795. https://doi.org/10.1084/jem.20181468

Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., Weber, C., Nagasawa, T., Frenette, P.S., Castrillo, A., Hidalgo, A., 2013. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. Cell 153, 1025–1035. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.040

Casilag, F., Matarazzo, L., Franck, S., Figeac, M., Michelet, R., Kloft, C., Carnoy, C., Sirard, J.-C., 2021. The Biosynthetic Monophosphoryl Lipid A Enhances the Therapeutic Outcome

of Antibiotic Therapy in Pneumococcal Pneumonia. ACS Infect. Dis. 7, 2164–2175. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00176

Centre National de Référence des Pneumocoques, 2021. Rapport annuel 2021 du Centre National de Référence des Pneumocoques [WWW Document]. Cent. Natl. Réf. Pneumoc. URL https://cnr-pneumo.com/rapports-publis (accessed 6.16.24).

Chaban, B., Hughes, H.V., Beeby, M., 2015. The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. Semin. Cell Dev. Biol. 46, 91–103. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.032

Chen, G., Shaw, M.H., Kim, Y.-G., Nuñez, G., 2009. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. Annu. Rev. Pathol. 4, 365–398. https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239

Christaki, E., Marcou, M., Tofarides, A., 2020. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. J. Mol. Evol. 88, 26–40. https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3

Clasen, S.J., Bell, M.E.W., Borbón, A., Lee, D.-H., Henseler, Z.M., de la Cuesta-Zuluaga, J., Parys, K., Zou, J., Wang, Y., Altmannova, V., Youngblut, N.D., Weir, J.R., Gewirtz, A.T., Belkhadir, Y., Ley, R.E., 2023. Silent recognition of flagellins from human gut commensal bacteria by Toll-like receptor 5. Sci. Immunol. 8, eabq7001. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abq7001

Cole, A.M., Liao, H.-I., Stuchlik, O., Tilan, J., Pohl, J., Ganz, T., 2002. Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. J. Immunol. Baltim. Md 1950 169, 6985–6991. https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.12.6985

Comstock, L.E., Thomas, D.D., 1991. Characterization of Borrelia burgdorferi invasion of cultured endothelial cells. Microb. Pathog. 10, 137–148. https://doi.org/10.1016/0882-4010(91)90074-k

Cossart, P., Sansonetti, P.J., 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. Science 304, 242–248. https://doi.org/10.1126/science.1090124

Cox, L.M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A.V., Leung, J.M., Cho, I., Kim, S., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., Rodriguez, J.G.Z., Rogers, A.B., Robine, N., Loke, P., Blaser, M.J., 2014. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. Cell 158, 705–721. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.052

Craig, A., Mai, J., Cai, S., Jeyaseelan, S., 2009. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. Infect. Immun. 77, 568–575. https://doi.org/10.1128/IAI.00832-08

Dagan, R., Patterson, S., Juergens, C., Greenberg, D., Givon-Lavi, N., Porat, N., Gurtman, A., Gruber, W.C., Scott, D.A., 2013. Comparative immunogenicity and efficacy of 13-valent and 7-valent pneumococcal conjugate vaccines in reducing nasopharyngeal colonization: a randomized double-blind trial. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 57, 952–962. https://doi.org/10.1093/cid/cit428

Dalia, A.B., Standish, A.J., Weiser, J.N., 2010. Three Surface Exoglycosidases from Streptococcus pneumoniae, NanA, BgaA, and StrH, Promote Resistance to Opsonophagocytic Killing by Human Neutrophils. Infect. Immun. 78, 2108–2116. https://doi.org/10.1128/IAI.01125-09

Davis, K.M., Akinbi, H.T., Standish, A.J., Weiser, J.N., 2008. Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by Streptococcus

pneumoniae. PLoS Pathog. 4, e1000241. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000241

Davis, K.M., Nakamura, S., Weiser, J.N., 2011. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of S. pneumoniae colonization in mice. J. Clin. Invest. 121, 3666–3676. https://doi.org/10.1172/JCI57761

De Wals, P., Lefebvre, B., Deceuninck, G., Longtin, J., 2018. Incidence of invasive pneumococcal disease before and during an era of use of three different pneumococcal conjugate vaccines in Quebec. Vaccine 36, 421–426. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.054

De Yang, null, Chen, Q., Schmidt, A.P., Anderson, G.M., Wang, J.M., Wooters, J., Oppenheim, J.J., Chertov, O., 2000. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. J. Exp. Med. 192, 1069–1074. https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1069

Demoré, B., Charmillon, A., 2018. Traitement des infections respiratoires basses et hautes. Pharm. Clin. Thérapeutique 801-814.e1. https://doi.org/10.1016/B978-2-294-75077-9.00044-X

Deng, J.C., Moore, T.A., Newstead, M.W., Zeng, X., Krieg, A.M., Standiford, T.J., 2004. CpG Oligodeoxynucleotides Stimulate Protective Innate Immunity against Pulmonary Klebsiella Infection. J. Immunol. Baltim. Md 1950 173, 5148–5155.

Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B.C., Hacker, J., Steinert, M., 2001. Flagellum of Legionella pneumophila positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. Infect. Immun. 69, 2116–2122. https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2116-2122.2001

Domon, H., Terao, Y., 2021. The Role of Neutrophils and Neutrophil Elastase in Pneumococcal Pneumonia. Front. Cell. Infect. Microbiol. 11, 615959. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.615959

Dowson, C.G., Coffey, T.J., Kell, C., Whiley, R.A., 1993. Evolution of penicillin resistance in Streptococcus pneumoniae; the role of Streptococcus mitis in the formation of a low affinity PBP2B in S. pneumoniae. Mol. Microbiol. 9, 635–643. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01723.x

Drusano, G.L., 2004. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of “bug and drug.” Nat. Rev. Microbiol. 2, 289–300. https://doi.org/10.1038/nrmicro862

Duchamp, M., Miot, C., Bustamante, J.C., Picard, C., 2016. [Innate immunity primary immunodeficiencies and infections]. Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr. 23, 760–768. https://doi.org/10.1016/j.arcped.2016.04.020

Dudek, M., Puttur, F., Arnold-Schrauf, C., Kühl, A.A., Holzmann, B., Henriques-Normark, B., Berod, L., Sparwasser, T., 2016. Lung epithelium and myeloid cells cooperate to clear acute pneumococcal infection. Mucosal Immunol. 9, 1288–1302. https://doi.org/10.1038/mi.2015.128

Dumont, B.L., Neagoe, P.-E., Charles, E., Villeneuve, L., Ninni, S., Tardif, J.-C., Räkel, A., White, M., Sirois, M.G., 2024. Low-Density Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Are New Inflammatory Players in Heart Failure. Can. J. Cardiol. S0828-282X(24)00281–2. https://doi.org/10.1016/j.cjca.2024.03.018

Echlin, H., Iverson, A., Sardo, U., Rosch, J.W., 2023. Airway proteolytic control of pneumococcal competence. PLOS Pathog. 19, e1011421.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011421

Effah, C.Y., Drokow, E.K., Agboyibor, C., Ding, L., He, S., Liu, S., Akorli, S.Y., Nuamah, E., Sun, T., Zhou, X., Liu, H., Xu, Z., Feng, F., Wu, Y., Zhang, X., 2021. Neutrophil-Dependent Immunity During Pulmonary Infections and Inflammations. Front. Immunol. 12, 689866. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.689866

GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators, 2018. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet Infect. Dis. 18, 1191–1210. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30310-4

Evrard, M., Kwok, I.W.H., Chong, S.Z., Teng, K.W.W., Becht, E., Chen, J., Sieow, J.L., Penny, H.L., Ching, G.C., Devi, S., Adrover, J.M., Li, J.L.Y., Liong, K.H., Tan, L., Poon, Z., Foo, S., Chua, J.W., Su, I.-H., Balabanian, K., Bachelerie, F., Biswas, S.K., Larbi, A., Hwang, W.Y.K., Madan, V., Koeffler, H.P., Wong, S.C., Newell, E.W., Hidalgo, A., Ginhoux, F., Ng, L.G., 2018. Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. Immunity 48, 364-379.e8. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.002

Eyler, R.F., Shvets, K., 2019. Clinical Pharmacology of Antibiotics. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN 14, 1080–1090. https://doi.org/10.2215/CJN.08140718

Fang, R., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Shen, Y., Hara, H., Sakai, S., Yamamoto, T., Fernandes-Alnemri, T., Yang, R., Hernandez-Cuellar, E., Dewamitta, S.R., Xu, Y., Qu, H., Alnemri, E.S., Mitsuyama, M., 2011. Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to Streptococcus pneumoniae infection. J. Immunol. Baltim. Md 1950 187, 4890–4899. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100381

Fensterheim, B.A., Young, J.D., Luan, L., Kleinbard, R.R., Stothers, C.L., Patil, N.K., McAtee-Pereira, A.G., Guo, Y., Trenary, I., Hernandez, A., Fults, J.B., Williams, D.L., Sherwood, E.R., Bohannon, J.K., 2018. The TLR4 Agonist Monophosphoryl Lipid A Drives Broad Resistance to Infection via Dynamic Reprogramming of Macrophage Metabolism. J. Immunol. Baltim. Md 1950 200, 3777–3789. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800085

Flannagan, R.S., Cosío, G., Grinstein, S., 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. Nat. Rev. Microbiol. 7, 355–366. https://doi.org/10.1038/nrmicro2128

Flores-Langarica, A., Cook, C., Müller Luda, K., Persson, E.K., Marshall, J.L., Beristain-Covarrubias, N., Yam-Puc, J.C., Dahlgren, M., Persson, J.J., Uematsu, S., Akira, S., Henderson, I.R., Lindbom, B.J., Agace, W., Cunningham, A.F., 2018. Intestinal CD103+CD11b+ cDC2 Conventional Dendritic Cells Are Required for Primary CD4+ T and B Cell Responses to Soluble Flagellin. Front. Immunol. 9, 2409. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02409

Forstnerič, V., Ivičak-Kocjan, K., Plaper, T., Jerala, R., Benčina, M., 2017. The role of the C-terminal D0 domain of flagellin in activation of Toll like receptor 5. PLoS Pathog. 13, e1006574. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006574

Fougeron, D., Van Maele, L., Songhet, P., Cayet, D., Hot, D., Van Rooijen, N., Mollenkopf, H.-J., Hardt, W.-D., Benecke, A.G., Sirard, J.-C., 2015. Indirect Toll-like receptor 5-mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract. Vaccine 33, 3331–3341. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.022

Franck, S., Fuhrmann-Selter, T., Joseph, J.F., Michelet, R., Casilag, F., Sirard, J.-C., Wicha, S.G., Kloft, C., 2019. A rapid, simple and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to determine amoxicillin concentrations in biological matrix of little volume. Talanta 201, 253–258. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.098

Francois, B., Jeannet, R., Daix, T., Walton, A.H., Shotwell, M.S., Unsinger, J., Monneret, G., Rimmelé, T., Blood, T., Morre, M., Gregoire, A., Mayo, G.A., Blood, J., Durum, S.K., Sherwood, E.R., Hotchkiss, R.S., 2018. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. JCI Insight 3. https://doi.org/10.1172/jci.insight.98960

Galanis, I., Lindstrand, A., Darenberg, J., Browall, S., Nannapaneni, P., Sjöström, K., Morfeldt, E., Naucler, P., Blennow, M., Örtqvist, Å., Henriques-Normark, B., 2016. Effects of PCV7 and PCV13 on invasive pneumococcal disease and carriage in Stockholm, Sweden. Eur. Respir. J. 47, 1208–1218. https://doi.org/10.1183/13993003.01451-2015

Ganaie, F.A., Saad, J.S., Lo, S.W., McGee, L., van Tonder, A.J., Hawkins, P.A., Calix, J.J., Bentley, S.D., Nahm, M.H., 2023. Novel pneumococcal capsule type 33E results from the inactivation of glycosyltransferase WciE in vaccine type 33F. J. Biol. Chem. 299, 105085. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105085

Gauger, E.J., Leatham, M.P., Mercado-Lubo, R., Laux, D.C., Conway, T., Cohen, P.S., 2007. Role of motility and the flhDC Operon in Escherichia coli MG1655 colonization of the mouse intestine. Infect. Immun. 75, 3315–3324. https://doi.org/10.1128/IAI.00052-07

Georgel, A.-F., Cayet, D., Pizzorno, A., Rosa-Calatrava, M., Paget, C., Sencio, V., Dubuisson, J., Trottein, F., Sirard, J.-C., Carnoy, C., 2019. 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. 168, 28–35. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.05.002

Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Gominet, M., Lereclus, D., Wong, A.C.L., Senesi, S., 2002. Requirement of flhA for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol. 184, 6424–6433. https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6424-6433.2002

Gibson, P.S., Bexkens, E., Zuber, S., Cowley, L.A., Veening, J.-W., 2022. The acquisition of clinically relevant amoxicillin resistance in Streptococcus pneumoniae requires ordered horizontal gene transfer of four loci. PLoS Pathog. 18, e1010727. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010727

Gill, N., Deacon, P.M., Lichty, B., Mossman, K.L., Ashkar, A.A., 2006. Induction of Innate Immunity against Herpes Simplex Virus Type 2 Infection via Local Delivery of Toll-Like Receptor Ligands Correlates with Beta Interferon Production. J. Virol. 80, 9943–9950. https://doi.org/10.1128/JVI.01036-06

Gómez, M.I., Prince, A., 2008. Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens. Pediatr. Pulmonol. 43, 11–19. https://doi.org/10.1002/ppul.20735

Greenlee-Wacker, M.C., 2016. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. Immunol. Rev. 273, 357–370. https://doi.org/10.1111/imr.12453

Griese, M., Steinecker, M., Schumacher, S., Braun, A., Lohse, P., Heinrich, S., 2008. Children with absent surfactant protein D in bronchoalveolar lavage have more frequently pneumonia. Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol. 19, 639–647. https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2007.00695.x

Grieshaber-Bouyer, R., Radtke, F.A., Cunin, P., Stifano, G., Levescot, A., Vijaykumar, B.,

Nelson-Maney, N., Blaustein, R.B., Monach, P.A., Nigrovic, P.A., ImmGen Consortium, 2021. The neutrotime transcriptional signature defines a single continuum of neutrophils across biological compartments. Nat. Commun. 12, 2856. https://doi.org/10.1038/s41467-021-22973-9

Guilliams, M., Mildner, A., Yona, S., 2018. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. Immunity 49, 595–613. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005

Guttenplan, S.B., Kearns, D.B., 2013. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. FEMS Microbiol. Rev. 37, 849–871. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12018

Hahn, I., Klaus, A., Janze, A.-K., Steinwede, K., Ding, N., Bohling, J., Brumshagen, C., Serrano, H., Gauthier, F., Paton, J.C., Welte, T., Maus, U.A., 2011. Cathepsin G and neutrophil elastase play critical and nonredundant roles in lung-protective immunity against Streptococcus pneumoniae in mice. Infect. Immun. 79, 4893–4901. https://doi.org/10.1128/IAI.05593-11

Hajam, I.A., Dar, P.A., Shahnawaz, I., Jaume, J.C., Lee, J.H., 2017. Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. Exp. Mol. Med. 49, e373. https://doi.org/10.1038/emm.2017.172

Hakenbeck, R., Brückner, R., Denapaite, D., Maurer, P., 2012. Molecular mechanisms of β-lactam resistance in Streptococcus pneumoniae. Future Microbiol. 7, 395–410. https://doi.org/10.2217/fmb.12.2

Haleem, K.S., Ali, Y.M., Yesilkaya, H., Kohler, T., Hammerschmidt, S., Andrew, P.W., Schwaeble, W.J., Lynch, N.J., 2019. The Pneumococcal Surface Proteins PspA and PspC Sequester Host C4-Binding Protein To Inactivate Complement C4b on the Bacterial Surface. Infect. Immun. 87, e00742-18. https://doi.org/10.1128/IAI.00742-18

Han, S., Mallampalli, R.K., 2015. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. Ann. Am. Thorac. Soc. 12, 765–774. https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201411-507FR

Hanquet, G., Krizova, P., Dalby, T., Ladhani, S.N., Nuorti, J.P., Danis, K., Mereckiene, J., Knol, M.J., Winje, B.A., Ciruela, P., de Miguel, S., Portillo, M.E., MacDonald, L., Morfeldt, E., Kozakova, J., Valentiner-Branth, P., Fry, N.K., Rinta-Kokko, H., Varon, E., Corcoran, M., van der Ende, A., Vestrheim, D.F., Munoz-Almagro, C., Sanz, J.-C., Castilla, J., Smith, A., Henriques-Normark, B., Colzani, E., Pastore-Celentano, L., Savulescu, C., 2022. Serotype Replacement after Introduction of 10-Valent and 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccines in 10 Countries, Europe. Emerg. Infect. Dis. 28, 127–138. https://doi.org/10.3201/eid2801.210734

Harbarth, S., Balkhy, H.H., Goossens, H., Jarlier, V., Kluytmans, J., Laxminarayan, R., Saam, M., Van Belkum, A., Pittet, D., 2015. Antimicrobial resistance: one world, one fight! Antimicrob. Resist. Infect. Control 4, 49. https://doi.org/10.1186/s13756-015-0091-2

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S.W., Forsberg, E.C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E.R., Ginhoux, F., Frenette, P.S., Merad, M., 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. Immunity 38, 792–804. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004

Hazeldine, J., Harris, P., Chapple, I.L., Grant, M., Greenwood, H., Livesey, A., Sapey, E., Lord, J.M., 2014. Impaired neutrophil extracellular trap formation: a novel defect in the

innate immune system of aged individuals. Aging Cell 13, 690–698. https://doi.org/10.1111/acel.12222

He, S., Sharpless, N.E., 2017. Senescence in Health and Disease. Cell 169, 1000–1011. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 408, 740–745. https://doi.org/10.1038/35047123

Henson, P.M., 2017. Cell Removal: Efferocytosis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 33, 127–144. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125315

Henson, P.M., Tuder, R.M., 2008. Apoptosis in the lung: induction, clearance and detection. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 294, L601-611. https://doi.org/10.1152/ajplung.00320.2007

Herbold, W., Maus, R., Hahn, I., Ding, N., Srivastava, M., Christman, J.W., Mack, M., Reutershan, J., Briles, D.E., Paton, J.C., Winter, C., Welte, T., Maus, U.A., 2010. Importance of CXC chemokine receptor 2 in alveolar neutrophil and exudate macrophage recruitment in response to pneumococcal lung infection. Infect. Immun. 78, 2620–2630. https://doi.org/10.1128/IAI.01169-09

Herold, S., Tabar, T.S., Janssen, H., Hoegner, K., Cabanski, M., Lewe-Schlosser, P., Albrecht, J., Driever, F., Vadasz, I., Seeger, W., Steinmueller, M., Lohmeyer, J., 2011. Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 183, 1380–1390. https://doi.org/10.1164/rccm.201009-1431OC

Heß, N., Waldow, F., Kohler, T.P., Rohde, M., Kreikemeyer, B., Gómez-Mejia, A., Hain, T., Schwudke, D., Vollmer, W., Hammerschmidt, S., Gisch, N., 2017. Lipoteichoic acid deficiency permits normal growth but impairs virulence of Streptococcus pneumoniae. Nat. Commun. 8, 2093. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01720-z

Hidalgo, A., Chilvers, E.R., Summers, C., Koenderman, L., 2019. The Neutrophil Life Cycle. Trends Immunol. 40, 584–597. https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.013

Hoegl, S., Bachmann, M., Scheiermann, P., Goren, I., Hofstetter, C., Pfeilschifter, J., Zwissler, B., Muhl, H., 2011. Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 44, 369–376. https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0440OC

Holers, V.M., 2014. Complement and its receptors: new insights into human disease. Annu. Rev. Immunol. 32, 433–459. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120154

Hung, L.-Y., Sen, D., Oniskey, T.K., Katzen, J., Cohen, N.A., Vaughan, A.E., Nieves, W., Urisman, A., Beers, M.F., Krummel, M.F., Herbert, D.R., 2019. Macrophages promote epithelial proliferation following infectious and non-infectious lung injury through a Trefoil factor 2-dependent mechanism. Mucosal Immunol. 12, 64–76. https://doi.org/10.1038/s41385-018-0096-2

Hussell, T., Bell, T.J., 2014. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. Nat. Rev. Immunol. 14, 81–93. https://doi.org/10.1038/nri3600

Huynh, M.-L.N., Fadok, V.A., Henson, P.M., 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. J. Clin. Invest. 109, 41–50. https://doi.org/10.1172/JCI11638

Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K., Brown, J.S., 2010. The Streptococcus pneumoniae capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. Infect. Immun. 78, 704–715. https://doi.org/10.1128/IAI.00881-09

Hyer, R.N., Janssen, R.S., 2019. Immunogenicity and safety of a 2-dose hepatitis B vaccine, HBsAg/CpG 1018, in persons with diabetes mellitus aged 60-70 years. Vaccine 37, 5854–5861. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.08.005

Ichikawa, A., Kuba, K., Morita, M., Chida, S., Tezuka, H., Hara, H., Sasaki, T., Ohteki, T., Ranieri, V.M., dos Santos, C.C., Kawaoka, Y., Akira, S., Luster, A.D., Lu, B., Penninger, J.M., Uhlig, S., Slutsky, A.S., Imai, Y., 2013. CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 187, 65–77. https://doi.org/10.1164/rccm.201203-0508OC

Ieven, M., Coenen, S., Loens, K., Lammens, C., Coenjaerts, F., Vanderstraeten, A., Henriques-Normark, B., Crook, D., Huygen, K., Butler, C.C., Verheij, T.J.M., Little, P., Zlateva, K., van Loon, A., Claas, E.C.J., Goossens, H., 2018. Aetiology of lower respiratory tract infection in adults in primary care: a prospective study in 11 European countries. Clin. Microbiol. Infect. 24, 1158–1163. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.004

Jackson, L.A., Neuzil, K.M., Yu, O., Benson, P., Barlow, W.E., Adams, A.L., Hanson, C.A., Mahoney, L.D., Shay, D.K., Thompson, W.W., Vaccine Safety Datalink, 2003. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine in older adults. N. Engl. J. Med. 348, 1747–1755. https://doi.org/10.1056/NEJMoa022678

Janot, L., Sirard, J.-C., Secher, T., Noulin, N., Fick, L., Akira, S., Uematsu, S., Didierlaurent, A., Hussell, T., Ryffel, B., Erard, F., 2009. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. Eur. J. Immunol. 39, 1587–1596. https://doi.org/10.1002/eji.200838907

Jarchum, I., Liu, M., Lipuma, L., Pamer, E.G., 2011. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute Clostridium difficile colitis. Infect. Immun. 79, 1498–1503. https://doi.org/10.1128/IAI.01196-10

Jim, K.K., Aprianto, R., Koning, R., Domenech, A., Kurushima, J., van de Beek, D., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Bitter, W., Veening, J.-W., 2022. Pneumolysin promotes host cell necroptosis and bacterial competence during pneumococcal meningitis as shown by whole-animal dual RNA-seq. Cell Rep. 41, 111851. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111851

Jones, M.R., Simms, B.T., Lupa, M.M., Kogan, M.S., Mizgerd, J.P., 2005. Lung NF-kappaB activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. J. Immunol. Baltim. Md 1950 175, 7530–7535. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7530

Joseph, C., Togawa, Y., Shindo, N., 2013. Bacterial and viral infections associated with influenza. Influenza Other Respir. Viruses 7 Suppl 2, 105–113. https://doi.org/10.1111/irv.12089

Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., Andrew, P.W., 2008. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nat. Rev. Microbiol. 6, 288–301. https://doi.org/10.1038/nrmicro1871

Kalinina, A.A., Nesterenko, L.N., Bruter, A.V., Balunets, D.V., Chudakov, D.M., Izraelson, M., Britanova, O.V., Khromykh, L.M., Kazansky, D.B., 2020. Adoptive Immunotherapy Based on Chain-Centric TCRs in Treatment of Infectious Diseases. iScience 23.

https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101854

Kalizang'oma, A., Chaguza, C., Gori, A., Davison, C., Beleza, S., Antonio, M., Beall, B., Goldblatt, D., Kwambana-Adams, B., Bentley, S.D., Heyderman, R.S., 2021. Streptococcus pneumoniae serotypes that frequently colonise the human nasopharynx are common recipients of penicillin-binding protein gene fragments from Streptococcus mitis. Microb. Genomics 7, 000622. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000622

Kim, T.H., Kim, D., Gautam, A., Lee, H., Kwak, M.H., Park, M.C., Park, S., Wu, G., Lee, B.L., Lee, Y., Kwon, H.-J., 2018. CpG-DNA exerts antibacterial effects by protecting immune cells and producing bacteria-reactive antibodies. Sci. Rep. 8, 16236. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34722-y

Kinnebrew, M.A., Buffie, C.G., Diehl, G.E., Zenewicz, L.A., Leiner, I., Hohl, T.M., Flavell, R.A., Littman, D.R., Pamer, E.G., 2012. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. Immunity 36, 276–287. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.011

Kinnebrew, M.A., Ubeda, C., Zenewicz, L.A., Smith, N., Flavell, R.A., Pamer, E.G., 2010. Bacterial flagellin stimulates TLR5-dependent defense against vancomycin-resistant Enterococcus infection. J. Infect. Dis. 201, 534–543. https://doi.org/10.1086/650203

Knowles, M.R., Daniels, L.A., Davis, S.D., Zariwala, M.A., Leigh, M.W., 2013. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 188, 913–922. https://doi.org/10.1164/rccm.201301-0059CI

Koirala, S., Mears, P., Sim, M., Golding, I., Chemla, Y.R., Aldridge, P.D., Rao, C.V., 2014. A nutrient-tunable bistable switch controls motility in Salmonella enterica serovar Typhimurium. mBio 5, e01611-01614. https://doi.org/10.1128/mBio.01611-14

Koppe, U., Högner, K., Doehn, J.-M., Müller, H.C., Witzenrath, M., Gutbier, B., Bauer, S., Pribyl, T., Hammerschmidt, S., Lohmeyer, J., Suttorp, N., Herold, S., Opitz, B., 2012a. Streptococcus pneumoniae stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. J. Immunol. Baltim. Md 1950 188, 811–817. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004143

Koppe, U., Suttorp, N., Opitz, B., 2012b. Recognition of Streptococcus pneumoniae by the innate immune system. Cell. Microbiol. 14, 460–466. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x

Kuebler, W.M., Goetz, A.E., 2002. The marginated pool. Eur. Surg. Res. Eur. Chir. Forsch. Rech. Chir. Eur. 34, 92–100. https://doi.org/10.1159/000048894

Kumar, A., Gao, N., Standiford, T.J., Gallo, R.L., Yu, F.-S.X., 2010. Topical flagellin protects the injured corneas from Pseudomonas aeruginosa infection. Microbes Infect. 12, 978–989. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.06.007

Kumpitsch, C., Koskinen, K., Schöpf, V., Moissl-Eichinger, C., 2019. The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. BMC Biol. 17, 87. https://doi.org/10.1186/s12915-019-0703-z

Kurushima, J., Campo, N., van Raaphorst, R., Cerckel, G., Polard, P., Veening, J.-W., 2020. Unbiased homeologous recombination during pneumococcal transformation allows for multiple chromosomal integration events. eLife 9, e58771. https://doi.org/10.7554/eLife.58771

LaFemina, M.J., Sutherland, K.M., Bentley, T., Gonzales, L.W., Allen, L., Chapin, C.J., Rokkam, D., Sweerus, K.A., Dobbs, L.G., Ballard, P.L., Frank, J.A., 2014. Claudin-18 deficiency results in alveolar barrier dysfunction and impaired alveologenesis in mice. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 51, 550–558. https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0456OC

Lange, K., Buerger, M., Stallmach, A., Bruns, T., 2016. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. Dig. Dis. Basel Switz. 34, 260–268. https://doi.org/10.1159/000443360

Lanks, C.W., Musani, A.I., Hsia, D.W., 2019. Community-acquired Pneumonia and Hospital-acquired Pneumonia. Med. Clin. North Am. 103, 487–501. https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.008

Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T., Golenbock, D.T., 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. Nat. Immunol. 5, 190–198. https://doi.org/10.1038/ni1028

Lawrence, S.M., Corriden, R., Nizet, V., 2018. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 82, e00057-17. https://doi.org/10.1128/MMBR.00057-17

Lecaille, F., Lalmanach, G., Andrault, P.-M., 2016. Antimicrobial proteins and peptides in human lung diseases: A friend and foe partnership with host proteases. Biochimie 122, 151–168. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.08.014

Lees, J.A., Croucher, N.J., Goldblatt, D., Nosten, F., Parkhill, J., Turner, C., Turner, P., Bentley, S.D., 2017. Genome-wide identification of lineage and locus specific variation associated with pneumococcal carriage duration. eLife 6, e26255. https://doi.org/10.7554/eLife.26255

Leiva-Juárez, M.M., Kolls, J.K., Evans, S.E., 2018. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. Mucosal Immunol. 11, 21–34. https://doi.org/10.1038/mi.2017.71

Levy, M., Kolodziejczyk, A.A., Thaiss, C.A., Elinav, E., 2017. Dysbiosis and the immune system. Nat. Rev. Immunol. 17, 219–232. https://doi.org/10.1038/nri.2017.7

Li, R., Banjanin, B., Schneider, R.K., Costa, I.G., 2022. Detection of cell markers from single cell RNA-seq with sc2marker. BMC Bioinformatics 23, 276. https://doi.org/10.1186/s12859-022-04817-5

Lightfield, K.L., Persson, J., Brubaker, S.W., Witte, C.E., von Moltke, J., Dunipace, E.A., Henry, T., Sun, Y.-H., Cado, D., Dietrich, W.F., Monack, D.M., Tsolis, R.M., Vance, R.E., 2008. Critical role of Naip5 in inflammasome activation by a conserved C-terminal domain of flagellin. Nat. Immunol. 9, 1171–1178. https://doi.org/10.1038/ni.1646

Lillehoj, E.P., Kim, B.T., Kim, K.C., 2002. Identification of Pseudomonas aeruginosa flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 282, L751-756. https://doi.org/10.1152/ajplung.00383.2001

Lin, J., Park, P., Li, H., Oh, M.W., Dobrucki, I.T., Dobrucki, W., Lau, G.W., 2020. Streptococcus pneumoniae Elaborates Persistent and Prolonged Competent State during Pneumonia-Derived Sepsis. Infect. Immun. 88, e00919-19. https://doi.org/10.1128/IAI.00919-19

Liu, H., Chen, F., Wu, W., Cao, A.T., Xue, X., Yao, S., Evans-Marin, H.L., Li, Y.-Q., Cong, Y., 2016. TLR5 mediates CD172α(+) intestinal lamina propria dendritic cell induction of

Th17 cells. Sci. Rep. 6, 22040. https://doi.org/10.1038/srep22040

Liu, X., Van Maele, L., Matarazzo, L., Soulard, D., Alves Duarte da Silva, V., de Bakker, V., Dénéréaz, J., Bock, F.P., Taschner, M., Ou, J., Gruber, S., Nizet, V., Sirard, J.-C., Veening, J.-W., 2024. A conserved antigen induces respiratory Th17-mediated broad serotype protection against pneumococcal superinfection. Cell Host Microbe 32, 304-314.e8. https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.02.002

López-Gálvez, R., Fleurot, I., Chamero, P., Trapp, S., Olivier, M., Chevaleyre, C., Barc, C., Riou, M., Rossignol, C., Guillon, A., Si-Tahar, M., May, T., Barbry, P., Bähr, A., Klymiuk, N., Sirard, J.-C., Caballero, I., 2021. Airway Administration of Flagellin Regulates the Inflammatory Response to Pseudomonas aeruginosa. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 65, 378–389. https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0125OC

Lovewell, R.R., Hayes, S.M., O'Toole, G.A., Berwin, B., 2014. Pseudomonas aeruginosa flagellar motility activates the phagocyte PI3K/Akt pathway to induce phagocytic engulfment. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 306, L698-707. https://doi.org/10.1152/ajplung.00319.2013

Maele, L.V., Fougeron, D., Janot, L., Didierlaurent, A., Cayet, D., Tabareau, J., Rumbo, M., Corvo-Chamaillard, S., Boulenouar, S., Jeffs, S., Walle, L.V., Lamkanfi, M., Lemoine, Y., Erard, F., Hot, D., Hussell, T., Ryffel, B., Benecke, A.G., Sirard, J.-C., 2014. Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. Mucosal Immunol. 7, 489–500. https://doi.org/10.1038/mi.2013.66

Mahrt, N., Tietze, A., Künzel, S., Franzenburg, S., Barbosa, C., Jansen, G., Schulenburg, H., 2021. Bottleneck size and selection level reproducibly impact evolution of antibiotic resistance. Nat. Ecol. Evol. 5, 1233–1242. https://doi.org/10.1038/s41559-021-01511-2

Maia, A.R., Cezard, A., Fouquenet, D., Vasseur, V., Briard, B., Sirard, J.-C., Si-Tahar, M., Hervé, V., 2024. Preventive nasal administration of flagellin restores antimicrobial effect of gentamicin and protects against a multidrug-resistant strain of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 68, e0136123. https://doi.org/10.1128/aac.01361-23

Marriott, H.M., Bingle, C.D., Read, R.C., Braley, K.E., Kroemer, G., Hellewell, P.G., Craig, R.W., Whyte, M.K.B., Dockrell, D.H., 2005. Dynamic changes in Mcl-1 expression regulate macrophage viability or commitment to apoptosis during bacterial clearance. J. Clin. Invest. 115, 359–368. https://doi.org/10.1172/JCI21766

Matarazzo, L., Casilag, F., Porte, R., Wallet, F., Cayet, D., Faveeuw, C., Carnoy, C., 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. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00723

McCullers, J.A., 2014. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. Nat. Rev. Microbiol. 12, 252–262. https://doi.org/10.1038/nrmicro3231

McCulloch, T., Wells, T., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., 2022. Towards efficient immunotherapy for bacterial infection. Trends Microbiol. 30. https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.005

McGreal, E.P., Hearne, K., Spiller, O.B., 2012. Off to a slow start: under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth. Immunobiology 217, 176–186. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.027

McNeela, E.A., Burke, A., Neill, D.R., Baxter, C., Fernandes, V.E., Ferreira, D., Smeaton, S., El-Rachkidy, R., McLoughlin, R.M., Mori, A., Moran, B., Fitzgerald, K.A., Tschopp, J.,

Pétrilli, V., Andrew, P.W., Kadioglu, A., Lavelle, E.C., 2010. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. PLoS Pathog. 6, e1001191. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001191

Medzhitov, R., Schneider, D.S., Soares, M.P., 2012. Disease tolerance as a defense strategy. Science 335, 936–941. https://doi.org/10.1126/science.1214935

Meinel, C., Spartà, G., Dahse, H.-M., Hörhold, F., König, R., Westermann, M., Coldewey, S.M., Cseresnyés, Z., Figge, M.T., Hammerschmidt, S., Skerka, C., Zipfel, P.F., 2018. Streptococcus pneumoniae From Patients With Hemolytic Uremic Syndrome Binds Human Plasminogen via the Surface Protein PspC and Uses Plasmin to Damage Human Endothelial Cells. J. Infect. Dis. 217, 358–370. https://doi.org/10.1093/infdis/jix305

Mettelman, R.C., Allen, E.K., Thomas, P.G., 2022. Mucosal immune responses to infection and vaccination in the respiratory tract. Immunity 55, 749–780. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.04.013

Ministère de la Santé, 2024. Le calendrier des vaccinations - Ministère du travail, de la santé et des solidarités [WWW Document]. URL https://sante.gouv.fr/prevention-en-sante/preserver-sa-sante/vaccination/calendrier-vaccinal (accessed 6.14.24).

Mitchell, A.M., Mitchell, T.J., 2010. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 16, 411–418. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x

Mondemé, M., Zeroual, Y., Soulard, D., Hennart, B., Beury, D., Saliou, J.-M., Carnoy, C., Sirard, J.-C., Faveeuw, C., 2023. Amoxicillin treatment of pneumococcal pneumonia impacts bone marrow neutrophil maturation and function. J. Leukoc. Biol. qiad125. https://doi.org/10.1093/jleuko/qiad125

Montaldo, E., Lusito, E., Bianchessi, V., Caronni, N., Scala, S., Basso-Ricci, L., Cantaffa, C., Masserdotti, A., Barilaro, M., Barresi, S., Genua, M., Vittoria, F.M., Barbiera, G., Lazarevic, D., Messina, C., Xue, E., Marktel, S., Tresoldi, C., Milani, R., Ronchi, P., Gattillo, S., Santoleri, L., Di Micco, R., Ditadi, A., Belfiori, G., Aleotti, F., Naldini, M.M., Gentner, B., Gardiman, E., Tamassia, N., Cassatella, M.A., Hidalgo, A., Kwok, I., Ng, L.G., Crippa, S., Falconi, M., Pettinella, F., Scapini, P., Naldini, L., Ciceri, F., Aiuti, A., Ostuni, R., 2022. Cellular and transcriptional dynamics of human neutrophils at steady state and upon stress. Nat. Immunol. 23, 1470–1483. https://doi.org/10.1038/s41590-022-01311-1

Montgomery, R.R., Shaw, A.C., 2015. Paradoxical changes in innate immunity in aging: recent progress and new directions. J. Leukoc. Biol. 98, 937–943. https://doi.org/10.1189/jlb.5MR0315-104R

Muñoz, K.A., Ulrich, R.J., Vasan, A.K., Sinclair, M., Wen, P.-C., Holmes, J.R., Lee, H.Y., Hung, C.-C., Fields, C.J., Tajkhorshid, E., Lau, G.W., Hergenrother, P.J., 2024. A Gram-negative-selective antibiotic that spares the gut microbiome. Nature 630, 429–436. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07502-0

Muñoz, N., Van Maele, L., Marqués, J.M., Rial, A., Sirard, J.-C., Chabalgoity, J.A., 2010. Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection. Infect. Immun. 78, 4226–4233. https://doi.org/10.1128/IAI.00224-10

Muñoz-Wolf, N., Rial, A., Fougeron, D., Tabareau, J., Sirard, J.-C., Chabalgoity, J.A., 2016. Sublingual flagellin protects against acute pneumococcal pneumonia in a TLR5-dependent and NLRC4-independent fashion. Future Microbiol. 11, 1167–1177. https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0045

Münzer, P., Negro, R., Fukui, S., di Meglio, L., Aymonnier, K., Chu, L., Cherpokova, D., Gutch, S., Sorvillo, N., Shi, L., Magupalli, V.G., Weber, A.N.R., Scharf, R.E., Waterman, C.M., Wu, H., Wagner, D.D., 2021. NLRP3 Inflammasome Assembly in Neutrophils Is Supported by PAD4 and Promotes NETosis Under Sterile Conditions. Front. Immunol. 12, 683803. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683803

Nakahashi-Ouchida, R., Uchida, Y., Yuki, Y., Katakai, Y., Yamanoue, T., Ogawa, H., Munesue, Y., Nakano, N., Hanari, K., Miyazaki, T., Saito, Y., Umemoto, S., Sawada, S.-I., Mukerji, R., Briles, D.E., Yasutomi, Y., Akiyoshi, K., Kiyono, H., 2021. A nanogel-based trivalent PspA nasal vaccine protects macaques from intratracheal challenge with pneumococci. Vaccine 39, 3353–3364. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.04.069

Nelson, A.L., Roche, A.M., Gould, J.M., Chim, K., Ratner, A.J., Weiser, J.N., 2007. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. Infect. Immun. 75, 83–90. https://doi.org/10.1128/IAI.01475-06

Nempont, C., Cayet, D., Rumbo, M., Bompard, C., Villeret, V., Sirard, J.-C., 2008. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. J. Immunol. Baltim. Md 1950 181, 2036–2043. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2036

Ng, L.G., Liu, Z., Kwok, I., Ginhoux, F., 2023. Origin and Heterogeneity of Tissue Myeloid Cells: A Focus on GMP-Derived Monocytes and Neutrophils. Annu. Rev. Immunol. 41, 375–404. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-081022-113627

Nikolich-Žugich, J., 2018. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. Nat. Immunol. 19, 10–19. https://doi.org/10.1038/s41590-017-0006-x

Nishimoto, A.T., Dao, T.H., Jia, Q., Ortiz-Marquez, J.C., Echlin, H., Vogel, P., van Opijnen, T., Rosch, J.W., 2022. Interspecies recombination, not de novo mutation, maintains virulence after β-lactam resistance acquisition in Streptococcus pneumoniae. Cell Rep. 41, 111835. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111835

Nussbaum, C., Gloning, A., Pruenster, M., Frommhold, D., Bierschenk, S., Genzel-Boroviczény, O., von Andrian, U.H., Quackenbush, E., Sperandio, M., 2013. Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. J. Leukoc. Biol. 93, 175–184. https://doi.org/10.1189/jlb.0912468

Oh, M.W., Lin, J., Chong, S.Y., Lew, S.Q., Alam, T., Lau, G.W., 2024. Time-resolved RNA-seq analysis to unravel the in vivo competence induction by Streptococcus pneumoniae during pneumonia-derived sepsis. Microbiol. Spectr. 12. https://doi.org/10.1128/spectrum.03050-23

OMS, 2024. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [WWW Document]. URL https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461 (accessed 6.17.24).

O'Neil, J., 2014. Antimicrobial resistance : tackling a crisis for the health and wealth of nations / the Review on Antimicrobial Resistance chaired by Jim O'Neill. [WWW Document]. Wellcome Collect. URL https://wellcomecollection.org/works/rdpck35v (accessed 6.17.24).

Opitz, B., van Laak, V., Eitel, J., Suttorp, N., 2010. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 181, 1294–1309. https://doi.org/10.1164/rccm.200909-1427SO

Papayannopoulos, V., 2018. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Nat. Rev. Immunol. 18, 134–147. https://doi.org/10.1038/nri.2017.105

Pardoll, D.M., 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer 12, 252–264. https://doi.org/10.1038/nrc3239

Parker, D., Martin, F.J., Soong, G., Harfenist, B.S., Aguilar, J.L., Ratner, A.J., Fitzgerald, K.A., Schindler, C., Prince, A., 2011. Streptococcus pneumoniae DNA initiates type I interferon signaling in the respiratory tract. mBio 2, e00016-00011. https://doi.org/10.1128/mBio.00016-11

Paton, J.C., Trappetti, C., 2019. Streptococcus pneumoniae Capsular Polysaccharide. Microbiol. Spectr. 7, 10.1128/microbiolspec.gpp3-0019–2018. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0019-2018

Peñaloza, H.F., Nieto, P.A., Muñoz-Durango, N., Salazar-Echegarai, F.J., Torres, J., Parga, M.J., Alvarez-Lobos, M., Riedel, C.A., Kalergis, A.M., Bueno, S.M., 2015. Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by Streptococcus pneumoniae. Immunology 146, 100–112. https://doi.org/10.1111/imm.12486

Picard, C., von Bernuth, H., Ghandil, P., Chrabieh, M., Levy, O., Arkwright, P.D., McDonald, D., Geha, R.S., Takada, H., Krause, J.C., Creech, C.B., Ku, C.-L., Ehl, S., Maródi, L., Al-Muhsen, S., Al-Hajjar, S., Al-Ghonaium, A., Day-Good, N.K., Holland, S.M., Gallin, J.I., Chapel, H., Speert, D.P., Rodriguez-Gallego, C., Colino, E., Garty, B.-Z., Roifman, C., Hara, T., Yoshikawa, H., Nonoyama, S., Domachowske, J., Issekutz, A.C., Tang, M., Smart, J., Zitnik, S.E., Hoarau, C., Kumararatne, D.S., Thrasher, A.J., Davies, E.G., Bethune, C., Sirvent, N., de Ricaud, D., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Guedes, M., Vitor, A.B., Rodrigo, C., Almazán, F., Méndez, M., Aróstegui, J.I., Alsina, L., Fortuny, C., Reichenbach, J., Verbsky, J.W., Bossuyt, X., Doffinger, R., Abel, L., Puel, A., Casanova, J.-L., 2010. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. Medicine (Baltimore) 89, 403–425. https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3181fd8ec3

Porte, R., Fougeron, D., Muñoz-Wolf, N., Tabareau, J., Georgel, A.-F., Wallet, F., Paget, C., Trottein, F., Chabalgoity, J.A., Carnoy, C., Sirard, J.-C., 2015. 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. 59, 6064–6072. https://doi.org/10.1128/AAC.01210-15

Porte, R., Van Maele, L., Muñoz-Wolf, N., Foligné, B., Dumoutier, L., Tabareau, J., Cayet, D., Gosset, P., Jonckheere, N., Van Seuningen, I., Chabalgoity, J.A., Simonet, M., Lamkanfi, M., Renauld, J.-C., Sirard, J.-C., Carnoy, C., 2017. Flagellin-Mediated Protection against Intestinal Yersinia pseudotuberculosis Infection Does Not Require Interleukin-22. Infect. Immun. 85. https://doi.org/10.1128/IAI.00806-16

Portsmouth, S., van Veenhuyzen, D., Echols, R., Machida, M., Ferreira, J.C.A., Ariyasu, M., Tenke, P., Nagata, T.D., 2018. Cefiderocol versus imipenem-cilastatin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by Gram-negative uropathogens: a phase 2, randomised, double-blind, non-inferiority trial. Lancet Infect. Dis. 18, 1319–1328. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30554-1

Pose, E., Coll, M., Martínez-Sánchez, C., Zeng, Z., Surewaard, B.G.J., Català, C., Andrés, M.V., Lozano, J.J., Ariño, S., Fuster, D., Niñerola-Bazán, A., Graupera, I., Muñoz, É., Lozano, F., Sancho-Bru, P., Kubes, P., Ginès, P., 2021. Programmed Death Ligand 1 Is Overexpressed in Liver Macrophages in Chronic Liver Diseases, and Its Blockade Improves

the Antibacterial Activity Against Infections. Hepatol. Baltim. Md 74, 296. https://doi.org/10.1002/hep.31644

Qian, F., Guo, X., Wang, X., Yuan, X., Chen, S., Malawista, S.E., Bockenstedt, L.K., Allore, H.G., Montgomery, R.R., 2014. Reduced bioenergetics and toll-like receptor 1 function in human polymorphonuclear leukocytes in aging. Aging 6, 131–139. https://doi.org/10.18632/aging.100642

Quinton, L.J., Mizgerd, J.P., 2015. Dynamics of lung defense in pneumonia: resistance, resilience, and remodeling. Annu. Rev. Physiol. 77, 407–430. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071937

Quinton, L.J., Walkey, A.J., Mizgerd, J.P., 2018. Integrative Physiology of Pneumonia. Physiol. Rev. 98, 1417–1464. https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2017

Rai, P., He, F., Kwang, J., Engelward, B.P., Chow, V.T.K., 2016. Pneumococcal Pneumolysin Induces DNA Damage and Cell Cycle Arrest. Sci. Rep. 6, 22972. https://doi.org/10.1038/srep22972

Ramos, H.C., Rumbo, M., Sirard, J.-C., 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. Trends Microbiol. 12, 509–517. https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.09.002

Reppe, K., Radünzel, P., Dietert, K., Tschernig, T., Wolff, T., Hammerschmidt, S., Gruber, A.D., Suttorp, N., Witzenrath, M., 2015. Pulmonary Immunostimulation with MALP-2 in Influenza Virus-Infected Mice Increases Survival after Pneumococcal Superinfection. Infect. Immun. 83, 4617–4629. https://doi.org/10.1128/IAI.00948-15

Rørvig, S., Østergaard, O., Heegaard, N.H.H., Borregaard, N., 2013. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. J. Leukoc. Biol. 94, 711–721. https://doi.org/10.1189/jlb.1212619

Rosain, J., Ngo, S., Bordereau, P., Poulain, N., Roncelin, S., Vieira Martins, P., Dragon-Durey, M.-A., Frémeaux-Bacchi, V., 2014. [Complement deficiencies and human diseases]. Ann. Biol. Clin. (Paris) 72, 271–280. https://doi.org/10.1684/abc.2014.0961

Sadeghi, K., Berger, A., Langgartner, M., Prusa, A.-R., Hayde, M., Herkner, K., Pollak, A., Spittler, A., Forster-Waldl, E., 2007. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. J. Infect. Dis. 195, 296–302. https://doi.org/10.1086/509892

Salvadori, G., Junges, R., Morrison, D.A., Petersen, F.C., 2019. Competence in Streptococcus pneumoniae and Close Commensal Relatives: Mechanisms and Implications. Front. Cell. Infect. Microbiol. 9, 94. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00094

Salvo, F., De Sarro, A., Caputi, A.P., Polimeni, G., 2009. Amoxicillin and amoxicillin plus clavulanate: a safety review. Expert Opin. Drug Saf. 8, 111–118. https://doi.org/10.1517/14740330802527984

Sauder, D.N., Skinner, R.B., Fox, T.L., Owens, M.L., 2003. Topical imiquimod 5% cream as an effective treatment for external genital and perianal warts in different patient populations. Sex. Transm. Dis. 30, 124–128. https://doi.org/10.1097/00007435-200302000-00006

Savinova, T., Brzhozovskaya, E., Shagin, D., Mikhaylova, Y., Shelenkov, A., Yanushevich, Y., Mayanskiy, N., 2020. A multiple drug-resistant Streptococcus pneumoniae of serotype 15A occurring from serotype 19A by capsular switching. Vaccine 38, 5114–5118.

https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.05.075

Sawa, T., Kooguchi, K., Moriyama, K., 2020. Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. J. Intensive Care 8, 13. https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6

See, J.-X., Chandramathi, S., Abdulla, M.A., Vadivelu, J., Shankar, E.M., 2017. Persistent infection due to a small-colony variant of Burkholderia pseudomallei leads to PD-1 upregulation on circulating immune cells and mononuclear infiltration in viscera of experimental BALB/c mice. PLoS Negl. Trop. Dis. 11. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005702

Segal, B.H., Leto, T.L., Gallin, J.I., Malech, H.L., Holland, S.M., 2000. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. Medicine (Baltimore) 79, 170–200. https://doi.org/10.1097/00005792-200005000-00004

Sencio, V., Barthelemy, A., Tavares, L.P., Machado, M.G., Soulard, D., Cuinat, C., Queiroz-Junior, C.M., Noordine, M.-L., Salomé-Desnoulez, S., Deryuter, L., Foligné, B., Wahl, C., Frisch, B., Vieira, A.T., Paget, C., Milligan, G., Ulven, T., Wolowczuk, I., Faveeuw, C., Le Goffic, R., Thomas, M., Ferreira, S., Teixeira, M.M., Trottein, F., 2020. Gut Dysbiosis during Influenza Contributes to Pulmonary Pneumococcal Superinfection through Altered Short-Chain Fatty Acid Production. Cell Rep. 30, 2934-2947.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.013

Sengupta, S., Chattopadhyay, M.K., Grossart, H.-P., 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Front. Microbiol. 4, 47. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047

Shak, J.R., Ludewick, H.P., Howery, K.E., Sakai, F., Yi, H., Harvey, R.M., Paton, J.C., Klugman, K.P., Vidal, J.E., 2013. Novel role for the Streptococcus pneumoniae toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. mBio 4, e00655-00613. https://doi.org/10.1128/mBio.00655-13

Shaper, M., Hollingshead, S.K., Benjamin, W.H., Briles, D.E., 2004. PspA protects Streptococcus pneumoniae from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. Infect. Immun. 72, 5031–5040. https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5031-5040.2004

Shi, C., Pamer, E.G., 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat. Rev. Immunol. 11, 762–774. https://doi.org/10.1038/nri3070

Simell, B., Vuorela, A., Ekström, N., Palmu, A., Reunanen, A., Meri, S., Käyhty, H., Väkeväinen, M., 2011. Aging reduces the functionality of anti-pneumococcal antibodies and the killing of Streptococcus pneumoniae by neutrophil phagocytosis. Vaccine 29, 1929–1934. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.121

Smith, A.M., Klugman, K.P., 2001. Alterations in MurM, a Cell Wall Muropeptide Branching Enzyme, Increase High-Level Penicillin and Cephalosporin Resistance in Streptococcus pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2393–2396. https://doi.org/10.1128/AAC.45.8.2393-2396.2001

Spoor, J., Farajifard, H., Rezaei, N., 2019. Congenital neutropenia and primary immunodeficiency diseases. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 133, 149–162. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.10.003

Srivastava, A., Henneke, P., Visintin, A., Morse, S.C., Martin, V., Watkins, C., Paton, J.C., Wessels, M.R., Golenbock, D.T., Malley, R., 2005. The apoptotic response to pneumolysin is

Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. Infect. Immun. 73, 6479–6487. https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6479-6487.2005

Stanhope, M.J., Lefébure, T., Walsh, S.L., Becker, J.A., Lang, P., Pavinski Bitar, P.D., Miller, L.A., Italia, M.J., Amrine-Madsen, H., 2008. Positive selection in penicillin-binding proteins 1a, 2b, and 2x from Streptococcus pneumoniae and its correlation with amoxicillin resistance development. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 8, 331–339. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.02.001

Stecher, B., Hapfelmeier, S., Müller, C., Kremer, M., Stallmach, T., Hardt, W.-D., 2004. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. Infect. Immun. 72, 4138–4150. https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004

Steinwede, K., Henken, S., Bohling, J., Maus, R., Ueberberg, B., Brumshagen, C., Brincks, E.L., Griffith, T.S., Welte, T., Maus, U.A., 2012. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) exerts therapeutic efficacy for the treatment of pneumococcal pneumonia in mice. J. Exp. Med. 209, 1937–1952. https://doi.org/10.1084/jem.20120983

Straume, D., Stamsås, G.A., Håvarstein, L.S., 2015. Natural transformation and genome evolution in Streptococcus pneumoniae. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 33, 371–380. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.020

Surabhi, S., Cuypers, F., Hammerschmidt, S., Siemens, N., 2020. The Role of NLRP3 Inflammasome in Pneumococcal Infections. Front. Immunol. 11, 614801. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.614801

Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell 140, 805–820. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022

Tan, A.C.L., Mifsud, E.J., Zeng, W., Edenborough, K., McVernon, J., Brown, L.E., Jackson, D.C., 2012. Intranasal administration of the TLR2 agonist Pam2Cys provides rapid protection against influenza in mice. Mol. Pharm. 9, 2710–2718. https://doi.org/10.1021/mp300257x

Tecle, T., Tripathi, S., Hartshorn, K.L., 2010. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity. Innate Immun. 16, 151–159. https://doi.org/10.1177/1753425910365734

Thanawastien, A., Joyce, K.E., Cartee, R.T., Haines, L.A., Pelton, S.I., Tweten, R.K., Killeen, K.P., 2021. Preclinical in vitro and in vivo profile of a highly-attenuated, broadly efficacious pneumolysin genetic toxoid. Vaccine 39, 1652–1660. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.04.064

Thibault, P., Logan, S.M., Kelly, J.F., Brisson, J.R., Ewing, C.P., Trust, T.J., Guerry, P., 2001. Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in Campylobacter jejuni flagellin. J. Biol. Chem. 276, 34862–34870. https://doi.org/10.1074/jbc.M104529200

To, E.E., Erlich, J., Liong, F., Luong, R., Liong, S., Bozinovski, S., Seow, H.J., O'Leary, J.J., Brooks, D.A., Vlahos, R., Selemidis, S., 2019. Intranasal and epicutaneous administration of Toll-like receptor 7 (TLR7) agonists provides protection against influenza A virus-induced morbidity in mice. Sci. Rep. 9, 2366. https://doi.org/10.1038/s41598-019-38864-5

Tomlinson, G., Chimalapati, S., Pollard, T., Lapp, T., Cohen, J., Camberlein, E., Stafford, S., Periselneris, J., Aldridge, C., Vollmer, W., Picard, C., Casanova, J.-L., Noursadeghi, M., Brown, J., 2014. TLR-mediated inflammatory responses to Streptococcus pneumoniae are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins. J. Immunol. Baltim. Md 1950 193, 3736–3745. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401413

Tooke, C.L., Hinchliffe, P., Bragginton, E.C., Colenso, C.K., Hirvonen, V.H.A., Takebayashi, Y., Spencer, J., 2019. β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. J. Mol. Biol. 431, 3472–3500. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002

Tseng, C.W., Liu, G.Y., 2014. Expanding roles of neutrophils in aging hosts. Curr. Opin. Immunol. 29, 43–48. https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.03.009

Tyers, M., Wright, G.D., 2019. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. Nat. Rev. Microbiol. 17, 141–155. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0141-x

Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.-G., Jung, Y.-J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K.J., Akira, S., 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. Nat. Immunol. 9, 769–776. https://doi.org/10.1038/ni.1622

Unicef, 2023. Pneumonia in Children Statistics [WWW Document]. UNICEF DATA. URL https://data.unicef.org/topic/child-health/pneumonia/ (accessed 6.13.24).

Uriarte, S.M., Powell, D.W., Luerman, G.C., Merchant, M.L., Cummins, T.D., Jog, N.R., Ward, R.A., McLeish, K.R., 2008. Comparison of proteins expressed on secretory vesicle membranes and plasma membranes of human neutrophils. J. Immunol. Baltim. Md 1950 180, 5575–5581. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5575

Van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R., 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. Lancet Infect. Dis. 14, 742–750. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7

van der Poll, T., Opal, S.M., 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. Lancet Lond. Engl. 374, 1543–1556. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61114-4

Van Giau, V., An, S.S.A., Hulme, J., 2019. Recent advances in the treatment of pathogenic infections using antibiotics and nano-drug delivery vehicles. Drug Des. Devel. Ther. 13, 327–343. https://doi.org/10.2147/DDDT.S190577

van Linge, C.C.A., Hulme, K.D., Peters-Sengers, H., Sirard, J.-C., Goessens, W.H.F., de Jong, M.D., Russell, C.A., de Vos, A.F., van der Poll, T., 2023. Immunostimulatory Effect of Flagellin on MDR-Klebsiella-Infected Human Airway Epithelial Cells. Int. J. Mol. Sci. 25, 309. https://doi.org/10.3390/ijms25010309

Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Ivanov, S., Porte, R., Deruy, E., Chabalgoity, J.A., Renauld, J.-C., Eberl, G., Benecke, A.G., Trottein, F., Faveeuw, C., Sirard, J.-C., 2014a. Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during Streptococcus pneumoniae infection. J. Infect. Dis. 210, 493–503. https://doi.org/10.1093/infdis/jiu106

Van Maele, L., Fougeron, D., Janot, L., Didierlaurent, A., Cayet, D., Tabareau, J., Rumbo, M., Corvo-Chamaillard, S., Boulenouar, S., Jeffs, S., Vande Walle, L., Lamkanfi, M., Lemoine, Y., Erard, F., Hot, D., Hussell, T., Ryffel, B., Benecke, A.G., Sirard, J.-C., 2014b. Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. Mucosal Immunol. 7, 489–500. https://doi.org/10.1038/mi.2013.66

Vijayan, A., Rumbo, M., Carnoy, C., Sirard, J.-C., 2018. Compartmentalized Antimicrobial Defenses in Response to Flagellin. Trends Microbiol. 26, 423–435. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.008

Vijayan, A., Van Maele, L., Fougeron, D., Cayet, D., Sirard, J.-C., 2020. The GM-CSF Released by Airway Epithelial Cells Orchestrates the Mucosal Adjuvant Activity of Flagellin. J. Immunol. Baltim. Md 1950 205, 2873–2882. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000746

Vilhena, C., Du, S., Battista, M., Westermann, M., Kohler, T., Hammerschmidt, S., Zipfel, P.F., 2023. The choline-binding proteins PspA, PspC, and LytA of Streptococcus pneumoniae and their interaction with human endothelial and red blood cells. Infect. Immun. 91, e0015423. https://doi.org/10.1128/iai.00154-23

von Bernuth, H., Picard, C., Jin, Z., Pankla, R., Xiao, H., Ku, C.-L., Chrabieh, M., Mustapha, I.B., Ghandil, P., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Sirvent, N., Guedes, M., Vitor, A.B., Herrero-Mata, M.J., Aróstegui, J.I., Rodrigo, C., Alsina, L., Ruiz-Ortiz, E., Juan, M., Fortuny, C., Yagüe, J., Antón, J., Pascal, M., Chang, H.-H., Janniere, L., Rose, Y., Garty, B.-Z., Chapel, H., Issekutz, A., Maródi, L., Rodriguez-Gallego, C., Banchereau, J., Abel, L., Li, X., Chaussabel, D., Puel, A., Casanova1, J.-L., 2008. Pyogenic Bacterial Infections in Humans with MyD88 Deficiency. Science 321, 691–696. https://doi.org/10.1126/science.1158298

Wallis, R.S., O'Garra, A., Sher, A., Wack, A., 2023. Host-directed immunotherapy of viral and bacterial infections: past, present and future. Nat. Rev. Immunol. 23, 121–133. https://doi.org/10.1038/s41577-022-00734-z

Wartha, F., Beiter, K., Albiger, B., Fernebro, J., Zychlinsky, A., Normark, S., Henriques-Normark, B., 2007. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect Streptococcus pneumoniae against neutrophil extracellular traps. Cell. Microbiol. 9, 1162–1171. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00857.x

Watson, L., Wilson, B.J., Waugh, N., 2002. Pneumococcal polysaccharide vaccine: a systematic review of clinical effectiveness in adults. Vaccine 20, 2166–2173. https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00112-3

Weiser, J.N., Ferreira, D.M., Paton, J.C., 2018. Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. Nat. Rev. Microbiol. 16, 355–367. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8

Westerink, M.A.J., Schroeder, H.W., Nahm, M.H., 2011. Immune Responses to pneumococcal vaccines in children and adults: Rationale for age-specific vaccination. Aging Dis. 3, 51–67.

Whitsett, J.A., Alenghat, T., 2014. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. Nat. Immunol. 16, 27–35. https://doi.org/10.1038/ni.3045

Wigerblad, G., Cao, Q., Brooks, S., Naz, F., Gadkari, M., Jiang, K., Gupta, S., O'Neil, L., Dell'Orso, S., Kaplan, M.J., Franco, L.M., 2022. Single-Cell Analysis Reveals the Range of Transcriptional States of Circulating Human Neutrophils. J. Immunol. Author Choice 209, 772–782. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200154

Wu, Y., Huang, H., Wu, J., Qin, Y., Zhao, N., Chen, B., Nong, Q., Huang, Y., Hu, L., 2023. Lead activates neutrophil degranulation to induce early myocardial injury in mice. Ecotoxicol. Environ. Saf. 268, 115694. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115694

Wykes, M., Lewin, S., 2018. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. Nat. Rev. Immunol. 18. https://doi.org/10.1038/nri.2017.112

Xie, X., Shi, Q., Wu, P., Zhang, X., Kambara, H., Su, J., Yu, H., Park, S.-Y., Guo, R., Ren, Q., Zhang, S., Xu, Y., Silberstein, L.E., Cheng, T., Ma, F., Li, C., Luo, H.R., 2020. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection.

Nat. Immunol. 21, 1119–1133. https://doi.org/10.1038/s41590-020-0736-z

Xiong, H., Carter, R.A., Leiner, I.M., Tang, Y.-W., Chen, L., Kreiswirth, B.N., Pamer, E.G., 2015. Distinct Contributions of Neutrophils and CCR2+ Monocytes to Pulmonary Clearance of Different Klebsiella pneumoniae Strains. Infect. Immun. 83, 3418–3427. https://doi.org/10.1128/IAI.00678-15

Yahiaoui, R.Y., den Heijer, C.D., van Bijnen, E.M., Paget, W.J., Pringle, M., Goossens, H., Bruggeman, C.A., Schellevis, F.G., Stobberingh, E.E., APRES Study Team, 2016. Prevalence and antibiotic resistance of commensal Streptococcus pneumoniae in nine European countries. Future Microbiol. 11, 737–744. https://doi.org/10.2217/fmb-2015-0011

Yamada, M., Gomez, J.C., Chugh, P.E., Lowell, C.A., Dinauer, M.C., Dittmer, D.P., Doerschuk, C.M., 2011. Interferon-γ production by neutrophils during bacterial pneumonia in mice. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 183, 1391–1401. https://doi.org/10.1164/rccm.201004-0592OC

Yang, H., Biermann, M.H., Brauner, J.M., Liu, Y., Zhao, Y., Herrmann, M., 2016. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. Front. Immunol. 7, 302. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00302

Yin, C., Heit, B., 2018. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. Cell Tissue Res. 371, 455–471. https://doi.org/10.1007/s00441-017-2731-8

Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N.V., Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., Malawista, S.E., de Boisfleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J., Kubes, P., 2012. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. Nat. Med. 18, 1386–1393. https://doi.org/10.1038/nm.2847

Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D.A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S., 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. Immunity 38, 79–91. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001

Yoon, S., Kurnasov, O., Natarajan, V., Hong, M., Gudkov, A.V., Osterman, A.L., Wilson, I.A., 2012. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. Science 335, 859–864. https://doi.org/10.1126/science.1215584

Yu, F., Cornicelli, M.D., Kovach, M.A., Newstead, M.W., Zeng, X., Kumar, A., Gao, N., Yoon, S.G., Gallo, R.L., Standiford, T.J., 2010. Flagellin Stimulates Protective Lung Mucosal Immunity: Role of Cathelicidin Related Antimicrobial Peptide (CRAMP). J. Immunol. Baltim. Md 1950 185, 1142–1149. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000509

Zafar, M.A., Wang, Y., Hamaguchi, S., Weiser, J.N., 2017. Host-to-Host Transmission of Streptococcus pneumoniae Is Driven by Its Inflammatory Toxin, Pneumolysin. Cell Host Microbe 21, 73–83. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.005

Zgair, A.K., 2012. Flagellin administration protects respiratory tract from Burkholderia cepacia infection. J. Microbiol. Biotechnol. 22, 907–916. https://doi.org/10.4014/jmb.1112.11079

Zhang, B., Chassaing, B., Shi, Z., Uchiyama, R., Zhang, Z., Denning, T.L., Crawford, S.E., Pruijssers, A.J., Iskarpatyoti, J.A., Estes, M.K., Dermody, T.S., Ouyang, W., Williams, I.R., Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A.T., 2014. Viral infection. Prevention and cure of rotavirus

infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. Science 346, 861–865. https://doi.org/10.1126/science.1256999

Zhang, Z., Cherryholmes, G., Chang, F., Rose, D.M., Schraufstatter, I., Shively, J.E., 2009. Evidence that cathelicidin peptide LL-37 may act as a functional ligand for CXCR2 on human neutrophils. Eur. J. Immunol. 39, 3181–3194. https://doi.org/10.1002/eji.200939496

Zhao, Y., Shao, F., 2015. The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type III secretion apparatus. Immunol. Rev. 265, 85–102. https://doi.org/10.1111/imr.12293

Zilionis, R., Engblom, C., Pfirschke, C., Savova, V., Zemmour, D., Saatcioglu, H.D., Krishnan, I., Maroni, G., Meyerovitz, C.V., Kerwin, C.M., Choi, S., Richards, W.G., De Rienzo, A., Tenen, D.G., Bueno, R., Levantini, E., Pittet, M.J., Klein, A.M., 2019. Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. Immunity 50, 1317-1334.e10. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.009

Annexes

Annexe I : Article III

Title : **Targeted delivery of flagellin by nebulization offers optimized respiratory immunity and defense against pneumococcal pneumonia**

Author list

Mara Baldry[1*§], Charlotte Costa[1*], Yasmine Zeroual[1*], Delphine Cayet[1], Jeoffrey Pardessus[2,3], Daphnée Soulard[1], Frédéric Wallet[1], Delphine Beury[4], David Hot[4], Ronan MacLoughlin[5], Nathalie Heuzé-Vourc'h[2,3*], Jean-Claude Sirard[1*§], Christophe Carnoy[1*]

Affiliations

[1] Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

[2] INSERM, Respiratory Disease Research Centre, U1100, F-37032 Tours, France

[3] University of Tours, F-37032 Tours, France

[4]Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 - UAR 2014 – PLBS - Plateformes Lilloises de Biologie & Santé, F-59000 Lille, France

[5]Aerogen, IDA Business Park, Dangan, Galway, Ireland

[*]Contributed equally

[§]Correspondence: mara.baldry@inserm.fr or jean-claude.sirard@inserm.fr

Ce travail a été soumis le 12 juin 2024 au journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

Abstract

Novel therapeutic strategies are urgently needed to combat pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* strains resistant to standard-of-care antibiotics. Previous studies have shown that targeted stimulation of lung innate immune defenses through intranasal administration of the Toll-like receptor 5 agonist flagellin, improves the treatment of pneumonia when combined with antibiotics. To promote translation to the clinic application, this study assessed the direct delivery of flagellin to the airways through nebulization using a vibrating mesh nebulizer in mice. Intranasal delivery achieved approximately 40% lung deposition of the administered flagellin dose, whereas nebulization yielded less than 1%. Despite these differences, nebulized flagellin induced a transient activation of lung innate immunity characterized by cytokine/chemokine production and neutrophil infiltration into airways analogous to intranasal administration. Furthermore, inhalation by nebulization resulted in an accelerated resolution of systemic pro-inflammatory responses. Lastly, adjunct therapy combining nebulized flagellin and amoxicillin proved effective against antibiotic-resistant pneumococcal pneumonia in mice. We posit that flagellin aerosol therapy represents a safe and promising approach to address bacterial pneumonia within the context of antimicrobial resistance.

Keywords: Nebulization, intranasal, flagellin, pneumococcal pneumonia, deposition, inhalation, vibrating mesh nebulizer

1. Introduction

Streptococcus pneumoniae, commonly known as pneumococcus, typically inhabits the human nasopharynx but can cause severe and often fatal diseases upon invasion of the host, such as pneumonia [1]. While vaccines prevent pneumococcal pneumonia, they target only a fraction of the nearly 100 serotypes identified thus far [2]. Consequently, there has been a rise in infections caused by serotypes not included in the current available vaccines, many of which exhibit antimicrobial resistance (AMR) [3, 4]. Resistance of *S. pneumoniae* to β-lactam antibiotics such as amoxicillin (the standard of care for pneumococcal pneumonia) as well as macrolides, is a major concern worldwide with the prevalence of resistance likely exceeding 20% in Europe alone [5]. Given the slow pace of new antimicrobial innovation and discovery [6], it is imperative to explore alternative therapeutic strategies to treat pneumococcal pneumonia otherwise untreatable with antibiotics.

Host-immune directed therapy, also referred to as immunotherapy, is a promising alternative strategy to antibiotics aimed at either activating antimicrobial immunity or modulating inflammation [7]. Toll-like receptors (TLRs) are pivotal pattern-recognition receptors involved in orchestrating the antimicrobial immune defenses. TLRs can recognize pathogen-associated or damage-associated molecular patterns and are widely expressed, particularly in immune cells and structural cells [8]. TLR agonists have been developed as immunotherapeutic agents in the field of infectious diseases. For example, the TLR5 agonist flagellin, a key structural protein of the bacterial flagellum, demonstrates notable immunotherapeutic potential against respiratory infections [9]. Flagellin is highly soluble and can be readily formulated in a saline solution for delivery in human, including inhalation. TLR5 is expressed by airway epithelial cells that are recognized as the principal drivers of TLR5-mediated protection. These cells orchestrate the production of cytokines, chemokines, and antimicrobial peptides, and facilitate the recruitment and activation of immune cells within the airways, particularly neutrophils [10-12]. Inhalation of flagellin prior to infection was found protective against pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* [12-14]. When combined with oral amoxicillin or intraperitoneal sulfamethoxazole, inhaled flagellin demonstrates synergistic effects, leading to a substantial decrease in pneumococcal load within the lungs of infected mice, otherwise not achieved with antibiotic or flagellin monotherapy [15, 16]. This combined treatment enables a reduction in the antibiotic dosage required to achieve a comparable therapeutic outcome observed with antibiotic. More importantly, the synergistic effect is also seen when the mice are infected with amoxicillin-resistant pneumococcus [15].

Additionally, adjunct flagellin therapy to antibiotics attenuates the selection of antibiotic resistant strains in a co-infection model emphasizing the relevance of this approach in combating AMR [17]. Another example of TLR agonist application in respiratory immunotherapy was demonstrated by the exposure of mice to aerosolized TLR2/6 and TLR9 agonists, which induced protection to subsequent respiratory infections with viruses or bacteria through the induction of respiratory innate immunity [18-21].

For treating infections of the lower respiratory tract, *i.e.*, pneumonia, direct delivery to the lungs is obvious, matching the delivery route and the pathogen location. The method of delivering therapeutics to the lungs depends on the clinical situation, the drug nature and its formulation, and it is crucial to deliver a therapeutic dose of the drug to the target site [22-26] While intranasal administration is a common method for targeting therapeutics into conducting airway in animal studies, it is not adapted to target the lungs, in particular the deep lungs, in humans [27]. Nebulization delivery, which produces an aerosol, stands out as the most efficient approach for administering drugs and biologics as liquid forms, into the lungs in patients under both spontaneous breathing and mechanical ventilation [23-25]. Vibrating mesh nebulizers allow for fast, effective and user-friendly drug delivery to the airways [28-30]. Moreover, they are usually more appropriate for biologics, limiting adverse effects during the aerosol generation [24, 26, 31]. Adapting flagellin to aerosol delivery is an important step towards the development of clinical investigations.

Here, we describe the use of a custom-made nebulization chamber for nose-only delivery of aerosols in mice using a vibrating mesh nebulizer, and studied the fate and activity of nebulized flagellin (hereafter referred to as FLAMOD), the activation of lung innate immunity, and the therapeutic efficacy in combination with antibiotics against pneumococcal pneumonia. Comparing with intranasal administration as a benchmark, our study reveals that nebulizer-mediated delivery of FLAMOD demonstrates comparable or superior efficacy in promoting lung immunity and protection, despite lower amounts being delivered to the lung. Moreover, it induces a less pronounced and enduring impact on systemic pro-inflammatory responses.

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial strains

Streptococcus pneumoniae serotype 1 (clinical isolate E1586) was obtained from the National Reference Laboratory—Ministry of Health, Uruguay [12]. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19F (clinical isolate LILPNEUHC 19F) was obtained from the University Hospital of Lille (Frédéric Wallet, CHU Lille, France); it is a multidrug-resistant clinical isolate from a bacteremia patient, and is resistant to amoxicillin (minimal inhibitory concentration, MIC_{AMX} = 1.5 μg/ml), erythromycin and tetracycline, and has intermediate resistance to cefotaxime and ceftriaxone. Working stocks were prepared as described previously [12]. Briefly, fresh colonies grown on blood- agar plates were incubated in Todd Hewitt Yeast Broth (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 broth + 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 and incubating at 37°C for 18 h with 5% CO_2.

2.2 FLAMOD preparation

Flagellin was produced in *Escherichia coli* by the Vaccine Development department at Statens Serum Institut, Denmark. The custom-designed flagellin used in the present study, *i.e.*, FLAMOD (recombinant flagellin $FliC_{\Delta 174\text{-}400}$ as described in Nempont et al 2008 [32] harboring one extra amino acid at the N terminus) derives from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FliC. FLAMOD was purified by filtration and chromatography and resuspended in NaPi buffer: 10 mM phosphate, 145 mM NaCl, polysorbate 80 0.02 % (w/v) pH 6.5. Immunostimulatory activity was validated using the HEK-Dual™ hTLR5 cells assay (Invivogen). The endotoxin content in the protein preparation was assessed with a *Limulus* assay (Pyrochrome, kinetic LAL assay from Associates of Cape Cod Inc.).

2.3 Mouse treatment and infection

All experiments complied with institutional regulations and ethical guidelines, were approved by Institutional Animal Care and Use Committee (E59-350009, Institut Pasteur de Lille; Protocol APAFIS#16966 201805311410769_v3) and were conducted by qualified personnel. Female BALB/cJRj mice, male C57BL/6JRj mice (6–8 weeks old) (Janvier Laboratories, Saint

Berthevin, France) and female and male *Tlr5*$^{-/-}$ (varying ages, breed in-house on C57BL/6JRj background) were maintained in ventilated cages (Innorack® IVC Mouse 3.5) and handled in a laminar flow biosafety cabinet (Class II Biohazard, Tecniplast).

Intranasal treatment was performed with 2.5 µg or 30 µg FLAMOD in 30 µl NaPi buffer that was administered intranasally under light anesthesia via isoflurane inhalation (Axience, Pantin, France). The dose of 2.5 µg of FLAMOD has been previously demonstrated protective in pneumococcal infections while the dose of 30 µg corresponds to the amount of FLAMOD used for the biodistribution analysis. Control animals (mock treated) received intranasal NaPi buffer alone. For FLAMOD administration using the Aerogen® Solo vibrating mesh nebulizer (Aerogen, Ireland) in combination with ProX controller (Aerogen, Ireland), a custom-made chamber was used (EuroBioConcept, Bonneuil sur Marne, France). One milliliter of NaPi buffer or FLAMOD at 250 µg/mL was administered for 4-5 minutes to vigilant mice using the Aerogen® Solo nebulizer (**Supplementary Figure 1**). For intravenous administration, FLAMOD was injected retro-orbitally at concentrations of 10 or 30 µg per mouse prepared in 200 µl PBS. After treatment, mice were sacrificed via the intraperitoneal injection of 5.47 mg sodium pentobarbital in 100 µl PBS. Broncholalveolar lavage (BAL) fluids were obtained by intratracheal injection of 2 × 1 ml PBS supplemented with protease inhibitors (Roche). Serum was collected by intracardiac puncture and separated from whole blood in Z-Gel microtubes (Sarstedt). BAL and serum samples were stored at −20°C prior to analysis.

Prior to 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 µl of PBS. For primary infections with the serotype 1 isolate E1586 in BALB/c mice, $2x10^6$ CFU were inoculated intranasally in 30 µl PBS, as described previously [16]. For the pneumococcal superinfection, C57BL/6 mice were used as previously described [16, 33]. In this model, animals were first infected i.n.with 50 plaque-forming units (PFU) of the pathogenic, murine-adapted H3N2 influenza A virus strain Scotland/20/74 in 30 µl of PBS. Seven days later, i.n. *S. pneumoniae* infection was induced with $1x10^5$ CFU of the serotype 19F strain in 30 µl of PBS. Mice were treated 12 h post-infection with intranasal or nebulized FLAMOD and with intragastric administration of 5 µg or 1 mg of amoxicillin (Clamoxyl for injection, GlaxoSmithKline) in 200 µl of water. Mock treated control animals received NaPi buffer and water. After 24 h infection, lungs and spleen were homogenized with an UltraTurrax homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany), and viable bacterial counts were determined on blood agar plates.

2.4 FLAMOD-specific ELISA

Maxisorp 96 well (Nunc 442404) plates were coated with 50 µl of capture anti-FLAMOD monoclonal antibody (Mab, 9H10-R2-2E8 mouse IgG1 - lot vt220802-7034) at 5µg/ml in D-PBS 1X (PBS, Gibco 14190-094) and incubated overnight at 4°C. The plates were washed 3 times with PBS/Tween 20 0.05% (PBS-T) and saturated for 2 h at room temperature (RT) with 300 µl per well ELISA/ELISPOT diluent 1X (Invitrogen 00-4202-56, 5X solution diluted in sterile water Versylene Fresenius B230531). The plates were washed again 3 times with PBS/T. Serum samples were diluted 1:5 in ELISA /ELISPOT diluent (i.e., 20% final ratio of mouse serum), BAL samples 1:200 and 50 µl were distributed per well in the microplates. To generate a calibration curve, FLAMOD (lot 4182.5) was diluted from 100 ng/ml to 0.78 ng/ in ELISA /ELISPOT diluent substituted with 20% mouse serum (in-house serum harvested from naïve C57BL/6JRj mice) and 50 µl were distributed per well. Plates were incubated for 2 h at RT and washed 3 times with PBS-T. Fifty µl per well of the biotinylated FLAMOD-specific detection Mab (4C1H7 mouse IgG1 - lot b220809-7034, [34]) diluted at 2 µg/ml in ELISA/ELISPOT diluent were distributed and incubated for 1 h at RT. Plates were washed 3 times with PBS-T and 50 µl per well of the avidin-HRP (eBioscience 18-4100-51) diluted 1:2000 in ELISA/ELISPOT diluent were added and incubated for 25 min at RT. Plates were washed 5 times with PBS-T. The reaction was developed using 50 µl per well of the TMB substrate reagent (Interchim ref: UP664781). Plates were incubated for 5 min at RT in the dark, prior to stopping the reaction by adding 25 µl H_2SO_4 2N per well. The plates were read immediately at 450 nm absorbance and subtracted at 540-570 nm. The values were transformed using a four-parameter logistic regression (R^2>0.99) to calculate the concentration of FLAMOD in the biological samples.

2.5 Transcriptional analysis by RT-qPCR and RNA sequencing

Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA Plus kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). Trachea and whole lungs were homogenized in RA1 buffer with an UltraTurrax homogenizer. Lysates of nasal cavity were obtained by injecting 500 µl RA1 buffer through a 22-gauge canula that was inserted into the posterior naris along the direction of the nostrils and collecting from the anterior naris. Bronchial epithelium sampling was performed as described [35]. Briefly, sanded PE50 tubing was inserted into the main bronchus via the trachea with gentle brushing and immediately processed for RNA extraction. Total RNA was 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 ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) 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 treated vs. control group ($\Delta\Delta Cq$). All the primers used in this study are listed in **Supplementary Table 1**.

For sequencing, RNA concentration and quality were evaluated by spectrophotometry (Nanodrop) and the TapeStation 4200 (Agilent Technologies), respectively. The libraries were prepared using the QIAseq stranded mRNA library kit (Qiagen), quantified by quantitative PCR (KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms; KapaBiosystems) and pooled in an equimolar manner prior to sequencing on a NovaSeq sequencer (Illumina) in 2 × 150 bp. RNA sequencing data (FASTQ files) were mapped to the mouse genome build (GRCm39) with STAR (STAR-2.7.10a). The mapped reads were annotated using GENCODE M30 GTF file. Differentially expressed genes analysis (DEG) were performed using the DESeq2 package (1.38.2 [36]). Median of ratio method was used for data normalization. Genes with null sum of read counts were filtered out. Genes with p-adjusted value < 0.05 and log2 fold change >1 were considered as differentially expressed. Over-Representation Analysis (ORA) was performed using ClusterProfiler (version 4.6.2) and the functions enrichGo and CompareCluster to identify Biological Processes. Analysis was carried out using Bioconductor (version 3.16.0). Sequencing data have been deposited in the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus repository under the accession number GSE252037.

2.6 Cytokine and chemokine production

Protein concentrations of CCL20, CXCL2, IL-6, IL-22, and SAA were determined in BAL fluids and serum by enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA kit from eBioscience, R&D Systems or Becton Dickinson).

2.7 Scintigraphy in mice

All scintigraphy experiments were conducted on male C57BL/6JRj (9-16 weeks old), approved by local ethics committee and recorded under the agreement reference N°11682-201700217166146. Prior to the scintigraphy study, a perfusion scintigraphy study was performed to evaluate technetium 99m (^{99m}Tc) γ-rays absorption by tissues. Mice were slightly sedated via isoflurane inhalation (Vetflurane, Virbac, France) and a suspension of macro aggregates labeled with ^{99m}Tc (^{99m}Tc-MAA, Pulmocis, Curium Pharma, France) was

intravenously injected through the tail vein. After ensuring that all ^{99m}Tc-MAA was trapped in the pulmonary capillaries, animals were imaged in anterior static position using Biospace® gamma imager (Biospace, France) for 60 seconds under isoflurane anesthesia. This step allowed to determine the attenuation coefficient of animal tissues against γ-rays, which must be considered when calculating activity measured in mice, and takes into account the background activity and radioactive decay of technetium. Moreover, it allows the illustration of the region of interest (ROI). For the scintigraphy study, inhalation by intranasal and nebulization routes were compared. For intranasal delivery mice were sedated, then 40 µL of 0.9% NaCl solution mixed with diethylenetriaminepentaacetic acid labeled with ^{99m}Tc (^{99m}TC-DTPA, Technescan™ DTPA, Curium Pharma, France) were rapidly administered. For the nebulization route, experiments were performed as described in 2.3 using the custom-made nebulization chamber and an Aerogen® Solo to nebulize 1 mL of 0.9% NaCl solution mixed with 0.1 mL of ^{99m}TC-DTPA (n=4 per nebulization round). Immediately after i.n. or nebulized administration, mice were imaged for 120 seconds under isoflurane anesthesia.

2.8 Histology and staining

The left lung from each mouse was collected in buffered 10% formalin (Q-Path VWR Chemicals), included in paraffin, and 3- to 5-µm tissue sections were prepared (Althisia, Troyes, France). Tissue sections (n=3 for FLAMOD treated and n=2 for untreated control) were stained with a classical hematoxylin and eosin reagent or processed for immunohistochemistry. Immunohistochemistry on neutrophils was performed using rabbit monoclonal anti-Ly6G antibody (clone EPR22909-135). The Ly6G-stained images were evaluated for neutrophil infiltration.

2.9 Statistical Analysis

Results were expressed as individual values and median [interquartile range] or mean ± standard error of the mean (SEM). Groups were compared using a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunn's post-test (for three or more groups) and two-way ANOVA mixed model with Šídák's multiple comparisons test. All analyses were performed using GraphPad Prism software (version 10.10, GraphPad Software Inc., San Diego, CA), and the threshold for statistical significance was set to $p<0.05$.

3. Results

3.1 Fate of inhaled FLAMOD in mice after intranasal and aerosol administration

Understanding the fate of inhaled flagellin is imperative to characterizing its safety and efficacy parameters as an adjunct to antibiotics. The outcome of flagellin (defined here as FLAMOD) was investigated after intranasal administration of 30 µg FLAMOD in bronchoalveolar lavages (BAL), as a surrogate of lung deposition, and serum using a FLAMOD-specific ELISA. Immediate recovery after administration (<5 min) revealed that around 30 % of the administered FLAMOD reached the lungs, *i.e.,* 8.6 ± 2.0 µg (**Figure 1A**). Similar levels of lung deposition (~45 %) were defined using scintigraphy (**Figure 1C-D**)**.** FLAMOD was rapidly degraded over time and became undetectable after 24 h. In addition, serum levels of FLAMOD remained consistently below the lower limit of quantification (LLOQ), *i.e.,* <4 ng/mL, at all timepoints following administration.

Mice were also exposed to nebulized FLAMOD (1 ml at 250 µg/mL) for 5 min using a customized chamber connected to an Aerogen® Solo mesh nebulizer (**Supplementary Figure 1A-B**). FLAMOD deposition in BAL reached 25 ± 16 ng immediately after aerosolization and decreased to below the LLOQ within the first 2 h (**Figure 1B**). In contrast, scintigraphy determined that 0.52 % lung deposition after nebulization is achieved which is equivalent to 1.30 µg FLAMOD (**Figure 1E-F**). FLAMOD was undetectable in serum post-nebulization, indicating no systemic leakage. The difference in lung deposition between the two analytical methods (ELISA and scintigraphy) highlights differing sensitivities and suggests rapid degradation of FLAMOD upon aerosol delivery. To better understand the fate of FLAMOD when in the circulatory compartment and to have a positive reference for immune activation when FLAMOD is found directly in the systemic compartment, FLAMOD was injected intravenously (**Supplementary Figure 2**). Serum levels of FLAMOD corresponding to around 60% delivered dose were detected immediately after injection (< 5 min) followed by a decline to <1% by 60 min post-administration. This suggests rapid FLAMOD clearance. In conclusion, inhalation of FLAMOD by the intranasal or nebulization route in mice provides local delivery without systemic leakage, while resulting in distinct levels of lung deposition.

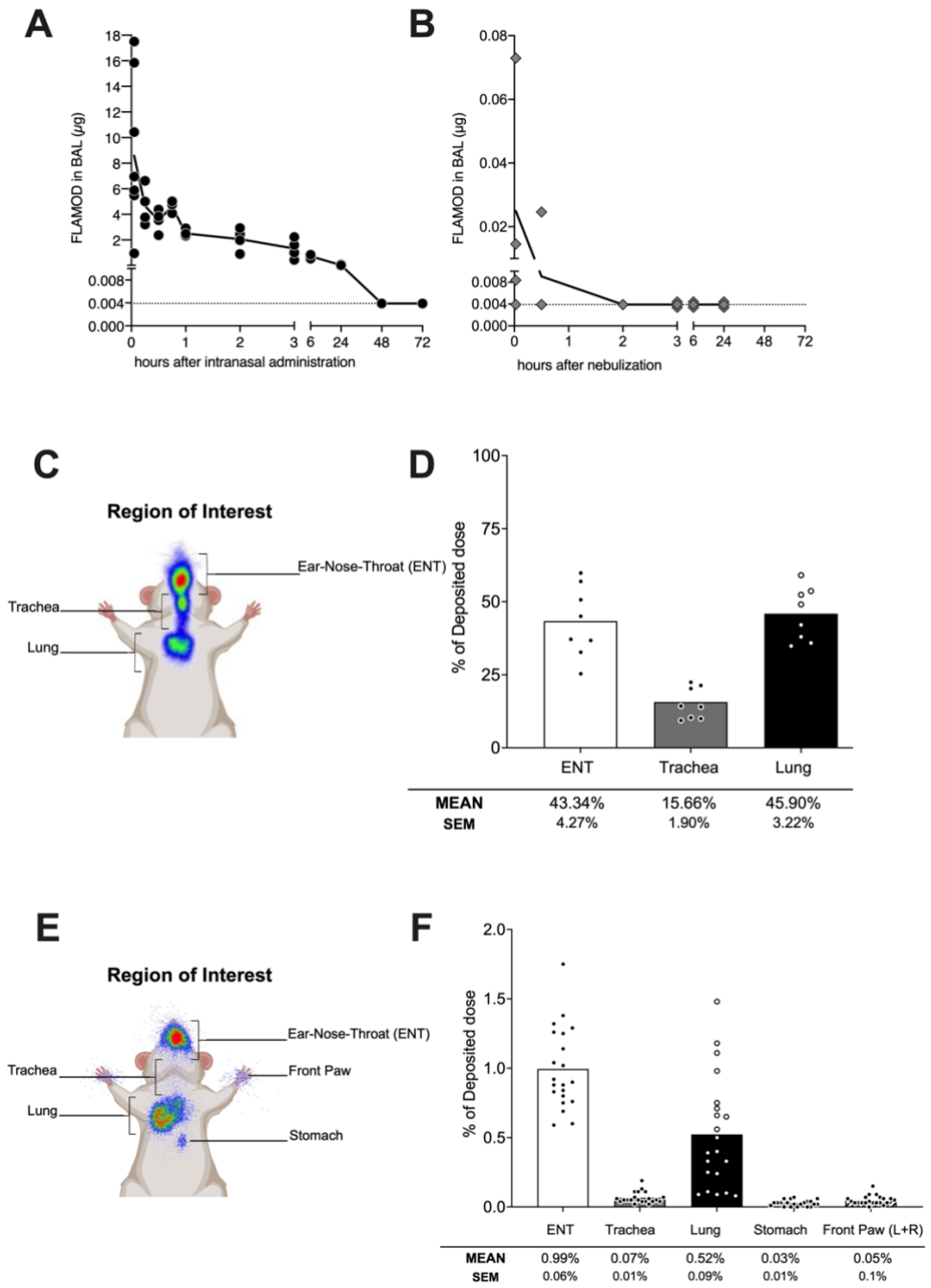


Figure 1. FLAMOD biodistribution after intranasal or aerosol inhalation. BALB/c mice (n=4-8) per time point and treatment group) were subjected to intranasal administration of 30 µg FLAMOD or nebulization with 1 ml of FLAMOD at 250 µg/ml in NaPi buffer, utilizing a mesh-nebulizer and aerosol chamber setup. Control groups were either treated with NaPi buffer or left untreated. BAL was collected at varying timepoints to measure FLAMOD. **(A-B)** FLAMOD deposition in BAL after **(A)** intranasal administration or **(B)** nebulization was quantified using a FLAMOD-specific ELISA. Dotted line indicates LLOQ of FLAMOD, i.e., 3.9 ng/ml. Deposition of intranasal FLAMOD (**C-D**) and nebulized FLAMOD (**E-F**) was further analyzed by scintigraphy. Mice were subjected to intranasal administration of 0.9% NaCl containing ^{99m}TC-DTPA (n=8), or nebulization with 0.9% NaCl containing ^{99m}TC-DTPA (n=21). Left images show the regions of interest (ROI) where

radioactivity was measured, and the quantitative data for each ROI are presented on the right panel. The amount of aerosol deposited is expressed as a percentage of the total amount administered.

3.2 Immunostimulatory activity of inhaled FLAMOD

We first confirmed the TLR5-dependent activation of immune mediators by FLAMOD using TLR5 knock-out mice. As expected, when FLAMOD was provided intravenously to wild-type and TLR5 knock-out mice respectively, no immune mediators (namely CCL20, IL-6 and IL-22) were produced in the TLR5 knock-out mice in response to FLAMOD treatment (**Supplementary Figure 3**). We next analyzed the TLR5-specific immune responses to nebulized FLAMOD based on the expected immune outcomes after intranasal delivery [11, 32, 37-39]. The activation of respiratory innate immunity subsequent to intranasal or nebulization delivery of FLAMOD exhibited comparable levels of CCL20, CXCL2 and IL-6 in BAL (**Figure 2A**). However, aerosol delivery resulted in a less persistent immune response compared to intranasal administration, generally returning to steady-state within a shorter period to that of intranasal. Serum analysis revealed that nebulization triggered similar levels of IL-6 and CCL20, as well as shorter responses compared to intranasal delivery (**Figure 2B**). The serum concentration of the acute phase inflammation marker serum amyloid A (SAA) was globally lower in response to nebulization than intranasal delivery. Importantly, IL-22 was undetectable in serum after nebulization in contrast to intranasal route. We previously showed that IL-22 is produced when flagellin is found systemically but not when it stays in the mucosal compartment [39]. Thus, this cytokine indicates leakage of flagellin into the bloodstream and thus represents a surrogate marker of lung barrier integrity. The absence of IL-22 in the serum of nebulized mice suggests that FLAMOD does not cross the pulmonary barrier after nebulization, particularly when compared to the very high IL-22 levels detected in mice receiving FLAMOD intravenously (**Supplementary Figure 2**). These findings fully corroborate the data on FLAMOD biodistribution presented above.

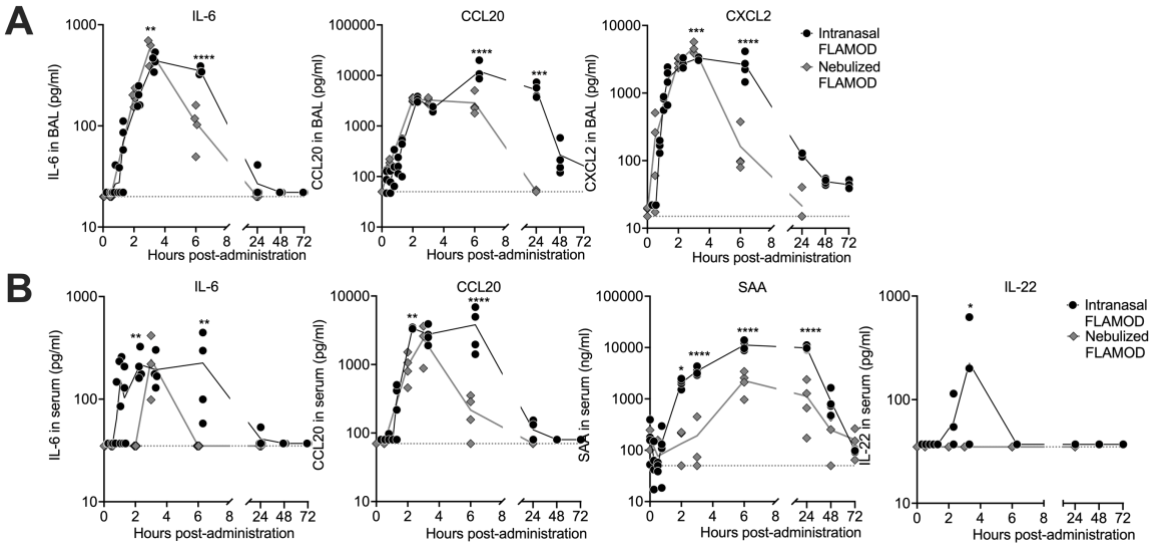


Figure 2. Transient innate immune activation following FLAMOD inhalation. BALB/c mice (n=4 per time point and treatment group) were subjected to intranasal administration of 30 µg FLAMOD or nebulization with 1 ml of FLAMOD at 250 µg/ml in NaPi buffer, utilizing a mesh-nebulizer and aerosol chamber setup, or left untreated. BAL and serum were collected at varying timepoints to monitor immune response. Cytokine and chemokine concentrations in BAL fluids **(A)** and serum **(B)**. Dotted lines indicate LLOQ. Statistical differences were analyzed using two-way ANOVA (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

Consistent with the findings from ELISA analysis of BAL (**Figure 1**) and similarly to the previous finding following intranasal delivery [11, 32, 37], nebulized FLAMOD elicited a temporary increase in transcriptional activity of pro-inflammatory genes, reaching its peak at 2 h post-administration (**Supplementary Figure 4)**. Given that inhalation delivers the drug into the nose, trachea, bronchi and lung, we compared the gene expression from these compartments 2 h after the treatment of animals with nebulized or intranasal FLAMOD and normalized the expression profiles to the buffer treated animals (**Figure 3**). Inhaled FLAMOD stimulated the transcription of *Il6*, *Ccl20* and *Cxcl2* in all respiratory compartments. Interestingly, with the exception of the nasal compartment, activation levels were significantly higher under the nebulization condition than for intranasal inhalation. This finding is also intriguing when considering that scintigraphy data displayed negligible tracheal deposition during nebulization (0.07%) as opposed to that deposited intranasally (15.7%), amounting to a 224-fold difference. To further compare the modes of inhalation, RNA-seq analysis was conducted on lungs collected at 2 h after FLAMOD or buffer administration (**Figure 4 and Supplementary Table 2**). This analysis identified 955 and 1470 differentially expressed genes (DEG) that were significantly regulated ($log_2FC \geq 1$ and $p \leq 0.05$) by aerosol and intranasal

inhalation, respectively. Similar genes were up- and down-regulated for both types of FLAMOD administration as depicted in **Figure 4A-B and Supplementary Table 2**. For both inhalation modes, over-representation analysis (ORA) revealed a significant modulation of signaling pathways associated with response to bacterial molecules, innate immunity and innate receptors, NF-κB, cytokine/chemokine production, immune cell activation and migration, defense to pathogens or negative regulation to dampen inflammation (**Figure 4C and Supplementary Table 3**). Despite the significant disparity in FLAMOD deposition observed across nebulization and intranasal delivery, our findings demonstrated that nebulization is a potent method for eliciting TLR5-specific innate immune responses within the respiratory tract.

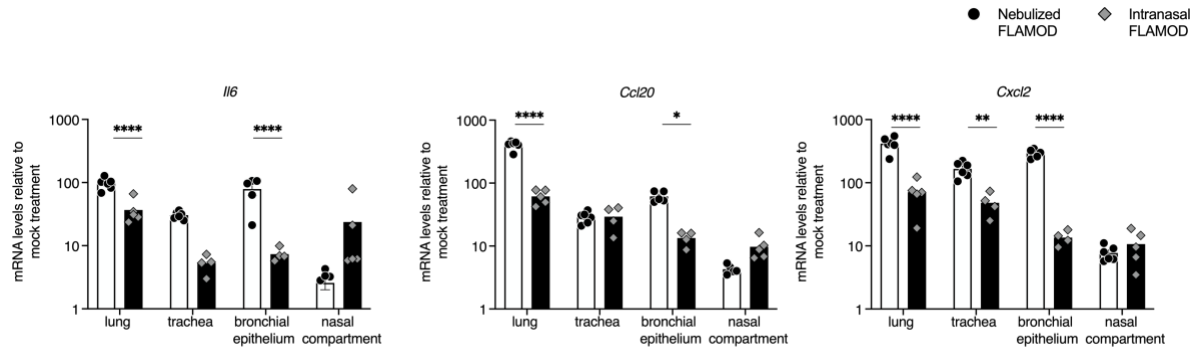


Figure 3. Compartmentalization of transcriptional response to FLAMOD inhalation. BALB/c mice (n=5-6 per time point and treatment group) were subjected to intranasal administration of 30 µg FLAMOD or nebulization with 1 ml of FLAMOD at 250 µg/ml in NaPi buffer, utilizing a mesh-nebulizer and aerosol chamber setup, or mock treatment with NaPi buffer. Lungs, trachea, bronchial epithelium and nasal lavages were analyzed at 2 h post-administration**.** Gene expression of innate immune markers was measured by RT-qPCR. The relative mRNA levels of selected genes are expressed against the reference gene *Actb* and normalized to the mock condition. Statistical differences were analyzed using two-way ANOVA (*p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001).

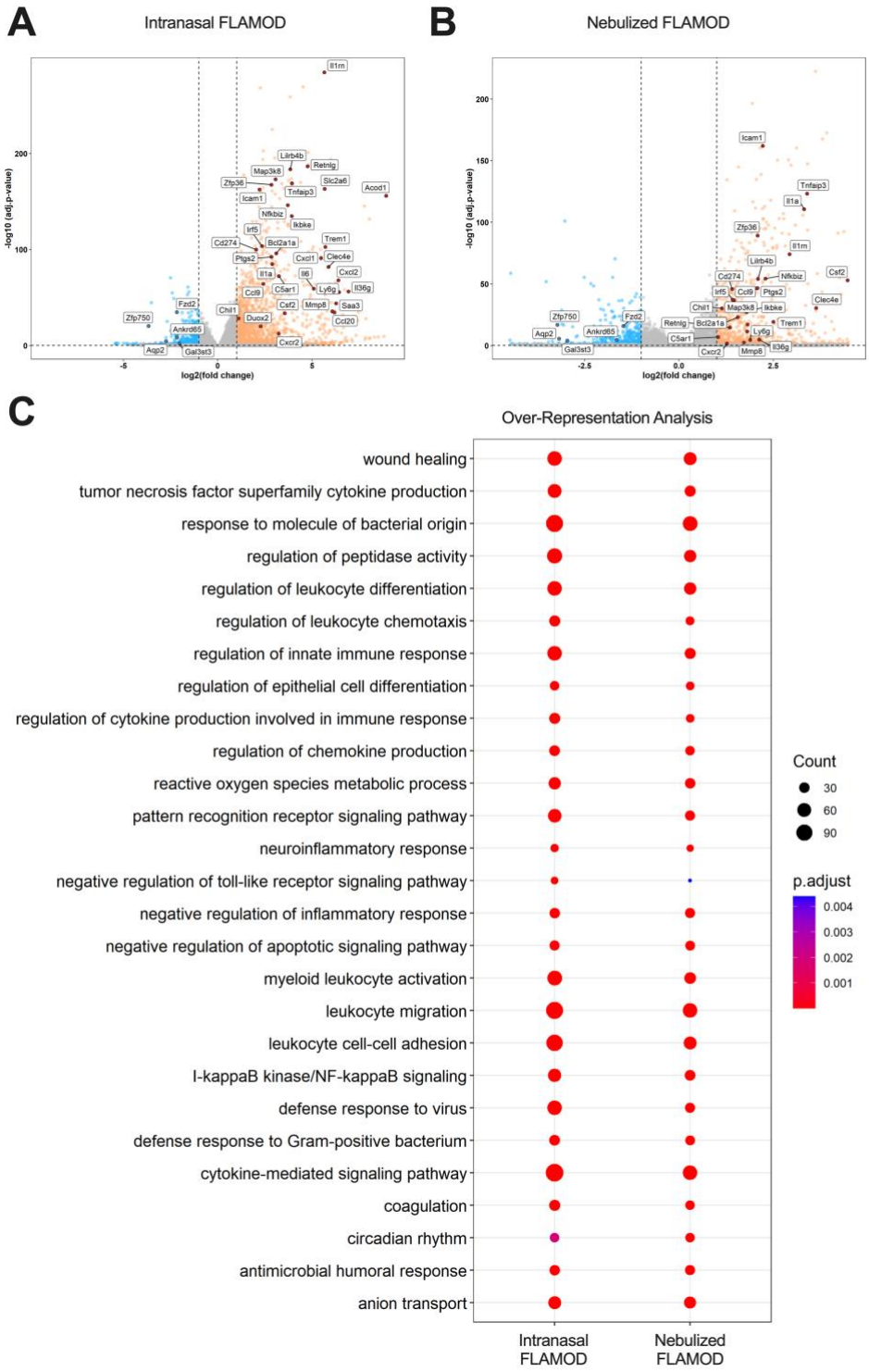


Figure 4. FLAMOD inhalation by the intranasal or nebulization route activates similar innate immune responses. BALB/c mice (n=4 per time point and treatment group) were subjected to intranasal administration of 30 µg FLAMOD or nebulization with 1 ml of FLAMOD at 250 µg/ml in NaPi buffer, utilizing a mesh-nebulizer and aerosol chamber setup, or mock treatment with NaPi buffer. Lungs were collected 2 h post-administration for RNA sequencing. **(A-B)** Volcano plots of DEG between intranasal FLAMOD and intranasal buffer group **(A)** and nebulized FLAMOD and nebulized buffer group **(B)**. Labelled genes represent the top DEG. **(C)** Immune pathways in nebulized and intranasal groups were identified using ORA. The common biological processes

enriched in both conditions are represented. The count and p.adjust scales indicate the number of genes enriched in the pathway and the significance of enrichment, respectively.

Neutrophil recruitment stands as a pivotal indicator of TLR5 activation within pulmonary tissues [10, 16, 37, 40, 41]. To elucidate the influence of inhalation on this process, lung samples were analyzed by immunohistochemical staining employing the anti-Ly6G antibody for neutrophil detection (**Figure 5**). Evaluations were performed at two distinct time points: 4 hours post-treatment, coinciding with the peak of neutrophil recruitment in response to flagellin [10, 37], and 24 hours post-treatment, representing a period wherein FLAMOD becomes undetectable and most activation markers return to baseline levels. After 4 h, a comparable pattern of neutrophil infiltration was observed between the two inhalation methods, with a tendency for more clustering around the bronchioles rather than within the alveolar space. However, a notable contrast emerged at 24 h between the intranasal and nebulized conditions. In the intranasal group neutrophil presence remained elevated, while in the nebulized group the level of infiltration resembled that of untreated controls. Taken together, these observations suggest that nebulized FLAMOD can induce transient lung neutrophil infiltration, with a more rapid return to baseline compared to intranasal administration.

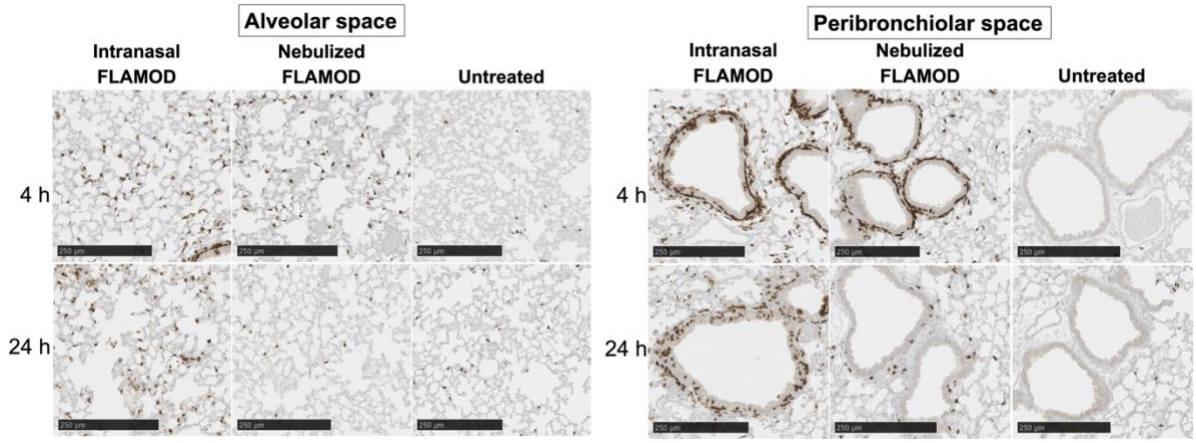


Figure 5. Transient neutrophil recruitment in response to FLAMOD inhalation. BALB/c mice (n=3 per FLAMOD treatment) were subjected to intranasal administration of 30 µg FLAMOD or nebulization with 1 ml of FLAMOD at 250 µg/ml in NaPi buffer, utilizing a mesh-nebulizer and aerosol chamber setup, or mock treatment with buffer (n=2). Lungs were collected 4 h and 24 h after FLAMOD inhalation and processed for immunohistochemical Ly6G-staining of neutrophils (brown). (**A)** Alveolar space and **(B)** peribronchiolar space. The images are representative of individual animals.

3.3 Therapeutic efficacy of nebulized FLAMOD against pneumococcal pneumonia

Nebulization of FLAMOD was next compared to intranasal delivery of FLAMOD as an adjunct therapy to the antibiotic amoxicillin (AMX) in a pneumococcal superinfection model (**Figure 6A**). To this end, the animals were superinfected with a serotype 19F of *S. pneumoniae* that displays resistance to AMX (MIC_{AMX}, of 1.5 μg/ml). As expected, treatment with AMX and intranasal FLAMOD substantially improved bacterial clearance compared to AMX alone (**Figure 6B**). The same synergy and efficacy were found when FLAMOD was nebulized resulting in significant reduction of bacterial burden in the lung as well as bacterial dissemination in spleen (**Figure 6C**). In the context of superinfection, the fate of FLAMOD in the BAL after intranasal inhalation or nebulization was in line with that observed for naïve mice (**Figure 6D-E**). However, FLAMOD was found at very low levels in the bloodstream of mice treated intranasally, suggesting marginal leakage (**Figure 6D)**. The immune activation profiles in lung and bloodstream were also similar to those seen in mice without prior infection, implying that activity of inhaled FLAMOD did not change in the context of infection (**Figure 6F-G**). Importantly, IL-22 was not detected in the bloodstream after nebulization with FLAMOD, indicating that even when the lungs are compromised by infection, leakage is not observed. Finally, the therapeutic synergy of nebulized FLAMOD with AMX was also effective in a primary respiratory infection with a serotype 1 amoxicillin-sensitive strain (MIC_{AMX} = 0.016μg/ml) (**Supplementary Figure 5**). Collectively, these data indicate that despite the low lung deposition upon nebulization in mouse models of antibiotic-resistant and antibiotic-sensitive pneumococcal infections, the delivered dose is sufficient to provide therapeutic efficacy within the range observed for intranasal administration.

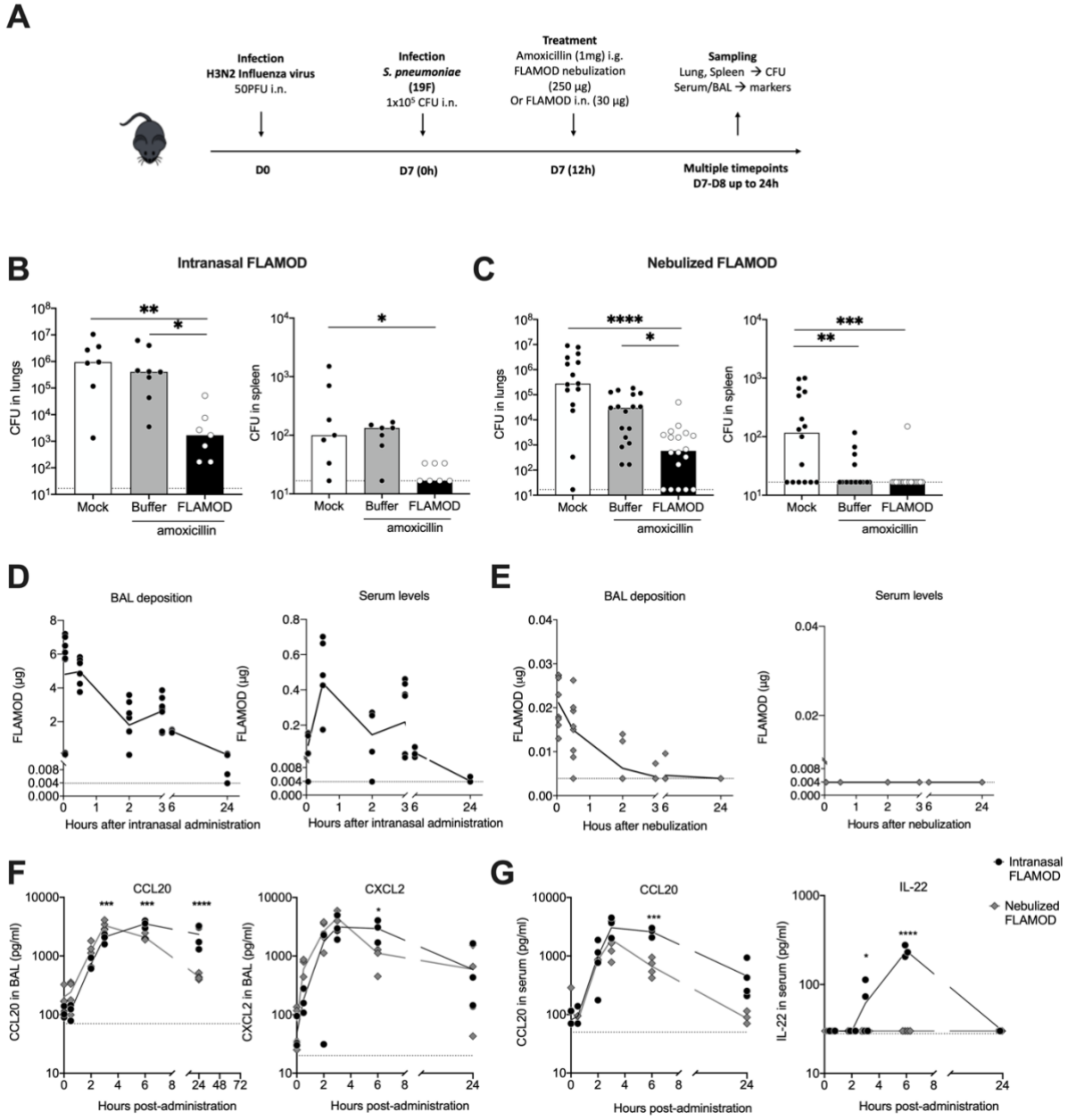


Figure 6. FLAMOD inhalation efficacy, kinetics and therapeutic activity in pneumococcal superinfection. **(A)** C57BL/6 mice (n=7-8 for intranasal and 15-19 for nebulization, per condition) were infected intranasally with influenza virus followed 7 days later by intranasal inoculation of $1x10^5$ CFU of *S. pneumoniae* 19F. Animals were treated at 12 hours post pneumococcal infection by intranasal administration of 2.5 µg **(B, F-G) or** 30 µg **(D)** FLAMOD or nebulization with 1 ml of FLAMOD at 250 µg/ml in NaPi buffer **(C, E-G)** combined with intragastric administration of 1 mg amoxicillin. Mock animals received NaPi buffer and water. **(B-C)** Lungs and spleen for CFU were sampled 12 h post-treatment to monitor therapeutic effects of intranasal administration **(B)** or nebulized FLAMOD **(C)**. Statistical differences between the groups were analyzed by One-way ANOVA (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001). **(D-G)** BAL and serum were sampled to measure FLAMOD and immune activity. **(D-E)** FLAMOD distribution in BAL and serum after intranasal administration **(D)** and nebulized FLAMOD **(E)**. FLAMOD was measured by ELISA. LLOQ was fixed to 4 ng/ml. **(F-G)** Cytokine and

chemokine production in BAL **(F)** and serum **(G)** in response to FLAMOD inhalation methods. Statistical differences between the two methods over time were analyzed using two-way ANOVA (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

4. Discussion

This study underscores the potent immunostimulatory effects of nebulized flagellin (FLAMOD) on the respiratory tract's immune defenses by combining quantitative analysis of the biologic and the immune responses to it in the airways and bloodstream, as well as its therapeutic efficacy. Although FLAMOD has been administered intranasally to target the lower respiratory tract in mice, this route is not appropriate for similar targeting in humans. To overcome this limitation and bridge the translational gap for this therapeutic, we engineered a new custom-designed chamber integrated with the Aerogen Solo® vibrating mesh nebulizer. Despite observing low lung deposition of nebulized FLAMOD, our results indicate that the immunomodulatory and therapeutic efficacy of FLAMOD remained potent. Remarkably, our aerosol delivery system achieved comparable therapeutic outcomes to intranasal administration against pneumococcal pneumonia [15, 16], despite delivering doses 5-to-300-fold lower, as defined by scintigraphy and ELISA data, respectively. Furthermore, nebulization was not linked to any significant systemic exposure at the deposited dose achieved, thereby highlighting both the relevance of the delivery methodology and the safety profile. Our findings provide robust evidence supporting the development of FLAMOD as an immune-booster complementing antibiotic therapy against respiratory bacterial pathogens with high potency even at low concentrations.

Scintigraphy analysis unveils distinct contrast in deposition patterns between nebulized and intranasally administered FLAMOD. A small fraction, less than 1%, of the nebulized formulation is found to reach the lower airways, contrasting sharply with the intranasal route, which achieves a deposition exceeding 40%. Furthermore, scintigraphy demonstrates pronounced divergence in distribution across respiratory compartments between nebulized and intranasal routes. Notably, the intranasal approach exhibits heightened exposure of the trachea, whereas such exposure is lacking in the nebulization method. Despite these differences in deposition patterns, RNAseq analysis indicates activation of similar immune pathways in the lungs across both administration approaches. Moreover, RT-qPCR analysis of genes encoding immune mediators reveals comparable or even elevated levels of transcriptional activation in the nasal compartment, trachea, and bronchial epithelium following nebulization, in contrast to intranasal administration. These findings suggest that saturation of immune activation is achieved at low doses of FLAMOD effect. While it has been previously inferred that inhalation of flagellin does not enter the bloodstream [11], this study was the first to measure FLAMOD using a new ELISA test developed for this purpose. Compared to scintigraphy, ELISA

measurements reported much lower levels in the deposition of FLAMOD in the pulmonary compartment shortly after administration: less than 0.1% for nebulized FLAMOD versus 30% for intranasal administration. These findings strongly suggest rapid elimination of nebulized FLAMOD within the airways, despite the differential deposition detection by the two quantification methods used.

Several factors could contribute to accelerated FLAMOD elimination upon nebulization. The intranasal administration facilitates the entry of the biologic solution into the airways primarily though gravitational forces and diffusion mechanisms. In contrast, nebulization generates fine liquid particles that deeply penetrate tissues via the respiratory flow [42]. The interaction of nebulized particles with various components such as epithelial lining fluid factors, mucus, pulmonary surfactants, epithelial cells and alveolar macrophages is expected to be of a specific nature. Consequently, these distinct inhalation methods lead to differing spatial distributions and interactions within the respiratory system, which may play a crucial role in the observed degradation dynamics of FLAMOD. Previous studies have reported that proteins deposited in the airways by nebulization can be eliminated by various mechanisms including pulmonary surfactant opsonization [43], endocytosis or phagocytosis by alveolar macrophages [44] proteolytic degradation, mucus entrapping, or mucociliary clearance [45]. It is usually considered that mucus is not a barrier for proteins <500 kDa while particles trapped in the mucus, can be transported to the pharynx by the mucociliary clearance mechanisms [45, 46]. The conducting airways including bronchi and alveoli contain many secreted and cell-associated proteases such cathepsins, dipeptidylpeptidases, metalloproteinases, carboxypeptidases, or xenobiotic metabolizing enzymes such as cytochromes that can be active against biologics [47, 48]. Of note, FLAMOD is derived from the native *Salmonella* flagellin that is known to contain multiple proteolytic cleavage sites in the distal region, rendering FLAMOD prone to degradation by proteases [49]. Whether nebulization exacerbates these catabolic processes compared to intranasal delivery remains to be determined.

Biologic drugs specific for treating lung conditions, such as the recombinant human DNAse used as a mucolytic in cystic fibrosis lung disease, have been adapted for nebulization as it is a unique method to compartmentalize the drug activity within the respiratory tract, thereby mitigating systemic exposure and potential toxicity [50, 51]. While the TLR5-dependent immunomodulation in the airways presents a promising therapeutic avenue, it is important to acknowledge a potential caveat stemming from systemic exposure. TLR5, being widely expressed across various cells and tissues, carries the risk of precipitating undesired inflammation, commonly referred to as immune-related adverse events [52]. Nebulization is

thus an attractive administration route for our biologic in order to mitigate such events. To assess systemic exposure to FLAMOD, the production of serum IL-22 serves as a surrogate marker. Previous studies have established that IL-22 necessitates flagellin-mediated activation of TLR5 signaling in dendritic cells derived from either blood or tissue parenchyma [11, 38, 39]. This study showed no or very low levels of serum IL-22 after inhalation, corroborating the FLAMOD dosing in serum and insinuating little to no systemic leakage. The efficient elimination of nebulized FLAMOD may contribute to the minimal systemic exposure observed. Factors that influence systemic absorption include properties of the aerosol particles such as pH, charge, and surface activity. Studies have indicated a variable availability of inhaled proteins in the bloodstream, ranging from 10% to 50% [53]. In mice, systemic exposure to antibodies via orotracheal inhalation is notably low, despite efficient deposition in the airways [54]. This trend is echoed in clinical trials, where nebulized administration of antibodies results in systemic exposure of approximately 1% of the deposited dose [55].

Despite the rapid clearance of FLAMOD, its administration via nebulization still effectively stimulates innate immunity within the lungs, mirroring the response observed with the intranasal route. TLR signaling, including activation of TLR5, initiates immediate NF- κB activation within minutes, alongside the induction of negative feedback mechanisms [8, 9]. This "hit and run" activation of TLR5 rationalizes the efficacy of nebulized FLAMOD despite its short residency half-life within respiratory tissues. Although nebulized FLAMOD induces a transient immunomodulatory effect on neutrophil mobilization in alveoli and bronchi, it promotes a more rapid resolution of the TLR5-mediated pro-inflammatory response compared to intranasal delivery. This accelerated resolution aligns with the observed differences in the biodistribution of intranasal versus nebulized FLAMOD, with intranasal FLAMOD persisting longer in the lungs compared to the nebulized form. However, the precise mechanisms underlying these differential kinetics require further investigation.

The effectiveness of nebulized FLAMOD as an adjunct to antibiotics was demonstrated in two clinically relevant models of pneumonia: primary pneumonia and pneumococcal superinfection, which occurs when there is a pre-existing influenza virus infection. Furthermore, this proof-of-concept was confirmed using two different serotypes of pneumococcus, one susceptible and the other resistant to amoxicillin (with MIC_{AMX} values of 0.016 μg/ml and 1.5 μg/ml respectively). The results from this study align with the clinical development of nebulized FLAMOD and support previous findings from intranasal administration in pneumonia treatment [15, 16]. Analysis of FLAMOD distribution throughout

the body, as well as the immune responses in the lungs and blood following inhalation, revealed that pneumonia-induced damage had minimal impact on the observed bioavailability and immune activation patterns. This reinforces the safety and effectiveness of our therapeutic approach targeting the respiratory tissues.

In conclusion, our findings underscore the intricate interplay between inhalation methods, respiratory and systemic distribution, and immunomodulatory activity of FLAMOD, which are critical considerations in optimizing therapeutic outcomes and minimizing adverse effects. It will be important to extend these investigations to the study of more representative models to allow better translation of nebulized FLAMOD to the clinic. More appropriate species, for better defining nebulized FLAMOD PK and PD parameters with higher translational value, will include pig models and non-human primate models. Nevertheless, this study has determined nebulization as an effective and safe method for next step development of host-directed lung-targeting therapies of pneumonia.

Conflicts of interest

JCS, CCa and NHV are inventors of the patents WO2009156405, WO2011161491, WO2015011254, and WO2016102536 that describe the use of flagellin as biologic against infectious diseases and the patent WO2023275292 on the formulation of FLMAOD. NHV is a cofounder of Cynbiose Respiratory and does not hold stock options. In the last few years, she has been paid as a scientific advisor (Novartis, European Commission, Immune Biosolution, ANR, Alvea/Telis Bioscience). Her group has financial relationships with private-sector entities (Nemera, Aptar Pharma, Affilogic, 4P-Pharma, EuroAPI) outside the scope of the present work and Aerogen within the scope of this study. RMACL is named inventor on several vibrating mesh nebulizer patents. Authors declare no other competing interests.

Author Contributions

MB, CCo, JP planned studies, performed experiments and analyzed data. DC, DS performed experiments. YZ analyzed transcriptomic data. RM provided the nebulizers plus controllers and reviewed the paper. FW provided the clinical isolate LILPNEUHC 19F strain and reviewed the paper. MB, CCo, YZ, JCS and CCa wrote the paper with input from all authors. MB, JCS, CCa and NHV supervised the project.

Funding. The study was funded by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, the project FAIR that received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No 847786, and the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-19-CE18- 0030-01).

Acknowledgements. We thank the Vaccine Development department of Statens Serum Institut (Denmark) for the manufacture and supply of FLAMOD. We thank the PLETHA animal facility from UMS2014-US41-PLBS.

References

[1] https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019, (2019).

[2] C. Scelfo, F. Menzella, M. Fontana, G. Ghidoni, C. Galeone, N.C. Facciolongo, Pneumonia and Invasive Pneumococcal Diseases: The Role of Pneumococcal Conjugate Vaccine in the Era of Multi-Drug Resistance, Vaccines (Basel), 9 (2021).

[3] L.M. Wang, T. Cravo Oliveira Hashiguchi, M. Cecchini, Impact of vaccination on carriage of and infection by antibiotic-resistant bacteria: a systematic review and meta-analysis, Clin Exp Vaccine Res, 10 (2021) 81-92.

[4] A. Lochen, N.J. Croucher, R.M. Anderson, Divergent serotype replacement trends and increasing diversity in pneumococcal disease in high income settings reduce the benefit of expanding vaccine valency, Sci Rep, 10 (2020) 18977.

[5] J. Liñares, C. Ardanuy, R. Pallares, A. Fenoll, Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in Streptococcus pneumoniae over a 30-year period, Clin Microbiol Infect, 16 (2010) 402-410.

[6] M. Miethke, M. Pieroni, T. Weber, M. Brönstrup, P. Hammann, L. Halby, P.B. Arimondo, P. Glaser, B. Aigle, H.B. Bode, R. Moreira, Y. Li, A. Luzhetskyy, M.H. Medema, J.-L. Pernodet, M. Stadler, J.R. Tormo, O. Genilloud, A.W. Truman, K.J. Weissman, E. Takano, S. Sabatini, E. Stegmann, H. Brötz-Oesterhelt, W. Wohlleben, M. Seemann, M. Empting, A.K.H. Hirsch, B. Loretz, C.-M. Lehr, A. Titz, J. Herrmann, T. Jaeger, S. Alt, T. Hesterkamp, M. Winterhalter, A. Schiefer, K. Pfarr, A. Hoerauf, H. Graz, M. Graz, M. Lindvall, S. Ramurthy, A. Karlén, M. van Dongen, H. Petkovic, A. Keller, F. Peyrane, S. Donadio, L. Fraisse, L.J.V. Piddock, I.H. Gilbert, H.E. Moser, R. Müller, Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics, Nature Reviews Chemistry, 5 (2021) 726-749.

[7] R.S. Wallis, A. O'Garra, A. Sher, A. Wack, Host-directed immunotherapy of viral and bacterial infections: past, present and future, Nat Rev Immunol, 23 (2023) 121-133.

[8] K.A. Fitzgerald, J.C. Kagan, Toll-like Receptors and the Control of Immunity, Cell, 180 (2020) 1044-1066.

[9] J. Yang, H. Yan, TLR5: beyond the recognition of flagellin, Cellular & Molecular Immunology, 14 (2017) 1017-1019.

[10] L. Janot, J.C. Sirard, T. Secher, N. Noulin, L. Fick, S. Akira, S. Uematsu, A. Didierlaurent, T. Hussell, B. Ryffel, F. Erard, Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin, Eur J Immunol, 39 (2009) 1587-1596.

[11] L. Van Maele, D. Fougeron, L. Janot, A. Didierlaurent, D. Cayet, J. Tabareau, M. Rumbo, S. Corvo-Chamaillard, S. Boulenouar, S. Jeffs, L. Vande Walle, M. Lamkanfi, Y. Lemoine, F. Erard, D. Hot, T. Hussell, B. Ryffel, A.G. Benecke, J.C. Sirard, Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity, Mucosal Immunology, 7 (2014) 489-500.

[12] N. Muñoz, L. Van Maele, J.M. Marqués, A. Rial, J.C. Sirard, J.A. Chabalgoity, Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection, Infect Immun, 78 (2010) 4226-4233.

[13] A.K. Zgair, Flagellin administration protects respiratory tract from Burkholderia cepacia infection, J Microbiol Biotechnol, 22 (2012) 907-916.

[14] F.S. Yu, M.D. Cornicelli, M.A. Kovach, M.W. Newstead, X. Zeng, A. Kumar, N. Gao, S.G. Yoon, R.L. Gallo, T.J. Standiford, Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide, J Immunol, 185 (2010) 1142-1149.

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

[16] R. Porte, D. Fougeron, N. Muñoz-Wolf, J. Tabareau, A.F. Georgel, F. Wallet, C. Paget, F. Trottein, J.A. Chabalgoity, C. Carnoy, J.C. Sirard, 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, 59 (2015) 6064-6072.

[17] C. Costa, J.C. Sirard, P.S. Gibson, J.W. Veening, E. Gjini, M. Baldry, Triggering Toll-Like Receptor 5 signaling during pneumococcal superinfection prevents the selection of antibiotic resistance, J Infect Dis, (2024).

[18] D.L. Goldblatt, J.R. Flores, G. Valverde Ha, A.M. Jaramillo, S. Tkachman, C.T. Kirkpatrick, S. Wali, B. Hernandez, D.E. Ost, B.L. Scott, J. Chen, S.E. Evans, M.J. Tuvim, B.F. Dickey, Inducible epithelial resistance against acute Sendai virus infection prevents chronic asthma-like lung disease in mice, Br J Pharmacol, 177 (2020) 2256-2273.

[19] M.J. Tuvim, B.E. Gilbert, B.F. Dickey, S.E. Evans, Synergistic TLR2/6 and TLR9 activation protects mice against lethal influenza pneumonia, PLoS One, 7 (2012) e30596.

[20] J.M. Duggan, D. You, J.O. Cleaver, D.T. Larson, R.J. Garza, F.A. Guzmán Pruneda, M.J. Tuvim, J. Zhang, B.F. Dickey, S.E. Evans, Synergistic interactions of TLR2/6 and TLR9 induce a high level of resistance to lung infection in mice, J Immunol, 186 (2011) 5916-5926.

[21] A. Iwasaki, E.F. Foxman, R.D. Molony, Early local immune defences in the respiratory tract, Nat Rev Immunol, 17 (2017) 7-20.

[22] W.R. Ke, R.Y.K. Chang, H.K. Chan, Engineering the right formulation for enhanced drug delivery, Adv Drug Deliv Rev, 191 (2022) 114561.

[23] R. MacLoughlin, I. Martin-Loeches, Not all nebulizers are created equal: Considerations in choosing a nebulizer for aerosol delivery during mechanical ventilation, Expert Rev Respir Med, 17 (2023) 131-142.

[24] E. Bodier-Montagutelli, A. Mayor, L. Vecellio, R. Respaud, N. Heuze-Vourc'h, Designing inhaled protein therapeutics for topical lung delivery: what are the next steps?, Expert Opin Drug Deliv, 15 (2018) 729-736.

[25] T.C. Carvalho, J.T. McConville, The function and performance of aqueous aerosol devices for inhalation therapy, J Pharm Pharmacol, 68 (2016) 556-578.

[26] S.P. Hertel, G. Winter, W. Friess, Protein stability in pulmonary drug delivery via nebulization, Adv Drug Deliv Rev, 93 (2015) 79-94.

[27] L.-A. Keller, O. Merkel, A. Popp, Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development, Drug Delivery and Translational Research, 12 (2022) 735-757.

[28] S. Ehrmann, Vibrating Mesh Nebulizers-Can greater drug delivery to the airways and lungs improve respiratory outcomes?, European Respiratory & Pulmonary Diseases, 4 (2018) 33-43.

[29] W. Longest, B. Spence, M. Hindle, Devices for Improved Delivery of Nebulized Pharmaceutical Aerosols to the Lungs, J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 32 (2019) 317-339.

[30] J.N. Pritchard, R.H. Hatley, J. Denyer, D.V. Hollen, Mesh nebulizers have become the first choice for new nebulized pharmaceutical drug developments, Ther Deliv, 9 (2018) 121-136.

[31] L. Sweeney, A.P. McCloskey, G. Higgins, J.M. Ramsey, S.-A. Cryan, R. MacLoughlin, Effective nebulization of interferon-γ using a novel vibrating mesh, Respiratory Research, 20 (2019) 66.

[32] C. Nempont, D. Cayet, M. Rumbo, C. Bompard, V. Villeret, J.C. Sirard, Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity, J Immunol, 181 (2008) 2036-2043.

[33] C. Paget, S. Ivanov, J. Fontaine, F. Blanc, M. Pichavant, J. Renneson, E. Bialecki, J. Pothlichet, C. Vendeville, G. Barba-Spaeth, M.R. Huerre, C. Faveeuw, M. Si-Tahar, F. Trottein, 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, 186 (2011) 5590-5602.

[34] Y. Hiriart, M. Serradell, A. Martinez, S. Sampaolesi, D.G. Maciel, J.A. Chabalgoity, L. Yim, G. Algorta, M. Rumbo, Generation and selection of anti-flagellin monoclonal antibodies useful for serotyping Salmonella enterica, Springerplus, 2 (2013) 640.

[35] K. Chen, T. Eddens, G. Trevejo-Nunez, E.E. Way, W. Elsegeiny, D.M. Ricks, A.V. Garg, C.J. Erb, M. Bo, T. Wang, W. Chen, J.S. Lee, S.L. Gaffen, J.K. Kolls, IL-17 Receptor Signaling in the Lung Epithelium Is Required for Mucosal Chemokine Gradients and Pulmonary Host Defense against K. pneumoniae, Cell Host Microbe, 20 (2016) 596-605.

[36] M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, Genome Biology, 15 (2014) 550.

[37] D. Fougeron, L. Van Maele, P. Songhet, D. Cayet, D. Hot, N. Van Rooijen, H.J. Mollenkopf, W.D. Hardt, A.G. Benecke, J.C. Sirard, Indirect Toll-like receptor 5-mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract, Vaccine, 33 (2015) 3331-3341.

[38] M.A. Kinnebrew, C.G. Buffie, G.E. Diehl, L.A. Zenewicz, I. Leiner, T.M. Hohl, R.A. Flavell, D.R. Littman, E.G. Pamer, Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense, Immunity, 36 (2012) 276-287.

[39] L. Van Maele, C. Carnoy, D. Cayet, P. Songhet, L. Dumoutier, I. Ferrero, L. Janot, F. Erard, J. Bertout, H. Leger, F. Sebbane, A. Benecke, J.C. Renauld, W.D. Hardt, B. Ryffel, J.C. Sirard, TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa, J Immunol, 185 (2010) 1177-1185.

[40] L.R. Prince, M.K. Whyte, I. Sabroe, L.C. Parker, The role of TLRs in neutrophil activation, Current Opinion in Pharmacology, 11 (2011) 397-403.

[41] T.R. Hawn, W.R. Berrington, I.A. Smith, S. Uematsu, S. Akira, A. Aderem, K.D. Smith, S.J. Skerrett, Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with Legionella pneumophila, J Immunol, 179 (2007) 6981-6987.

[42] S. Ehrmann, O. Schmid, C. Darquenne, B. Rothen-Rutishauser, J. Sznitman, L. Yang, H. Barosova, L. Vecellio, J. Mitchell, N. Heuze-Vourc'h, Innovative preclinical models for pulmonary drug delivery research, Expert Opin Drug Deliv, 17 (2020) 463-478.

[43] T. Tschernig, N.T. Veith, E. Diler, M. Bischoff, C. Meier, M. Schicht, The importance of surfactant proteins—New aspects on macrophage phagocytosis, Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger, 208 (2016) 142-145.

[44] C. Lombry, D.A. Edwards, V. Preat, R. Vanbever, Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 286 (2004) L1002-1008.

[45] E. Frohlich, S. Salar-Behzadi, Oral inhalation for delivery of proteins and peptides to the lungs, Eur J Pharm Biopharm, 163 (2021) 198-211.

[46] S.S. Olmsted, J.L. Padgett, A.I. Yudin, K.J. Whaley, T.R. Moench, R.A. Cone, Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus, Biophys J, 81 (2001) 1930-1937.

[47] Z. Enlo-Scott, E. Bäckström, I. Mudway, B. Forbes, Drug metabolism in the lungs: opportunities for optimising inhaled medicines, Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 17 (2021) 611-625.

[48] F. Oesch, E. Fabian, R. Landsiedel, Xenobiotica-metabolizing enzymes in the lung of experimental animals, man and in human lung models, Archives of Toxicology, 93 (2019) 3419-3489.

[49] F. Vonderviszt, S. Aizawa, K. Namba, Role of the disordered terminal regions of flagellin in filament formation and stability, J Mol Biol, 221 (1991) 1461-1474.

[50] J.S. Tepper, P.J. Kuehl, S. Cracknell, K.J. Nikula, L. Pei, J.D. Blanchard, Symposium Summary: "Breathe In, Breathe Out, Its Easy: What You Need to Know About Developing Inhaled Drugs", Int J Toxicol, 35 (2016) 376-392.

[51] S. Mahri, T. Wilms, P. Hagedorm, M.-J. Guichard, K. Vanvarenberg, M. Dumoulin, H. Frijlink, R. Vanbever, Nebulization of PEGylated recombinant human deoxyribonuclease I using vibrating membrane nebulizers: A technical feasibility study, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 189 (2023) 106522.

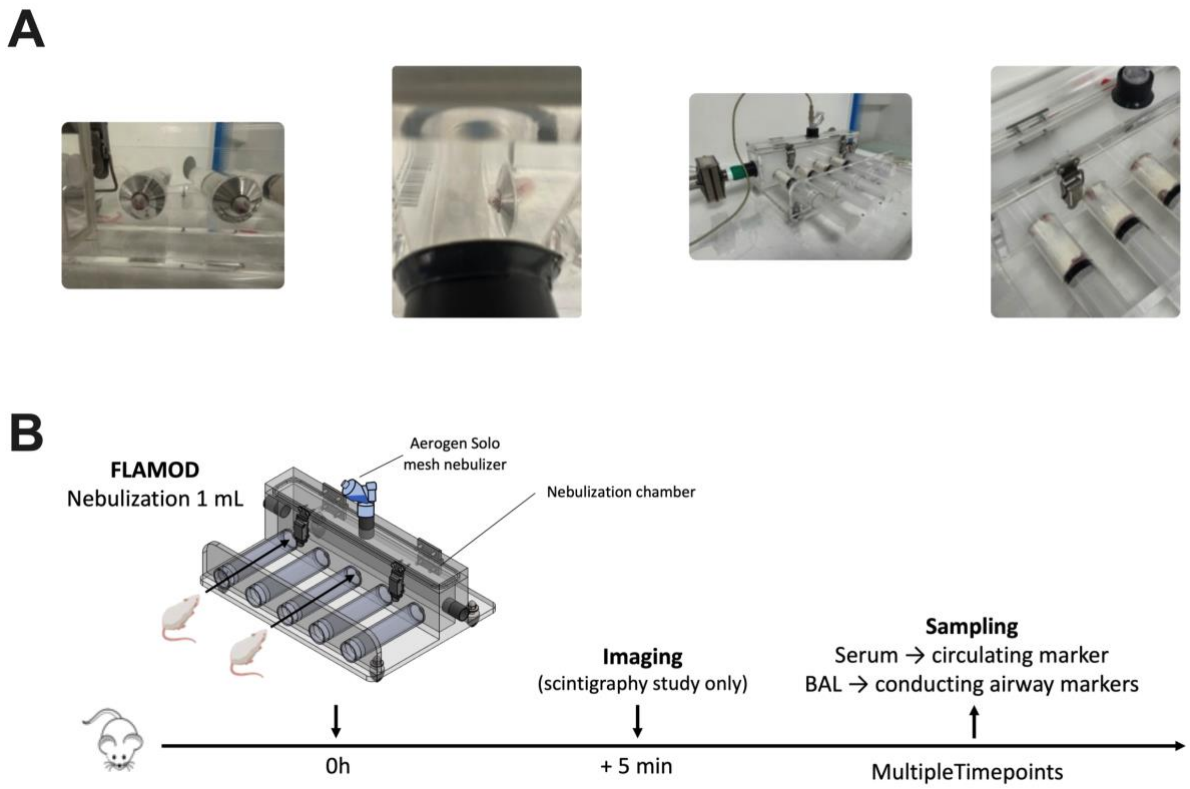
[52] M. Conroy, J. Naidoo, Immune-related adverse events and the balancing act of immunotherapy, Nature Communications, 13 (2022) 392.

[53] R. Siekmeier, G. Scheuch, Systemic treatment by inhalation of macromolecules--principles, problems, and examples, J Physiol Pharmacol, 59 Suppl 6 (2008) 53-79.

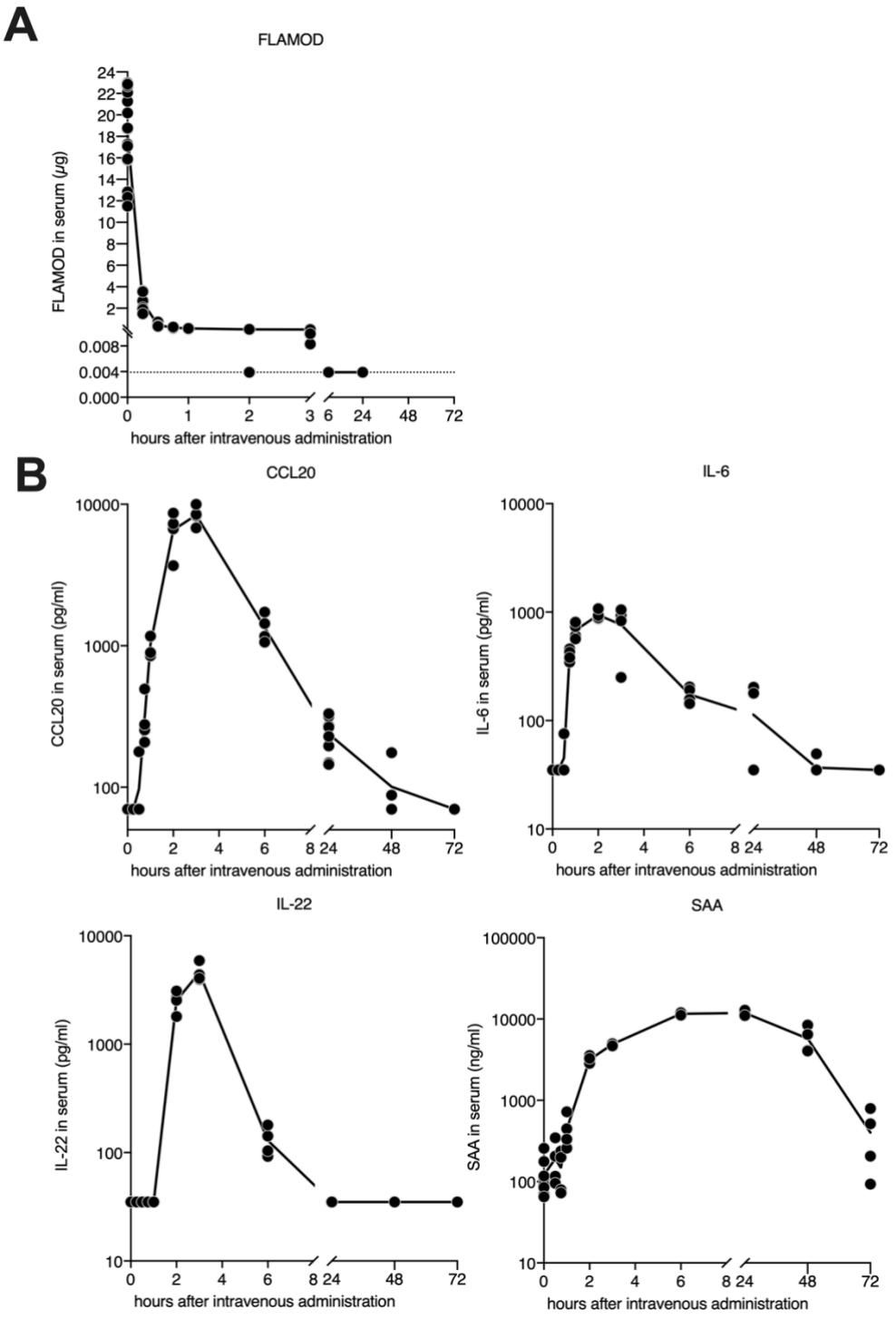
[54] T. Secher, E. Dalonneau, M. Ferreira, C. Parent, N. Azzopardi, G. Paintaud, M. Si-Tahar, N. Heuze-Vourc'h, In a murine model of acute lung infection, airway administration of a therapeutic antibody confers greater protection than parenteral administration, J Control Release, 303 (2019) 24-33.

[55] A. Proudfoot, A. Bayliffe, C.M. O'Kane, T. Wright, A. Serone, P.J. Bareille, V. Brown, U.I. Hamid, Y. Chen, R. Wilson, J. Cordy, P. Morley, R. de Wildt, S. Elborn, M. Hind, E.R. Chilvers, M. Griffiths, C. Summers, D.F. McAuley, Novel anti-tumour necrosis factor receptor-1 (TNFR1) domain antibody prevents pulmonary inflammation in experimental acute lung injury, Thorax, 73 (2018) 723-730.

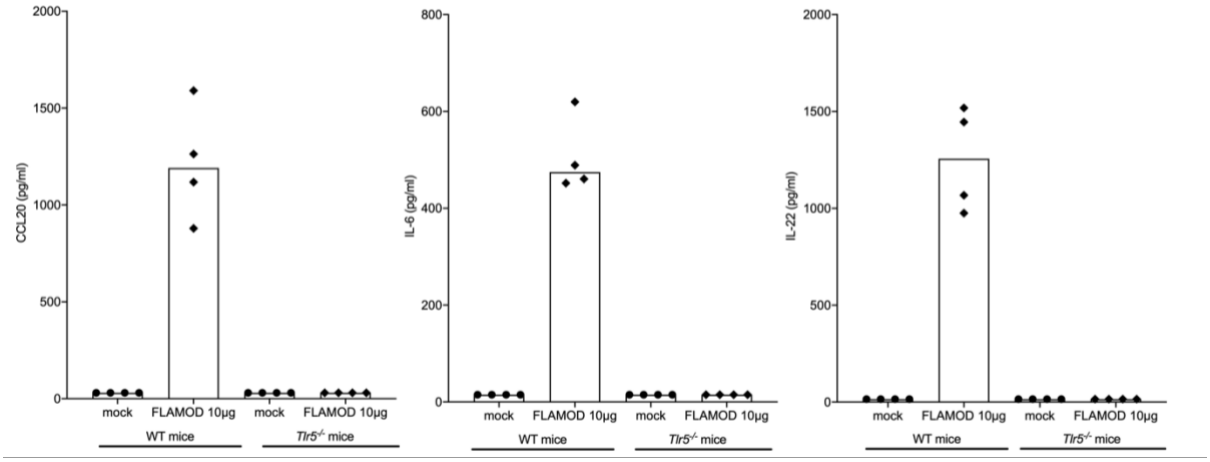
Supplementary Materials



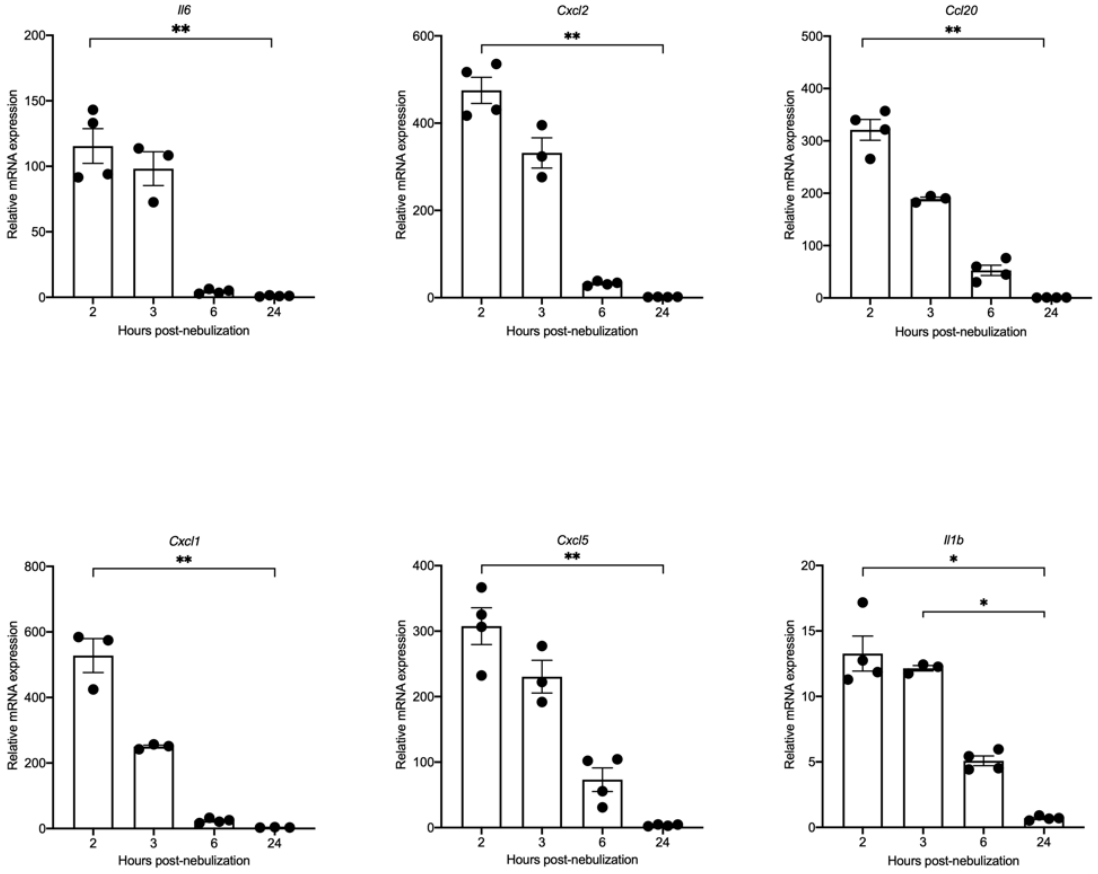
Supplementary Figure 1. Custom-made nebulization chamber and experimental designs. (**A)** Nebulization chamber images. Left images depict the naris of mice being exposed to the chamber where inhalation takes place. Right images describe the nebulization chamber set-up, including the Aerogen Solo vibrating mesh nebulizer. **(B)** Experimental design for kinetics and activity of nebulized FLAMOD in naïve mice.



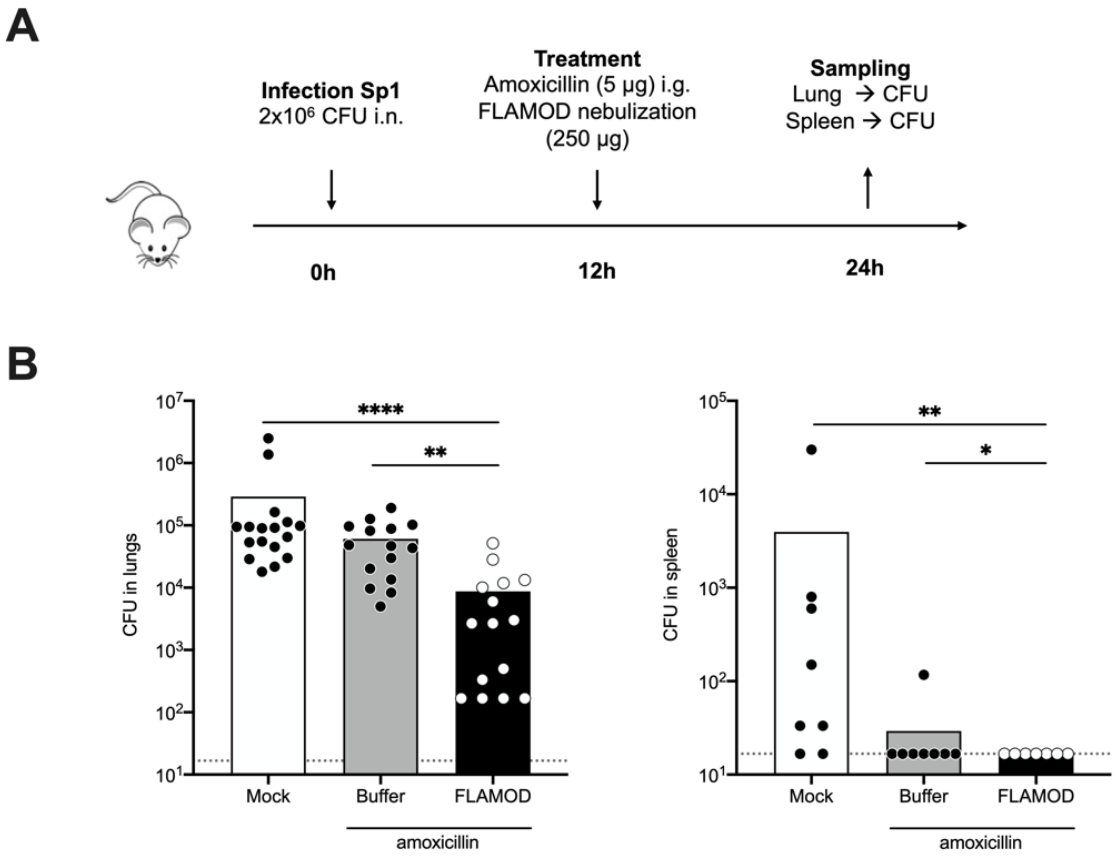
Supplementary Figure 2. FLAMOD kinetics and activity upon intravenous administration. BALB/c mice (n=4 per timepoint) were injected intravenously with 30 µg of FLAMOD (in 200 µl PBS). Serum was collected at varying timepoints to measure FLAMOD **(A)** and immune activity **(B)** FLAMOD, cytokines, chemokines and inflammatory markers were quantified by ELISA.



Supplementary Figure 3. TLR5-specific activation by FLAMOD. C57BL/6 mice (wild-type (WT) or *Tlr5*$^{-/-}$, n=4 per group) were injected intravenously with 10 µg FLAMOD in 200 µl PBS. Mock animals received 200 µl PBS alone. Blood was collected 2-hours post-treatment and TLR5 activation was assessed by measuring the serum concentrations of CCL20, IL-6 and IL-22 by ELISA.



Supplementary Figure 4. Time course of nebulized FLAMOD-mediated transcriptional activation in lungs. BALB/c mice (n=4 per time point and treatment group) were treated, utilizing a mesh-nebulizer and aerosol chamber setup, with 1 ml of FLAMOD at 250 µg/ml in NaPi buffer or mock-treated with NaPi buffer as a control. Lungs were collected at varying timepoints to monitor expression of pro-inflammatory genes. The relative mRNA levels are expressed against the reference gene *Actb* and normalized to the mock condition. Statistical differences were analyzed using one-way ANOVA (*p<0.05, **p<0.01).



Supplementary Figure 5. FLAMOD inhalation efficacy in a mouse model of primary pneumococcal pneumonia. BALB/c mice were infected intranasally with $2x10^6$ CFU of *S. pneumoniae* serotype 1. Animals were treated 12 hours post infection by nebulization with 1 ml of FLAMOD at 250 µg/ml in NaPi buffer combined with intragastric administration of 5 µg amoxicillin. Mock- and amoxicillin alone-treated animals received NaPi buffer and water, and NaPi buffer and amoxicillin, respectively. Lungs (n=15-17 per condition) and spleen (n=7-8 per condition) were sampled 12 h post-administration for CFU. **(A)** Experimental design. **(B)** CFU in the lungs and spleen of infected and treated mice. Dashed lines indicate limit of quantification. Statistical differences between the groups were analyzed by One-way ANOVA (*p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001).

Supplementary Table 1. **Forward and reverse primer sequences for qPCR**

Target gene	Forward primer	Reverse primer
Actb	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
B2m	TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC	GGGTGGCGTGAGTATACTTGAA
Ccl20	TTTTGGGATGGAATTGGACAC	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC
Cxcl2	CCCTCAACGGAAGAACCAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC
Il6	TCTAATTCATATCTTCAACCAAGAGG	TGGTCCTTAGCCACTCCTTC

Annexe II : Publications et communications scientifiques

Autres publications :

- Competence remodels the pneumococcal cell wall exposing key surface virulence factors that mediate increased host adherence
  Minhas V, Domenech A, Synefiaridou D, Straume D, Brendel M, Cebrero G, Liu X, Costa C, Baldry M, Sirard JC, Perez C, Gisch N, Hammerschmidt S, Håvarstein LS, Veening JW
  PLoS Biol. 2023 Jan 30;21(1):e3001990.
  doi: 10.1371/journal.pbio.3001990.eCollection 2023 Jan.

- Amoxicillin-resistant Streptococcus pneumoniae can be resensitized by targeting the mevalonate pathway as indicated by sCRilecs-seq
  Dewachter L, Dénéréaz J, Liu X, de Bakker V, Costa C, Baldry M, Sirard JC, Veening JW
  Elife. 2022 Jun 24:11:e75607.
  doi: 10.7554/eLife.75607.

Communications orales :

- FAIR 2nd annual meeting – Nice (juin 2022) – Sujet : Immunotherapy of antibiotic-resistant bacterial pneumonia

- Présentation vidéo pour la 22ème journée André Verbert (novembre 2022) – École Doctorale de Biologie Santé de Lille – Sujet : Immunotherapy of antibiotic-resistant bacterial pneumonia

- Congrès Europneumo – Crète (mai 2023) – Sujet : Airway targeting of flagellin inhibits antibiotic resistance selection in pneumococcal pneumonia

- Séminaire “hors site” du CIIL – Lille (juin 2023) – Sujet : The fate of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* upon immunotherapy

Communication par poster :

- Séminaire “hors site” du CIIL – Lille (septembre 2021) – Sujet : A coinfection model to study the fate of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* upon immunotherapy