

MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu publiquement le **24 Juin 2019**

Par **Mme Laura MATARAZZO**

conformément aux dispositions réglementaires en vigueur
tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Etude des propriétés anti-infectieuses de la flagelline
en association avec les antibiotiques
dans le traitement des pneumonies à pneumocoques
sensibles et résistants aux antibiotiques

Membres du jury :

Présidente : Mme le Professeur Delphine ALLORGE

Professeur des universités - praticien hospitalier
CHU Lille, Université de Lille - Faculté de pharmacie

Assesseurs : M. le Docteur Etienne BROCHOT

Maitre de Conférences – praticien hospitalier
CHU Amiens, Université de Picardie Jules Vernes – Faculté de Pharmacie

M. le Docteur Nicolas BLONDIAUX

Praticien hospitalier, CH Tourcoing

Directeur de Thèse : M. le Docteur Christophe CARNOY

Maitre de Conférences, Université de Lille - Faculté de pharmacie de Lille

MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu publiquement le **24 Juin 2019**

Par **Mme Laura MATARAZZO**

conformément aux dispositions réglementaires en vigueur
tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Etude des propriétés anti-infectieuses de la flagelline
en association avec les antibiotiques
dans le traitement des pneumonies à pneumocoques
sensibles et résistants aux antibiotiques

Membres du jury :

Présidente : Mme le Professeur Delphine ALLORGE

Professeur des universités - praticien hospitalier
CHU Lille, Université de Lille - Faculté de pharmacie

Assesseurs : M. le Docteur Etienne BROCHOT

Maitre de Conférences – praticien hospitalier
CHU Amiens, Université de Picardie Jules Vernes – Faculté de Pharmacie

M. le Docteur Nicolas BLONDIAUX

Praticien hospitalier, CH Tourcoing

Directeur de Thèse : M. le Docteur Christophe CARNOY

Maitre de Conférences, Université de Lille - Faculté de pharmacie de Lille



Faculté de Pharmacie de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire

M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle

M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie

M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	13
I) Immunité innée anti-infectieuse	14
1. <i>Principe général de la réponse immunitaire antimicrobienne.....</i>	14
2. <i>Détection des pathogènes par les Pattern recognition receptors.....</i>	14
3. <i>Les Toll-like receptors</i>	15
4. <i>Interactions et interconnexions des voies de signalisation des PRR</i>	18
II) Physiopathologie du poumon.....	18
1. <i>Anatomie et physiologie des voies respiratoires</i>	18
2. <i>Mécanismes de défense immunitaire du poumon.....</i>	20
3. <i>Les infections respiratoires basses</i>	26
III) Propriétés immunomodulatrices de la flagelline	34
1. <i>Structure et rôle de la flagelline</i>	34
2. <i>Interaction flagelline / TLR5.....</i>	35
3. <i>Modulation du système immunitaire inné en thérapie anti-infectieuse.....</i>	36
4. <i>La flagelline en thérapeutique</i>	37
OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	39
MATÉRIELS ET MÉTHODES	41
I) Infection bactérienne et virale	41
1. <i>Souche bactérienne</i>	41
2. <i>Préparation des stock et conservation</i>	41
3. <i>Modèle d'infection murine</i>	41
II) Administration des traitements	42
1. <i>Flagelline</i>	42
2. <i>Antibiotiques.....</i>	43
III) Test de synergie.....	43
1. <i>Quantification de l'effet d'un traitement</i>	43
2. <i>Proportional effect</i>	44
IV) Cytométrie en flux	44
1. <i>Préparation des cellules.....</i>	44
2. <i>Analyse phénotypique des cellules par cytométrie en flux.....</i>	45
V) Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR en temps réel	46
1. <i>Extraction de l'ARNm et rétrotranscription</i>	46
2. <i>PCR en temps réel.....</i>	47

VI) Dosage des protéines dans le BAL, le poumon et le sérum	48
VII) Analyses statistiques	48
RESULTATS	49
I) Mise en évidence de la synergie de l'association antibiotique – flagelline contre l'infection respiratoire à pneumocoque de sérotype 1 chez la souris	49
1. Détermination de la dose minimale de flagelline nécessaire pour obtenir une saturation de la réponse immunitaire in vivo en contexte infectieux.....	50
2. Etude des propriétés synergiques de l'association antibiotique – flagelline.....	52
II) Synergie de l'association amoxicilline – flagelline contre l'infection pulmonaire à pneumocoque résistant aux antibiotiques en contexte de surinfection post-grippale	55
1. Mise en place du modèle de surinfection post-grippale par un pneumocoque de sérotype 3 résistant aux antibiotiques.....	55
2. Efficacité du traitement combiné amoxicilline – flagelline contre l'infection pulmonaire par le pneumocoque résistant à l'amoxicilline	57
3. Réponse immunitaire induite par l'administration intranasale de flagelline dans le contexte de surinfection grippale par le pneumocoque	59
DISCUSSION	63
RÉFÉRENCES	69

INTRODUCTION

De par leur rôle dans la respiration, les poumons sont constamment exposés aux particules et organismes pathogènes transportés par l'air. Afin d'éviter que ces derniers ne parviennent jusqu'aux alvéoles, où ont lieu les échanges gazeux avec la circulation sanguine, les voies respiratoires sont dotées d'un ensemble de mécanismes de protection, à la fois mécaniques et immunitaires, dont les cellules épithéliales sont la pierre angulaire.

Les infections respiratoires basses, notamment les pneumonies aiguës communautaires et nosocomiales, représentent une des premières causes de mortalité dans le monde. Le pneumocoque, *Streptococcus pneumoniae*, est la première cause de pneumonies bactériennes et peut avoir de graves complications, comme le syndrome de détresse respiratoire aigu et le sepsis. D'autre part, la grippe, causée par les virus *Influenza*, touche 10 à 15% de la population mondiale chaque année. La première cause de mortalité liée à la grippe est la surinfection bactérienne, facilitée par les dommages épithéliaux causés par le virus. Le pneumocoque constitue une des premières causes de surinfection bactérienne post-grippale.

La progression constante de la résistance aux antibiotiques, traitement de référence des pneumonies bactériennes, complique la prise en charge des patients et conduit à une augmentation de la fréquence des échecs thérapeutiques. La stimulation des réponses immunitaires innées locales par des immunomodulateurs semble être une approche intéressante pour le développement de stratégies thérapeutiques anti-infectieuses innovantes, car la grande variété de mécanismes de défenses mis en jeu rend l'acquisition de résistances par les bactéries théoriquement impossible. Les récepteurs de l'immunité innée, comme les *Toll-like receptors* (TLR), constituent des cibles de choix dans cette optique. Notre équipe s'intéresse plus particulièrement aux effets de la flagelline, protéine constitutive du flagelle bactérien et agoniste du TLR5, administrée par voie intranasale en association avec l'antibiothérapie contre les infections pulmonaires à pneumocoques sensibles ou résistants aux antibiotiques.

I) Immunité innée anti-infectieuse

1. Principe général de la réponse immunitaire antimicrobienne

La réponse immunitaire anti-infectieuse repose sur deux phases successives et interdépendantes : la réponse innée et la réponse adaptative.

La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense contre les microorganismes pathogènes. Elle met en jeu de façon très rapide des mécanismes de défenses non spécifiques : production de peptides antimicrobiens agissant directement contre les pathogènes, de cytokines et chimiokines permettant le recrutement et l'activation de cellules immunitaires effectrices (monocytes/macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et cellules lymphoïdes innées), ainsi que de protéines du complément et opsonines facilitant la phagocytose et l'élimination des pathogènes par les cellules effectrices innées (1).

A l'inverse, la réponse adaptative se développe plus tardivement, généralement entre 3 et 15 jours suivant l'infection, et est initiée par la réponse innée via les cellules présentatrices d'antigènes. Ces dernières, représentées majoritairement par les cellules dendritiques (DC), permettent la sélection de clones de lymphocytes T spécifiques du pathogène par la présentation à leur surface de peptides microbiens liés au complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (CMH II). Ces clones vont alors proliférer et combattre les pathogènes par des mécanismes cytotoxiques pour les lymphocytes T (notamment en détruisant les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires), ou, pour les lymphocytes B, par la production d'anticorps neutralisants ou opsonisants qui vont se fixer à la surface des bactéries ou toxines bactériennes pour faciliter leur élimination. De plus, cette réponse adaptative s'accompagne de la production de lymphocytes B et T mémoires qui permettent une protection à long terme contre les réinfections par les pathogènes présentant les mêmes antigènes (2).

2. Détection des pathogènes par les *Pattern recognition receptors*

La réponse innée anti-infectieuse repose sur la détection des microorganismes par les récepteurs de l'immunité innée, appelés *Pattern Recognition Receptors* (PRR). Ces récepteurs sont exprimés par une grande variété de cellules, immunitaires (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes) ou structurales (cellules épithéliales et endothéliales des muqueuses, fibroblastes) (3,4). Ils reconnaissent des motifs

microbiens appelés MAMP (*microbe-associated molecular patterns*), qui sont généralement des éléments structuraux invariants des micro-organismes non retrouvés chez l'hôte, tels que des composants protéiques, glucidiques ou lipidiques de la paroi bactérienne ou fongique, de l'enveloppe virale ou du flagelle bactérien, ou bien des ADN et ARN bactériens ou viraux. L'activation des PRR par ces ligands microbiens déclenche une cascade de signalisation aboutissant à la mise en place des mécanismes immunitaires moléculaires et cellulaires participant à la clairance des pathogènes. Par leur capacité à reconnaître une grande variété de pathogènes intra- ou extra-cytoplasmique et la rapidité de la réponse et des mécanismes de défense immunitaires qui en découlent, les PRR sont les piliers de la réponse immunitaire innée. Plus d'une cinquantaine ont été identifiés à l'heure actuelle, classés en cinq familles : les *Toll-like receptors* (TLR), les *Nucleotide binding oligomerization domain* (NOD)-*like receptors* (NLR), les *retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I)-*like receptors* (RLR), les *C-type lectins* (CTL), et les censeurs cytosoliques de l'ADN. Par ailleurs, ces récepteurs sont également capables de reconnaître des signaux de danger endogènes, libérés par les cellules endommagées ou infectées, appelés *Danger-associated molecular patterns* (DAMP) (4).

3. Les *Toll-like receptors*

Les TLR ont été les premiers PRR identifiés (5), et on été nommés ainsi par analogie avec le récepteur Toll de la drosophile, nécessaire au développement embryonnaire de l'insecte mais également impliqué dans la défense contre les pathogènes fongiques (6). A ce jour, 13 TLR différents ont été identifiés, 10 chez l'homme et 12 chez la souris.

a) *Structure et ligands des TLR*

Les TLR sont des protéines transmembranaires constituées de 3 parties : un domaine extracellulaire impliqué dans la reconnaissance du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire impliqué dans la transduction du signal. Le domaine extracellulaire comporte un domaine *leucine-rich repeats* (LRR) constitué d'un nombre variable de motifs LRR d'une longueur de 24 à 29 amino-acides chacun, formant la structure tridimensionnelle en fer à cheval de la protéine. La partie

intracellulaire contient un domaine constant *Toll/interleukine 1 receptor homology domain* (TIR), homologue de celui du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1R), point de départ de la cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation de gènes impliqués dans la réponse immune (3,7). Les TLR1, 2, 4, 5 et 6, sont localisées au niveau de la surface cellulaire et ont de ce fait un rôle dans la détection des pathogènes extracellulaires, tandis que TLR3, 7, 8 et 9 sont retrouvés à la surface des endosomes et détectent les pathogènes intracellulaires ou phagocytés (2,3,7).

Les ligands microbiens, ou MAMP, reconnus par les TLR sont de natures très variées : protéines, lipides, lipoprotéines ou acides nucléiques, provenant de bactéries, virus, parasites ou champignons. Les TLR localisés au niveau de la membrane cellulaire (comme TLR1, 2, 4, 5 et 6) reconnaissent principalement des éléments de la paroi ou des organites externes des microorganismes. Par exemple, TLR4 se lie au lipopolysaccharide (LPS) de la paroi des bactéries gram négatif ; TLR2, associé sous forme d'hétérodimères avec TLR1 ou TLR6, se lie aux lipopeptides de la paroi des bactéries, comme le peptidoglycane et les acides lipotéichoïques des bactéries Gram positif et au lipoarabinomannane des mycobactéries ; et TLR5 a pour ligand la flagelline, protéine composant le flagelle bactérien. En revanche, les TLR à localisation endosomale (comme TLR3, 7, 8 et 9) sont spécialisés dans la détection des acides nucléiques, comme les ARN double brin (TLR3) et simple brin (TLR7 et 8) des virus ou les ADN viraux et bactériens (TLR9) (3,7–9).

b) *Transduction du signal*

L'activation d'un TLR par son ligand entraîne l'homodimérisation du récepteur (sauf pour TLR2 qui forme des hétérodimères avec TLR1 ou TLR6). Cela conduit à des changements conformationnels et au recrutement d'une protéine adaptatrice contenant un domaine TIR : le *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) recruté par tous les TLR sauf TLR3, ou le *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β* (TRIF) qui peut être recruté par TLR3 ou TLR4.

Ce recrutement de MyD88 ou TRIF déclenche une cascade de signalisation conduisant à l'activation de facteurs de transcription qui vont initier la transcription de gènes codant pour les différentes protéines impliquées dans la réponse immunitaire. Le recrutement

de MyD88 conduit ainsi à la production de cytokines proinflammatoires, tandis que TRIF induit la production d'interférons (INF) de types I principalement (**figure 1**) (3,4).

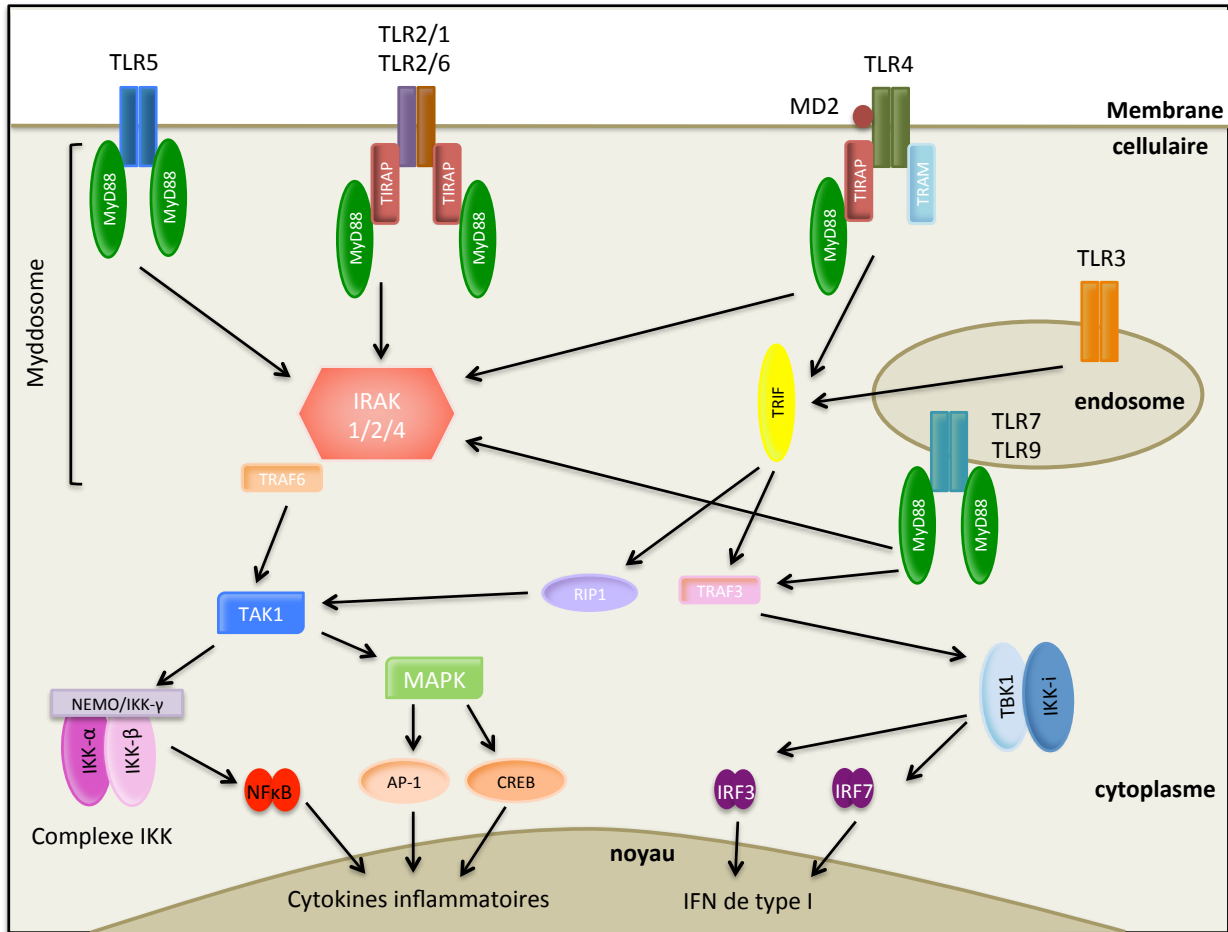


Figure 1: Voies de signalisation intracellulaire des TLR. L'activation des TLR par leurs ligands au niveau de la membrane cytoplasmique ou endosomal entraîne le recrutement des protéines adaptatrices MyD88 ou TRIF. MyD88 s'associe avec les protéines *IL-1R-associated kinases* (IRAK) 2 et 4 pour former le myddosome. Ce dernier active par ubiquitination, via le recrutement de TRAF6, le complexe *TGFβ-activated kinase 1* (TAK1). TAK1 active par phosphorylation le complexe IKK et la *mitogen-associated protein kinase* (MAPK), aboutissant à l'activation des facteurs de transcription NFκB et AP-1/CREB respectivement, qui vont activer dans le noyau la transcription de gènes codant pour les cytokines inflammatoires et chimiokines. TRIF entraîne l'activation, via TRAF3, de TBK1, qui s'assemble avec IKK-γ, puis active par phosphorylation les facteurs de transcription IRF3 et IRF7, essentiels pour la transcription d'interféron (IFN) de type I et d'*IFN-inducible genes*. La signalisation passant par TRIF aboutie également à la transcription de cytokines inflammatoires via l'activation de TAK1 par l'intermédiaire de la *receptor-interacting protein 1* (RIP1) (7,8,10,11).

4. Interactions et interconnexions des voies de signalisation des PRR

Des phénomènes d'interdépendance, d'interférence ou de redondance existent entre les voies d'activation dépendantes des PRR (12).

Un pathogène (viral, bactérien, fongique ou parasitaire) possède généralement plusieurs molécules jouant le rôle de MAMP, et peut ainsi être reconnu par des PRR de familles différentes, de localisations différentes (extra- ou intracellulaire), ou exprimés par différents types cellulaires. Par ailleurs, un même ligand peut être reconnu par plusieurs PRR (ex : la flagellin, est détectée par TLR5 au niveau extracellulaire conduisant à l'activation de NFκB, et par le complexe NLRC4/Naip5 au niveau intracytoplasmique conduisant à l'activation de l'inflammasome) (13,14). Cette détection multiple des pathogènes peut aboutir à l'activation des mêmes voies de signalisation ou à l'activation de voies différentes selon un mécanisme de coopération synergique (résultant en une activation supérieure à la somme de chaque voie de signalisation individuellement), complémentaire (induction d'effecteurs distincts formant une même unité fonctionnelle) ou compensatoire (redondance) (12). L'étude des déficits immunitaires primaires affectant les gènes des PRR montre que ces derniers sont rarement associés à une susceptibilité significativement accrue aux infections (contrairement aux mutations affectant les gènes de l'immunité adaptative), démontrant l'importance des phénomènes de redondance et de compensation des réponses associées aux PRR (15).

II) Physiopathologie du poumon

1. Anatomie et physiologie des voies respiratoires

Les poumons sont localisés dans la cage thoracique au-dessus du diaphragme, muscle principal de la respiration. Ils sont entourés de la plèvre, une enveloppe séreuse formée par deux feuillets (viscéral au contact du poumon et pariétal au contact de la cage thoracique) délimitant la cavité pleurale remplie de liquide, et permettant les mouvements et le maintien d'une pression négative dans les poumons. Le poumon droit se divise chez l'homme en trois lobes et le poumon gauche en deux lobes. L'air inspiré pénètre les voies respiratoires basses, de diamètre décroissant, par la trachée qui se sépare en deux bronches primaires (droite et gauche) puis en bronches secondaires ou lobaires au niveau de chaque lobe, et enfin en bronchioles qui débouchent sur les sacs

alvéolaires ou acini contenant les alvéoles. Ces dernières, d'une surface totale de 90 m² environ et richement vascularisées par un réseau de capillaires sanguins, sont le lieu privilégié des échanges gazeux par diffusion à travers la membrane alvéolo-capillaire (16). Ce phénomène permet d'une part, l'enrichissement du sang en oxygène qui sera redistribué aux cellules des différents organes du corps via la circulation artérielle ; et d'autre part, l'élimination des déchets sous forme de dioxyde de carbone, transporté depuis les organes vers les poumons par le système veineux aboutissant à l'artère pulmonaire (**Figure 2**).

Les voies respiratoires, depuis les cavités nasales jusqu'aux alvéoles, sont tapissées par un épithélium muqueux, composé en grande partie de cellules ciliées animées de mouvement vibratoires et de cellules productrices de mucus. La couche de mucus tapissant l'épithélium, associée aux mouvements des cellules ciliées constitue une barrière à la fois physique et immunologique contre les particules inhalées et organismes pathogènes, empêchant leur entrée dans les alvéoles et leur passage systémique (17,18).

Par ailleurs, bien que les voies respiratoires basses aient été longtemps considérées comme stériles, plusieurs études récentes font état de l'existence d'un microbiote pulmonaire, dont des variations de composition, ou dysbioses, ont été retrouvées dans certaines pathologies pulmonaires telles que l'asthme ou la bronchopneumopathie chronique obstructive (19–21).

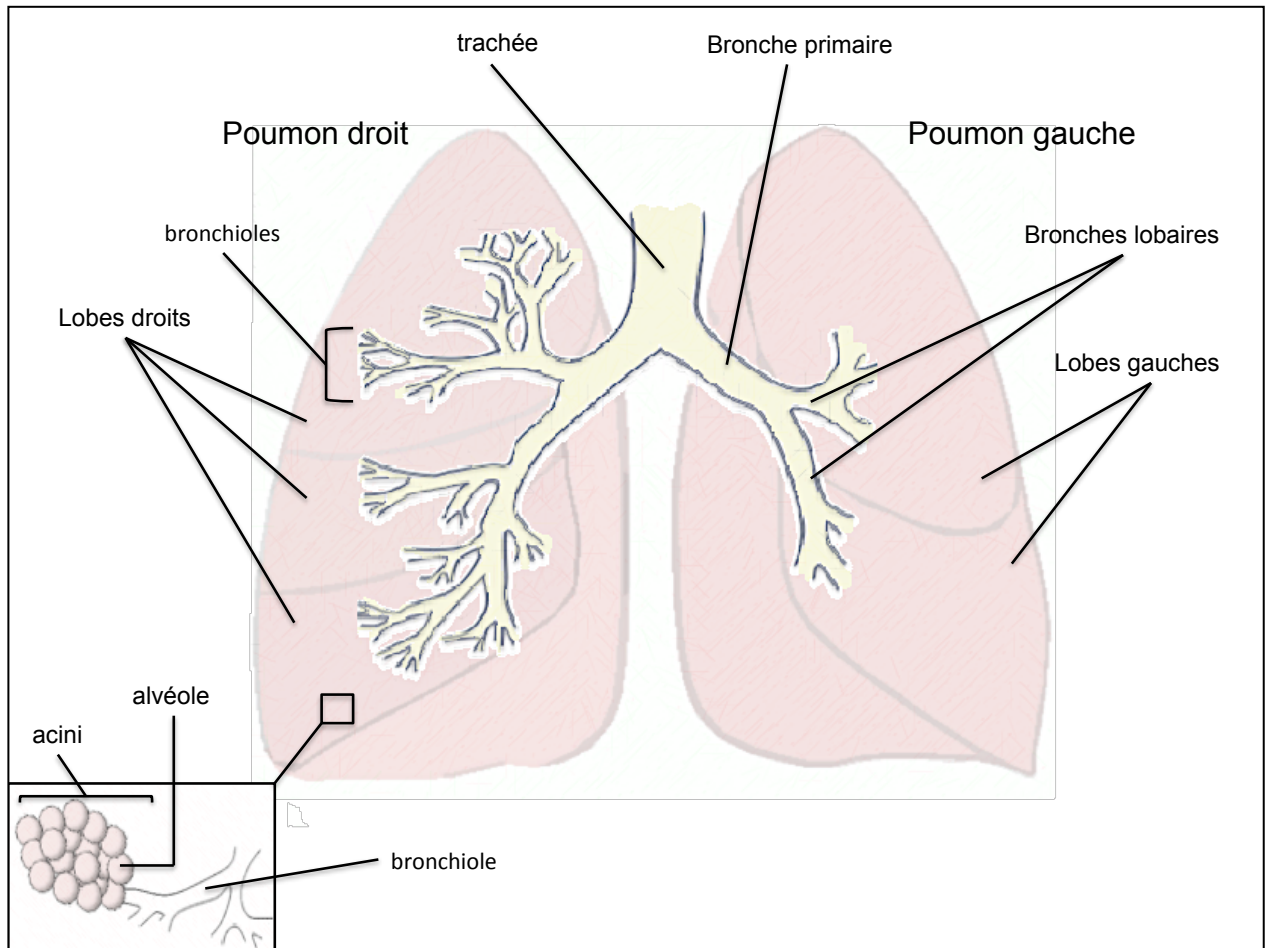


Figure 2 : Représentation schématique de la structure du poumon et des voies respiratoires basses.

2. Mécanismes de défense immunitaire du poumon

Les muqueuses (respiratoire, gastro-intestinale et génitale) sont à l'interface entre l'hôte et son environnement et ont donc un rôle primordial de barrière vis-à-vis des pathogènes environnementaux. De ce fait, elles possèdent un ensemble de mécanismes de protection particulièrement développés dans le but de protéger l'organisme contre les infections (18).

a) Défenses physiques

Au niveau pulmonaire, la structure branchée des voies respiratoires, de diamètre décroissant en allant de la trachée aux bronchioles, empêche les particules de diamètre important de pénétrer dans l'espace alvéolaire où ont lieu les échanges gazeux avec la circulation sanguine. L'épithélium respiratoire est formé d'une couche de cellules

polarisées liées par des jonctions serrées, formant un ainsi une couche continue jouant le rôle de barrière. Cet épithélium est composé de plusieurs types de cellules : les cellules ciliées possédant à leur surface apicale des cils animés de mouvements vibratoires, les cellules sécrétrices productrices de mucines et peptides antimicrobiens et des cellules basales qui sont des progéniteurs capables de se différencier en cellules ciliées ou en progéniteurs intermédiaires, les cellules club, qui peuvent elles-mêmes se différencier en cellules ciliées ou cellules sécrétrices pour renouveler l'épithélium (22). Il existe différents sous-types de cellules sécrétrices au sein de l'épithélium : les cellules caliciformes, les cellules séreuses et les cellules neuroendocrines, possédant chacune leurs spécificités de production (17,18).

La couche de mucus tapissant l'épithélium bronchique permet de piéger les particules et pathogènes tandis que les mouvements vibratoires des cellules ciliées permettent le transport des particules vers l'extérieur. Cet « escalator mucociliaire », est un mécanisme de clairance essentiel empêchant les particules inhalées et microbes d'atteindre les alvéoles pulmonaires (17,18,22).

Au niveau des alvéoles, l'épithélium est constitué par deux types cellulaires principaux : les cellules épithéliales avéolaires (*Alveolar epithelial cells, AEC*) de type I (AEC I) et les AEC de type II (AEC II). Les AEC I représentent 97% de la surface épithéliale alvéolaire. Elle sont de grande taille et très étendues pour former une couche épithéliale continue de faible épaisseur. Les AECs II, beaucoup plus petites, produisent le surfactant, qui forme une fine couche protectrice recouvrant l'épithélium alvéolaire. Le surfactant joue un rôle physiologique dans le maintien de la tension de surface des alvéoles, mais possède également un rôle de barrière physique et immunologique contre les particules et pathogènes inhalés. Les AEC II peuvent de plus être des précurseurs des AEC I, en cas de destruction de ces dernières (**figure 3**) (23).

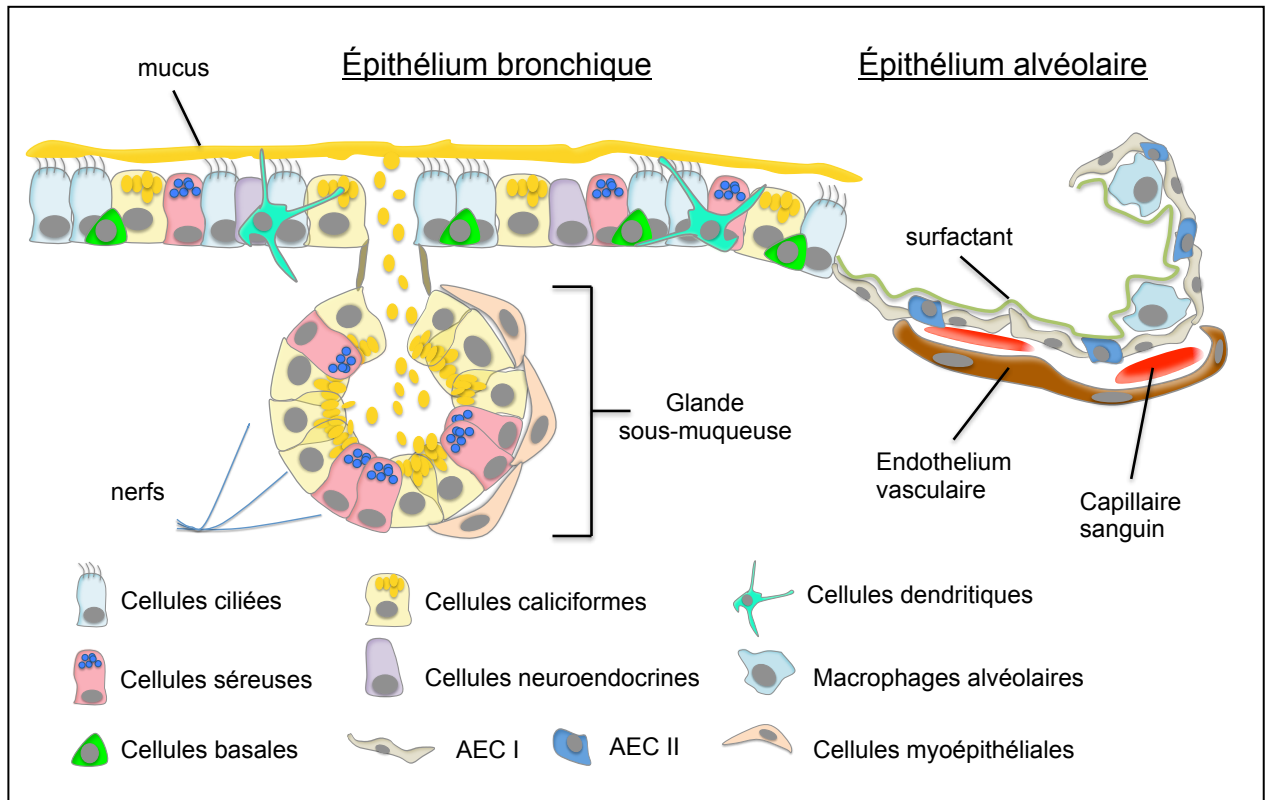


Figure 3 : Structure de l'épithélium bronchique et alvéolaire.

b) Défenses moléculaires

En plus de son rôle de barrière physique, le mucus contient une grande quantité de molécules de défenses, produites principalement par les cellules caliciformes. Les mucines sont des glycoprotéines encodées par les gènes *MUC* et sont les protéines majoritaires du mucus. Elles peuvent être associées à la membrane ou sécrétées et ont un rôle primordial dans la clairance microbienne, par la formation de gel piégeant les particules, favorisant ainsi leur élimination par l'escalator mucociliaire et bloquant leur passage transépithélial. Certaines mucines, comme Muc5b, possèdent également un rôle de médiateur de l'inflammation, par l'activation de cascades de signalisation, tandis que d'autres comme Muc1 (produite par les cellules alvéolaires) ont un rôle anti-inflammatoire (18,24). Le mucus contient également d'autres substances antimicrobiennes, telles que des β -défensines, cathelicidines, lactoferrine et lysozymes au niveau des voies aériennes. La production de ces molécules par les glandes sous-muqueuses est contrôlée principalement par l'activation des récepteurs de l'immunité innée (notamment les TLR et NLR exprimés par les cellules épithéliales (18). Par

ailleurs, l'activation des cellules épithéliales induit la production de chimiokines et cytokines, participant respectivement au recrutement depuis la circulation sanguine des cellules immunitaires effectrices et à l'activation des cellules recrutées et résidentes. Au niveau alvéolaire, les protéines du surfactant (SP-A à D) possèdent un rôle immunologique, via leur capacité à se lier au LPS, à s'adsorber à la surface des pathogènes pour former des agrégats facilitant leur phagocytose, ou via leurs fonctions immunomodulatrices, notamment vis-à-vis des cellules dendritiques et lymphocytes T (18,23).

c) *Défenses cellulaires*

i. Macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires sont une population de cellules résidentes s'établissant dans le poumon au cours de la période embryonnaire et sont capables d'auto-renouvellement, indépendamment des précurseurs médullaires (25). Cependant, des études ont démontré qu'en cas de forte déplétion de la population, notamment par apoptose en contexte inflammatoire ou infectieux sévère, des monocytes inflammatoires sont recrutés depuis la circulation sanguine et adoptent *in situ* un phénotype de macrophage alvéolaires afin de restaurer le pool de ces cellules (1,26). Les macrophages alvéolaires ont un rôle de sentinelle, par la détection des pathogènes et le déclenchement des réponses innées et adaptatives, ainsi que par l'élimination par phagocytose des microbes et cellules infectées et la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species, ROS*). De par leur importante sécrétion de chimiokines, cytokines (comme l'IL-1 β , IL-6 et TNF) et facteurs de croissance, ils ont un rôle primordial dans la coordination de la réponse inflammatoire local notamment par le recrutement et l'activation des autres types cellulaires. Les macrophages alvéolaires ont de plus un rôle de clairance des cellules apoptotiques, appelée efferocytose, et de régulation de la réponse inflammatoire au cours de l'infection, favorisant le retour à l'homéostasie après l'élimination des pathogènes, notamment via l'inhibition de l'activation des cellules T et la production de *Transforming growth factor- β* (TGF- β) (1,18).

Il existe également une population de macrophages au niveau du parenchyme pulmonaire, appelés macrophages interstitiels, impliqués notamment dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes (16).

ii. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) ont un rôle pivot dans la réponse immunitaire anti-infectieuse, grâce à leur capacité à initier la réponse adaptative via la présentation d'antigènes. Présentes au niveau des sites barrières en contact avec l'environnement, ces cellules sentinelles vont phagocyter les pathogènes, puis préparer l'antigène pour le présenter à leur surface, associé au CMH de type I ou II. Les DC vont alors migrer via la circulation lymphatique vers les organes lymphoïdes où elles vont activer et polariser les lymphocytes naïfs spécifiques de l'antigène (27).

Au niveau pulmonaire, les cellules dendritiques résidentes sont localisées au niveau basolatéral de l'épithélium, sous les cellules épithéliales, et possèdent des prolongements cellulaires en contact avec la surface apicale. Les DC classiques (cDC) sont issues de progéniteurs médullaires communs, qui se différencient en pré-DC avant de migrer vers les tissus périphériques pour devenir des DC matures, sous le contrôle du ligand Flt3 (Flt3L). Il existe deux autres populations de DC dans le poumon, les DC plasmacytoïdes (pDC) dont la production et la maturation ont lieu dans la moelle osseuse, et les DC dérivées des monocytes (moDC) (16). Ces DC expriment une grande variété de récepteurs, leur permettant de reconnaître un large éventail de microorganismes. Les DC activées, ou matures, sont alors capables de produire des médiateurs pro- ou anti-inflammatoires, comme l'IL-6, l'IL-12 et le TNF, influençant la réponse inflammatoire locale (28).

iii. Cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (*innate lymphoid cells*, ILC) sont retrouvées au niveau de la plupart des tissus muqueux, dont la muqueuse respiratoire, où elles forment une population résidente proliférant localement en cas d'inflammation aiguë. Les ILC se caractérisent par leur absence d'expression des récepteurs antigéniques recombinant des lymphocytes T et B (respectivement TCR et BCR). Elles sont classées en trois familles en fonction de l'expression de facteurs de transcription, marqueurs de surface

et de la production de cytokines spécifiques. Les ILCs du groupe 1, Tbet⁺, regroupent les cellules cytotoxiques *Natural killer* (NK) produisant de grandes quantités d'interferon gamma, et les ILC1 non cytotoxiques. Elles sont associées aux réponses immunitaires antivirale et anti-tumorale. Les ILC2, GATA-3^{hi}, produisent de l'IL-4, IL-5 et IL-13 et ont un rôle dans l'allergie et la réponse antiparasitaire. Les ILC3, RORγT⁺, produisent de l'IL-17 ou IL-22 suivant les sous-populations et sont impliquées dans la défense contre les pathogènes bactériens et fongiques. Ces différents types de réponses sont en miroir des réponses liées aux lymphocytes conventionnels de type Th1, Th2, et Th17, respectivement. Les ILC contribuent également à l'homéostasie tissulaire, la réparation épithéliale, ainsi que la régulation des lymphocytes T au niveau des muqueuses (1,29).

iv. Neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules leucocytaires granuleuses à noyau polylobé, produites en continu dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs myéloïdes sous le contrôle du *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF). Acteurs majeurs de la réponse inflammatoire, les neutrophiles sont les premières cellules effectrices à être recrutées sur le site de l'inflammation depuis la circulation sanguine. Au niveau pulmonaire, l'activation des cellules épithéliales par des signaux inflammatoires ou infectieux déclenche un recrutement rapide et massif de ces cellules, via la production et libération de cytokines et chimiokines induisant l'adhésion, la migration transendothéliale et transépithéliale et l'activation des neutrophiles (30,31). Les neutrophiles possèdent différents mécanismes d'élimination des pathogènes : la phagocytose, la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS), la dégranulation, et la formation de *neutrophil extracellular traps* (NET).

La phagocytose des microorganismes ou débris cellulaires par les neutrophiles est déclenchée soit par l'interaction PRR/MAMP, les neutrophiles exprimant un grand nombre de récepteurs innés à leur surface, soit par l'intermédiaire de l'opsonisation des particules par des protéines du complément ou des anticorps, notamment des IgG (dont le fragment Fc sera détecté par les neutrophiles via les récepteurs FcγR). Après leur phagocytose, les pathogènes inclus dans le phagosome sont détruits par la production de ROS ou la fusion du phagosome avec une vésicule lysosomale riche en protéines antimicrobiennes (32–34).

Les ROS sont produits grâce à trois enzymes : la NADPH oxydase, la myéloperoxydase et la *Nitric oxyde* (NO) synthase dans le phagosome selon un processus appelé burst oxydatif. Les ROS ont un effet direct sur les pathogènes, mais peuvent également agir via la régulation de l'activité d'autres protéines, comme les phosphatases, caspases et metalloprotéines, par des mécanismes d'oxydoréduction (32).

La dégranulation consiste en la libération dans le milieu extracellulaire du contenu de granules préformés riches en enzymes et substances antimicrobiennes. Il existe trois types de granules, qui se forment séquentiellement au cours de la maturation du neutrophile : les granules primaires (ou azurophiles) contenant notamment la myéloperoxydase et l'élastase et des défensines, les granules secondaires ou spécifiques riches en lactoferrine et lysosymes et les granules tertiaires riches en gélatinases comme la *matrix metalloprotease 9* (MMP-9) (32).

Un autre mécanisme de défense des neutrophiles a été découvert récemment : la formation de NET. Ce mécanisme consiste en un relargage par les cellules (à la suite d'un contact prolongé avec les pathogènes), d'ADN couplé à des histones et protéines antimicrobiennes qui piègent et immobilisent les microorganismes extracellulaires, empêchant leur propagation et facilitant leur phagocytose (1,34).

Les neutrophiles sont par ailleurs capables d'interagir avec d'autres types cellulaires au cours de la réponse immunitaire. En effet, les neutrophiles activés libèrent des médiateurs pro-inflammatoires tels que cytokines, chimiokines et facteurs de croissance, contribuant à l'amplification de la réponse inflammatoire notamment via l'interaction avec les DC, macrophages, cellules *Natural killer* (NK), et lymphocytes B et T (30,32,34).

3. Les infections respiratoires basses

a) *Introduction*

Les pneumonies aiguës et communautaires font parti, avec les bronchites aiguës, exacerbations de bronchites chroniques et la bronchiolite du nourrisson, des infections respiratoires basses.

Ces infections représentent une cause majeur de morbidité et de mortalité dans le monde, constituant d'après l'organisation mondiale de la santé la quatrième cause de

mortalité toutes causes confondues et la première cause par maladie transmissible en 2016, majoritairement dans les pays à faible revenu (35). Les enfants de moins de cinq ans et les personnes âgées sont particulièrement à risque. La pollution de l'air (intérieure et extérieure), la fumée de cigarette, le diabète, la malnutrition, l'immunosuppression et les pathologies cardiaques, hépatiques, respiratoires ou rénales chroniques constituent également des facteurs de risques de pneumonie (36).

b) *Epidémiologie, définition et étiologies des pneumonies*

Les pneumonies sont caractérisées sur le plan clinique par une accumulation de fluides exsudatifs dans le parenchyme pulmonaire causant toux et dyspnée, fréquemment accompagnées de fièvre et parfois de troubles gastro-intestinaux et troubles de la conscience. Devant ce tableau clinique, le diagnostic est généralement posé par l'examen radiologique du thorax mettant en évidence des signes d'infiltration pulmonaire plus ou moins caractéristiques en fonction de l'étiologie (36). Les pneumonies peuvent avoir de graves complications mettant en jeu le pronostic vital du patient, tels que le syndrome de détresse respiratoire aigu et le sepsis (36,37).

Les pathogènes pouvant être responsables de pneumonies sont extrêmement variés. Selon deux études européennes et américaines récentes réalisées sur des patients adultes atteints de pneumonie aigue communautaire, 27 à 30% sont dues à des virus (principalement rhinovirus, virus *Influenza* et coronavirus) et 14 à 23% à des bactéries, avec une nette prédominance de *Streptococcus pneumoniae*, suivi de *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Legionella pneumophila*. Il est à noter que dans plus de la moitié des cas aucune étiologie n'a pu être établie par les examens microbiologiques (culture positive ou identification par PCR à partir d'un prélèvement des voies respiratoires basses, détection d'antigènes urinaires) (**figure 4**) (37–40). De plus, bien que les co-infections soient encore difficiles à mettre en évidence par les techniques actuelles, il est aujourd'hui reconnu qu'un grand nombre de pneumonies sont probablement d'origine multi-microbienne (41).

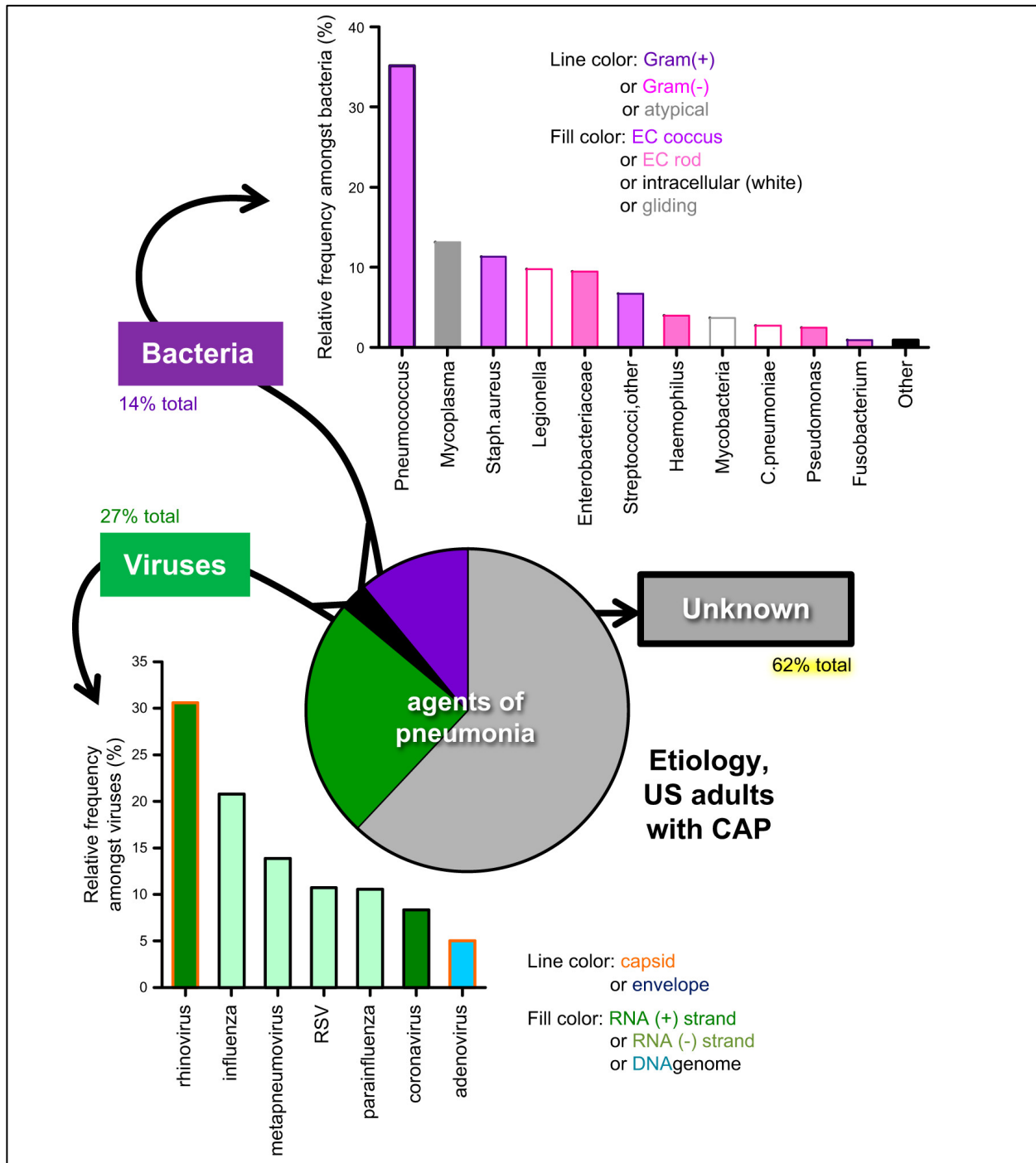


Figure 4 : Etiologie des pneumonies aiguës communautaires. Les données collectées proviennent de 2488 patients adultes immunocompétents hospitalisés pour pneumonie aiguë communautaire dans cinq hôpitaux (Etats-Unis) entre Janvier 2010 et Juin 2012. La recherche étiologique a été réalisée par culture, tests sérologiques, détection d'antigènes et tests de diagnostic moléculaire à partir des prélèvements respiratoires, sanguins et urinaires (37,39).

c) *Infection par les virus de la grippe*

La grippe touche 5 à 15% de la population mondiale chaque année, sous forme d'épidémies saisonnières, et est responsable d'environ 500 000 morts par an (42). Elle est causée par les virus *Influenza* appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae*. Ce sont des virus enveloppés à ARN simple brin fragmenté en huit segments codant pour 11 protéines virales (8 protéines structurales et 3 exprimées durant le cycle de réplication) (43). Les épidémies humaines sont majoritairement causées par les virus *Influenza* de type A (réservoir humain et animal) et B (réservoir humain uniquement).

Les virus du type A sont subdivisés en sous-type en fonction de leurs glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA, 18 sous-types identifiés) et la neuraminidase (NA, 11 sous-types identifiés). La plupart des sous-types sont retrouvés dans le réservoir animal, principalement les oiseaux sauvages, mais seuls 3 sous-types ont été reconnus comme responsables d'épidémies chez l'homme : A/H1N1, A/H2N2 et A/H3N2, certains autres sérotypes, comme le A/H5N1, pouvant être responsables d'infections occasionnelles chez l'homme. Le génome des virus *Influenza* évolue constamment au gré de leur réplication dans le réservoir humain ou animal, par accumulation de mutations, conduisant à l'apparition de nouveaux variants responsables des épidémies saisonnières (glissement antigénique), ou plus rarement par réassortiments génomiques, conduisant à l'apparition de nouveaux sous-types de virus responsables de pandémies mondiales (42,44). Les glissements antigéniques constants expliquent l'échappement du virus au système immunitaire de l'hôte, permettant la réinfection d'une personne déjà infectée ou vaccinée, et conduisent à la nécessité d'une vaccination annuelle des personnes à risque, avec un vaccin dont la composition est adaptée aux dernières souches circulantes (42).

Le virus infecte principalement les cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures et inférieures et des alvéoles, en se fixant aux résidus d'acide sialique via l'HA virale, déclenchant l'entrée du virus par endocytose. Le virus va alors se répliquer de façon importante à l'intérieur du noyau de ces cellules grâce à l'ARN polymérase virale et la machinerie cellulaire de l'hôte. La formation et la libération des néovirions se fait ensuite par bourgeonnement au niveau de la membrane cellulaire, puis clivage des liaisons HA/acide sialique par la NA virale (43). La transmission interhumaine du virus se fait ainsi par voie aérienne, par les sécrétions nasales riches en virions.

Le virus est détecté dans le cytosol des cellules épithéliales par TLR3, TLR7 et RIG-1 et dans cellules myéloïdes par l'inflammasome NLRP3, déclenchant les réponses immunitaires antivirales (production d'interférons de type I et III, d'IL-1 β et IL-18) (45). Les macrophages alvéolaires jouent un rôle important dans la clairance du virus, par la phagocytose des particules virales opsonisées ou des cellules infectées, ainsi que par la production d'IFN de type I et l'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (43). La forte production locale, par les cellules infectées, de cytokines et chimiokines entraîne par ailleurs un important recrutement de neutrophiles, mais aussi de monocytes circulants qui se différencient in situ en DC et macrophages alvéolaires dérivées des monocytes. Ces derniers produisent de fortes quantités de TNF et d'*inducible nitric oxide synthase* (iNOS) et expriment le *pro-apoptotic cytokine TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), associé à une induction de l'apoptose, voire de la nécrose, des cellules épithéliales alvéolaires (46).

Ce contexte fortement inflammatoire entraîne une destruction de l'épithélium pulmonaire, reconnue comme une cause majeure de syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) lié à l'infection grippale (43). La production massive d'interféron de type I inhibe de plus les mécanismes de défense antibactérienne (réponse Th17, production de CXCL1 et CXCL2, expression du *scavenger receptor* MARCO par les macrophages et phagocytose), favorisant les surinfections bactériennes, même après clairance du virus (41,47,48). En effet, la plupart des décès liés à la grippe sont dû non pas à l'infection grippale en elle-même, mais à ses complications, le SDRA et les pneumonies bactériennes secondaires, majoritairement causées par *S. pneumoniae* et *S. aureus*. Les personnes âgées sont les plus à risque de complication, mais l'obésité, la grossesse et les pathologies chroniques constituent également des facteurs de risque importants (16,41).

d) *Pneumonie à Streptococcus pneumoniae*

Le pneumocoque, *S. pneumoniae*, est une bactérie à Gram positif assemblé en diplocoques ou courtes chainettes. Il possède une capsule polysaccharidique, dont la nature permet la classification en sérotypes (plus de 90 identifiés à ce jour) (49). Le pneumocoque colonise fréquemment les voies aériennes supérieures chez l'homme, notamment les jeunes enfants et personnes vivant en collectivités. Il peut persister

pendant de longues périodes parmi les nombreuses autres bactéries commensales du nasopharynx, dont certaines du genre *Streptococcus*. La forte prévalence du portage et de la transmission aéroportée de la bactérie au sein de la population explique en partie la fréquence des infections opportunistes à pneumocoques. Le pneumocoque est en effet une des premières causes d'infections bactériennes locales de la sphère ORL (otites et sinusites) et des voies respiratoires basses (bronchites, bronchiolites et pneumonies), mais également d'infections sévères ou invasives (méningites et sepsis).

Il existe pourtant d'importantes différences de virulence entre les sérotypes de pneumocoques : certains sérotypes sont en effet fréquemment responsables d'infections locales ou invasives, avec en général une forte contagiosité et une phase de colonisation préalable du nasopharynx réduite voire absente, tandis que d'autres sont essentiellement associés à un portage asymptomatique. Ces derniers possèdent généralement des facteurs leur permettant d'échapper au système immunitaire, comme la production de protéases dégradant les IgA et les peptides antimicrobiens, et sont peu inflammatoires, limitant ainsi la réaction de l'hôte. Cependant, toute altération du système immunitaire ou de l'intégrité de la barrière épithéliale de l'hôte peut modifier cet équilibre et est susceptible de permettre à des souches faiblement virulentes de causer des infections opportunistes locales ou invasives.

Le processus de colonisation du nasopharynx passe par l'attachement de la bactérie aux cellules épithéliales et la formation d'un biofilm protégeant le pneumocoque contre les antibiotiques et le système immunitaire de l'hôte (41,50,51). Ce biofilm constitue un foyer à partir duquel des bactéries sont relarguées dans les sécrétions nasales, responsables de la transmission interhumaine, ainsi qu'un lieu privilégié de transmission horizontal de matériel génétique (gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques notamment) entre espèces bactériennes (52–54). Le pneumocoque possède en outre de nombreux facteurs de virulence. La capsule polysaccharidique, fortement antigénique, est un des facteurs de virulence majeurs. Elle constitue en effet une protection contre la phagocytose, l'opsonisation et le piégeage par le mucus (42,43,45). La différence de production de polysaccharides capsulaire, influant sur la composition et l'épaisseur de la capsule, peut ainsi expliquer en partie les différences de virulence entre sérotypes. On peut également citer comme facteurs de virulence importants la

pneumolysine et la bactériocine, cytotoxiques, et la *Pneumococcal surface protein A*, bloquant la liaison du C3b au facteur B du complément. Plusieurs protéines de surface du pneumocoque sont capables de se lier à des composants de surface des cellules épithéliales, favorisant l'attachement et la translocation de la bactérie. On peut citer notamment la phosphorylcholine et la *cholin binding protein A*, qui se lient au *Platelet-activating factor receptor* dont l'expression par les cellules épithéliales est augmentée en contexte inflammatoire. Le pneumocoque possède par ailleurs une neuraminidase, semblable à celle des virus *Influenza*, qui diminue la viscosité du mucus et clive des glycolipides et glycoprotéines de surface des cellules épithéliales, favorisant ainsi l'accès et l'attachement de la bactérie à ses récepteurs, et d'autres protéases dégradant le mucus ou les immunoglobulines (43–45).

La détection du pneumocoque et le déclenchement de la réponse immunitaire antibactérienne dépend des TLRs, notamment TLR2, couplé à TLR1 ou TLR6 (qui reconnaît le peptidoglycane et l'acide lipotéicoïque de la paroi bactérienne) et TLR4 (qui se lie à la pneumolysine). Les récepteurs SIGIRR, de la famille des *C-type lectins*, et le *scavenger receptor* MARCO, sont également nécessaires à la phagocytose de la bactérie par les macrophages. Au niveau intracellulaire, TLR9 et le *Nucleotide-binding oligomerisation domain protein 2* (NOD2) détectent respectivement l'ADN bactérien et un fragment du peptidoglycane de la paroi et sont importants pour la clairance par les macrophages des bactéries phagocytées. De plus, la protéine C-réactive circulante se lie à la phosphorylcholine bactérienne et joue un rôle dans la réponse antibactérienne lors de bactériémie (44). La production locale, par les cellules épithéliales notamment, de nombreux médiateurs inflammatoires (cytokines TNF, IL-6 et IL-1 β , chimiokines mais aussi peptides antimicrobiens tels que défensines et cathelicidines, ainsi que la protéine D du surfactant au niveau alvéolaire) et l'activation du complément (voie classique principalement) contribuent à la clairance du pneumocoque. Les neutrophiles, recrutés massivement dans le poumon au cours de l'infection, ont également un rôle primordial dans la clairance des bactéries, tandis que les macrophages alvéolaires ont principalement un rôle d'élimination des neutrophiles et autres cellules apoptotiques (44).

Les facteurs de risque d'infections à pneumocoque sont l'âge (< 2 ans ou > 65 ans), l'alcoolisme, le diabète, les pathologies pulmonaires et hépatiques chroniques, les infections respiratoires par les virus influenza (et probablement aussi d'autres virus respiratoires), la neutropénie, l'asplénie, l'infection par le VIH et les déficits immunitaires congénitaux (des immunoglobulines et du complément en particulier) (42,44,48). Par ailleurs, la composition de la flore microbienne des voies respiratoires supérieures joue un rôle dans le contrôle de la prolifération de la bactérie. Ainsi, toute modification de la composition de cette flore, notamment par la fumée de cigarette ou la prise d'antibiotiques, peut favoriser le développement d'infections pneumococques. D'autre part, la compétition entre sérotypes à l'intérieur du foyer nasopharyngé implique que les individus sont généralement porteurs d'un seul sérotype de pneumocoque à la fois, même si le portage multiple reste possible. (51).

Deux vaccins dirigés contre les polysaccharides capsulaires du pneumocoque sont actuellement disponibles : le vaccin conjugué à 13 valences (VPC13, dirigé contre 13 sérotypes différents) et le vaccin polysaccharidique à 23 valences (VPP23). Le VPC13 entraîne une immunité et une réponse mémoire, et réduit également le portage nasopharyngé. Il est recommandé chez le nourrisson dès l'âge de 2 mois, administré de façon concomitante avec le vaccin hexavalent (diphtérie, tétanos, polyomyélite, coqueluche, *Haemophilus influenzae* type b, hépatite B), ou chez l'enfant ou l'adulte non préalablement vaccinés par le VPC13 présentant un risque élevé d'infection invasive à pneumocoque (IIP). Le VPP23, beaucoup moins immunogène, notamment chez le nourrisson, nécessite une réadministration tous les 5 ans environ et ne protège pas contre le portage. Il est recommandé chez l'adulte à risque élevé d'IIP (56). Cependant, bien que la vaccination ait permis une diminution significative du portage et de l'incidence globale des IIP, il a rapidement été observé en parallèle une augmentation de la prévalence et des infections à sérotypes non-vaccinaux. Cette observation est à prendre en compte pour le développement de futures stratégies vaccinales, basées notamment sur d'autres cibles que les polysaccharides capsulaires (50,51).

e) *Traitement des pneumonies bactériennes*

Le traitement de référence des pneumonies bactériennes est l'antibiothérapie. Cette dernière est généralement prescrite de façon empirique suite au diagnostic clinique et radiologique, les tests d'identification (culture des prélèvements respiratoires ou sanguins, recherche d'antigènes urinaires ou PCR) n'étant préconisés qu'en cas de complications, hospitalisation ou échec de l'antibiothérapie, en raison de leur faible sensibilité et spécificité (31,35). Cependant, la progression constante au cours des dernières décennies de la résistance aux antibiotiques, associée à un déclin de la découverte de nouvelles molécules antibiotiques, complique la prise en charge des patients et conduit à une augmentation des échecs thérapeutiques et de la mortalité (59). Ce problème est particulièrement important dans le cas des pneumonies associées aux soins, notamment celles se développant sur ventilation assistée en milieu hospitalier, où la circulation de germes résistants est plus importante, et les étiologies plus variées que pour les pneumonies communautaires (37,60). Il existe cependant de fortes disparités en fonction des régions du monde, les pays à faible et moyen revenu étant davantage concernés par l'antibiorésistance en raison d'une mauvaise prise en charge des malades et une mauvaise utilisation des antibiotiques favorisant la sélection de souches bactériennes résistantes. De nombreuses campagnes nationales et internationales ont été menées afin de promouvoir un bon usage des antibiotiques visant à limiter le développement de résistance, et l'organisation mondiale de la santé a récemment émis un plan d'action global dans ce but, soulignant l'urgence de la situation (61).

III) Propriétés immunomodulatrices de la flagelline

1. Structure et rôle de la flagelline

La flagelline est la protéine constituant le filament du flagelle servant à la mobilité de certaines bactéries, facilitant ainsi la colonisation et l'invasion de l'hôte (62). Par ailleurs, d'autres rôles du flagelle dans la virulence des bactéries ont été mis en évidence, comme le chimiotactisme, l'adhésion (63–65), la formation de biofilm (66,67) et la sécrétion d'effecteurs selon un système de sécrétion de type III (68,69). Ce flagelle se compose de trois parties : le corps basal, ancré à la membrane cytoplasmique et

comprenant le moteur permettant la rotation du filament, le crochet servant de lien et enfin le filament, composé de molécules de flagelline associées de manière hélicoïdale.

La flagelline de *Salmonella enterica* serovar typhimurium est constituée de quatre domaines, D0, D1, D2 et D3. Les domaines constants D0 et D1 possèdent une structure en hélice- α et forment le corps du filament, participant à la fonction motrice. De plus, D1 contient les motifs nécessaires à la reconnaissance par ses récepteurs. Les domaines variables D2 et D3, en feuillet- β , sont localisés à la surface externe du filament et sont responsables de l'immunogénicité de la flagelline, c'est à dire l'induction de la production d'anticorps spécifiques par l'hôte (**figure 5**) (70,71). La flagelline utilisée dans notre étude (FliC $_{\Delta 174-400}$) est une protéine mutante présentant une délétion des domaines hypervariables immunogènes D2 et D3 (72).

La flagelline bactérienne est détectée chez l'hôte par deux types de récepteurs : TLR5 (dont elle est le seul agoniste connu) au niveau extracellulaire (13), et l'inflammasome NLRC4/Naip5 au niveau intracytosolique (14,73).

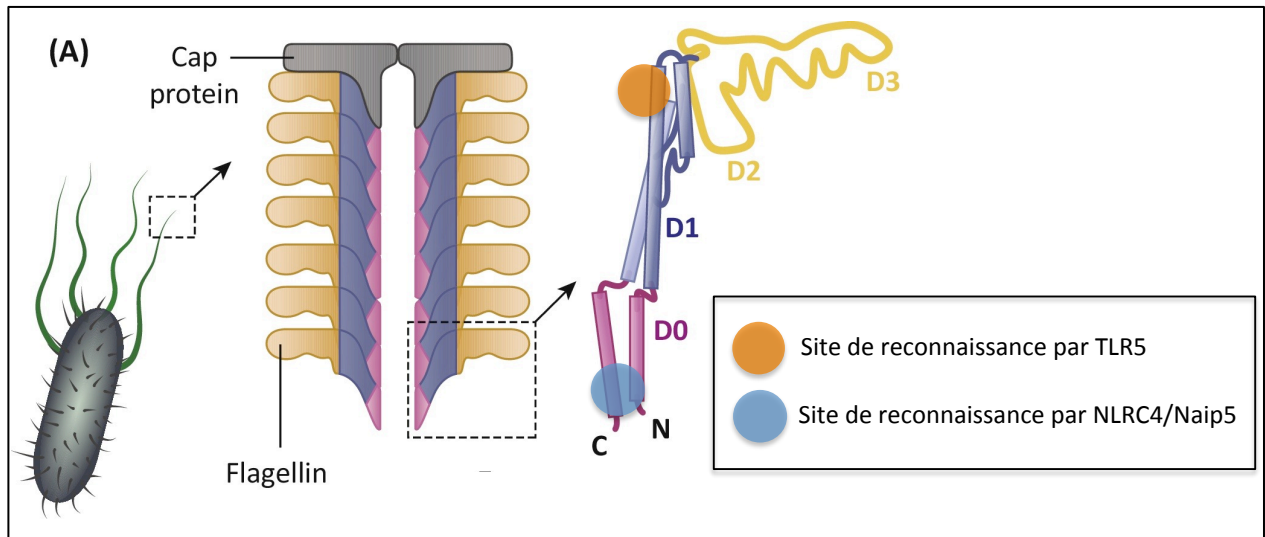


Figure 5 : Représentation schématique du flagelle bactérien et de la flagelline FliC de *Salmonella enterica* serovar typhimurium. D0, D1 : domaines invariants contenant les motifs de reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée TLR5 et NLRC4. D2, D3 : domaines hypervariables immunogènes. **Adapté de Vijayan et al., trends in immunology 2018 (72).**

2. Interaction flagelline / TLR5

TLR5 est exprimé par un grand nombre de cellules, comme les monocytes, macrophages, cellules dendritiques immatures, neutrophiles, cellules épithéliales des

muqueuses digestives et pulmonaires. Sa forte expression au niveau du tractus pulmonaire suggère un rôle essentiel dans la défense contre les pathogènes respiratoires (62,63). Suite à la détection de la flagelline par TLR5, le recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 va permettre la transduction intracellulaire du signal, et conduire à la production de protéines impliquées dans la réponse pro-inflammatoire et antimicrobienne. Au niveau des cellules épithéliales, la flagelline stimule ainsi la production de chimiokines comme CXCL1, CXCL2 et CCL20, impliquées dans le recrutement des neutrophiles et cellules dendritiques, de peptides antimicrobiens comme la β -defensin-2 humaine (*h*- β D2) ou la matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), ainsi que la production d'oxide nitrique et de *nitric oxide synthase* (iNOS) participant à l'activité antimicrobienne (74–76).

3. Modulation du système immunitaire inné en thérapie anti-infectieuse

La réponse immunitaire anti-infectieuse repose sur un équilibre entre mécanismes pro-inflammatoires, nécessaires pour combattre l'infection, et anti-inflammatoires, permettant le retour à l'homéostasie après l'élimination des microorganismes, et empêchant une exacerbation potentiellement délétère de l'inflammation, pouvant entraîner des lésions des organes ou une défaillance systémique (2). Les PRRs, et en particulier les TLRs, ont une distribution ubiquitaire et sont impliqués dans de nombreux mécanismes physiopathologiques comme la réponse anti-infectieuse, les maladies auto-immunes, les syndromes inflammatoires aigus ou chroniques, mais aussi les cancers (3). Dans ce dernier cas, si la stimulation des PRRs est généralement associée à l'activation de mécanismes cytotoxiques anti-tumoraux, plusieurs études ont mis en évidence le développement de réponses inflammatoires particulières dans le microenvironnement tumoral, favorisant la progression et la dissémination de la tumeur (77–79). Ces récepteurs constituent ainsi des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de nombreuses pathologies, et plusieurs molécules sont actuellement en phase de tests cliniques.

Dans le domaine de l'infectiologie, la vaccination représente l'exemple le plus commun d'utilisation des immunomodulateurs, en tant qu'adjuvants dont le rôle est de booster l'activation de l'immunité adaptative. Il existe par ailleurs certaines applications où les immunomodulateurs sont utilisés en tant que thérapie antivirale, comme l'interféron qui

est administré en association avec des antiviraux dans le traitement de l'hépatite C (3,9).

Dans le cadre de thérapies anti-infectieuses, l'utilisation d'immunomodulateurs présente certains avantages par rapport aux traitements ciblant les microorganismes. En effet, du fait de la grande diversité des mécanismes anti-infectieux mis en jeu, ils sont beaucoup moins soumis au risque de développement de mécanismes de résistances par les pathogènes. D'autre part, dans le cas des molécules ciblant le système immunitaire inné, leur important spectre d'action permet potentiellement une utilisation contre un large éventail de pathogènes, voire même en prophylaxie chez certaines catégories de patients à risque (2).

Cependant, le développement d'immunostimulateurs en tant que traitement anti-infectieux nécessite un contrôle stricte de la réponse pro-inflammatoire afin d'éviter le risque d'exacerbation délétère de l'inflammation (2).

4. La flagelline en thérapeutique

L'intérêt des propriétés immunostimulantes de la flagelline en tant qu'adjuvant de vaccination a été largement étudié, dans des modèles animaux d'infections bactériennes, virales ou parasitaires (80–88), mais également au cours de tests cliniques, principalement dans le développement de vaccins contre la grippe (89–91). De plus, les TLR étant particulièrement exprimés au niveau des cellules épithéliales des muqueuses, les propriétés adjuvantes de la flagelline ont été largement étudiées dans le cadre de vaccination par voie muqueuse, via un mécanisme dépendant de la stimulation de TLR5 au niveau des cellules épithéliales, induisant indirectement la maturation, l'activation et la migration des cellules dendritiques conventionnelles vers les nœuds lymphatiques (81,83,86,92).

Plusieurs études ont également montré un effet protecteur de la flagelline dans de nombreux modèles animaux d'infections bactériennes virales ou fongiques, par voie locale ou systémique (93–105) (**tableau 1**). Bien que la plupart de ces études démontrent un effet de la flagelline administrée en prophylaxie ou en co-administration avec le pathogène, l'effet de la flagelline en thérapeutique, lorsque l'infection est installée, a été relativement peu étudié. L'équipe a récemment démontré, dans un modèle murin d'infection respiratoire à pneumocoque de sérotype 1, qu'un traitement combinant un antibiotique (l'amoxicilline par voie orale ou le cotrimoxazole par voie

systémique) et l'administration intranasale de flagelline, était plus efficace que le traitement par antibiotique seul, à la fois en terme de diminution de la charge bactérienne pulmonaire et splénique et en terme de survie des animaux (106). Cet effet était dépendant de la signalisation via TLR5, démontré par l'absence de protection chez les souris TLR5^{-/-} ou lors de l'administration d'une flagelline mutante possédant une délétion dans le domaine de reconnaissance de la protéine par TLR5. De plus, l'analyse histologique du poumon des animaux infectés par le pneumocoque et traités par amoxicilline seule ou associée à la flagelline a montré que l'administration de flagelline n'entraînait pas d'exacerbation de l'inflammation au niveau pulmonaire. Cet effet protecteur de la flagelline s'accompagnait par ailleurs d'un recrutement de neutrophiles au niveau du parenchyme pulmonaire et de la production locale de chimiokines impliquées dans le recrutement de neutrophiles, comme CXCL1 et CXCL2, suggérant un potentiel rôle de ces cellules dans l'efficacité de la flagelline.

Tableau 1 : Modèles infectieux pour lesquels l'administration de flagelline a démontré un effet protecteur

	Pathogènes	Voie d'administration de la flagelline	Références
Bactéries	<i>S. Typhimurium</i> (intestinal)	systemique (prophylaxie)	(93)
	<i>E. faecalis</i> (intestinal)	systemique (prophylaxie)	(94)
	<i>C. difficile</i> (intestinal)	systemique (prophylaxie et thérapeutique)	(95)
	<i>Y. pseudotuberculosis</i> (intestinal)	systemique (prophylaxie)	(103)
	<i>P. aeruginosa</i> (respiratoire)	local (prophylaxie)	(96)
	<i>S. pneumoniae</i> (respiratoire)	local (prophylaxie)	(97)
	<i>B. cepacia</i> (respiratoire)	local (prophylaxie)	(100)
	<i>P. aeruginosa</i> (cornée)	local (prophylaxie)	(101)
	<i>S. Pneumoniae</i> (respiratoire)	local (thérapeutique)	(106)
fongique	<i>C. albicans</i> (cornée)	local (prophylaxie)	(105)
virus	<i>Cytomegalovirus</i> (systemique)	systemique (prophylaxie)	(98)
	<i>Rotavirus</i> (intestinal)	systemique (prophylaxie & thérapeutique)	(99)

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Dans le but de confirmer l'efficacité de la thérapie combinée antibiotique – flagelline, nous nous sommes intéressés au type d'interaction résultant de cette association, à savoir s'il s'agit d'une simple additivité des effets des deux molécules ou bien d'un effet synergique, ce dernier cas de figure étant défini comme un effet combiné supérieur à la somme des effets individuels de chaque molécule. D'autre part, la résistance aux antibiotiques étant à l'heure actuelle un problème majeur, nous avons voulu savoir si cette thérapie combinée pourrait présenter un intérêt pour le traitement des infections à germes résistants. Pour cela, nous avons développé un modèle murin de surinfection post-grippale par une souche de pneumocoque résistante à un grand nombre d'antibiotiques et testé l'efficacité du traitement combiné dans ce contexte.

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

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

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I) Infection bactérienne et virale

1. Souche bactérienne

La souche de *S. pneumoniae* de serotype 1 (Sp1, isolat clinique E1586) a été obtenue auprès du *National Reference laboratory – Ministry of health*, Uruguay (107). La souche de *S. pneumoniae* de serotype 3 (Sp3, numéro de souche 104491) provient de la Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France) et a été isolée à partir de sécrétions bronchiques humaines. Elle est résistante à l'amoxicilline, le cefotaxime, la doxycycline, l'érythromycine, le chloramphénicol, la streptomycine et le cotrimoxazole.

2. Préparation des stock et conservation

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

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

3. Modèle d'infection murine

a) Autorisations et normes de sécurité

Les souris femelles BALB/cJ et Swiss de 6 à 8 semaines utilisées dans les expérimentations ont été fournies par les laboratoires Janvier, Saint Berthevin, France. Les animaux sont maintenus en cages ventilées (6 animaux maximum par cage) et manipulés sous hotte à flux d'air laminaire vertical (class II A2, ESCO, Hatboro, PA) dans des locaux de norme de sécurité biologique de niveau 2 (n° d'agrément de

l'établissement : A 59-350009). Toutes les expériences réalisées sont en accord avec les réglementations nationales et institutionnelles actuelles et ont toutes été approuvées par le Comité d'Éthique en Expérimentation Animale du Nord-Pas-de-Calais (protocole CEEA 062011).

b) *Infection des souris*

Préalablement à l'infection intranasale, les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de 1,25 mg de kétamine et 0,25 mg de xylazine dans 250 µl de PBS. L'infection primaire par *S. pneumoniae* serotype 1 (Sp1) a été réalisée par administration intranasale de $2-4 \times 10^6$ CFU dans 30 µl de PBS (106). Le modèle d'infection grippale ayant développé dans notre laboratoire chez les souris C57BL/6 (108,109), le modèle de surinfection pneumococcique avec Sp3 a été réalisé chez ces animaux. Les souris ont été infectées par voie intranasale par 50 *plaque-forming units* (PFU) de virus influenza A H3N3 Scotland/20/74 dans 30 µl de PBS, comme décrit précédemment (108). Les souris ont été secondairement infectées, sept jours plus tard, par 10^3 CFU de Sp3 dans 30 µl de PBS par voie intranasale.

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

c) *Dénombrement des colonies bactériennes dans les organes*

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

II) **Administration des traitements**

1. Flagelline

a) *Production*

La flagelline recombinante FliC_{Δ174-400} utilisée dans toutes les expérimentations mentionnées dans ce mémoire (désignée FliC) est issue de la flagelline FliC de *S.*

typhimurium (110) délétée des domaines hypervariables immunogènes D2 et D3 et présentant un tag histidine en carboxy-terminal. La construction a été générée par PCR, clonée dans le vecteur d'expression pET22b⁺ avant d'être intégrée dans la souche *E. coli* BL21 pour la production de la protéine. Après destruction des bactéries sous french press, la fraction soluble a été déplétée en lipopolysaccharide (LPS) par extraction au Triton X-114 (111) puis purifiée par chromatographie.

b) *Administration*

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

2. Antibiotiques

a) *Amoxicilline*

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

b) *Cotrimoxazole*

Le cotrimoxazole ou sulfaméthoxazole (SXT) (Bactrim® Roche, Basel, Switzerland), a été administré à la dose de 0,2 ou 0,8 mg de triméthoprime et 0,8 ou 3,2 mg de sulfaméthoxazole dans 200 µl de PBS par voie intrapéritonéale.

III) **Test de synergie**

1. Quantification de l'effet d'un traitement

L'effet de chaque traitement sur la charge bactérienne pulmonaire des souris infectées par *S. pneumoniae* serotype 1 a été quantifié par le taux de croissance bactérienne pulmonaire chez les souris traitées par rapport aux souris non traitées (%*growth*), traduit expérimentalement par le ratio de la moyenne des CFUs dénombrées dans le poumon

après traitement rapporté à la moyenne des CFU dénombrées dans le poumon des souris non traitées (groupe *untreated*), soit, pour un composé A :

$$\%growth = CFU (A) / CFU (untreated)$$

2. Proportional effect

Afin de déterminer le potentiel d'additivité ou de synergie des traitements combinés, l'effet observé du traitement combiné a été comparé à l'effet théorique attendu (*Predicted additivity*) en cas d'additivité des deux composés (*Predicted additivity*), calculé comme le produit des *Percent-growth* de chaque composé utilisé seul, soit :

$$\text{Predicted additivity (A+B)} = \%growth (A) \times \%growth (B)$$

A partir de cette notion, le *Proportional effect* (PE) de l'association est calculé selon l'équation suivante :

$$PE = \frac{\text{Predicted additivity} - \text{Effet observé}}{\text{Predicted additivity}}$$

Un *Proportional effect* positif (> 0 %), implique un effet synergique entre les deux composés, tandis qu'un *proportional effect* égal à zéro reflète une relation d'indépendance ou d'additivité des composés (112).

IV) Cytométrie en flux

1. Préparation des cellules

a) *Liquide de lavage bronchoalvéolaire (BAL)*

Après sacrifice des souris, les BAL ont été prélevés par voie intratrachéale par lavage avec 3 x 1 ml de PBS + 5% de sérum de veau fœtal (SVF). Les BAL ont ensuite été filtrés sur filtre de nylon de 70 µm, puis les cellules ont été lavées au FACS buffer (PBS + 2% SVF) et incubées pendant 30 minutes à 4°C et à l'obscurité avec la solution de marquage (50 µl de solution pour 1-2 x 10⁶ cellules) contenant les anticorps fluorescents dilués dans un mélange en proportions égales de FACS buffer et de surnageant

d'hybridome 2.4G2 (contenant les anticorps anti-CD16 et anti-CD32 dirigés contre les récepteurs au fragment Fc des anticorps).

b) *Poumons*

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

2. Analyse phénotypique des cellules par cytométrie en flux

Les données ont été collectées sur un cytomètre en flux de type LSR Fortessa (Becton-Dickinson) et analysées à l'aide du logiciel BD FACSDiva software. Les cellules ont été sélectionnées selon leur taille et leur granulosité (SSC, FSC) et l'expression ou non à leur surface des marqueurs CD45 (marqueur des cellules leucocytaires), CD11b et CD11c, Siglec F, Ly6C, Ly6G et CCR2. Du iodure de propidium (PI) à été ajouté à la suspension cellulaire 5 min avant acquisition pour éliminer de l'analyse les cellules mortes, dont la membrane altérée permet l'entrée et la fixation du PI à l'ADN. Les neutrophiles, macrophages et monocytes inflammatoires ont été définies à partir des cellules vivantes, CD45 positives, lignages négatives selon les caractéristiques d'expression de marqueurs suivantes : macrophages (SiglecF⁺, CD11b⁻, CD11c⁺), neutrophiles (SiglecF⁻, Ly6G⁺, CD11b⁺) et monocytes inflammatoires (SiglecF⁻, CD11b⁺, Ly6C⁺, CCR2⁺). Les anticorps utilisés (**Tableau 2**) ont été obtenus auprès de BD Biosciences (San Jose, CA) ou Biolegend (San Diego, CA).

Tableau 2 : liste des anticorps utilisés pour l'analyse par cytométrie en flux

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

V) Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR en temps réel

1. Extraction de l'ARNm et rétrotranscription

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

2. PCR en temps réel

L'expression des gènes a été analysée par PCR (*polymerase chain reaction*) en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques des gènes d'intérêt (**Tableau 3**) et de Sybr Green Master Mix® (Applied Biosystems) contenant l'ADN polymérase, les dNTPs et le composé fluorescent Sybr Green® permettant la quantification de l'ADN. Pour chaque couple d'amorces, un contrôle de la spécificité de l'amplification a été réalisé en remplaçant l'ADNc par de l'eau. L'incorporation du Sybr Green® à l'amplicon a été suivie en temps réel par mesure de la fluorescence émise sur l'automate Quantstudio 12k (Applied Biosystems). La quantité initiale d'ARNm dans l'échantillon est proportionnelle au signal de fluorescence représenté par la valeur du cycle seuil (Ct), déterminé dans une zone où l'amplification est exponentielle. La limite de détection dans nos expériences a été fixée à une valeur de Ct de 34 cycles. La mesure du ΔCt ($\Delta Ct = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{actine}}$) normalise le niveau d'ARNm du gène d'intérêt à celui d'un gène de référence, ou gène de ménage, dont l'expression reste constante (gène codant la β -actine). La quantité relative d'ARN dans l'échantillon est exprimée selon la formule :

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{condition2}} - \Delta Ct_{\text{condition1}})}$$

Tableau 3 : séquences des amorces utilisées pour l'analyse par RT qPCR

Gène cible	Amorce sens (F)	Amorce anti-sens (R)
<i>Actb</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<i>B2m</i>	TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC	GGGTGGCGTGAGTATACTTGAA
<i>Ccl20</i>	TTTGGGATGGAATTGGACAC	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC
<i>Cxcl1</i>	CTTGGTTCAGAAAATTGTCCAAAA	CAGGTGCCATCAGAGCAGTCT
<i>Cxcl2</i>	CCCTCAACGGAAGAACCAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC
<i>Il1b</i>	AATCTATACCTGTCTGTGTAATGAAAGAC	TGGGTATTGCTTGGGATCCA
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
<i>S100a9</i>	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT	TGCATTTATGAGGGCTTCATT
<i>Actb</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<i>B2m</i>	TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC	GGGTGGCGTGAGTATACTTGAA

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

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

VII) Analyses statistiques

Les graphiques et analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel Graph Pad Prism® (GraphPad Software®). Les données de CFUs (**fig. 1**) ont été analysées avec le test non-paramétrique de Mann & Whitney permettant la comparaison de deux groupes indépendants. Pour la comparaison simultanée de plus de deux groupes, le test de Kruskal-Wallis a été appliqué, couplé au test de comparaison multiple de Dunn (**fig. 2 et 3**). La significativité est définie par une valeur de $p < 0,05$ et représentée de la façon suivante : * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$.

RESULTATS

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

Dans cette première partie, nous avons voulu déterminer si l'efficacité supérieure du traitement combinatoire antibiotique – flagelline par rapport à l'antibiotique ou la flagelline seuls (106) était due à un effet additif des deux composés, ou bien s'il existait un phénomène de synergie entre les deux.

L'effet résultant de l'administration conjointe de deux molécules peut être de trois types (113) :

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

La plupart des études évaluant le potentiel synergistique de différents agents antimicrobiens utilisent des systèmes *in vitro*, et des approches sous formes de *checkerboard*, où les deux molécules testées sont utilisées à doses croissantes, seules ou en association (113–115). Cependant, contrairement aux antibiotiques, la flagelline ne possède pas d'effet antibactérien direct, mais plutôt un effet indirect, impliquant la détection par des cellules sentinelles, la production de nombreux facteurs antimicrobiens par différents types cellulaires, notamment les cellules épithéliales, et le recrutement et l'activation de cellules immunitaires effectrices tuant les pathogènes via différents mécanismes. Ce mode d'action indirect rend les tests *in-vitro* inapplicables en l'absence de modèle reproduisant ces conditions physiologiques complexes. Nous avons donc étudié la nature et l'amplitude des interactions entre flagelline et antibiotiques dans un modèle d'infection respiratoire létale à Sp1 chez la souris.

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

L'approche *in-vivo* ne permettant pas, pour des raisons de coût et de faisabilité, de tester un large éventail de combinaisons de doses de chaque molécule à la manière des *checkerboards*, nous avons dans un premier temps recherché la dose minimale de flagelline FliC_{Δ174-400} induisant une saturation de la réponse immunitaire chez les souris infectées par Sp1. Pour cela, les souris BALB/c ont été infectées par une dose létale de Sp1 par voie intranasale, puis traitées par amoxicilline par voie orale (5 µg par animal, soit 0,2 mg/kg), associé à l'administration intranasale de flagelline à différentes doses, allant de 1 ng à 25 µg par animal (soit 0,4 µg à 1 mg/kg). La réponse immunitaire a ensuite été analysée par la mesure de l'expression relative dans le poumon, 4h post-traitement, de différents gènes classiquement induits par la flagelline, tels que ceux codants pour les chimiokines CXCL1, CXCL2 et CCL20, les cytokines inflammatoires IL-1β et IL-6 et le peptide antimicrobien S100A9 (81,92,106,107,116). Nous avons observé une saturation de l'amplitude de l'expression de *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl20*, *Il6* et *Il1b* à partir de 1 µg de flagelline (**figure 6**). Nous avons finalement choisi la dose saturante de 2,5 µg de FliC_{Δ174-400} pour notre étude de synergie *in vivo*.

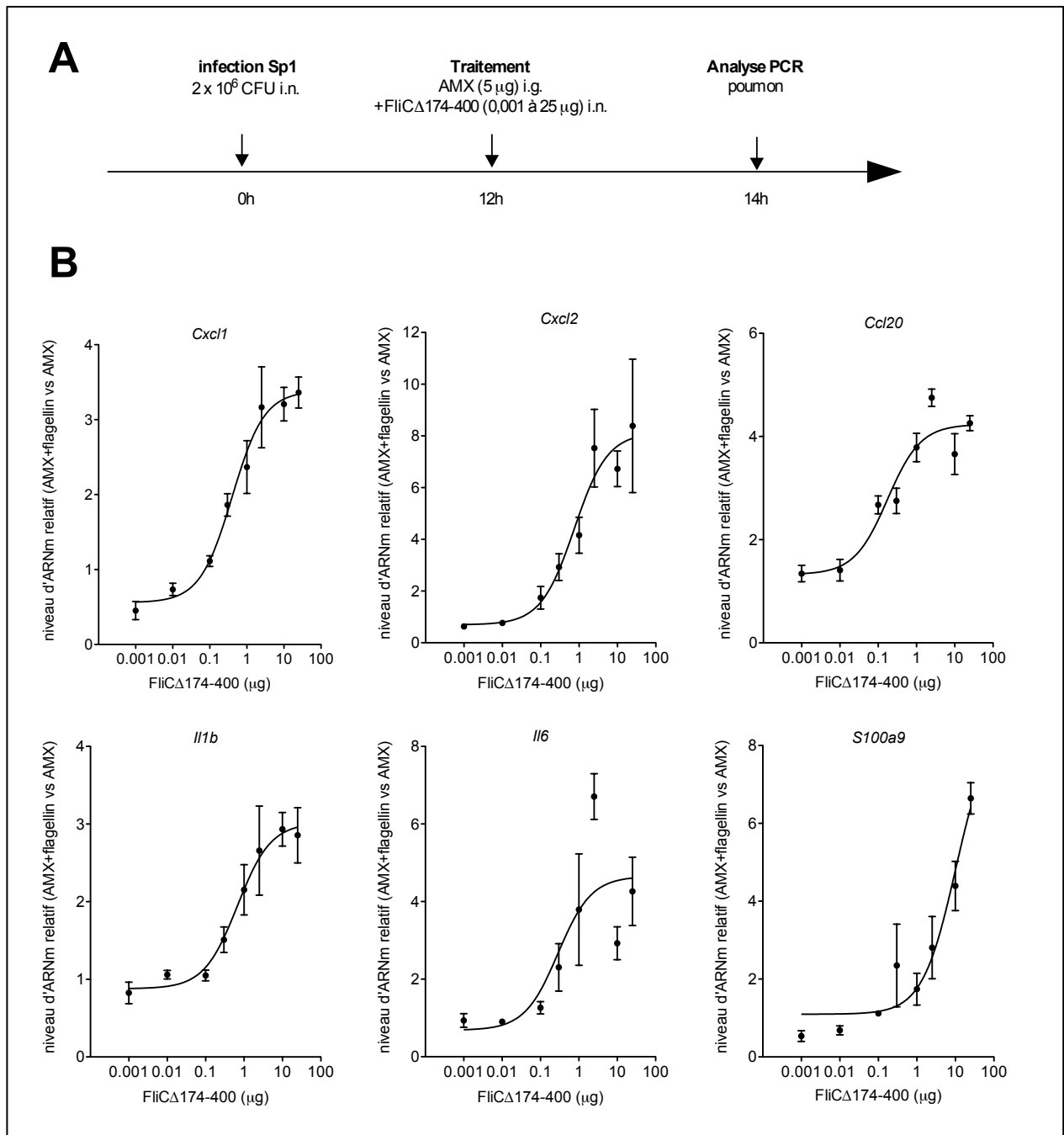


Figure 6: Effet de la dose de flagellin sur la réponse immunitaire transcriptionnelle du poumon. A) Les souris BALB/c (n=4 par groupe) ont été infectées par voie intranasale par 2×10^6 Sp1 et traitées 12h plus tard par l'amoxicilline (AMX; 5 µg, administration intragastrique) combiné à l'administration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

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

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

a) Synergie amoxicilline - flagelline

Afin de déterminer le type d'interaction thérapeutique entre antibiotique et flagelline *FliC_{Δ174-400} in vivo*, les souris ont été infectées par une dose intranasale létale de Sp1 (4×10^6 CFU) puis traitées 12h après par administration intragastrique d'AMX à la dose de 5 ou 40 μg (0,2 et 1,6 mg/kg, respectivement), l'instillation intranasale de flagelline à dose saturante (2,5 μg dans 30 μl de PBS) ou combinaison des deux traitements. La charge bactérienne pulmonaire a été déterminée 12h après traitement (**Figure 7A**). Les résultats montrent un effet antibactérien quasiment nul de la flagelline administrée en monothérapie, et un effet très limité de l'AMX en monothérapie, avec une réduction de la charge pulmonaire de 5 et 7 fois (pour les doses 5 et 40 μg , respectivement) par rapport aux souris non traitées. Le traitement combiné induit une diminution de la charge bactérienne d'un facteur 10 pour flagelline + AMX 5 μg et 82 pour flagelline + AMX 40 μg (**figure 7B**), démontrant un effet antibactérien significativement supérieur à celui de la même dose d'AMX administrée seule. Afin d'étudier le type d'interaction entre AMX et flagelline, nous avons quantifié l'effet de chaque traitement (combinaison ou monothérapie) par le calcul du pourcentage de croissance bactérienne résiduelle par rapport au groupe contrôle de souris non traitées ($\%_{\text{growth}}$). Nous avons ainsi comparé l'effet observé du traitement combiné à l'effet additif théorique de l'association, calculé comme le produit des effets de chaque traitement administré en monothérapie (soit $\%_{\text{growth(AMX)}} \times \%_{\text{growth(flagelline)}}$). Les résultats montrent une croissance bactérienne résiduelle observée plus faible que la valeur théorique pour les deux doses d'AMX

(8,4% vs 19,2% pour AMX 5 µg et 1,2% vs 12,3% pour AMX 40 µg), suggérant un effet synergique entre AMX et flagelline (**figure 7C**).

b) *Synergie cotrimoxazole – flagelline*

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

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

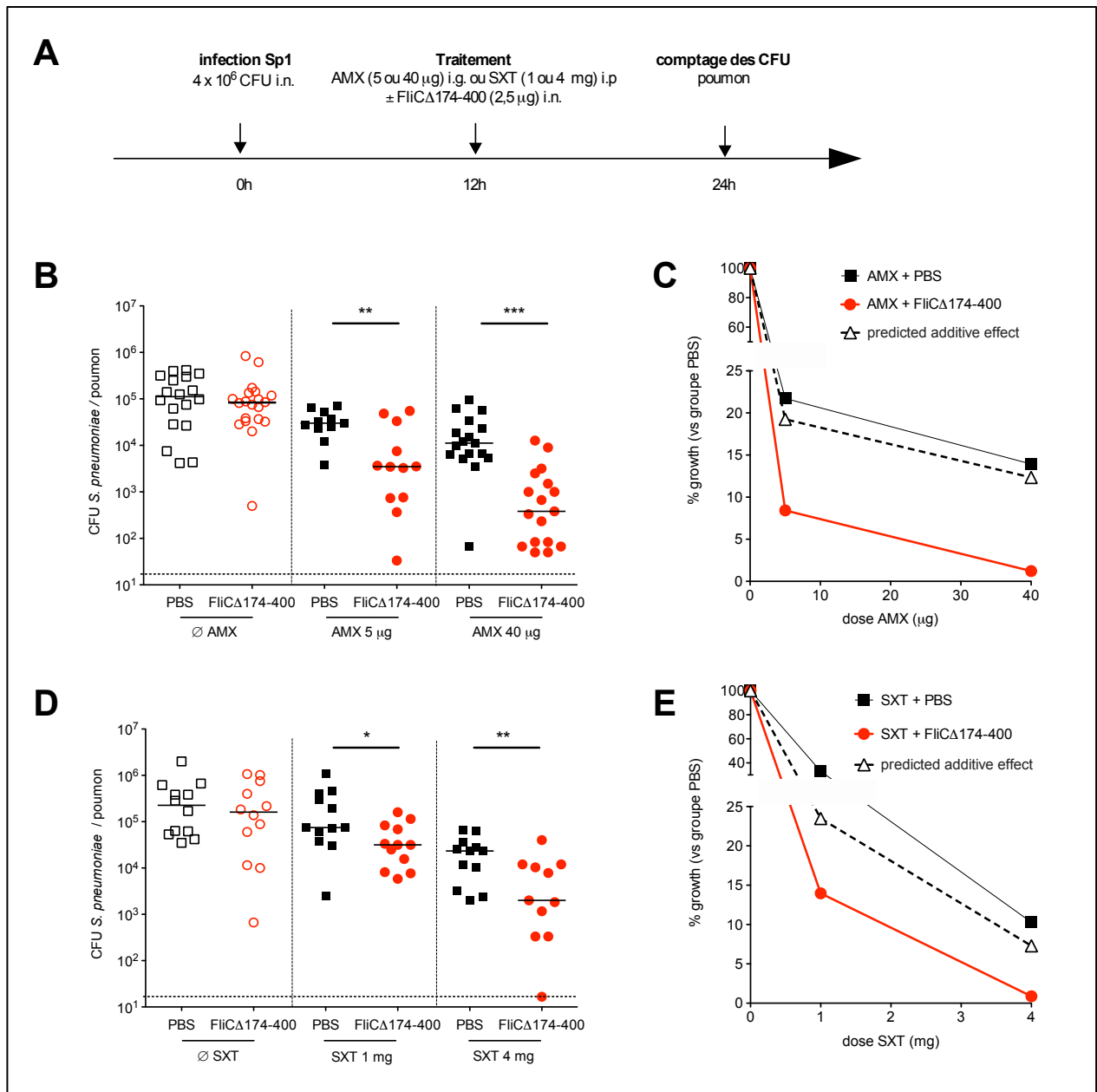


Figure 7: Synergie de l'association antibiotique - flagelline dans le traitement de l'infection pulmonaire à pneumocoque sensible de sérotype 1. A) Des souris Swiss (n=12-20) ont été infectées par voie intranasale avec 4 x 10⁶ Sp1. Les animaux ont été traités 12 h plus tard par une administration intragastrique d'amoxicilline (AMX; 5 ou 40 µg.) (B, C), une administration intrapéritonéale de cotrimoxazole (SXT; 1 ou 4 mg) (D, E) et/ou l'administration intranasale de flagelline FliC Δ 174-400 (2,5 µg dans 30 µl de PBS) ou de PBS seul. Les poumons ont été prélevés 12h après traitement, broyés et différentes dilutions ont été déposés sur gélose au sang. (B, D) Charge bactérienne pulmonaire représentée pour chaque groupe sous forme de médiane + valeurs individuelles de CFU pour chaque souris. La ligne pointillée représente le seuil de détection. Test de Mann-Whitney (* p<0.05, ** p<0.01, and *** p<0.001). (C, E) Quantification de l'effet des traitements sur la croissance bactérienne par le pourcentage de croissance résiduelle (%_{growth}) chez les souris traitées (antibiotique + PBS ou antibiotique + FliC Δ 174-400) par rapport aux souris non traitées (PBS). L'effet additif théorique a été calculé comme suit : %_{growth} [antibiotique] x %_{growth} [flagelline]. Les valeurs ont été groupées en fonction de la dose d'antibiotique.

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

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

L'antibiorésistance étant un problème de santé publique majeur, nous avons voulu déterminer si le traitement combiné antibiotique – flagelline intranasale était efficace contre l'infection pulmonaire par une souche de pneumocoque résistante aux antibiotiques. Nous avons pour cela développé un modèle d'infection par une souche de pneumocoque de sérotype 3 (Sp3) isolée de prélèvements respiratoires cliniques résistante à un grand nombre d'antibiotique, dont l'amoxicilline (CMI de 2 µg/ml, soit 125 fois supérieure à celle de la souche Sp1). Cependant, nous n'avons pas réussi à induire une infection respiratoire létale chez les souris avec cette souche, même à forte dose soit 10^7 CFU (**figure 8A-C**). L'infection par les virus de la grippe induit des dommages pulmonaires importants et une diminution de la réponse immunitaire locale, favorisant les surinfections bactériennes, même après l'élimination du virus (41,117–119). Nous avons donc développé un modèle d'infection avec la souche Sp3 dans un contexte de surinfection grippale. Dans ce contexte, l'infection par Sp3 induit une mortalité de 100% accompagnée d'une perte de poids significative à une dose de 10^3 CFU, soit 7 jours après l'infection intranasale par une dose sublétale (50 PFU) de virus influenza A H3N2 (**figure 8C**). L'étude cinétique de l'infection met en évidence une augmentation progressive de la charge bactérienne pulmonaire jusqu'à atteindre un plateau à partir de 24h post-infection, autour de 10^7 CFU par poumon. Cette phase de plateau coïncide avec l'apparition dès 24h de la bactérie dans la rate, indiquant une translocation de la bactérie et son passage systémique (**figure 7D, E**).

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

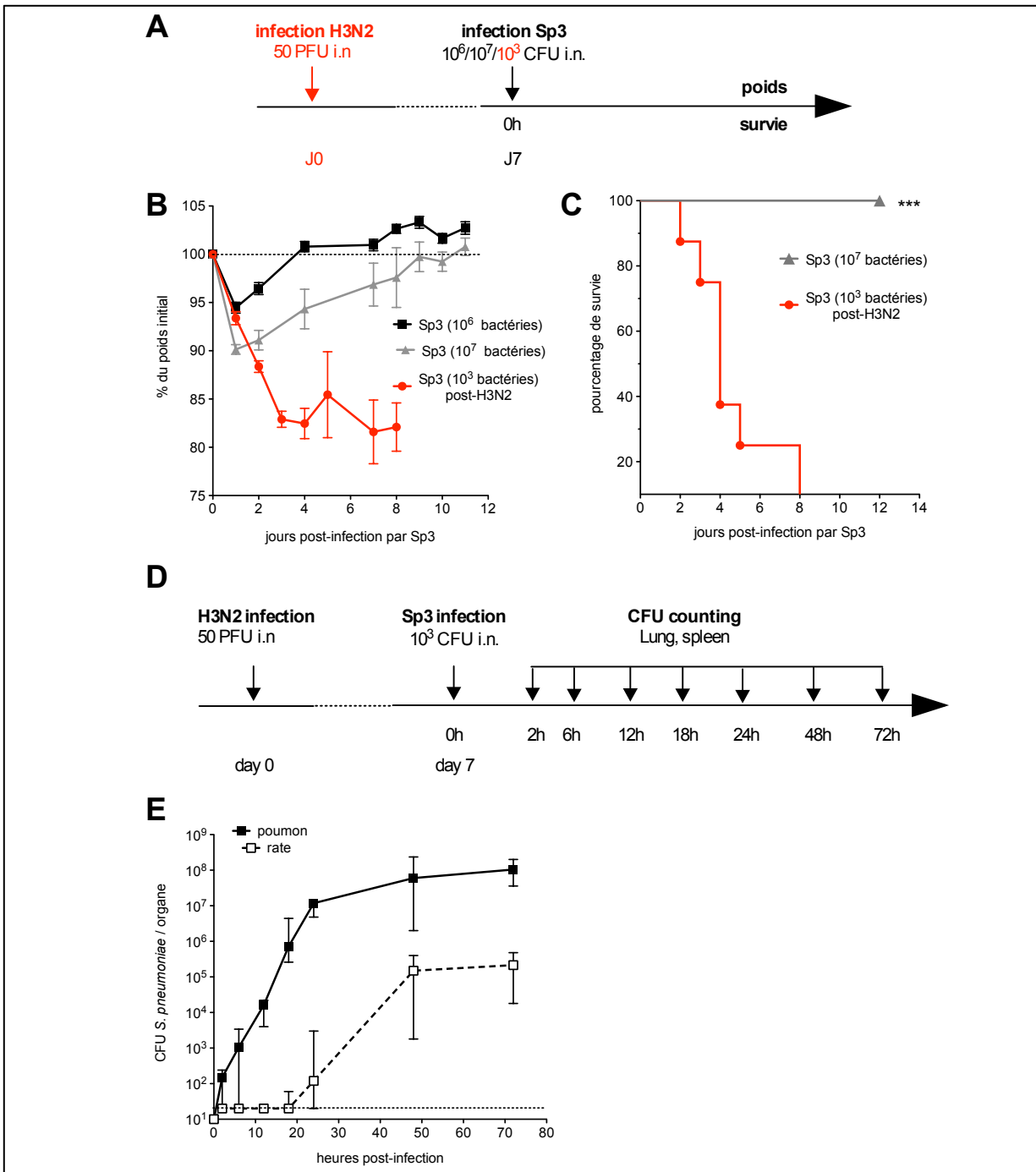


Figure 8 : modèle d'infection par une souche de pneumocoque de sérotype 3 résistante aux antibiotiques. (A–C) Les souris C57BL/6J (n = 5–8) ont été infectées par voie intranasale par 10^6 ou 10^7 CFU de Sp3 dans 30 μ l de PBS ou avec 50 PFU de virus influenza H3N2 dans 30 μ l de PBS suivie 7 jours plus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

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

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

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

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

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

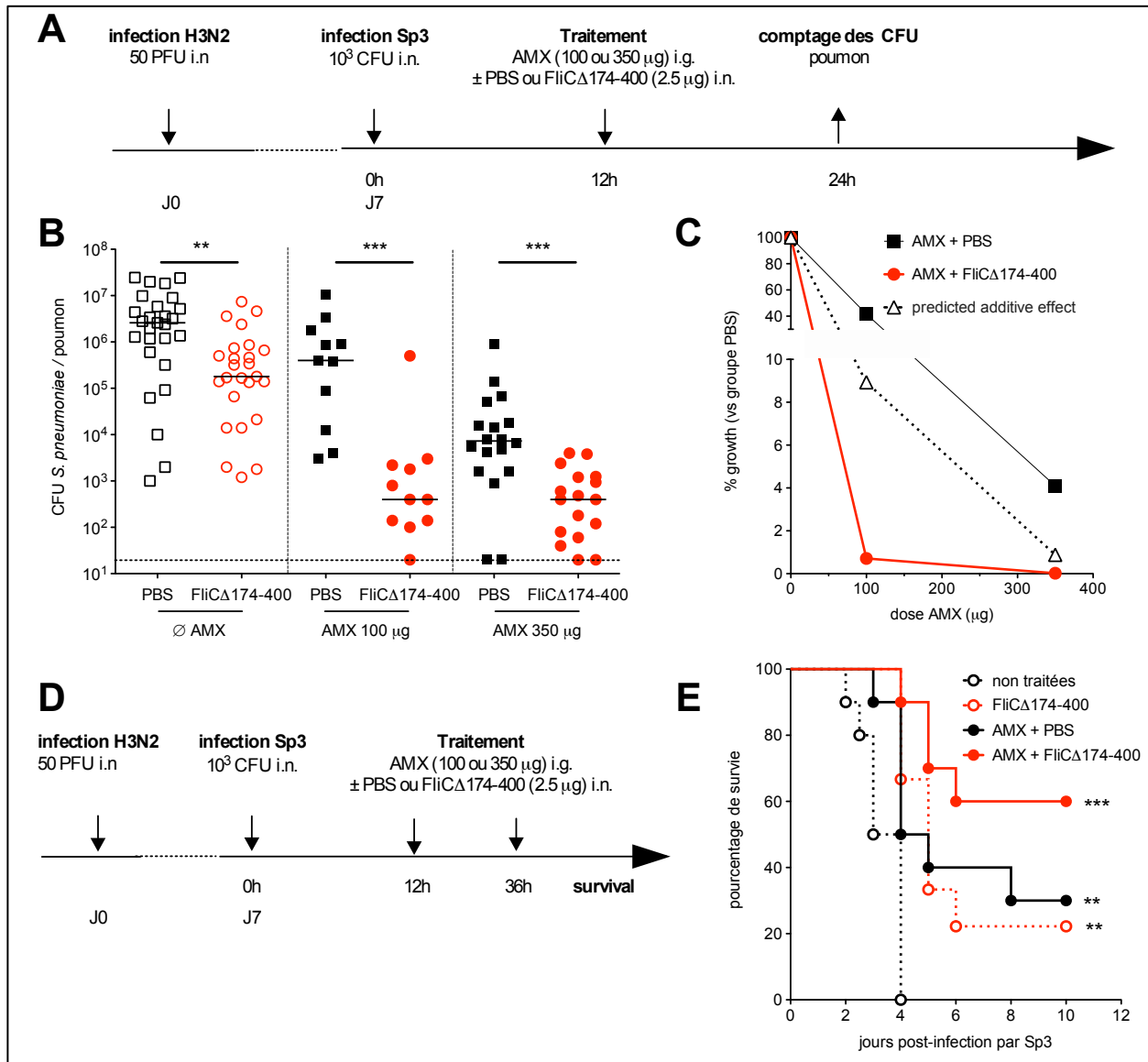


Figure 9 : Synergie entre amoxicilline et flagelline dans le traitement l'infection pulmonaire à pneumocoque résistant à l'amoxicilline. (A) Les souris C57BL/6J ($n = 12-28$) ont été infectées par voie intranasale par 50 PFUs de virus H3N2 dans 30 µl de PBS puis 7 jours plus tard par 10³ CFUs de pneumocoque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

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

L'infection par les virus influenza entraînant des modifications majeures de l'intégrité pulmonaire et des populations cellulaires immunitaires, nous avons cherché à déterminer l'impact de la flagelline au cours de l'infection post-grippale par la souche de pneumocoque Sp3. Résistant aux antibiotiques. Pour cela, les souris infectées par H3N2 puis surinfectées 7 jours plus tard par Sp3 par voie intranasale ont été traitées par AMX à la dose de 100 µg, associée ou non à la flagelline (2,5 µg), 12 h après l'infection pneumococcique. Une analyse transcriptionnelle a été réalisée par RT-qPCR à partir des poumons prélevés à 2 h post-traitement (**figure 10A**). Les résultats montrent que malgré le contexte fortement inflammatoire lié à la double infection, la flagelline induit une augmentation significative de *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl20*, *Il6*, *Il1b* et *S100a9*, qui sont des gènes classiquement associés à la réponse pulmonaire TLR5-dépendante (**figure 10B**). Nous avons ensuite quantifiée la production des chimiokines CCL20, CXCL1 et CXCL2 et des cytokines inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF dans le BAL et l'extrait de protéines pulmonaires 6h après traitement. Les taux de chimiokines et TNF étaient également augmentés à la fois dans le poumon (**10C**) et le BAL (**10D**) des souris traitées par AMX – flagelline par rapport aux souris traitées par AMX seule. Nous avons également observé une augmentation, non statistiquement significative, de l'IL-6 dans les deux compartiments. L'IL-1 β a été détectée uniquement dans le poumon et était significativement augmentée chez les souris traitées par flagelline. L'administration intranasale de flagelline étant associée à un fort recrutement de neutrophiles au niveau pulmonaire à la fois chez les souris naïves et infectées par le pneumocoque Sp1(106), nous avons évalué le recrutement cellulaire 12 h après traitement dans le poumon et le BAL par cytométrie en flux. Les résultats montrent une augmentation significative du nombre de neutrophiles à la fois dans le parenchyme pulmonaire (**figure 10E**) et le BAL (**figure 10F**) des souris traitées par le traitement combiné.

Par ailleurs, la réponse immunitaire induite par la flagelline était également détectable dans le sang, la production de médiateurs inflammatoires étant significativement augmentée à 2 h (pour IL-6, CCL20, CXCL1 et CXCL2) et 6h (CCL20 et CXCL1) par rapport aux souris traitées par AMX seule. Cependant, les niveaux sanguins de ces protéines diminuaient par la suite jusqu'à un niveau indétectable ou très faible à 12h,

suggérant que l'administration intranasale de flagelline n'induit pas d'inflammation systémique prolongée (**figure 11**).

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

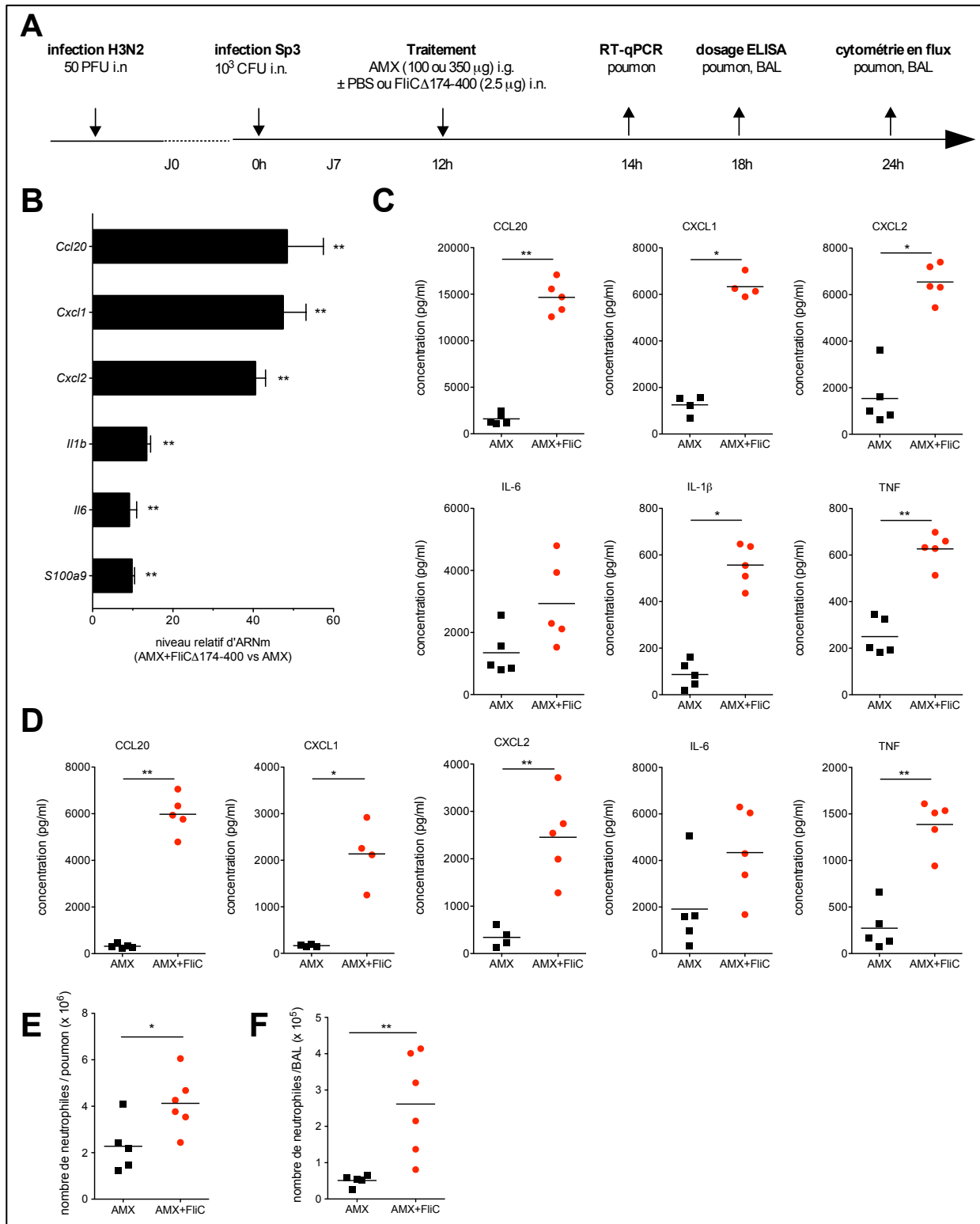


Figure 10 : Réponse immunitaire pulmonaire induite par la flagelline en contexte de surinfection pneumococcique post-grippale. A) Les souris C57BL/6J (n = 4–6) ont été infectées par voie intranasale par 50 PFU de virus H3N2 dans 30 µl de PBS puis 7 jours plus tard par 10³ Sp3 dans 30 µl de PBS. Les souris ont été traitées 12 h après par AMX (100 µg, administration intragastrique) et administration intranasale de flagelline FliC Δ 1174–400 (2,5 µg dans 30 µl de PBS) ou du PBS seul. (B) Les poumons ont été collectés 2h post-traitement et broyés avant extraction de l'ARN et analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR. Le niveau d'expression relative de chaque gène est exprimé par rapport aux gènes de références *Actb* et

B2m et au groupe de référence AMX+PBS (arbitrairement assigné à une valeur de 1). Les données sont représentées par la moyenne + SEM. Les poumons (C) et le BAL (D) ont été prélevés 6h après traitement et la quantité de chimiokines et cytokines a été mesurée par ELISA. Les données ont été comparées par test de Mann-Whitney et représentées sous forme de valeurs individuelles et moyenne. Les poumons (E) et le BAL (F) ont été prélevés 12 h après traitement. Les suspensions cellulaires ont été marquées par un mélange d'anticorps spécifiques de marqueurs de surface et analysées par cytométrie en flux. Les neutrophiles ont été définis comme les cellules CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ après exclusion des cellules mortes (iodure de propidium⁺) et des macrophages alvéolaires (CD45⁺SiglecF⁺CD11c⁺) de l'analyse. Le nombre de neutrophiles dans le parenchyme pulmonaire (D) et le BAL (E) est représenté sous forme de valeurs individuelles et moyenne. Les données ont été comparées par le test de Mann-Whitney test (*p < 0.05, and **p < 0.01).

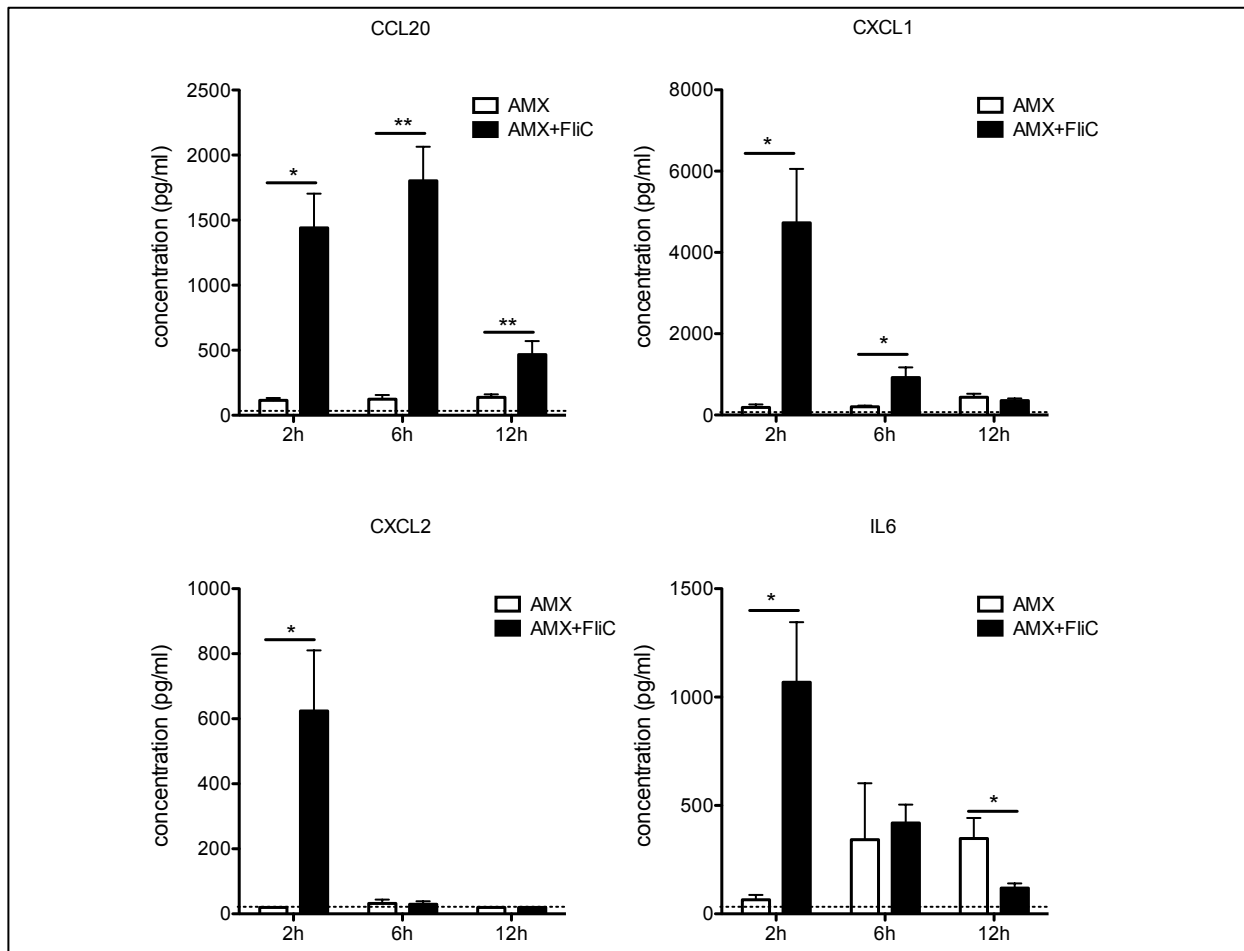


Figure 11 : Réponse immunitaire systémique induite par la flagelline en contexte de surinfection pneumococcique post-grippale. Les souris C57BL/6J (n = 4–6) ont été infectées par voie intranasale par 50 PFU de virus H3N2 dans 30 µl de PBS puis 7 jours plus tard par 10³ Sp3 dans 30 µl de PBS. Les souris ont été traitées 12 h après par AMX (100 µg, administration intragastrique) et administration intranasale de flagelline FliC_{Δ1174-400} (2,5 µg dans 30 µl de PBS) ou du PBS seul. Le sang Les poumons a été prélevé 6h après traitement et la quantité de chimiokines et cytokines a été mesurée par ELISA dans le sérum. Les données ont été comparées par test de Mann-Whitney et représentées sous forme de moyenne et écart-type (SEM). (*p < 0.05, and **p < 0.01).

DISCUSSION

Les résultats présentés dans cette étude démontrent l'efficacité d'une stratégie thérapeutique combinant un antibiotique (AMX ou SXT) et un immunomodulateur de l'immunité innée contre les infections respiratoires causées par *S. pneumoniae*. L'efficacité du traitement combiné antibiotique - flagelline, démontrée antérieurement chez des souris consanguines BALB/c et C57BL/6 par Porte et al. (106), a été ici étendue aux souris Swiss non consanguines, montrant que la protection est indépendante du fond génétique de la souris. Nos résultats démontrent de plus une interaction synergique entre flagelline et antibiotique, indépendante de la dose d'antibiotique et du mécanisme d'action, puisque l'AMX agit sur la paroi cellulaire bactérienne et que le SXT inhibe la synthèse de l'ADN.

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

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

Il a été démontré précédemment que l'administration intranasale de flagelline induisait une réponse innée locale dépendante de TLR5, avec une activité antibactérienne à large spectre. Cette réponse pulmonaire comprend en effet la production de divers peptides antimicrobiens (cathélicidine et β -défensines notamment), cytokines proinflammatoires (TNF, IL-1 β et IL-6) et chimiokines (CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL5 et CXCL8) (72,92,96,107,120,121). La production de cytokines et de chimiokines est corrélée avec le recrutement de cellules phagocytaires (et en particulier de neutrophiles) dans les poumons après l'administration intranasale de flagelline à des souris naïves (92,104,122). De plus, notre équipe a montré que l'administration intranasale de flagelline déclenche une réponse transcriptionnelle aussi bien dans le contexte d'une infection pneumococcique que lors d'une infection grippale (106). Ici, nous avons mis en

évidence que la signature immunitaire innée du poumon, induite par l'instillation respiratoire de flagelline, est toujours efficace dans un contexte fortement inflammatoire avec lésions pulmonaires associées comme celui causé par la surinfection pneumococcique post-grippale (figure 10). Fait intéressant, des rapports antérieurs ont indiqué que l'infection grippale induit une désensibilisation partielle mais soutenue des réponses innées dépendantes des récepteurs TLR et une réduction de leur expression (123). Nos observations démontrent cependant que, dans le contexte physiopathologique de la surinfection, la flagelline demeure capable de déclencher un niveau de réponse immunitaire suffisant et d'exercer un effet synergique en association avec les antibiotiques (Figure 9).

Les cellules épithéliales des voies respiratoires ont été identifiées comme une composante importante pour la détection de la flagelline et le déclenchement des voies de signalisation TLR5-dépendantes à l'homéostasie (81,121). Ces cellules sentinelles sont capables non seulement de détecter des signaux de danger introduits dans les voies aériennes, mais produisent également de nombreux facteurs agissant directement sur les pathogènes, ou indirectement via la mobilisation des cellules immunitaires effectrices, notamment phagocytaires. Plus généralement, la signalisation TLR au niveau de l'épithélium des voies aériennes représente un moteur essentiel de la défense antibactérienne (124). Récemment, Anas et al. ont démontré une contribution essentielle des cellules épithéliales pulmonaires en réponse à la flagelline dans le contexte d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* (74). Nos résultats montrent que l'expression de différents composés associés aux réponses épithéliales (peptide antimicrobien S100A9, cytokines IL-1 β et TNF et chimiokines CCL20, CXCL1, et CXCL2) est également augmentée après l'administration du traitement combiné dans le modèle de surinfection post-grippale (figure 10). Cela confirme le rôle primordial de l'épithélium dans la réponse innée locale induite par la flagelline, même dans le contexte fortement inflammatoire de la surinfection. Par ailleurs, l'administration locale, en ciblant l'épithélium, présente un avantage pour l'immunostimulation car elle permet de réduire les doses administrées et d'éviter les effets indésirables systémiques des molécules.

Nos données contribuent à mettre en évidence le potentiel thérapeutique de l'association de deux molécules ayant des modes d'action distincts : un antibiotique

ayant un effet direct sur les bactéries et un stimulateur de l'immunité innée à activité antibactérienne indirecte via la mobilisation de cellules phagocytaires et la production de peptides antimicrobiens, chimiokines et cytokines. Bien que les mécanismes responsables de cette synergie restent encore à définir, plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Il est en effet possible que les mécanismes de la réponse immunitaire innée aient un impact sur le métabolisme ou l'intégrité structurale des bactéries, augmentant leur sensibilité à l'antibiotique. Ces mécanismes peuvent également modifier la distribution de l'antibiotique dans le tissu pulmonaire (notamment via une augmentation de la perméabilité tissulaire), tandis que l'antibiotique, en endommageant le pathogène, pourrait également favoriser son élimination par le système immunitaire. D'autre part, il a été montré que la flagelline, en modulant l'immunité innée dans les voies respiratoires, renforçait la réponse adaptative épithéliale et systémique (81,92). Cette propriété pourrait être intéressante à exploiter pour susciter une mémoire immunitaire anti-pathogène et prévenir les infections récurrentes et rechutes.

En tant que bactérie opportuniste, *S. pneumoniae* colonise fréquemment les voies respiratoires supérieures et représente la principale cause de pneumonie aigue communautaire bactérienne (125). Cependant, de nombreuses autres espèces bactériennes peuvent être responsables de pneumonies, notamment dans le cadre particulier des pneumonies associées aux soins de santé, comme la ventilation assistée. On retrouve ainsi des bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, des bactéries à Gram négatif comme *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*, des mycoplasmes (*M. pneumoniae*) et des bactéries intracellulaires (*Legionella pneumophila*) (38). Le diagnostic et le traitement des pneumonies sont compliqués par la grande variété d'agents causatifs et la progression des résistances bactériennes aux antibiotiques. Dans ce contexte, les stimulateurs de l'immunité innée comme la flagelline sont d'un grand intérêt car ils activent une grande variété de mécanismes immunitaires antimicrobiens, potentiellement efficaces contre un large spectre de pathogènes. En effet, la flagelline a déjà démontré des propriétés protectrices contre divers agents pathogènes, y compris des bactéries à Gram négatif (*S. Typhimurium*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) et Gram positif (*S. pneumoniae*, *C. difficile*) (93–96,106,126) (tableau 1), et nos résultats semblent indiquer que l'efficacité synergique du traitement combiné est indépendante du sérotype de pneumocoque,

puisque cet effet a été observé avec deux souches différentes, de sérotypes 1 et 3. De plus, nos résultats actuels montrent que la synergie thérapeutique entre antibiotique et flagelline est indépendante du mécanisme d'action de l'antibiotique - ce qui suggère que la flagelline peut potentiellement être combinée avec divers antibiotiques pour s'adapter à un grand nombre de situations cliniques.

Compte tenu de la progression de la résistance aux antibiotiques, un modèle d'infection par des bactéries résistantes aux antibiotiques constitue un outil important pour le développement de stratégies anti-infectieuses alternatives. Nous avons tout d'abord tenté de développer un tel modèle chez des souris immunocompétentes. Cependant, la souche résistante de pneumocoque de sérotype 3 dont nous disposons, provenant d'un isolat clinique, s'est révélée incapable d'induire une infection létale chez les animaux, même à fortes doses (figure 8). Des études rapportent que l'acquisition de résistances aux antibiotiques est souvent associée à une perte de virulence de la bactérie (127), qui pourrait expliquer la très faible virulence de la souche Sp3 chez des souris naïves.

De nombreux cas de pneumonies bactériennes résultent de co-infections ou de surinfections virus - bactéries (en particulier avec les virus de la grippe) (41). Comme le montrent les figures 8 et 9, l'infection par le virus de la grippe crée un environnement favorable pour la colonisation et l'invasion par la souche Sp3 peu virulente. Nos données démontrent que le traitement combiné flagelline + AMX réduit efficacement la charge bactérienne de Sp3 dans le poumon, et améliore la survie des souris. La preuve de concept présentée ici est potentiellement transposable à la clinique pour les patients présentant des co-infections et des surinfections, qui sont des causes fréquentes d'hospitalisation et de complication des pneumonies.

Les antibiotiques constituent le traitement standard des pneumonies bactériennes, et la progression des souches résistantes est une préoccupation majeure de santé publique (61). Lors du choix des antibiotiques et des modalités de traitement (posologie, voie et schéma d'administration) pour un patient donné, le médecin doit tenir compte des caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des antibiotiques utilisés. La relation entre l'exposition *in vivo* au médicament (soit son absorption, sa distribution tissulaire et son élimination) et la sensibilité *in vitro* des bactéries (CMI) conditionne non

seulement l'efficacité thérapeutique, c'est à dire l'élimination de l'infection, mais aussi les effets indésirables ou toxiques du traitement (128). Ainsi, la dose maximale d'antibiotique pouvant être administré à un patient compte tenu de sa toxicité peut ne pas être suffisante pour obtenir des taux tissulaires permettant une clairance efficace de l'infection dans le cas de bactéries hautement résistantes. Nos données suggèrent que l'association avec la flagelline permettrait de rétablir l'efficacité de l'antibiothérapie dans le cas d'infections par des souches bactériennes résistantes.

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

La caractérisation des mécanismes de défense antibactériens moléculaires et cellulaires contribuant à l'efficacité de la flagelline et à la synergie avec les antibiotiques devrait ouvrir de nouvelles voies pour l'immunothérapie des infections respiratoires.

RÉFÉRENCES

1. Gasteiger G, D'Osualdo A, Schubert DA, Weber A, Bruscia EM, Hartl D. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *J Innate Immun.* 2017;9(2):111–25.
2. Hancock REW, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Mar 16;10(4):243–54.
3. Tarte S, Takeuchi O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *Int Rev Immunol.* 2017 04;36(2):57–73.
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):783–801.
5. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997 Jul 24;388(6640):394–7.
6. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996 Sep 20;86(6):973–83.
7. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):373–84.
8. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J.* 2009 Apr 28;420(1):1–16.
9. Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front Immunol.* 2013 Nov 18;4:387.
10. Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Oct 9;7(1):a016246.
11. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Oct 30;388(4):621–5.
12. Thaiss CA, Levy M, Itav S, Elinav E. Integration of Innate Immune Signaling. *Trends Immunol.* 2016 Feb;37(2):84–101.
13. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001 Apr 26;410(6832):1099–103.
14. Tenthorey JL, Haloupek N, López-Blanco JR, Grob P, Adamson E, Hartenian E,

- et al. The structural basis of flagellin detection by NAIP5: A strategy to limit pathogen immune evasion. *Science*. 2017 17;358(6365):888–93.
15. Fischer A, Rausell A. Primary immunodeficiencies suggest redundancy within the human immune system. *Sci Immunol*. 2016 Dec 23;1(6).
 16. Kopf M, Schneider C, Nobs SP. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):36–44.
 17. Brune K, Frank J, Schwingshackl A, Finigan J, Sidhaye VK. Pulmonary epithelial barrier function: some new players and mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Apr 15;308(8):L731-745.
 18. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):27–35.
 19. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(12):827–35.
 20. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS ONE*. 2010 Jan 5;5(1):e8578.
 21. Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, McDonough JE, Campbell JD, Brothers JF, et al. Host Response to the Lung Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Aug 15;192(4):438–45.
 22. Ahmed E, Sansac C, Assou S, Gras D, Petit A, Vachier I, et al. Lung development, regeneration and plasticity: From disease physiopathology to drug design using induced pluripotent stem cells. *Pharmacol Ther*. 2018;183:58–77.
 23. Hasenberg M, Stegemann-Koniszewski S, Gunzer M. Cellular immune reactions in the lung. *Immunol Rev*. 2013 Jan;251(1):189–214.
 24. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest*. 2018 Jul;154(1):169–76.
 25. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*. 2015 Feb 26;518(7540):547–51.
 26. van de Laar L, Saelens W, De Prijck S, Martens L, Scott CL, Van Isterdael G, et al. Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*. 2016 Apr 19;44(4):755–68.
 27. Durai V, Murphy KM. Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity*. 2016

18;45(4):719–36.

28. Cook PC, MacDonald AS. Dendritic cells in lung immunopathology. *Semin Immunopathol.* 2016;38(4):449–60.

29. Stehle C, Hernández DC, Romagnani C. Innate lymphoid cells in lung infection and immunity. *Immunol Rev.* 2018;286(1):102–19.

30. Brazil JC, Parkos CA. Pathobiology of neutrophil-epithelial interactions. *Immunol Rev.* 2016;273(1):94–111.

31. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013 Mar;13(3):159–75.

32. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:459–89.

33. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol.* 2013 Jul;35(4):377–94.

34. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013 Mar;13(3):159–75.

35. The top 10 causes of death [Internet]. [cited 2019 Jan 8]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

36. Prina E, Ranzani OT, Torres A. Community-acquired pneumonia. *Lancet.* 2015 Sep 12;386(9998):1097–108.

37. Quinton LJ, Walkey AJ, Mizgerd JP. Integrative Physiology of Pneumonia. *Physiol Rev.* 2018 01;98(3):1417–64.

38. Ieven M, Coenen S, Loens K, Lammens C, Coenjaerts F, Vanderstraeten A, et al. Aetiology of lower respiratory tract infection in adults in primary care: a prospective study in 11 European countries. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Feb 12;

39. Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N Engl J Med.* 2015 Jul 30;373(5):415–27.

40. Musher DM, Abers MS, Bartlett JG. Evolving Understanding of the Causes of Pneumonia in Adults, With Special Attention to the Role of Pneumococcus. *Clin Infect Dis.* 2017 Oct 30;65(10):1736–44.

41. McCullers JA. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Apr;12(4):252–62.

42. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Jan;16(1):47–60.
43. Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GRS. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *Eur Respir J.* 2015 May;45(5):1463–78.
44. Fukuyama S, Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol.* 2011 Aug;23(4):481–6.
45. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2014 May;14(5):315–28.
46. Högner K, Wolff T, Pleschka S, Plog S, Gruber AD, Kalinke U, et al. Macrophage-expressed IFN- β contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia. *PLoS Pathog.* 2013 Feb;9(2):e1003188.
47. Rice TW, Rubinson L, Uyeki TM, Vaughn FL, John BB, Miller RR, et al. Critical illness from 2009 pandemic influenza A virus and bacterial coinfection in the United States. *Crit Care Med.* 2012 May;40(5):1487–98.
48. Paget C, Trottein F. Mechanisms of Bacterial Superinfection Post-influenza: A Role for Unconventional T Cells. *Front Immunol.* 2019;10:336.
49. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jul;28(3):871–99.
50. Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 2004 Mar;4(3):144–54.
51. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet.* 2009 Oct 31;374(9700):1543–56.
52. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Apr;6(4):288–301.
53. Jensen A, Valdórrsson O, Frimodt-Møller N, Hollingshead S, Kilian M. Commensal streptococci serve as a reservoir for β -lactam resistance genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3529–40.
54. Juhas M. Horizontal gene transfer in human pathogens. *Crit Rev Microbiol.* 2015 Feb;41(1):101–8.
55. Cui YA, Patel H, O’Neil WM, Li S, Saddier P. Pneumococcal serotype distribution:

- A snapshot of recent data in pediatric and adult populations around the world. *Hum Vaccin Immunother.* 2017 03;13(6):1–13.
56. Point sur les connaissances / Infections à pneumocoque / Maladies à prévention vaccinale / Maladies infectieuses / Dossiers thématiques / Accueil [Internet]. [cited 2019 Apr 23]. Available from: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Infections-a-pneumocoque/Point-sur-les-connaissances>
 57. Principi N, Esposito S. Development of pneumococcal vaccines over the last 10 years. *Expert Opin Biol Ther.* 2018;18(1):7–17.
 58. Tin Tin Htar M, Christopoulou D, Schmitt H-J. Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infect Dis.* 2015 Oct 14;15:419.
 59. Schäberle TF, Hack IM. Overcoming the current deadlock in antibiotic research. *Trends Microbiol.* 2014 Apr;22(4):165–7.
 60. Cardoso T, Almeida M, Carratalà J, Aragão I, Costa-Pereira A, Sarmento AE, et al. Microbiology of healthcare-associated infections and the definition accuracy to predict infection by potentially drug resistant pathogens: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2015 Dec 11;15:565.
 61. WHO | Global action plan on antimicrobial resistance [Internet]. WHO. [cited 2018 Aug 23]. Available from: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>
 62. Chaban B, Hughes HV, Beeby M. The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Oct;46:91–103.
 63. Girón JA, Torres AG, Freer E, Kaper JB. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2002 Apr;44(2):361–79.
 64. Lillehoj EP, Kim BT, Kim KC. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Apr;282(4):L751-756.
 65. Roy K, Hilliard GM, Hamilton DJ, Luo J, Ostmann MM, Fleckenstein JM. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature.* 2009 Jan 29;457(7229):594–8.
 66. Blair KM, Turner L, Winkelman JT, Berg HC, Kearns DB. A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Science.* 2008 Jun 20;320(5883):1636–8.

67. Lemon KP, Higgins DE, Kolter R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol.* 2007 Jun;189(12):4418–24.
68. Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, et al. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol.* 2004 Jun;186(11):3296–303.
69. Neal-McKinney JM, Konkel ME. The *Campylobacter jejuni* CiaC virulence protein is secreted from the flagellum and delivered to the cytosol of host cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:31.
70. Ramos HC, Rumbo M, Sirard J-C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 2004 Nov;12(11):509–17.
71. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature.* 2003 Aug 7;424(6949):643–50.
72. Vijayan A, Rumbo M, Carnoy C, Sirard J-C. Compartmentalized Antimicrobial Defenses in Response to Flagellin. *Trends Microbiol.* 2018 May;26(5):423–35.
73. Duncan JA, Canna SW. The NLRC4 Inflammasome. *Immunol Rev.* 2018;281(1):115–23.
74. Anas AA, van Lieshout MHP, Claushuis TAM, de Vos AF, Florquin S, de Boer OJ, et al. Lung epithelial MyD88 drives early pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by a flagellin dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016 01;311(2):L219-228.
75. Clark JG, Kim K-H, Basom RS, Gharib SA. Plasticity of airway epithelial cell transcriptome in response to flagellin. *PLoS ONE.* 2015;10(2):e0115486.
76. Siervo F, Dubois B, Coste A, Kaiserlian D, Kraehenbuhl JP, Sirard JC. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Nov 20;98(24):13722–7.
77. Shalapour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest.* 2015 Sep;125(9):3347–55.
78. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(1):71–8.
79. Pandey S, Singh S, Anang V, Bhatt AN, Natarajan K, Dwarakanath BS. Pattern Recognition Receptors in Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Growth Metastasis.* 2015;8:25–34.
80. Holbrook BC, D’Agostino RB, Parks GD, Alexander-Miller MA. Adjuvanting an

inactivated influenza vaccine with flagellin improves the function and quantity of the long-term antibody response in a nonhuman primate neonate model. *Vaccine*. 2016 07;34(39):4712–7.

81. Van Maele L, Fougeron D, Janot L, Didierlaurent A, Cayet D, Tabareau J, et al. Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. *Mucosal Immunol*. 2014 May;7(3):489–500.

82. Braga CJM, Massis LM, Sbrogio-Almeida ME, Alencar BCG, Bargieri DY, Boscardin SB, et al. CD8+ T cell adjuvant effects of Salmonella FliC_d flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. *Vaccine*. 2010 Feb 3;28(5):1373–82.

83. Bruxelles J-F, Mizrahi A, Hoys S, Collignon A, Janoir C, Péchiné S. Clostridium difficile flagellin FliC: Evaluation as adjuvant and use in a mucosal vaccine against Clostridium difficile. *PLoS ONE*. 2017;12(11):e0187212.

84. Cui B, Liu X, Fang Y, Zhou P, Zhang Y, Wang Y. Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2018;17(4):335–49.

85. Xiao X, Zhang Y, Liu J, Wei Q, Yin X. Immunoenhancement with flagellin as an adjuvant to whole-killed rabies vaccine in mice. *Arch Virol*. 2016 Mar;161(3):685–91.

86. Hong SH, Byun Y-H, Nguyen CT, Kim SY, Seong BL, Park S, et al. Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection. *Vaccine*. 2012 Jan 5;30(2):466–74.

87. Carapau D, Mitchell R, Nacer A, Shaw A, Othoro C, Frevert U, et al. Protective humoral immunity elicited by a needle-free malaria vaccine comprised of a chimeric Plasmodium falciparum circumsporozoite protein and a Toll-like receptor 5 agonist, flagellin. *Infect Immun*. 2013 Dec;81(12):4350–62.

88. Deng L, Kim JR, Chang TZ, Zhang H, Mohan T, Champion JA, et al. Protein nanoparticle vaccine based on flagellin carrier fused to influenza conserved epitopes confers full protection against influenza A virus challenge. *Virology*. 2017;509:82–9.

89. Taylor DN, Treanor JJ, Sheldon EA, Johnson C, Umlauf S, Song L, et al. Development of VAX128, a recombinant hemagglutinin (HA) influenza-flagellin fusion vaccine with improved safety and immune response. *Vaccine*. 2012 Aug 24;30(39):5761–9.

90. Treanor JJ, Taylor DN, Tussey L, Hay C, Nolan C, Fitzgerald T, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine

(VAX125) in healthy young adults. *Vaccine*. 2010 Dec 6;28(52):8268–74.

91. Turley CB, Rupp RE, Johnson C, Taylor DN, Wolfson J, Tussey L, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*. 2011 Jul 18;29(32):5145–52.

92. Fougeron D, Van Maele L, Songhet P, Cayet D, Hot D, Van Rooijen N, et al. Indirect Toll-like receptor 5-mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract. *Vaccine*. 2015 Jun 26;33(29):3331–41.

93. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, Frias A, Sloane VM, Xu J, et al. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol*. 2008 Jun 15;180(12):8280–5.

94. Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J Infect Dis*. 2010 Feb 15;201(4):534–43.

95. Jarchum I, Liu M, Lipuma L, Pamer EG. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infect Immun*. 2011 Apr;79(4):1498–503.

96. Yu F, Cornicelli MD, Kovach MA, Newstead MW, Zeng X, Kumar A, et al. Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide. *J Immunol*. 2010 Jul 15;185(2):1142–9.

97. Muñoz N, Van Maele L, Marqués JM, Rial A, Sirard J-C, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun*. 2010 Oct;78(10):4226–33.

98. Hossain MS, Ramachandiran S, Gewirtz AT, Waller EK. Recombinant TLR5 agonist CBLB502 promotes NK cell-mediated anti-CMV immunity in mice. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e96165.

99. Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, Denning TL, et al. Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science*. 2014 Nov 14;346(6211):861–5.

100. Zgair AK. Flagellin administration protects respiratory tract from *Burkholderia cepacia* infection. *J Microbiol Biotechnol*. 2012 Jul;22(7):907–16.

101. Kumar A, Gao N, Standiford TJ, Gallo RL, Yu F-SX. Topical flagellin protects the injured corneas from *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect*. 2010 Nov;12(12–13):978–89.

102. Neely CJ, Kartchner LB, Mendoza AE, Linz BM, Frelinger JA, Wolfgang MC, et al. Flagellin treatment prevents increased susceptibility to systemic bacterial infection after injury by inhibiting anti-inflammatory IL-10+ IL-12- neutrophil polarization. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e85623.
103. Porte R, Van Maele L, Muñoz-Wolf N, Foligné B, Dumoutier L, Tabareau J, et al. Flagellin-Mediated Protection against Intestinal *Yersinia pseudotuberculosis* Infection Does Not Require Interleukin-22. *Infect Immun*. 2017;85(2).
104. Muñoz-Wolf N, Rial A, Fougeron D, Tabareau J, Sirard J-C, Chabalgoity JA. Sublingual flagellin protects against acute pneumococcal pneumonia in a TLR5-dependent and NLRC4-independent fashion. *Future Microbiol*. 2016;11:1167–77.
105. Gao N, Kumar A, Guo H, Wu X, Wheeler M, Yu F-SX. Topical flagellin-mediated innate defense against *Candida albicans* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 May 10;52(6):3074–82.
106. Porte R, Fougeron D, Muñoz-Wolf N, Tabareau J, Georgel A-F, Wallet F, et al. A Toll-Like Receptor 5 Agonist Improves the Efficacy of Antibiotics in Treatment of Primary and Influenza Virus-Associated Pneumococcal Mouse Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Oct;59(10):6064–72.
107. Muñoz N, Van Maele L, Marqués JM, Rial A, Sirard J-C, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun*. 2010 Oct;78(10):4226–33.
108. Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Renneson J, Blanc F, Pichavant M, et al. Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: potential role in protection against lung epithelial damages. *J Biol Chem*. 2012 Mar 16;287(12):8816–29.
109. Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Blanc F, Pichavant M, Renneson J, et al. Potential role of invariant NKT cells in the control of pulmonary inflammation and CD8+ T cell response during acute influenza A virus H3N2 pneumonia. *J Immunol*. 2011 May 15;186(10):5590–602.
110. Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard J-C. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol*. 2008 Aug 1;181(3):2036–43.
111. Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol*. 2000 Jan 21;76(2–3):97–119.

112. Planer JD, Hulverson MA, Arif JA, Ranade RM, Don R, Buckner FS. Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jul;8(7):e2977.
113. Fouquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect*. 2015 Jun;3(3):e00149.
114. Rao GG, Li J, Garonzik SM, Nation RL, Forrest A. Assessment and modelling of antibacterial combination regimens. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Dec 18;
115. Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol*. 2014 Dec;52(12):4124–8.
116. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov S, Porte R, Deruy E, et al. Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Infect Dis*. 2014 Aug 1;210(3):493–503.
117. McNamee LA, Harmsen AG. Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2006 Dec;74(12):6707–21.
118. Kudva A, Scheller EV, Robinson KM, Crowe CR, Choi SM, Slight SR, et al. Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice. *J Immunol*. 2011 Feb 1;186(3):1666–74.
119. Rynda-Apelle A, Robinson KM, Alcorn JF. Influenza and Bacterial Superinfection: Illuminating the Immunologic Mechanisms of Disease. *Infect Immun*. 2015 Oct;83(10):3764–70.
120. Porte R, Fougeron D, Muñoz-Wolf N, Tabareau J, Georgel A-F, Wallet F, et al. A Toll-Like Receptor 5 Agonist Improves the Efficacy of Antibiotics in Treatment of Primary and Influenza Virus-Associated Pneumococcal Mouse Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Oct;59(10):6064–72.
121. Janot L, Sirard J-C, Secher T, Noulin N, Fick L, Akira S, et al. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur J Immunol*. 2009 Jun;39(6):1587–96.
122. Honko AN, Mizel SB. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect Immun*. 2004 Nov;72(11):6676–9.
123. Didierlaurent A, Ferrero I, Otten LA, Dubois B, Reinhardt M, Carlsen H, et al. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type

response. *J Immunol*. 2004 Jun 1;172(11):6922–30.

124. Leiva-Juárez MM, Kolls JK, Evans SE. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunol*. 2018;11(1):21–34.

125. Donkor ES. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:7.

126. Andersen-Nissen E, Hawn TR, Smith KD, Nachman A, Lampano AE, Uematsu S, et al. Cutting edge: Tlr5^{-/-} mice are more susceptible to *Escherichia coli* urinary tract infection. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):4717–20.

127. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*. 2010 Apr;8(4):260–71.

128. de Velde F, Mouton JW, de Winter BCM, van Gelder T, Koch BCP. Clinical applications of population pharmacokinetic models of antibiotics: Challenges and perspectives. *Pharmacol Res*. 2018 Aug;134:280–8.



DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : MATABAZZO Laura INE : 04000360084.....

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 24 | 06 | 2019 à 14 h..... Amphithéâtre ou salle : Curie.....
jour mois année

Avis du conseiller (directeur) de thèse

Nom : CARNOY.....

Prénom : christophe.....

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 13/05/2019

Signature: 

Avis du Président de Jury

Nom : ALLORGE.....

Prénom : Delphine.....

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 16/05/19

Signature: 

Décision de Monsieur le Doyen

Favorable

Défavorable



Le Doyen


D DÉCAUDIN

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2018/2019

Nom : MATARAZZO

Prénom : Laura

Titre du mémoire / thèse : Etude des propriétés anti-infectieuses de la flagelline en association avec les antibiotiques dans le traitement des pneumonies à pneumocoques sensibles et résistants aux antibiotiques

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

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

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré que l'association antibiotique – flagelline était synergique dans ce modèle, avec deux antibiotiques différents, l'amoxicilline et le cotrimoxazole. Nous avons également montré la synergie du traitement combiné amoxicilline – flagelline dans un modèle murin de surinfection bactérienne post-grippale par une souche de *S. pneumoniae* résistante à l'amoxicilline. Ces résultats démontrent l'intérêt la stimulation de l'immunité innée par la flagelline en tant que stratégie thérapeutique anti-infectieuse innovante pour le traitement des pneumonies, permettant de renforcer l'efficacité de l'antibiothérapie contre des souches résistantes, de diminuer les doses d'antibiotiques utilisées et de limiter l'apparition de résistances.