

Université de Lille II - Droit et Santé
Ecole Doctorale Biologie Santé



THÈSE

Pour l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE II
Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Rémi PORTE

Le 18 décembre 2015

**Caractérisation des propriétés anti-infectieuses
de la flagelline, agoniste du *Toll-like receptor 5***

Devant le jury composé de :

M. le Professeur **Michel SIMONET**
M. le Professeur **Jean-Michel SALLENAVE**
M. le Docteur **Yves DELNESTE**
M. le Docteur **Bernhard RYFFEL**
M. le Docteur **Christophe CARNOY**
M. le Docteur **Jean-Claude SIRARD**

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Co-directeur de thèse
Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie le **Pr. Michel SIMONET** pour me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse.

Je remercie également le **Pr. Jean-Michel SALLENAVE** et le **Dr. Yves DELNESTE** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le **Dr. Bernhard RYFFEL** d'avoir accepté d'être examinateur de ces travaux et de faire partie du jury.

J'adresse aussi mes remerciements aux membres de mon comité de suivi de thèse, le **Dr. Nadine LEMAITRE**, le **Dr. Isabelle WOLOWCZUK** et le **Dr. Alain BAULARD** pour leurs remarques et suggestions ayant grandement contribué au développement de la thèse.

Un grand merci au **Dr. Jean-Claude SIRARD**, pour m'avoir accueilli dans son groupe toujours avec beaucoup de gentillesse et d'humanité, et qui au cours de ses fonctions de directeur de thèse m'a beaucoup apporté : un soutien intellectuel important, les stimulations adéquates, et dont les conseils scientifiques et personnels ont joué un rôle majeur pendant cette période de thèse.

Ces trois années de thèse ne se seraient jamais si bien déroulées sans la contribution du **Dr. Christophe CARNOY**, qui a joué bien des rôles pendant ma thèse et mon Master. Un directeur de thèse investi et idéal, un tuteur de monitorat exemplaire pour le corps enseignant, un support technique dont chaque thésard rêverait, un mentor dont la sagesse m'a toujours fasciné, une oreille humaine et attentive, un très bon conseiller musical, un ami... et même un mécanicien et bientôt un déménageur. Je lui serai toujours extrêmement reconnaissant pour m'avoir pris sous son aile.

Sans oublier **Stéphanie**, je la remercie d'avoir partagé le temps de son conjoint avec moi, d'avoir toujours été chaleureuse et bienveillante pendant ces années à Lille, allant même jusqu'à partager le jour de son anniversaire avec la soutenance de mes travaux.

Je remercie les membres actuels de notre groupe et ceux partis vers de nouveaux horizons. Merci à **Daphnée**, à **Anne-France**, à la **"petite" Delphine**, à **Laurie** et à la **"grande" Delphine** pour leur aide technique, et pour avoir toujours maintenu la bonne entente du groupe. Merci aux stagiaires : **Anne-Gaelle**, **Monique**, **Sarah**, **Kevin** et **Quentin**, pour leur aide technique et pour avoir fait des expérimentations, parfois tardives, des moments moins agréables. Un grand merci à **Julien**, ex-collègue précieux au groupe et désormais ami de valeur, qui m'a accueilli en tant qu'étudiant. Il a participé de multiples façons au développement des projets de cette thèse, m'a introduit à la vie lilloise... par de nombreuses facettes il a contribué au bon déroulement de cette thèse.

Je remercie le groupe des Dr. Philippe GOSSET et Muriel PICHAVANT pour leur contribution à la bonne humeur et l'énergie ambiante dans les murs du bâtiment. Merci donc à **Philippe**, **Muriel**, **Gwenola**, **Eva**, **Olivier**, **Gaelle**, **Bachirou**, **Riti**, **Magdiel**, **Fahima** et leurs nombreux étudiants pour m'avoir fait passer un si bon moment et pour avoir tant contribué à l'éducation de mon palet pour la dégustation de la bière belge.

J'adresse mes remerciements également au groupe des Dr. François TROTTEIN, Christelle FAVEEUW, Christophe PAGET et Isabelle WOLOWCZUK. Merci à **Josette**, **François**, **Christophe**, **Christelle**, **Isabelle**, **Sandra**, **Stoyan**, **Elodie**, **Adeline**, **Maya**, **Reem**, **Asma**, **Manu**, **Julie**, **Morgane** et **Marie-Jo**, pour leur aide, leurs connaissances et leurs réflexions sans lesquels les projets ne seraient pas ce qu'ils sont aujourd'hui.

Je remercie une seconde fois le **Pr. Michel SIMONET** pour sa contribution au projet *Yersinia*, son expertise dans les intraveineuses et son enseignement au cours du DU de Microbiologie Cellulaire.

Merci au **Dr. Benoit FOLIGNE** pour son aide, son accessibilité et sa contribution intellectuelle permettant l'avancé des deux études.

Je suis reconnaissant à l'équipe de la plateforme d'imagerie BICel dirigée par le Dr. Franck LAFONT et principalement à **Antonino** et **Elisabeth** pour leur contribution aux essais de microscopie à fluorescence ainsi qu'à **Hélène** pour son aide technique autour du cytomètre de flux.

J'adresse toute ma gratitude au membre de l'équipe argentine *del Instituto de Estudios Inmunologicos y Fisiopatologico*, et principalement à **Martin, Agustina, Juan-Marco, Griselda, Guillermo, Fernando** pour leur merveilleux accueil au sein du laboratoire et dans leur foyer pour certains, leur aide et leurs conseils, m'apportant un confort incroyable au cours de mon séjour en Argentine. Merci également à **Juan-Pablo** pour son aide au quotidien avec le microdissecteur laser et son amicalité au cours de mon séjour.

Je remercie l'équipe d'enseignement d'immunologie et de parasitologie de la faculté de pharmacie de Lille c'est à dire **Benjamin, Manu, Nadine, Monique, El Moukhtar, Cécile-Marie, Annie, Magalie, Christine** et **Murielle** pour m'avoir permis de participer aux travaux pratiques, d'apprécier le contact avec les étudiants et d'avoir développer mon intérêt pour l'enseignement universitaire.

Je remercie grandement **Andrea** pour son soutien et sa contribution aux définitions de mes attentes de la vie privée et professionnelle. Merci de m'avoir appris à profiter des *petites choses* du quotidien et de m'avoir permis de trouver les bulles d'airs qui remettent les idées en place.

Je tiens particulièrement à remercier mes amis **Mati** et **Thibaut** qui ont toujours été là pour moi ces dernières années, que ce soit dans la science ou dans les nombreuses aventures dont les suites s'écriront dans le futur.

Merci à **Christian** pour sa participation quotidienne à ma 2^{ème} année de thèse pendant laquelle son accent allemand aura continuellement contribué à ma joie de vivre.

Je remercie mes amis lillois **Romain, Jude, Flo, Guigui, François, Julie** qui m'ont fait découvrir la joie de vivre dans cette merveilleuse région qu'est le Nord et qui m'ont toujours encouragé.

Je n'aurai jamais réalisé cette thèse sans ma famille. Je le dois à **mes parents**, qui de manière subtile et parfois même caché, ont éprouvé cette fierté qui est restée une de mes plus grandes motivations. Je le dois à **mes sœurs** qui de manières très différentes ont su soutenir leur petit frère au cours de ces trois années de thèse. Je le dois à **mon cousin Romain**, qui a travers ses yeux fraternels, m'a sans le savoir toujours poussé à garder le cap et les pieds sur terre. Et je le dois aux autres membres de **ma famille**, qui malgré mon aversion pour le sport, m'ont toujours soutenu et motivé à poursuivre mes buts.

Merci également aux nombreux **Couchsufers** et **voyageurs**, croisés dans mes aventures, qui m'ont permis de relativiser, de sortir la tête du laboratoire, de rêver, de voyager, et d'apprendre d'autres langues qui me seront utiles tout au long de ma vie et de ma future carrière.

Chacun à sa façon, en contribuant aux différents projets scientifiques, à la qualité de vie au laboratoire ou à ma vie en générale, tous trois nécessaires et intimement liés pour un étudiant de doctorat, vous avez tous participé à l'accomplissement de cette thèse.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	2
LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	7
A. Les récepteurs de l'immunité innée	7
I. Les NOD-like receptors.....	9
II. Les RIG-like receptors.....	11
III. Les senseurs cytoplasmiques de l'ADN	12
IV. Les C-type lectin-like receptors	15
V. Les Toll-like receptors.....	16
1. Structure et localisation des TLR.....	17
2. Les agonistes des TLR de surface	19
3. Les agonistes des TLR endosomaux.....	20
4. Voies de signalisation des TLR	22
Voie de signalisation dépendante de MyD88.....	24
a. Voie de signalisation dépendante de TRIF	25
5. Régulation négative de l'activation des TLR.....	25
a. Régulation transcriptionnelle des voies de signalisation	25
b. Régulation par dissociation des complexes de la signalisation	26
c. Régulation par dégradation des éléments de la signalisation.....	26
VI. Pathologies infectieuses liées aux mutations génétiques des TLR chez l'Homme	27
1. Mutations associées au voies de signalisation des TLR.....	27
2. Polymorphismes des TLR et des molécules associées	29
B. La flagelline, ses récepteurs innés et leur rôle dans l'immunité des muqueuses	30
I. La flagelline, composant majeur du flagelle bactérien.....	30
II. Les récepteurs innés de la flagelline	31
1. TLR5, le premier récepteur de la flagelline découvert	31
a. Reconnaissance de la flagelline par TLR5.....	31
b. Activité biologique de la flagelline dépendante de la reconnaissance par TLR5	33
2. Le complexe NAIP/NLRC4, pour la reconnaissance intracellulaire de la flagelline	36
a. Reconnaissance de la flagelline et activation du complexe NAIP/NLRC4.....	36
b. Signalisation et activité biologique dépendante de la stimulation du complexe NAIP/NLRC4 par la flagelline	37
C. Les TLR comme cibles thérapeutiques dans des approches anti-infectieuses.....	39
I. TLR7 et TLR8.....	39

II. TLR9	41
III. TLR3.....	41
IV. TLR4.....	43
V. TLR2.....	44
VI. TLR5	45
OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	49
La flagelline protège contre une infection intestinale par <i>Yersinia</i>	
<i>pseudotuberculosis</i> dans un mécanisme indépendant de l'IL-22.	50
A. Article I.....	50
B. Résumé de l'article I	78
C. Discussion de l'article I.....	78
L'administration respiratoire de la flagelline augmente le potentiel thérapeutique	
des antibiotiques dans le traitement de pneumonies ou de surinfections	
pneumococciques post-Influenza.	82
A. Article II	82
B. Résumé de l'article II.....	85
C. Résultats complémentaires de l'article II	85
D. Discussion de l'article II et des résultats complémentaires	90
DISCUSSION GÉNÉRALE	95
BIBLIOGRAPHIE	98
ANNEXE I.....	120
ANNEXE II	122
A. Brevets.....	122
B. Communications scientifiques.....	122
I. Présentation orale.....	122
II. Présentations de posters.....	122
ANNEXE III.....	123
Autres contributions scientifiques	123

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
AIM2 : *absent in melanoma 2*
ALR : *AIM2-like receptors*
ARN : acide ribonucléique
ASC : *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
BAL : *bronchoalveolar lavage*
BIR : *baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat*
CARD : *caspase recruitment domain*
CDN : dinucléotides cycliques
cGAS : *cGAMP synthase*
cGAMP : *cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate*
CIITA : *class II transactivator*
CLR : *C-type lectin receptors*
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : cytomégalovirus
CpG : *2'-deoxyribo-cytidine-phosphate-guanosine*
CRAMP : *cathelicidin-related antimicrobial peptide*
CTD : *C-terminal domain*
DAI : *DNA-dependent activator of IRFs*
DAMP : *danger-associated molecular patterns*
DNA-PK : *DNA-dependent protein kinase*
FDA : *Food and Drug Administration*
GFP : *Green Fluorescent Protein*
HSV : *Herpes Simplex virus*
iE-DAP : *glutamic acid-diaminopimelic acid*
IFI16 : *interferon- γ -inducible protein 16*
IFN : interféron
IL : interleukine
ILC : *innate lymphoid cells*
IRAK : *IL-1R-associated kinases*
IRF : *interferon regulatory factors*
LBP : *LPS binding protein*
LGP2 : *laboratory of genetics and physiology 2*
LPS : lipopolysaccharide
LRR : *leucine-rich repeat*
LRRFIP1 : *leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1*
MAL : *MyD88 adaptor-like*

MAMP : *microbe-associated molecular patterns*
MAPK : *mitogen-activated protein kinases*
MAVS : *mitochondrial antiviral-signaling protein*
MCMV : cytomégalovirus murin
MD-2 : *myeloid differentiation factor 2*
MDA5 : *melanoma differentiated gene 5*
MDP : *muramyl dipeptide*
miRNA : *micro RNA*
MMP : métalloprotéinase matricielle
MyD88 : *myeloid differentiation factor 88*
NAIP : *NLR family, apoptosis inhibitory protein*
NF- κ B : *nuclear factor-kappa B*
NLR : *NOD-like receptors*
NOD : *nucleotide oligomerization domain*
NK : *natural killer*
ODN : oligodinuéotide
PAMP : *pathogen-associated molecular patterns*
pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes
PNN : polynucléaires neutrophiles
polyI:C : acide polyinosinique-polycytidylique
PRR : *pattern recognition receptors*
PYD : *pyrin domain*
RIG-I : *retinoic acid inducible genes I*
RLR : *RIG-I-like receptors*
ROS : radicaux libres oxygénés
RSV : virus respiratoire syncytial
S100A : famille de protéines liant le calcium
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*
STING : *stimulator of interferon genes*
Syk : *spleen tyrosine kinase*
TAB : *TAK1 binding protein*
TAK : *TGF β -activated kinase 1*
TIR : *Toll/IL-1 receptor*
TLR : *Toll-like receptors*
TNF : *tumor necrosis factor*
TRAF : *TNF receptor-associated factor 6*
TRAM : *TRIF related adaptor molecule*
TRIM : *tripartite-motif containing*
TRIF : *TIR domain containing adaptor inducing IFN- β*
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VHC : virus de l'hépatite C

INTRODUCTION

L'organisme est constamment exposé aux agressions microbiennes, parasitaires et environnementales. L'immunité est un système complexe qui participe au maintien de l'intégrité en assurant la défense contre les agressions grâce à la détection et la mise en place de mécanismes protecteurs. Il est ainsi primordial pour les acteurs de l'immunité de faire la distinction entre le Soi et le non-Soi, mais également entre une situation menaçante ou non pour l'organisme. Le système immunitaire peut être artificiellement subdivisé en deux parties. D'une part l'immunité innée, qui représente l'ensemble des mécanismes mis en place immédiatement, agissant comme première barrière de défense face au danger. D'autre part l'immunité adaptative, plus tardive, qui aboutit à des effecteurs hautement spécifiques du micro-organisme et au développement de la mémoire immunitaire.

L'immunité innée est caractérisée par deux composantes. Une composante cellulaire comprenant les cellules dotées de la capacité à phagocyter les micro-organismes (macrophages, polynucléaires neutrophiles [PNN]), les cellules sentinelles (mastocytes), les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques) assurant l'activation de l'immunité adaptative, les cellules cytotoxiques naturelles (*natural killer*, NK) et des cellules lymphoïdes innées (*innate lymphoid cells*, ILC) régulatrices de l'état inflammatoire de l'organisme. A cela s'ajoute une composante humorale regroupant les molécules cytotoxiques du complément, les molécules de la phase aiguë de l'inflammation, les cytokines, les peptides antimicrobiens et les opsonines. Ces acteurs ont pour fonctions (i) d'établir une barrière physico-chimiques réduisant l'accès aux agents infectieux, (ii) de détecter les agents étrangers ou les signaux de danger via les récepteurs de l'immunité innée, (iii) de recruter les cellules immunitaires innées effectrices, (iv) de mettre en place l'inflammation et (v) d'initier la maturation du système immunitaire adaptatif.

A. Les récepteurs de l'immunité innée

A la fin des années 1980, Charles Janeway propose dans un article clé ses théories concernant l'activation du système immunitaire au cours de l'invasion des micro-organismes pathogènes [1]. Selon l'auteur, des structures moléculaires invariantes exprimées par les micro-organismes pathogènes seraient reconnues par des récepteurs présents sur les cellules immunitaires innées. Cette reconnaissance permettrait d'activer l'expression de molécules de co-stimulation et jouerait un rôle important dans l'activation de l'immunité adaptative. Il fut

le premier à utiliser les termes *pattern recognition receptors* (PRR) et *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP).

Désormais, il est établi que les espèces microbiennes (bactéries, mycètes, parasites ou virus), expriment des motifs moléculaires (*microbe-associated molecular patterns*, MAMP) généralement essentiels à leur survie, détectées par les PRR. Ces récepteurs ne sont pas restreints à la reconnaissance des micro-organismes via les MAMP, puisqu'ils sont également capables de détecter les signaux de danger cellulaire (*danger-associated molecular patterns*, DAMP), reliant ainsi les récepteurs de l'immunité innée à la détection de stress cellulaires ou à la protection contre le développement de tumeurs [2]. La détection des MAMP par les PRR induit la production de cytokines inflammatoires, de chimiokines, d'interférons (IFN), et de molécules antimicrobiennes ainsi que le recrutement et l'activation de cellules de l'immunité comme les macrophages ou les PNN. Parallèlement, la stimulation de la signalisation des PRR permet la maturation des cellules dendritiques, participant à l'activation de l'immunité adaptative [3].

Ces trente dernières années ont permis d'approfondir les connaissances sur les mécanismes moléculaires de l'immunité innée. La découverte des PRR, de leurs ligands et des différentes fonctions qu'ils exercent démontre un large éventail de mécanismes assurant la détection d'une infection ou d'un dysfonctionnement cellulaire. La multiplicité des MAMP détectés par les PRR permet de palier aux mécanismes d'échappement microbiens qui peuvent contourner la signalisation immunitaire d'une famille de récepteurs, mais difficilement de plusieurs types de PRR [3]. La diversité des récepteurs et de leur localisation permet également d'établir une réponse spécifique du micro-organisme.

A l'heure actuelle, plus de 50 PRR ont été décrits chez l'Homme. Ils sont classés en fonction de leur structures ou de la nature du ligand qu'ils reconnaissent : les *nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLR), les *retinoic acid inducible genes* (RIG) *I-like receptors* (RLR), les nouveaux senseurs cytosoliques de l'ADN, les *C-type lectin receptors* (CLR) et les *Toll-like receptors* (TLR).

I. Les NOD-like receptors

Les premiers PRR cytosoliques décrits furent les NLR. Ces récepteurs représentent la famille la plus étendue puisqu'il existe 22 membres chez l'Homme, 34 chez la souris et peuvent représenter plus de 200 récepteurs chez l'oursin [4]. Comme les autres familles de PRR, les NLR ont été initialement décrits comme reconnaissant des composants microbiens, mais des études ont relié l'activation des NLR à d'autres activités biologiques. En effet de récentes publications associent certains membres des NLR (i) à la régulation de l'inflammation, (ii) au contrôle de la présentation des antigènes aux acteurs de l'immunité adaptative, (iii) à la mortalité cellulaire, (iv) à la détection de changement métabolique et (v) au développement embryonnaire [4].

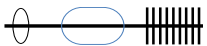
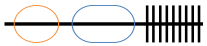
La structure des NLR consiste en un domaine d'interaction protéine/protéine en N-terminal, un domaine NOD responsable de l'oligomérisation, et enfin un domaine riche en leucine (*leucine-rich repeat*, LRR) en C-terminal. Cette famille est subdivisée en 4 groupes en fonction de la nature de leur domaine d'interaction protéine/protéine : un domaine de transactivation pour les NLRA, un domaine BIR (*baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat*) pour les NLRB, un domaine CARD (*caspase recruitment domain*) pour les NLRC et un domaine PYD (*pyrin domain*) pour les NLRP (**Tableau 1**) [4].

NOD1 et NOD2 ont été les NLR les plus étudiés. Par leur détection de composés du microbiote intestinal et leur expression à l'interface hôte/microbiote, ils sont liés au contrôle de la flore microbienne et de l'homéostasie intestinale. Ces récepteurs reconnaissent des structures simples formant la paroi des bactéries. NOD1 reconnaît ainsi le composant du peptidoglycane des bactéries à Gram négatif (iE-DAP, *glutamic acid-diaminopimelic acid*) et NOD2 celui des bactéries à Gram positif (MDP, *muramyl dipeptide*). La déficience de NOD2 est associée au développement de maladies chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn à cause d'un défaut de contrôle des composants de la flore intestinale et des pathogènes entériques [4, 5]. Après reconnaissance de leurs ligands, les NOD1 et NOD2 activent la signalisation des voies NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) et MAPK (*mitogen-activated protein kinases*).

La stimulation des autres NLR permet l'assemblage de l'inflammasome, complexe protéique cytosolique qui permet l'activation de la caspase-1. Ainsi activée la caspase-1 exerce une activité cystéine-acide aspartique protéinase qui permet le clivage des précurseurs

protéiques (pro-interleukine [IL]-1 β et pro-IL-18) en IL-1 β et IL-18 matures. NLRC4, en association avec NAIP (*NLR family, apoptosis inhibitory protein*) pour la détection de son ligand, la flagelline, est capable de directement interagir avec le domaine CARD de la caspase-1. NLRP1 et NLRP3 nécessitent le recrutement de la molécule adaptatrice ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) contenant un domaine PYD et un domaine CARD pour interagir avec la caspase-1. Des études récentes sur les NLRP suggèrent l'existence de trois nouveaux inflammasomes. En effet la co-expression de NLRP6, NLRP7 et NLRP12 avec ASC activerait la caspase-1 [4].

Tableau 1 : Classification, structures et fonctions des NOD-like receptors humains. Les NLR sont subdivisés en 4 sous-familles en fonction de la structure de leur domaine d'interaction protéine/protéine : domaine de transactivation, domaine BIR, domaine CARD et domaine PYD. Tableau inspiré de la revue de Motta *et al.* [4].

Groupe	Structure protéique	Membres	Fonctions	Ligands
NLRA		CIITA	expression MHC-II	IFN- γ
NLRB		NAIP	contrôle d'infections	flagelline
NLRC		NOD1	NF- κ B	iE-DAP
		NOD2	NF- κ B, autophagie, IFN- α/β	MDP
		NLRC3	inhibiteur activation lymphocyte T	inconnu
		NLRC4	inflammasome, pyroptose	flagelline
		NLRC5	inflammation, expression MHC-I	IFN- $\alpha/\beta/\gamma$
		NLRX1	production de ROS, antivirale	inconnu
NLRP		NLRP1	élimination bactérienne (anthrax)	MDP/toxine
		NLRP10	migration des cellules dendritiques	inconnu
		NLRP2	régulation de NF- κ B, embryogénèse	inconnu
		NLRP3	inflammasome	ATP, alun, Ply
		NLRP4	embryogénèse, IFN- α/β , autophagie	inconnu
		NLRP5	embryogénèse	inconnu
		NLRP6	inhibition NF- κ B, inflammasome	inconnu
		NLRP7	embryogénèse, inflammasome	lipopeptides
		NLRP12	inhibition NF- κ B/MAPK, inflammasome	<i>Yersinia</i>
		NLRP14	spermatogénèse	inconnu

 = NOD,  = LRR,  = Transactivation Domain,  = CARD,  = BIR,  = PYD,  = non-défini
 ATP (Adénosine triphosphate), DAP (*glutamic acid-diaminopimelic acid*), IFN (interféron), MDP (*Muramyl dipeptide*), MHC (complexe majeur d'histocompatibilité), NF- κ B (*Nuclear factor-kappa B*), Ply (pneumolysine), ROS (Radicaux libres oxygénés).

CIITA, l'unique membre du groupe des NLRA, relie l'immunité innée à l'immunité adaptative. Son implication dans la régulation de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II module la maturation de l'immunité adaptative [4, 6].

Enfin, d'autres NLR ne sont connus que pour leur action régulatrice de voies de signalisation. C'est le cas de NLRP10, qui ne possède pas de domaine LRR, et qui réprime l'activation de l'inflammasome et de l'immunité adaptative. NLRP2, NLRX1, NLRC3, NLRC5 et NLRP12 ont aussi été reportés comme pouvant réguler négativement la voie NF- κ B [4].

II. Les RIG-like receptors

En 2004, deux études ont révélé l'existence de deux récepteurs cytosoliques ayant la capacité de reconnaître l'ARN de virus : RIG-I (*retinoic acid inducible genes*) et MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) [7, 8]. LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*), découvert peu après, représente le troisième membre de la famille des RLR [9]. Ces récepteurs sont exprimés par une grande variété de types cellulaires (cellules myéloïdes, cellules épithéliales, fibroblastes, cellules du système nerveux central) et sont capables de reconnaître spécifiquement l'ARN viral dans les cellules infectées [10].

Les RLR sont constitués d'un domaine CTD (*C-terminal domain*) permettant la reconnaissance du ligand, d'un domaine *DEXD box helicase* ouvrant l'ARN double brin et de deux domaines CARD adjacents en N-terminal (excepté pour LGP2) (**Figure 1**) [10].

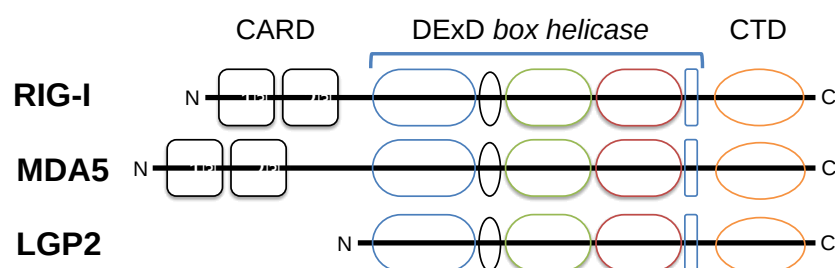


Figure 1 : Structures des RIG-like receptors : RIG-I, MDA5 et LGP2. Les RLR sont composés d'une région comprenant des domaines à activité hélicase (*DEXD box helicases*) et un domaine C-terminal (CTD) reconnaissant le ligand. Les récepteurs RIG-I et MDA5 possèdent également un domaine CARD permettant la transduction du signal.

L'activation des RLR par l'infection virale, mène à l'interaction du domaine CARD du RLR avec celui de MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*) situé au niveau de la membrane externe des mitochondries. MAVS stimule ainsi différentes kinases nécessaires à

l'activation des IRF (*interferon regulatory factors*) et de la voie NF- κ B. Ces voies de signalisation permettent finalement la production d'IFN de type I (IFN- α et IFN- β) et de type III (IFN- λ) responsables de l'activation de l'immunité antivirale dans les cellules infectées et les tissus avoisinants.

RIG-I reconnaît préférentiellement les ARN double brin de petites tailles (jusqu'à 1 kb) avec la partie 5' triphosphorylée en simple brin sur quelques nucléotides, ce qui est caractéristique des ARN viraux. Certains ARN bactériens produits par des bactéries intracellulaires comme *Listeria monocytogenes* activent également RIG-I [11].

A la différence de RIG-I, MDA5 reconnaît des ARN viraux de plus haut poids moléculaire et est capable de reconnaître le polyI:C (acide polyinosinique-polycytidylique), l'analogue synthétique de l'ARN viral. Bien que la spécificité de MDA5 soit moins caractérisée que celle de RIG-I, son implication dans la reconnaissance des infections virales est à l'heure actuelle très documentée [10].

La particularité de LGP2, le dernier membre de la famille des RLR, est l'absence du domaine CARD dans sa structure. LGP2 a été décrit comme contrôlant négativement l'activation de RIG-I et MDA5. Cependant des études récentes démontrent une activité activatrice, notamment avec MDA5 [12].

III. Les senseurs cytoplasmiques de l'ADN

Cette classe de récepteurs cytosoliques est représentée par de nombreux membres sans homologies de structure mais ayant pour point commun la reconnaissance de l'ADN. Le premier senseur cytoplasmique de l'ADN décrit fut DAI (*DNA-dependent activator of IRFs*), découvert en 2007, introduisant ainsi une nouvelle classe de récepteurs innés [13]. L'ARN polymérase III est un autre senseur de l'ADN qui collabore avec le système RIG-I/MAVS [14]. De façon remarquable l'ARN polymérase III participe à la transcription d'ADN viral en ARN et génère ainsi des signaux activant les RLR [14]. D'autres récepteurs ont été caractérisés tels que LRRFIP1 (*leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1*) capable de reconnaître l'ADN de *L. monocytogenes* et d'induire une réponse IFN de type I. Le complexe DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) constitué de Ku70, Ku80 et d'une sous-unité catalytique participe à la détection de l'ADN [15]. La sous-unité Ku70 a été décrite comme un senseur de l'ADN cytosolique, et l'activation du complexe DNA-PK permet la production d'IFN de type III (**Figure 2**) [16].

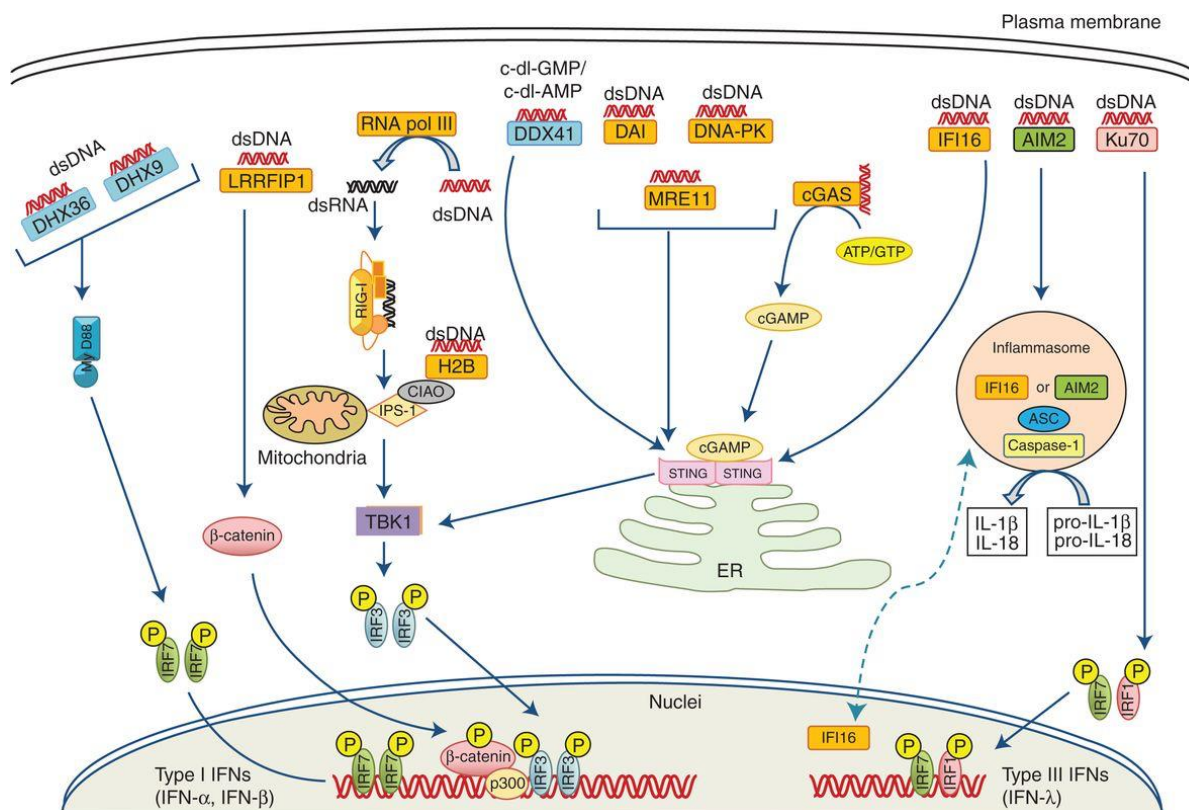


Figure 2 : Les senseurs cytosoliques de l'ADN et leurs voies de signalisation. DAI, DDX41, DNA-PK, IFI16 et cGAS reconnaissent l'ADN et activent STING qui lui-même permet l'activation de TBK1 nécessaire à la phosphorylation d'IRF3 et à l'expression des IFN de type I. Le récepteur LRRFIP1 active l'expression de l'IFN de type I par l'intermédiaire de la β-caténine. La RNA pol III (ARN polymérase III) transcrit l'ADN cytosolique en ARN qui sera reconnu par RIG-I. DHX9 et DHX36 reconnaissent l'ADN cytosolique et permettent la synthèse d'IFN de type I. AIM2 et IFI16 activent l'inflammasome via la caspase-1. Schéma provenant de la revue de Pandley *et al.* [17].

En parallèle, la découverte de la molécule adaptatrice STING (*stimulator of interferon genes*), essentiel à l'expression d'IFN-β suite à la stimulation directe par des virus à ADN, a permis de mieux comprendre le mode de fonctionnement des récepteurs cytosoliques de l'ADN [18, 19]. En effet, non seulement STING est nécessaire à la signalisation en aval de différents senseurs cytosoliques de l'ADN, mais il a été décrit récemment comme pouvant reconnaître directement les messagers secondaires bactériens que sont les dinucléotides cycliques (CDN) [20]. En 2013, le groupe de Chen découvrit un analogue des CDN bactériens synthétisé par la cGAS (*cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate [cGAMP] synthase*) et activant la voie STING (**Figure 2**). cGAS est capable de détecter l'ADN cytosolique microbien puis de former le cGAMP, très proche structurellement des CDN bactériens, qui active directement STING [21]. Cette voie a aussi une importance dans la communication cellulaire du tissu infecté car le cGAMP produit par les cellules infectées peut être transféré aux cellules voisines et directement induire la réponse IFN antivirale via STING [22].

La famille des *DEx*D box *helicases* comporte également des membres capables de reconnaître l'ADN cytosolique. DHX9 et DHX36 furent les premiers proposés comme ayant cette capacité. DHX9 est décrit comme important pour la production de TNF (*tumor necrosis factor*) et d'IL-6 via la voie NF- κ B après une stimulation avec de l'ADN microbien synthétique. Suite au même type de stimulation, DHX36 stimule la production d'IFN- α via la signalisation IRF7 [23]. Depuis d'autres membres de cette famille ont été caractérisés tel que DDX41 capable de reconnaître l'ADN viral et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et d'induire une réponse antivirale en recrutant STING [24].

D'autres récepteurs activent l'inflammasome après la détection d'ADN cytosolique. C'est le cas de Rad50 connu dans les mécanismes de réparation de l'ADN mais récemment décrit comme pouvant induire l'activation de l'inflammasome via le recrutement de CARD9 après une infection virale [25]. Deux autres senseurs de l'ADN cytosolique ont été largement étudiés dans l'induction de l'inflammasome. Il s'agit de AIM2 (*absent in melanoma 2*) et de IFI16 (*interferon- γ -inducible protein 16*) appartenant tous les deux à la famille des PYHIN (*pyrin and HIN domain-containing protein*). Ces récepteurs détectent l'ADN et recrutent ASC via leur domaine pyrine pour finalement activer la caspase-1. IFI16 et AIM2 ont été proposés en 2011 comme appartenant à une nouvelle famille de récepteur, les *AIM2-like receptors* (ALR) [26].

IV. Les C-type lectin-like receptors

Les CLR permettent la détection de MAMP extracellulaires de divers micro-organismes. Ce sont des récepteurs transmembranaires capables de reconnaître les carbohydrates comme (i) les β -glucanes retrouvés au niveau des parois des mycètes et des mycobactéries, (ii) les mannanes exprimés par certains mycètes et bactéries. L'activation de ces récepteurs exprimés majoritairement par les cellules myéloïdes, permet la mise en place de mécanismes d'élimination microbiens et d'une réponse inflammatoire [27].

Certains CLR comme le récepteur au mannose et la langerine, induisent un mécanisme d'endocytose dès leur stimulation par leurs agonistes. Cette réponse permet notamment l'internalisation et la gestion des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes. D'autres mettent en place une signalisation aboutissant à l'inflammation. C'est le cas de Dectin-1 qui reconnaît les β -glucanes de *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* et *Mycobacteria*, et de CLEC-2 et DNGR-1, deux CLR proches de Dectin-1, dont les ligands sont à l'heure actuelle peu connus [28]. Tous trois sont capables de signaler via le recrutement intracellulaire direct de Syk (*spleen tyrosine kinase*) permettant l'activation de NF- κ B et la production de cytokines inflammatoires comme le TNF et l'IL-6.

DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) est un CLR humain capable de reconnaître des structures contenant du mannose chez de nombreux pathogènes (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Candida albican*, VIH) et d'induire leur phagocytose [27].

Dectin-2 reconnaît également des structures hautement mannosylées comme les α -mannanes, et permet ainsi la détection des mycètes, mais aussi des extraits d'œuf du parasite *Schistosoma mansoni*. Les récepteurs de la superfamille de Dectin-2 (*blood dendritic cell antigen 2* [BDCA-2], *dendritic cell immunoactivating receptor* [DCAR], *C-type lectin superfamily 8* [CLECS8] et *macrophage inducible C-type lectin* [Mincle]) nécessitent la collaboration du récepteur des fragments Fc des immunoglobulines G (Fc γ R) pour le recrutement de Syk et la transduction du signal [27, 29].

D'autres CLR détiennent un rôle régulateur de l'activation de l'immunité innée. C'est le cas de DCIR (*dendritic cell immunoreceptor*) et MICAL (*myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor*) qui semblent avoir un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale [30].

V. Les *Toll-like receptors*

Parmi les PRR décrits à ce jour, les TLR ont été de loin les plus étudiés au cours de ces 20 dernières années. Leur variété, leur expression chez un grand nombre de types cellulaires (cellules immunitaires et structurales), leur localisation extracellulaire et endosomale, leur capacité à détecter de nombreux ligands, font des TLR les sentinelles majeures de l'immunité innée.

Le clonage du gène codant le récepteur de l'IL-1 (IL-1R) en 1988 apparaît comme la première étape de la découverte des TLR [31]. En 1991, le domaine cytosolique de l'IL-1R a été décrit comme ayant une homologie avec le domaine cytosolique de la protéine *Toll* de *Drosophila melanogaster*, alors connue pour son importance dans la polarisation dorso-ventrale au cours du développement embryonnaire [32, 33]. Il a ensuite été rapporté que des promoteurs de gènes codant des molécules antimicrobiennes possédaient des motifs de reconnaissance pour des facteurs associés à *Toll* [34]. Cette observation a relié définitivement *Toll* à l'immunité innée et mena le groupe de Jules Hoffman (Prix Nobel de Physiologie ou Médecine, 2011) à démontrer la participation de *Toll* dans l'immunité antifongique de la drosophile en contrôlant de l'expression de la drosomycine [35]. Cette étude entraîna rapidement la découverte d'un homologue chez l'Homme (*hToll*) par Ruslan Medzhitov et Charles Janeway qui ont mis en évidence la capacité de cet homologue à activer l'immunité innée et adaptative [36]. Ensuite, l'équipe de Bazan a décrit cinq nouveaux récepteurs présentant la même structure chez l'Homme et proposèrent l'appellation de *Toll-like receptors*. En Janvier 1998, les premiers TLR (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 [anciennement *hToll*] et TLR5) furent décrits [37]. Dès septembre 1998, la course au ligand était lancée. Une première étude démontrait que la détection du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif était régie par le TLR2 dans des cellules humaines transfectées [38]. L'utilisation du modèle murin démentit rapidement cette erreur attribuée à une contamination en peptidoglycane dans le lot de LPS utilisé. En effet, l'équipe de Beutler (Prix Nobel de Physiologie ou Médecine, 2011) montrât que la résistance au LPS de deux souches murines était due à une mutation dans le gène *Tlr4* [39, 40]. Les travaux de Shizuo Akira et de son équipe ont permis d'identifier par la suite la majorité des TLR murins et leurs ligands.

Actuellement 13 TLR ont été identifiés. TLR10, présent chez l'Homme, est non fonctionnel chez la souris à cause de l'insertion d'un rétrovirus dans sa séquence [3]. Les

TLR11, TLR12 et TLR13, fonctionnels chez la souris, ont été perdus au cours de l'évolution du génome humain [3].

Les TLR sont impliqués dans la réponse anti-infectieuse en participant (i) au recrutement de cellules immunitaires, (ii) à la potentialisation de l'opsonisation et de l'activité bactéricide des cellules immunitaires innées, (iii) au maintien de l'intégrité tissulaire et (iv) à la maturation de la réponse adaptative spécifique [41].

1. Structure et localisation des TLR

Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires composées de trois domaines (**Figure 3 A**) :

- Un domaine extracellulaire riche en leucines (LRR) formant une structure en fer à cheval qui a pour fonction de reconnaître le ligand.
- Une simple hélice- α transmembranaire.
- Un domaine cytoplasmique homologue à celui de l'IL-1R (*Toll/IL-1 receptor*, TIR) permettant la transduction du signal.

Des études structurales ont permis de définir les interactions moléculaires entre les TLR et leurs ligands [42-46] (**Figure 3 B-D**). Le domaine extracellulaire des TLR peut être composé de 16 à 28 copies de LRR formant une structure solénoïde directement liée à la fonction de détection du ligand [47]. Il est désormais admis qu'une dimérisation des TLR est nécessaire pour la reconnaissance de l'agoniste et la mise en place de la signalisation. Bien que la plupart des TLR forment des homodimères après l'interaction avec leurs ligands, d'autres comme TLR2, TLR1, TLR6 et TLR10, s'associent en hétérodimères pour leur activation (TLR2/TLR1, TLR2/TLR6 et TLR2/TLR10) [48]. La dimérisation des TLR peut être de deux types. Pour les hétérodimères de TLR2, ainsi que TLR5 et TLR3, la fixation du ligand nécessite le recrutement physique du second TLR pour permettre l'activité biologique. Pour d'autres récepteurs (TLR7, TLR8 et TLR9), le dimère est préformé au cours de la synthèse des TLR, et la détection du ligand permet un réarrangement conformationnel qui active le complexe [49]. Quel que soit le type d'interaction, il permettra le rapprochement des domaines TIR et l'induction de la signalisation en aval.

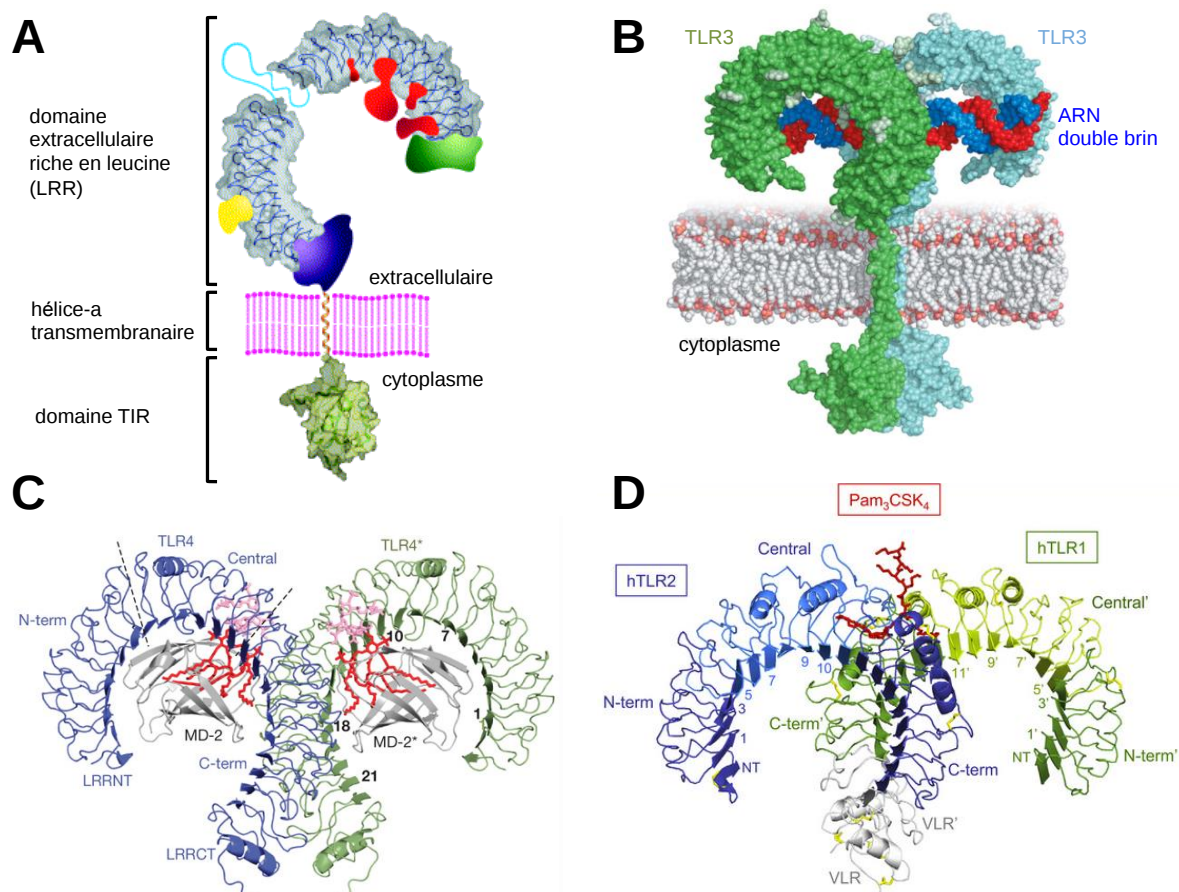


Figure 3 : Organisation structurale des Toll-like receptors. (A) Structure schématique de l'organisation du domaine extracellulaire riche en leucines, de la simple hélice- α transmembranaire et du domaine TIR responsable de la transduction du signal intracellulaire [42]. (B) Représentation modélisée de la liaison entre le TLR3 et son ligand, l'ARN double brin [43]. (C) Structure du complexe TLR4 – MD-2 – LPS (lipopolysaccharide [rouge]) [44]. (D) Structure du complexe TLR1 – TLR2 et de son ligand le Pam₃CSK₄ [50].

Les TLR sont exprimés à la surface des cellules ou dans la membrane des vésicules endosomales, de cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques ou lymphocytes) et de cellules de structurales (fibroblastes, cellules épithéliales ou endothéliales) [3]. Ainsi, les TLR ont été classés en fonction de leur localisation cellulaire :

- TLR de surface : TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10.
- TLR exprimés au niveau des vésicules intracellulaires : TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 et TLR13.

2. Les agonistes des TLR de surface

Le premier ligand de TLR a été caractérisé en 1999. Les auteurs avaient découvert que certaines souches de souris étaient résistantes à l'immunostimulation par le LPS, composant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, par l'altération de l'expression de TLR4 [39]. Depuis 2000, TLR4 est connu pour exercer sa fonction de récepteur en collaboration avec la molécule accessoire MD-2 (*myeloid differentiation factor 2*) [51, 52]. L'analyse cristallographique du complexe formé de TLR4, MD-2 et le LPS, a révélé les interactions physiques entre le ligand et son récepteur [44]. La liaison du LPS avec TLR4 est assistée par la LBP (*LPS binding protein*) et par le corécepteur CD14 reliant les observations décrites en 1990 par Wright *et al.* [53]. TLR4 est également capable de reconnaître d'autres ligands comme la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (RSV), la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae*, une protéine de membrane du parasite *Toxoplasma gondii* et même le paclitaxel extrait à partir d'écorce d'arbre et utilisé en chimiothérapie anti-tumorale [54-57].

TLR2, tout comme TLR4, nécessite la collaboration des corécepteurs CD14 et CD36 pour la détection des différents ligands [41]. Initialement décrit pour reconnaître le peptidoglycane et les acides lipotéichoïques, composants de la paroi des bactéries à Gram positif, TLR2 reconnaît des agonistes variés [58, 59]. Ainsi, TLR2 lie les lipopeptides bactériens, les lipoarabinomannanes mycobactériens, certains glycolipides du spirochète *Treponema maltophilum*, une mucine de *Toxoplasma cruzi*, des toxines du virus de la rougeole et de *Staphylococcus aureus* [3, 48]. Le large spectre de reconnaissance de TLR2 réside dans sa capacité à former des hétérodimères avec TLR1, TLR6 et TLR10 [48]. En fonction de son partenaire, TLR2 est capable de distinguer les lipopeptides diacétylés (via TLR6) ou des lipopeptides triacétylés (via TLR1). Cette distinction est simplement due à une différence conformationnelle de TLR6 qui ne lui permet pas de capter la troisième chaîne lipidique comme le fait TLR1 [42, 60]. L'association de TLR2 avec TLR10 a récemment été décrite comme modulateur de la réponse TLR2 en exerçant une compétition pour la reconnaissance de ses ligands et en stimulant la production de cytokines anti-inflammatoires [61].

Contrairement à TLR4 ou TLR2, un seul ligand a été décrit pour TLR5. Dès 2001, la flagelline, protéine qui forme le flagelle bactérien, a été décrite comme agoniste de TLR5 [62]. La récente caractérisation structurale du récepteur TLR5 du poisson zèbre a montré que

les homodimères de TLR5 reconnaissent deux molécules de flagelline [63]. Les caractéristiques de la liaison entre TLR5 et son ligand, la signalisation et l'activité biologique induite par la stimulation du récepteur seront traitées dans la partie « B.II.1. TLR5 » de ce manuscrit.

3. Les agonistes des TLR endosomaux

D'autres TLR sont localisés dans les membranes des endosomes et permettent ainsi la détection d'éléments microbiens obtenus après endocytose ou phagocytose.

TLR3 a été initialement décrit comme reconnaissant le polyI:C, analogue synthétique de l'ARN double brin [64]. Il est maintenant démontré que TLR3 reconnaît l'ARN double brin provenant du génome viral, du cycle viral, ou des petits ARN régulateurs de la traduction [3]. Le virus de l'encéphalomyocardite, le virus *West Nile*, le cytomégalo virus murin (MCMV), le virus de l'Herpes Simplex de type I (HSV-1) font partie des virus reconnus par TLR3, et cela malgré le fait que certains d'entre eux soient des virus à ADN [3]. La forte expression de TLR3 dans les cellules immunitaires (excepté les PNN et les cellules dendritiques plasmacytoïdes [pDC]) en fait un des récepteurs majeurs pour la détection de l'ARN viral [17].

Comme TLR3, TLR7 fut initialement décrit pour reconnaître un composé synthétique. Il s'agit des composés de la famille des imidazoquinoléines comme l'imiquimod et le resiquimod [65]. Ces composés sont des médicaments utilisés principalement contre les verrues génitales causées par le papillomavirus et dans des stratégies antitumorales [48]. TLR7 est associé à la détection de différents virus à ARN simple brin comme le VIH, le virus de la stomatite vésiculaire ou encore le virus Influenza [48].

TLR8 est phylogénétiquement très proche de TLR7 et est capable, chez l'Homme, de reconnaître les mêmes ligands que TLR7. Un rapport récent démontre que le TLR8 murin est capable de reconnaître l'ARN synthétique et le resiquimod par l'intermédiaire d'un domaine extracellulaire différent de celui de TLR7 [66]. La distinction entre TLR7 et TLR8 se fait également par leur tropisme cellulaire, puisque TLR8 est principalement exprimé par les lymphocytes T régulateurs tandis que TLR7 est exprimé par les cellules dendritiques et particulièrement les pDC [48].

TLR9 est connu pour détecter l'ADN viral et bactérien. Ce TLR reconnaît le CpG (2'-deoxyribo-cytidine-phosphate-guanosine) non méthylé, motif fréquemment retrouvé dans l'ADN génomique bactérien ou viral, et très rarement retrouvé dans l'ADN des mammifères [65]. Quatre classes d'oligodinucléotides (ODN) CpG sont reconnues par TLR9 (**Figure 4**).



Figure 4 : Structure des différentes classes de CpG ODN. Les liaisons rouges représentent les liaisons phosphorothioates et les liaisons noires les liaisons phosphodiesteres. Les séquences soulignées sont des palindromes. Les oligonucléotides en bleu indiquent les groupements CpG (2'-deoxyribo-cytidine-phosphate-guanosine) [67].

Le CpG-A, présentant un palindrome en son centre, induit une réponse IFN de type I dans les pDC [68]. Le CpG-B, formé intégralement par des liaisons de type phosphorothioate résistantes aux enzymes de dégradation de l'ADN, permet d'induire une réponse via la production de cytokines inflammatoires (IL-12 et TNF) par les lymphocytes B. La classe C du CpG contient un palindrome complètement formé de liaisons phosphorothioates en son extrémité 3' alors que son extrémité 5' est principalement constituée de liaisons phosphodiesteres. Finalement le CpG-P contient deux palindromes et est principalement formé de liaisons phosphorothioates. La spécificité cellulaire du CpG-C et du CpG-P reste à ce jour peu connue, mais ces deux composés sont capables d'induire une réponse chez les pDC et les lymphocytes B [67]. TLR9 est associé à la détection de différents virus à ADN comme le MCMV ou HSV-1 [3]. L'hémozoïne, un pigment produit à partir de l'hémoglobine au cours d'infections par *Plasmodium falciparum* a été décrit pour être reconnu par TLR9 ce qui rompt le dogme établissant que les TLR endosomaux ne reconnaissent que des acides nucléiques [69]. C'est le cas également pour TLR11 et TLR12 qui reconnaissent la profiline de *T. gondii* [70, 71].

TLR13 a été récemment décrit chez la souris comme lié à la reconnaissance de la séquence ACGGAAAGACCCC présent dans l'ARN 23S bactérien [72]. Cette séquence est la cible des macrolides / lincosamides / streptogramines, antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique, et est mutée chez les bactéries résistantes à ces antibiotiques. Ainsi, la bactérie résistante développe un mécanisme d'évasion non seulement de l'action des antibiotiques mais également de la détection par un récepteur de l'immunité innée [73].

4. Voies de signalisation des TLR

La stimulation des TLR induit la mise en place de réponses dépendantes (i) de la nature du TLR et de son agoniste, (ii) du type cellulaire ciblé et (iii) des voies de signalisations mobilisées. L'activation des voies de signalisation nécessite le recrutement de molécules adaptatrices au niveau des domaines intracellulaires TIR des TLR. A l'heure actuelle deux voies de signalisation en aval de la stimulation des TLR sont décrites en fonction des molécules adaptatrices impliquées : une voie dépendante de MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), et une voie dépendante de TRIF (*TIR domain containing adaptor inducing IFN- β*) (**Figure 5**) [49].

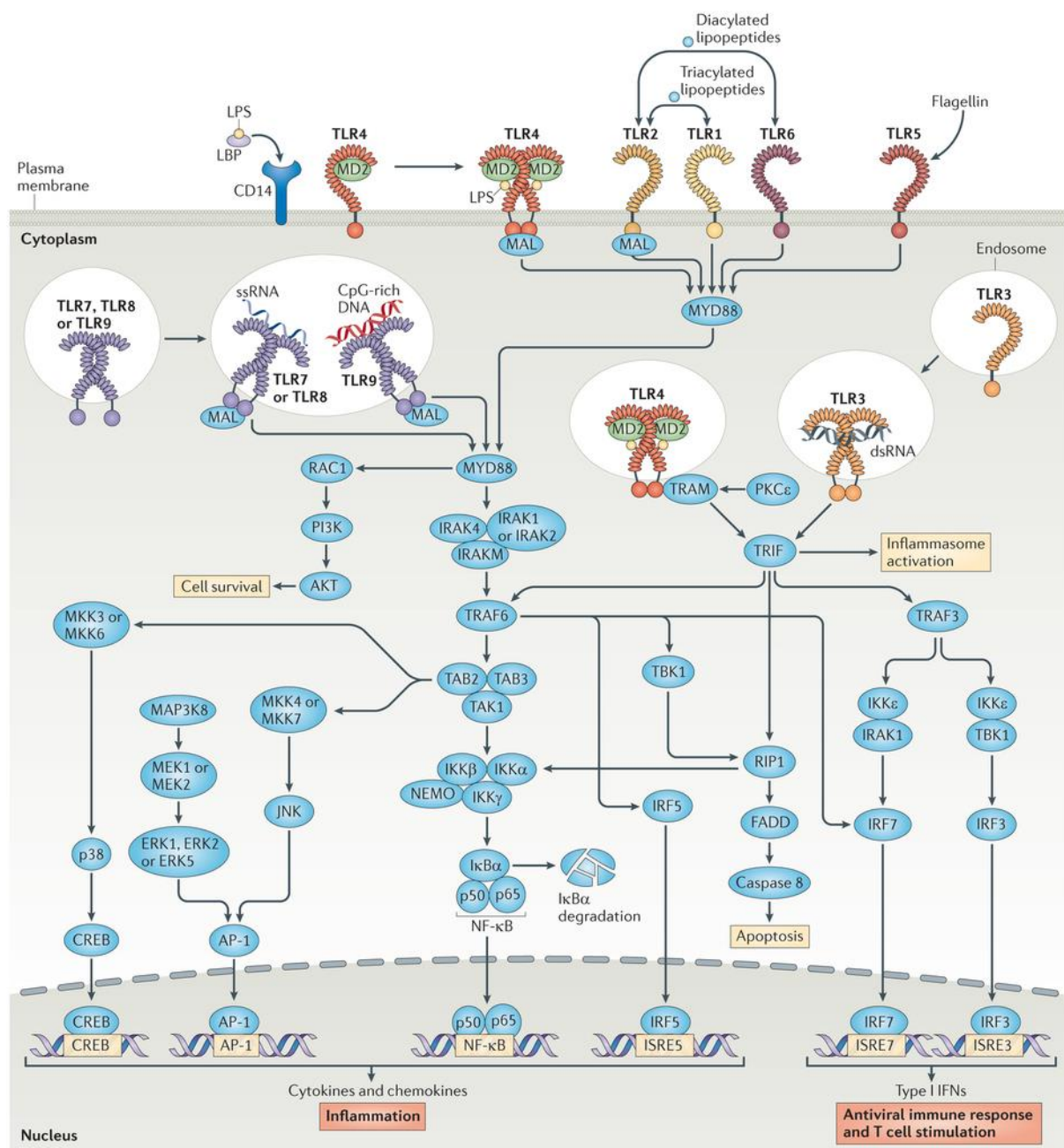


Figure 5 : Voies de signalisation des Toll-like receptors. Les TLR activent globalement deux voies de signalisation : la voie dépendante de MyD88 et la voie dépendante de TRIF.

AP-1 (activator protein 1), CREB (cAMP-responsive element-binding protein), dsDNA (ADN double brin), dsRNA (ARN double brin), ERK (extracellular signal-regulated kinase), FADD (FAS-associated death domain), IκBα (inhibitor of NF-κBα), IKK (inhibitor of NF-κB kinase), IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinase), IRF (interferon-regulatory factor), ISRE (interferon-stimulated response element), JNK (JUN N-terminal kinase), MAL (MyD88 adaptor-like protein), MAP3K (mitogenactivated protein kinase kinase kinase 8), MD-2 (myeloid differentiation factor 2), MEK (mitogen-activated protein kinase/ERK kinase), MKK (mitogenactivated protein kinase kinase), NEMO (NF-κB essential modulator), PI3K (phosphoinositide 3-kinase), PKCε (protein kinase Cε), RIP1 (receptor-interacting protein 1), ssRNA (ARN simple brin), TAB (TAK1-binding protein), TAK1 (TGFβ-activated kinase 1), TBK1 (TANK-binding kinase 1), TRAF (tumour necrosis factor receptor-associated factor), TRAM (TRIF-related adaptor molecule) [49].

a. Voie de signalisation dépendante de MyD88

MyD88 est la première molécule adaptatrice identifiée en 1990 [74]. Les études sur la signalisation en aval des TLR ont révélé que tous les TLR excepté TLR3, engagent l'adaptateur MyD88. Cependant, le recrutement de MyD88 peut être direct au niveau du domaine TIR du TLR, ou par l'intermédiaire d'autres molécules adaptatrices. C'est le cas de TLR4, des différents hétérodimères de TLR2 (TLR2/TLR1, TLR2/TLR6) et des TLR endosomaux (TLR7, TLR8, TLR9), qui nécessitent la molécule MAL (*MyD88 adaptator-like*) comme lien entre le TLR et MyD88 [41]. MyD88 recrute ensuite les membres d'une famille de protéines kinases, les IRAK (*IL-1R-associated kinases*), pour former le Myddosome. Ce complexe est composé de 6 copies de MyD88, 4 molécules de IRAK4 et 4 molécules de IRAK2 (**Figure 6**) [49]. Une fois le Myddosome formé, les kinases IRAK sont activées par phosphorylation puis interagissent avec TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), une protéine à activité E3 ligase qui met en œuvre sa propre ubiquitination. TRAF6 ubiquitiné est reconnu par deux composants régulateurs de la molécule TAK1 (*transforming growth factor* [TGF] β -activated kinase 1): TAB2 (*TAK1 binding protein*) et TAB3 (**Figure 5**). L'activation du complexe TAK1 permet d'initier la cascade de phosphorylation des différents membres de la voie des MAPK. TAK1 ainsi activé est responsable également de l'induction de la dégradation d'I κ B α (*inhibitor of NF- κ B α*) par l'intermédiaire de l'activation du complexe I κ K (*I κ B kinase*), aboutissant à la libération de NF- κ B et à sa translocation nucléaire [3]. L'activation des voies des MAPK et du facteur de transcription NF- κ B permet l'expression de cytokines inflammatoires.

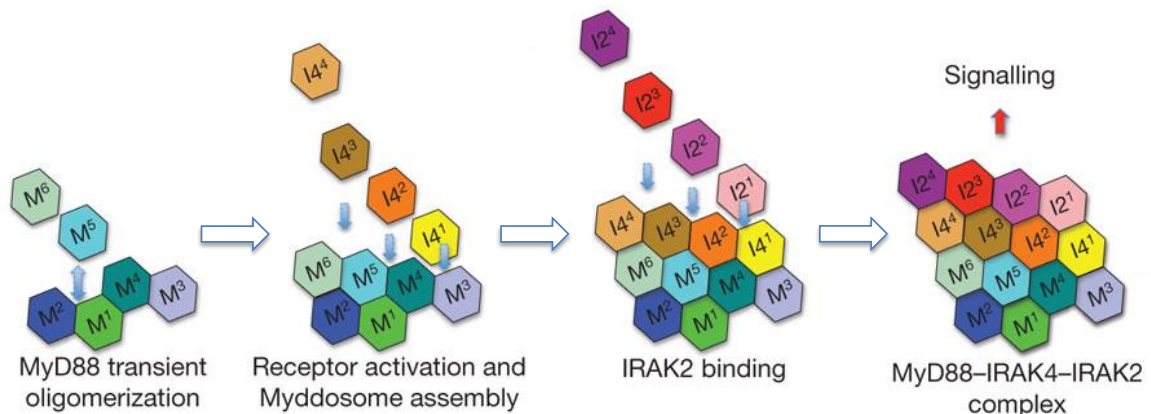


Figure 6 : Modèle d'assemblage du Myddosome après activation d'un Toll-like receptor. Après stimulation d'un TLR activant la voie dépendante de MyD88, la première molécule de MyD88 est recrutée et induit l'oligomérisation de 5 autres molécules de MyD88 (M¹ à M⁶). Les 4 molécules d'IRAK4 sont alors recrutées (I4¹ à I4⁴) et oligomérisent avec les molécules de MyD88. Finalement les 4 molécules d'IRAK2 sont recrutées (I2¹ à I2⁴) et oligomérisent avec les molécules de IRAK4 permettant la transduction du signal.

b. Voie de signalisation dépendante de TRIF

Une autre voie indépendante de MyD88 est associée à TLR3 et TLR4 [75]. Cette voie engage TRIF, qui est une molécule adaptatrice recrutée au niveau du domaine TIR, soit directement pour TLR3, soit assistée par TRAM (*TRIF related adaptor molecule*) pour TLR4 (**Figure 5**). TRIF interagit avec TRAF6 et RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) pour activer les voies des MAPK et NF- κ B de la même manière que la voie de signalisation dépendante de MyD88. Cependant TRIF collabore également avec TRAF3 qui active IKK ϵ (*inhibitor of NF- κ B kinase ϵ*) et TBK1 (*TRAF family member-associated NF- κ B activator-binding kinase 1*), tous deux responsables de la phosphorylation et ainsi de la translocation nucléaire d'IRF3 et d'IRF7. Cette voie permet ainsi l'expression des IFN de type I et principalement de l'IFN- β .

Il est désormais admis que suite à l'activation de TLR4 par le LPS, il y a mise en place d'une première réponse dépendante de MyD88 induisant l'activation précoce des voies des MAPK et NF- κ B, puis d'une seconde réponse dépendante de TRIF après endocytose de TLR4 et fixation de TRAM [3].

Choi *et al* ont observé une contribution de TRIF au cours de l'activation de TLR5 dans les cellules épithéliales intestinales. De plus, cette étude a mis en évidence que cette signalisation induisait non seulement l'activation des voies NF- κ B et des MAPK, mais également la dégradation de TLR5 via l'activation de la caspase-3 et la caspase-8 [76, 77]. Ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres équipes.

5. Régulation négative de l'activation des TLR

L'activation des TLR, comme tout phénomène proinflammatoire, peut avoir un impact néfaste sur l'homéostasie immunitaire. Il est donc nécessaire pour l'organisme de réguler la signalisation en aval de la stimulation des TLR [78]. Différents mécanismes sont mis en place pour contrôler les réponses dépendantes des TLR.

a. Régulation transcriptionnelle des voies de signalisation

ATF3 (*Activating transcription factor-3*) est rapidement exprimé après la stimulation des TLR. Ce facteur induit le recrutement d'une histone désacétylase au niveau du promoteur de différents gènes pro-inflammatoires. La condensation de l'ADN induite par cette enzyme réduit l'accès au promoteur pour les différents acteurs de la transcription [79]. Un des membres de la famille des I κ B, Bcl-3 (*B cell leukemia 3*), stabilise l'ubiquitination et la dégradation d'une des sous-unités de NF- κ B (sous-unité p50), réprimant ainsi la transcription

des gènes cibles de NF- κ B [80]. Une autre molécule, Zc3h12a, dégrade spécifiquement les ARNm de gènes codant l'IL-6 et l'IL-12p40 via son activité de dégradation de l'ARN [81]. Les ARN non codants (miRNA) ont également été caractérisés comme intervenant dans la régulation négative des voies TLR. Ces miRNA perturbent la traduction des ARNm cibles. miR-155 cible l'expression de MyD88, TAB2 et IKK ϵ tandis que miR-146a, induit après l'activation de TLR4, TLR2 et TLR5, inhibe la traduction de TRAF6 et IRAK1 [78, 82].

b. Régulation par dissociation des complexes de la signalisation

Certains facteurs déstabilisent les complexes formés par les molécules adaptatrices des TLR. C'est le cas de TAG (*TRAM adaptator with Golgi dynamics domain*), un homologue de TRAM exprimé au cours d'un traitement par le LPS, qui agit en tant que compétiteur de TRAM et régule l'activation de TLR4 dépendante de TRIF [83]. SARM (*Sterile α and armadillo-motif-containing protein*) joue un rôle similaire en se liant directement à TRIF [84]. MyD88s est une forme tronquée de MyD88 qui agit comme inhibiteur compétitif de MyD88 dans la formation du Myddosome et empêche ainsi la phosphorylation de IRAK4 [85, 86]. Certains PRR sont dotés de cette capacité régulatrice. C'est le cas de NLRX1 qui modifie l'ubiquitination de TRAF6 réprimant ainsi l'activation de la voie NF- κ B [87]. NLRC5 régule négativement la voie NF- κ B en inhibant la phosphorylation de IKK β [88].

c. Régulation par dégradation des éléments de la signalisation

La dégradation des différents composants de la signalisation représente un moyen de réguler l'activation des TLR. L'activation de Syk permet la phosphorylation de MyD88 et de TRIF menant ainsi à leur ubiquitination par CBL-B (*Casitas B-lineage lymphoma*) suivie de leur dégradation par le protéasome [89]. Deux membres de la famille des TRIM (*tripartite-motif containing*), exprimés au cours de la stimulation de divers TLR, sont désormais décrits pour leur activité régulatrice de la signalisation TLR : TRIM30 α et TRIM38 induisent la dégradation respectivement du complexe TAK1 et de TRAF6 [90, 91]. Les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 sont également soumis à une régulation de leur activation par leur dégradation par le protéasome. En effet, Pin1 (*peptidyl-prolyl isomerase*) cible directement la forme phosphorylée de IRF3 et promeut son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. IRF7 est directement ubiquitiné par RAUL (*replication and transcription activator-associated ubiquitin ligase*) réprimant ainsi la réponse IFN de type I associée à la stimulation TLR [92]. Ces mécanismes de dégradation irréversibles favorisent la terminaison de la réponse inflammatoire induite par l'activation des TLR.

VI. Pathologies infectieuses liées aux mutations génétiques des TLR chez l'Homme

Contrairement aux récepteurs des lymphocytes B (BCR) et T (TCR), impliqués dans la réponse adaptative, les gènes codant les PRR ne subissent pas de recombinaisons génétiques aléatoires et sont donc considérés comme invariables. Cependant des polymorphismes génétiques, sont apparus dans la population humaine et peuvent avoir un impact sur la fonction de ces récepteurs et par conséquent, sur la sensibilité aux infections.

1. Mutations associées au voies de signalisation des TLR

Des mutations affectant des médiateurs de la signalisation des TLR ont été associées avec le développement d'infections graves. En effet, des mutations abolissent la fonction de MyD88 et de IRAK4, et ainsi induisent un défaut dans la production de cytokines pro-inflammatoires après la stimulation des TLR. Ces patients sont alors très sensibles aux infections par *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et par certaines espèces de *Salmonella* [93-96]. Les conséquences de ces mutations sont surtout visibles chez les jeunes enfants avec une mortalité allant de 30% à 40% dans des pays où la médicalisation et les traitements antibiotiques sont accessibles. Cependant, ces patients deviennent plus résistants aux infections pendant l'adolescence. Finalement aucune étude n'a rapporté d'infections graves chez ces patients passés l'âge adulte, indiquant que le développement de l'immunité adaptative compense ce défaut d'immunité innée [93]. D'autres mutations affectent les molécules de l'axe TLR3-TRIF-TRAF3 responsable en grande partie de la détection des infections virales. Ces mutations induisent une sensibilisation aux infections virales par HSV-1 et principalement entre 3 mois et 6 ans [93]. Par ailleurs, une étude a décrit qu'un polymorphisme affectant la fonction de la molécule adaptatrice MAL était associé à une augmentation de la susceptibilité au développement de méningites et pneumonies par *M. tuberculosis* [97].

Tableau 2 : Description des polymorphismes associés au *Toll-like receptors* induisant une susceptibilité aux infections.

TLR	SNP	Changement d'acides aminés	Sensibilité aux infections
TLR1	A-7202G	promoteur	susceptibilité aux bactéries à Gram positif (sepsis) [98]
	G1805T	Ser 602 Ile	protection contre la lèpre [99] et la pyélonéphrite [100] association avec infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> [101]
	A743G	Asn 248 Ser	susceptibilité à la malaria au cours de la grossesse [102], à la tuberculose [103], aux infections par <i>Atopobium vaginae</i> [104] et aux aspergilloses [105]
TLR2	C2029T	Arg 677 Trp	susceptibilité à la lèpre [106] et à la tuberculose [107]
	G2258A	Arg 753 Gln	susceptibilité aux chocs septiques par <i>Staphylococcus</i> [108], à la tuberculose [109, 130], aux endocardites infectieuses [110] protection contre la maladie de Lyme [111]
	T597C	Asn 199 Asn	susceptibilité à la filariose par <i>Wuchereria bancrofti</i> [112] et aux méningites tuberculeuses [113]
	T1350C	Ser 450 Ser	susceptibilité à la filariose par <i>Wuchereria bancrofti</i> [112]
TLR3	C1660T	Pro 554 Ser	susceptibilité aux infections par Coxsakievirus B3 [114] résistance au VIH [115]
	C1235T	Leu 142 Phe	susceptibilité aux infections par HSV-1 [116]
TLR4	A1063G et C1363T	Asp 299 Gly et Thr 399 Ile	susceptibilité aux infections par RSV [117], à la malaria [118], aux aspergilloses invasives [119] et cavitaires [120], aux infections et choc septique par bactéries à Gram négatif [121, 122] protection contre les infections par <i>Legionella pneumophila</i> [123]
TLR5	C1174T	Arg 392 stop	susceptibilité aux infections par <i>Legionella pneumophila</i> [124]
TLR6	T745C	Ser 249 Pro	susceptibilité aux aspergilloses [105]
TLR7	A32C	Gln 11 Leu	immunosuppression plus rapide au cours d'infection du VIH [125]
TLR8	A1G	Met 1 Val	protection contre la progression du VIH [126] susceptibilité aux infections par le VHC [127]
	G129C	non-transcrit	susceptibilité à la tuberculose pulmonaire [128] et aux infections par le VHC [127]
TLR9	A1635G et G1174A	Pro 545 Pro et non-traduit	progression rapide de l'infection par le VIH [129]
	T1237C	promoteur	susceptibilité aux aspergilloses bronchopulmonaires [120]

2. Polymorphismes des TLR et des molécules associées

Les études des polymorphismes dues à la modification d'un seul nucléotide (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) dans les gènes des TLR ont mis en évidence de nombreuses associations avec la susceptibilité à certaines infections (**Tableau 2**).

Les premières études ont été réalisées sur les SNP A1063G et C1363T de TLR4, modifiant respectivement l'acide aspartique en position 299 en glycine, et la thréonine en position 399 en isoleucine. Des études ont permis de mettre en évidence que les patients présentant ces mutations étaient sensibles au développement de chocs septiques, aux infections par des bactéries à Gram négatif et aux infections bronchiques par le RSV chez l'enfant [111].

Un seul polymorphisme a été décrit comme associé à la sensibilité aux infections pour le TLR5 humain. Il s'agit du SNP C1174T qui remplace l'arginine en position 392 en un codon stop. Cette mutation est présente chez 10% des européens et peut atteindre 23% de certaines populations [93]. L'équipe d'Aderem a démontré que cette mutation affectant TLR5 était associée à une susceptibilité des patients nord-américains et européens aux infections par *Legionella pneumophila* [124]. Une étude plus récente a rapporté que les patients dont le génome contenait le SNP C1174T et recevant une transplantation allogénique de cellules souches, présentaient une augmentation des risques de développer une aspergillose invasive [131].

Des polymorphismes affectant les corécepteurs des TLR sont également associés à une susceptibilité aux infections. En effet, la mutation C1625G dans le promoteur du gène codant pour MD-2 induit une sensibilité accrue de ces patients au développement de sepsis [132].

Il est intéressant de noter que la plupart des sensibilisations aux maladies dues à ces mutations sont dépendantes de la population étudiée. Cela nous indique que ces susceptibilités ne sont pas uniquement dues à la mutation, mais à une association de facteurs (ethniques, environnementaux, habitudes alimentaires, niveau de médicalisation) et à l'absence d'une compensation biologique de ce défaut de l'immunité innée [93].

B. La flagelline, ses récepteurs innés et leur rôle dans l'immunité des muqueuses

Les muqueuses des mammifères constituent des interfaces entre l'organisme et le milieu extérieur et sont exposées à une quantité massive de micro-organismes, que ce soit le microbiote du tractus digestif pour la muqueuse gastro-intestinale ou encore les micro-organismes environnementaux pour la muqueuse respiratoire. Les récepteurs de la flagelline exprimés dans ces muqueuses jouent un rôle majeur dans la détection innée des micro-organismes et dans le maintien de l'homéostasie.

I. La flagelline, composant majeur du flagelle bactérien

Le flagelle est un organe lié à la capacité motrice de la bactérie. Il a également un rôle dans l'adhésion aux cellules de l'hôte, l'établissement de niches de colonisation et la mise en place de biofilms, caractérisant ainsi le flagelle bactérien comme un facteur de virulence [133-135]. Cet organe est constitué (i) d'un système de sécrétion nécessaire à l'assemblage, (ii) d'un corps basal qui permet d'ancrer la structure à la membrane bactérienne, (iii) d'un complexe moléculaire moteur permettant la rotation du flagelle, (iv) d'un crochet et (v) d'un filament coiffé d'une pointe (**Figure 7 A-B**) [136-138].

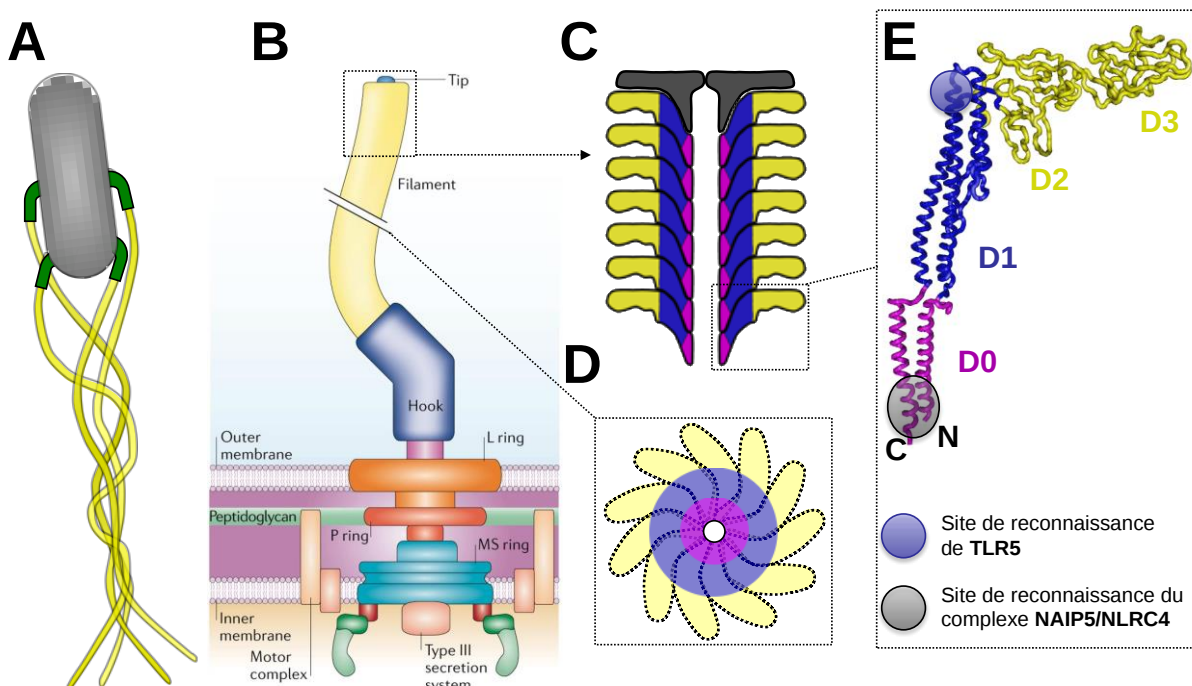


Figure 7 : Organisation structurale du flagelle bactérien et de la flagelline le constituant. (A) Représentation schématique du flagelle bactérien. (B) Structure du flagelle bactérien, ancré dans la membrane plasmique par un corps basal (composé d'un crochet [hook], d'un complexe moteur et d'anneaux [L, P, MS ring]), formé majoritairement d'un long filament et coiffé d'une pointe (tip) [137]. Représentation schématique d'une coupe longitudinale (C) et transversale (D) du filament composé d'une multitude de monomères de flagelline. (E) Modélisation tridimensionnelle de la flagelline constituée d'une région constante (domaines D0 et D1) et d'une région hypervariable (domaines D2 et D3). Les sites de fixation de TLR5 et du complexe NAIP5/NLRC4 sont indiqués respectivement par les zones bleues et noires [139].

Le filament représente la partie la plus imposante du flagelle bactérien puisqu'il peut atteindre 20 µm pour 20 nm de diamètre, et il est composé de la polymérisation d'une multitude de sous-unités protéiques identiques : la flagelline (30 000 à 70 000 monomères par flagelle) (**Figure 7 C-D**).

Les flagellines sont des protéines de taille variable (30 à 60 kDa en fonction des espèces) retrouvées chez de nombreuses espèces bactériennes. La flagelline de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium désignée FliC est composée de 494 acides aminés (52kDa) et est la plus utilisée dans les modèles d'activation de TLR5 (**Figure 7 E**). La structure tridimensionnelle de la protéine présente quatre domaines. Les domaines D0 et D1 sont composés de 170 acides aminés et sont formés principalement d'hélice- α . Ils constituent le corps interne du filament en liaison avec les autres domaines D0 et D1 des flagellines voisines. Ces deux domaines ont la particularité d'être très conservés chez différentes espèces bactériennes et ils contiennent les motifs nécessaires à la reconnaissance de la flagelline par ses récepteurs de l'immunité innée (TLR5 et NAIP/NLRC4) [140, 141]. Les domaines D2 et D3 représentent la partie hypervariable de la flagelline et sont formés majoritairement de feuillet- β . Contrairement aux domaines D0 et D1, la partie hypervariable n'est pas impliquée dans la signalisation, mais est responsable de la capacité à induire la production d'anticorps dirigés contre la flagelline [142].

II. Les récepteurs innés de la flagelline

La flagelline, en fonction de sa localisation, peut être reconnue par deux récepteurs distincts : TLR5 détecte la flagelline présente à la surface cellulaire et le complexe NAIP/NLRC4 s'associe à la flagelline présente dans le cytosol. L'activation de l'un ou de l'autre de ces récepteurs aboutit à des réponses biologiques différentes.

1. TLR5, le premier récepteur de la flagelline découvert

a. Reconnaissance de la flagelline par TLR5

L'équipe de Sztein a été la première à montrer que le flagelle de *S. enterica* sérovar Typhi pouvait activer des monocytes humains [143]. Des travaux complémentaires ont permis de mettre en évidence que le caractère proinflammatoire du flagelle bactérien était dû aux monomères de flagellines qui le composent [144]. En 2001, le groupe d'Aderem a démontré que le récepteur transmembranaire TLR5 était impliqué dans la reconnaissance de la flagelline. Cette étude a montré que des cellules exprimant TLR5 étaient activées *in vitro* par

le surnageant de cultures d'*Escherichia coli*, de *P. aeruginosa* et de *Listeria innocua*. Le fractionnement par chromatographie et l'analyse par spectrométrie de masse de ces surnageants ont permis d'identifier la flagelline monomérique comme agoniste de TLR5 et démontré qu'elle induisait une expression d'IL-6 dépendante de MyD88 chez la souris [62]. Cette observation a été confirmée en 2006 par la mise en évidence de l'absence de réponse proinflammatoire après stimulation par la flagelline chez des souris déficientes en TLR5 (*Tlr5*^{-/-}) [145]. L'utilisation de flagellines recombinantes mutées a permis de définir les résidus en positions 89 à 96 comme site de fixation de TLR5 [140]. Ces résidus sont différents chez certaines bactéries comme *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*, ce qui est suffisant pour éviter la reconnaissance par TLR5 [140]. Des études cristallographiques ont défini l'interaction d'une forme tronquée du TLR5 du poisson zèbre avec la flagelline de *S. enterica* sérovar Dublin et de *P. aeruginosa* (**Figure 8**) [63, 146]. Ces études ont caractérisé l'interaction physique du domaine D1 de la flagelline avec les différents LRR formant la partie extracellulaire de TLR5.

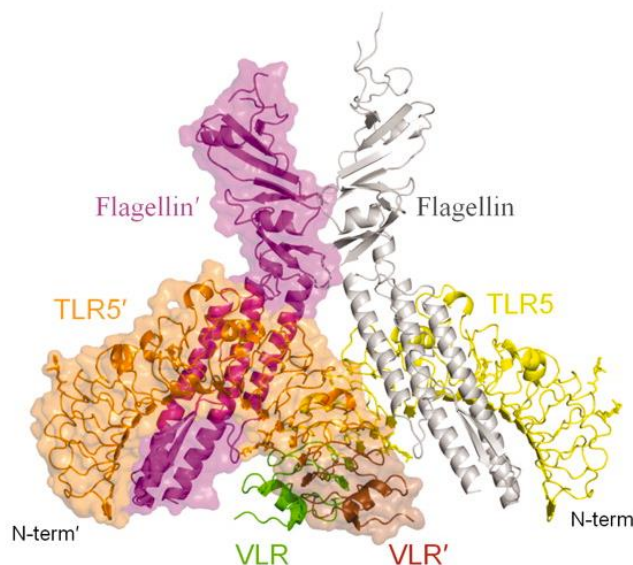


Figure 8 : Interaction entre Toll-like receptor 5 et la flagelline. Représentation cristallographique du domaine extracellulaire de TLR5 du poisson zèbre avec la flagelline de *Salmonella enterica* sérovar Dublin tronquée de son domaine D0 [63].

TLR5 est exprimé par les cellules structurales et hématopoïétiques. Initialement, les travaux de l'équipe de Gewirtz ont permis de localiser l'expression de TLR5 à la surface basolatérale de cellules épithéliales intestinales T84 [147]. Cependant, des études ont également montré l'expression apicale de TLR5 par des cellules intestinales [148-150]. En ce qui concerne la muqueuse respiratoire, une étude sur des cellules bronchiques polarisées *in vitro* a démontré que la stimulation basolatérale de TLR5 activait son expression à la surface apicale [151]. Une autre étude plus récente utilisant des biopsies humaines a décrit l'expression de TLR5 par les cellules épithéliales bronchiques au niveau de la membrane basolatérale. De plus, cette même étude a localisé l'expression de TLR5 à la surface apicale des pneumocytes de type II, corrélant avec leur importance dans le contrôle des infections [152, 153]. Les cellules endothéliales expriment aussi TLR5 et sont activées par la stimulation de ce récepteur [154].

L'expression de TLR5 par les cellules hématopoïétiques a été caractérisée chez la souris puis chez l'Homme. Une étude d'Akira a mis en évidence chez la souris une expression de TLR5 par les cellules dendritiques résidant dans la *lamina propria* intestinale [155]. Les monocytes provenant de la rate, de la circulation sanguine et de la moelle osseuse, ainsi que les cellules dendritiques spléniques expriment également TLR5 [156]. De plus, les PNN murins ont été décrits comme exprimant TLR5 mais semblent être insensibles à la flagelline [156]. Chez l'Homme, les macrophages et notamment les macrophages alvéolaires, les PNN ainsi que les monocytes sont connus pour exprimer TLR5 [152, 157-160].

b. Activité biologique de la flagelline dépendante de la reconnaissance par TLR5

La stimulation de TLR5 par la flagelline, induit une réponse engageant MyD88 (**Figure 9 A**). Cependant les réponses immunitaires mises en place par l'activation de TLR5 dépendent des cellules stimulées. Une étude a mis en évidence en 2006 cette disparité de réponse via l'utilisation de souris chimères, exprimant TLR5 par les cellules radiorésistantes (cellules structurales) ou par les cellules hématopoïétiques. Ces travaux ont démontré que la stimulation systémique de TLR5 induit une réponse proinflammatoire nécessitant l'expression de TLR5 par cellules hématopoïétiques. Toutefois, la stimulation de la muqueuse respiratoire par une instillation intranasale de flagelline requiert l'expression de TLR5 par les cellules hématopoïétiques et par les cellules radiorésistantes pour induire la réponse immunitaire innée [145].

Depuis, des études ont caractérisé les différences d'activités biologiques en fonction du type cellulaire exprimant TLR5 (**Figure 9 B-C**). Tout d'abord, la stimulation du TLR5 des cellules structurales dans les muqueuses se traduit par l'expression de chimiokines comme l'IL-8, CCL2, CCL20, CXCL1, CXCL2 et CXCL5. Ces dernières possèdent une activité chimioattractante permettant le recrutement de cellules immunitaires effectrices comme les PNN et les monocytes. Ainsi, l'instillation intranasale de flagelline stimule TLR5 exprimé par les cellules radiorésistantes, induit une infiltration massive de PNN au sein de la muqueuse respiratoire et permet de protéger contre les infections respiratoires [161-163]. La stimulation de l'épithélium par la flagelline a également été caractérisée par la production de métalloprotéases (MMP3, MMP13) jouant un rôle dans le remodelage tissulaire et les phénomènes de maintien de l'homéostasie tissulaire [164]. De plus, la flagelline induit une réponse anti-apoptotique et la production de composés antioxydants par les cellules épithéliales protégeant d'infections intracellulaires et de stress physiques [165-167]. Finalement la stimulation de cellules épithéliales intestinales par la flagelline *in vitro* démontre la production de composés antimicrobiens comme la β -défensine 2, sous la dépendance de l'activation de la voie NF- κ B [168]. Une analyse transcriptomique d'explants de cellules épithéliales de trachées humaines cultivées en monocouche ou en interphase air/liquide, stimulées *in vitro* par la flagelline, a récemment confirmé l'expression chez l'Homme des composés observée dans les études chez la souris [169] (**Figure 9 B**).

La stimulation par la flagelline des cellules hématopoïétiques de la lignée myéloïde (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) est caractérisée par l'induction de l'expression de cytokines inflammatoires comme le TNF, l'IL-6 et la sous-unité β de l'IL-12 (IL-12p40) [170-172]. Les cellules dendritiques CD103⁺CD11b⁻ de la *lamina propria* intestinale sont directement stimulées par la flagelline et produisent rapidement l'IL-23. Cette cytokine, en collaboration avec l'IL-6 et l'IL-1 β , active les ILC de type 3 (ILC3) qui synthétisent une grande quantité d'IL-22, cytokine désormais reliée à la protection des muqueuses (**Figure 9 C**) [164, 173]. Cette réponse n'est pas restreinte à l'intestin puisque nous avons récemment décrit l'activation des ILC3 pulmonaires par la stimulation par la flagelline [174].

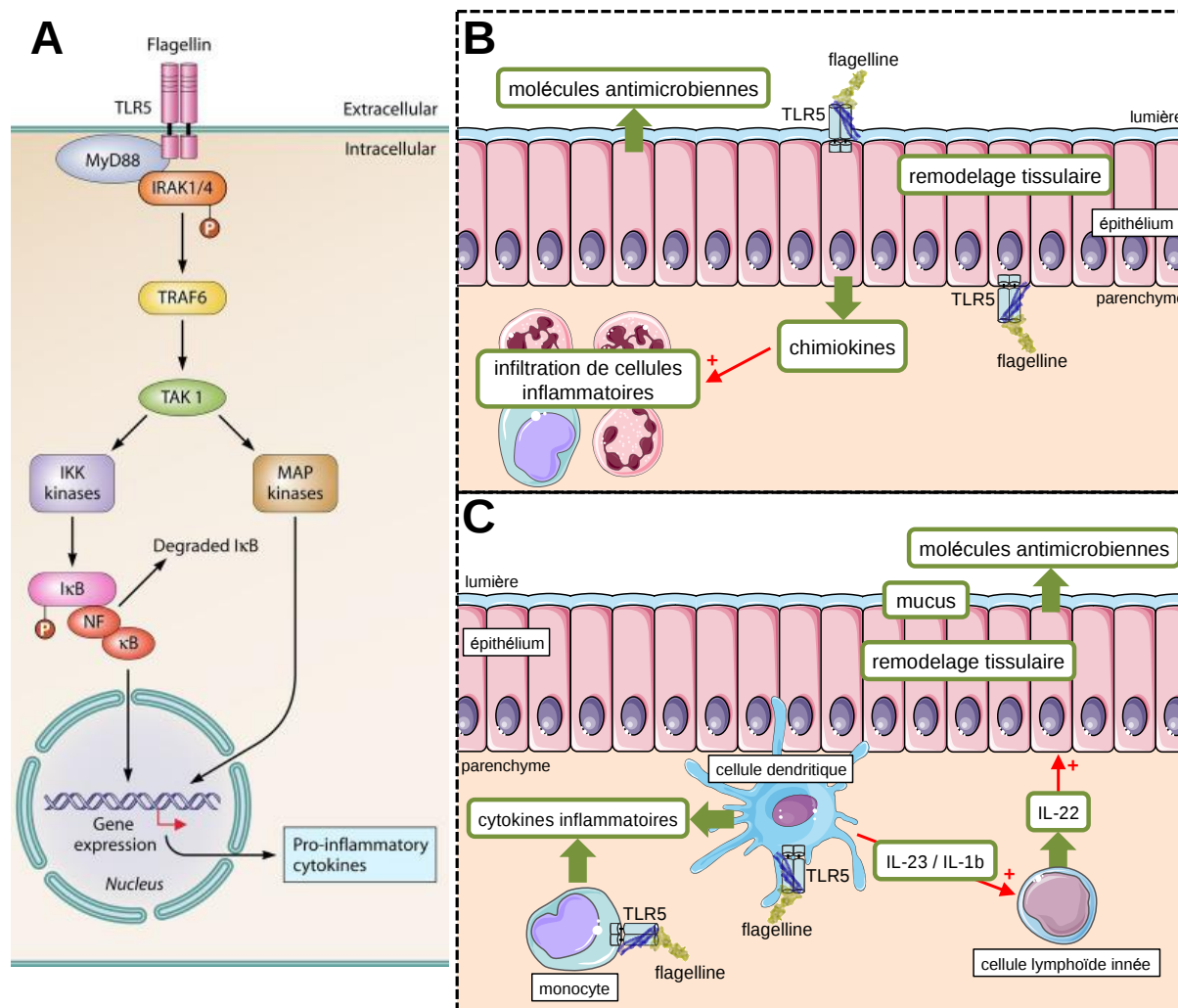


Figure 9 : Stimulation de Toll-like receptor 5 par son ligand la flagelline et son activité sur l'immunité innée des muqueuses. (A) Voie de signalisation induite par la reconnaissance de la flagelline par TLR5. MyD88, IRAK1/4, TRAF6, IKK kinases, MAP kinases, IκB, NF-κB [175]. (B) L'activation épithéliale de TLR5 par la flagelline induit la production épithéliale de chimiokines, de molécules antimicrobiennes et de facteurs assurant le remodelage du tissu. (C) L'activation de TLR5 des cellules myéloïdes induit l'expression de cytokines permettant l'activation des cellules lymphoïdes innées et ainsi la production d'IL-22 responsable de la stimulation épithéliale des mécanismes de défense innée.

Une étude récente confirme la compartimentation de la réponse TLR5 via l'utilisation de mutants conditionnels de souris [176]. Les souris dont les cellules intestinales épithéliales sont déficientes en TLR5 ($Tlr5^{\Delta IEC}$) présentent une diminution de l'expression de chimiokines, une altération de la flore bactérienne intestinale, une diminution de l'espace entre la flore bactérienne et l'épithélium intestinal, suggérant un défaut dans la production de mucus ou de molécules antimicrobiennes. D'autre part, la déficience en TLR5 des cellules dendritiques chez les souris $Tlr5^{\Delta DC}$ réduit l'expression d'IL-22 et d'IL-23, modifie la flore bactérienne et son interaction avec l'épithélium. Cette étude suggère donc que l'activation de TLR5 des cellules hématopoïétiques et structurales peut aboutir à des mécanismes immunitaires similaires (**Figure 9 B-C**) [176].

2. Le complexe NAIP/NLRC4, pour la reconnaissance intracellulaire de la flagelline

a. Reconnaissance de la flagelline et activation du complexe NAIP/NLRC4

Le récepteur cytosolique NLRC4 a été associé à la reconnaissance des bactéries flagellées en 2004. Ainsi, des souris déficientes pour NLRC4 présentaient une réduction drastique de l'activation de la caspase-1 et de la production d'IL-1 β dans un modèle d'infection par *S. Typhimurium* [177]. Par la suite, l'activation de la caspase-1 par NLRC4 avec la détection intracellulaire de la flagelline de *S. Typhimurium* [178]. Des études ont confirmé le mécanisme de détection intracellulaire de la flagelline avec d'autres bactéries pathogènes comme *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* ou *L. monocytogenes* [179-181].

En comparant deux souches de souris dont les macrophages sont sensibles (souris A/J) ou résistants (souris C57BL/6J) à l'infection intracellulaire par *L. pneumophila*, le mécanisme moléculaire d'interaction a pu être précisé. La susceptibilité des souris A/J a été associée avec une mutation de NAIP5, l'un des sept NAIP exprimés chez la souris (un seul NAIP est exprimé chez l'Homme) [182, 183]. La création de souris déficientes en NAIP5 a permis de confirmer l'implication de ce composé, au même titre que NLRC4, dans l'activation de la caspase-1 par la flagelline [184]. Deux études publiées ont finalement mis en évidence les mécanismes biochimiques nécessaires pour l'interaction directe de la flagelline avec NAIP5, lui-même se liant à NLRC4 [185, 186].

Différents modèles incluant des bactéries exprimant une flagelline mutée ou des flagellines recombinantes modifiées, ont mis en évidence que les 35 acides aminés de l'extrémité C-terminale de la flagelline étaient nécessaires et suffisants pour l'activation de l'inflammasome NLRC4. Cela a été notamment démontré par l'absence d'activation de l'inflammasome de macrophages provenant de souris *Naip5*^{-/-} par ces 35 acides aminés [184]. Une seconde étude a confirmé la capacité du motif en C-terminal à induire la formation du complexe NAIP5/NLRC4. Cependant cette étude rapporte que les 52 acides aminés en N-terminal contiennent un motif participant également à l'activation de l'inflammasome [141]. Ces études démontrent donc l'importance du domaine D0, qui est composé des parties N-terminale et C-terminale, dans la stimulation du complexe NAIP5/NLRC4. De manière intéressante, une étude récente a mis en évidence que la reconnaissance de la flagelline par NAIP5 était indépendante de son LRR, rompant ainsi le dogme selon lequel les régions LRR seraient le domaine « sensoriel » des NLR [187].

Les diverses études sur les interactions entre la flagelline, NAIP5 et NLRC4 ont permis à Halff *et al.* de proposer un modèle d'assemblage du complexe dans lequel la reconnaissance de la flagelline par NAIP5 induit un changement conformationnel de NAIP5 qui, ainsi modifié, interagit avec NLRC4 (**Figure 10 A**). L'association de NAIP5 et NLRC4 recrute ensuite plusieurs copies de NLRC4 pour former un complexe circulaire en anneau dans lequel les molécules de la signalisation sont mobilisées pour exercer leurs activités biologiques [141, 187-189].

b. Signalisation et activité biologique dépendante de la stimulation du complexe NAIP/NLRC4 par la flagelline

La stimulation et l'assemblage du complexe flagelline-NAIP-NLRC4 permet l'activation de la caspase-1 et aboutit à deux phénomènes biologiques distincts mais qui agissent en collaboration (**Figure 10 B**). Tout d'abord la caspase-1 activée permet, grâce à son activité protéasique, la maturation de l'IL-1 β et de l'IL-18 qui présentent un fort potentiel inflammatoire et activateur de certaines cellules effectrices de l'immunité [190-192]. Le recrutement des PNN par l'IL-1 β et l'IL-18 a été proposé comme étant important dans le contrôle de l'infection à *S. Typhimurium* [193]. En parallèle, l'activation de l'inflammasome NLRC4 induit un phénomène de mort cellulaire non apoptotique, la pyroptose, chez les cellules hématopoïétiques et principalement les macrophages. La pyroptose libère non-seulement l'IL-1 β et l'IL-18, mais également les formes pro-IL-1 β et pro-IL-18 dont la maturation est réalisée par les protéases extracellulaires apportées par les PNN et les mastocytes. Ce phénomène assure une amplification de l'inflammation [192].

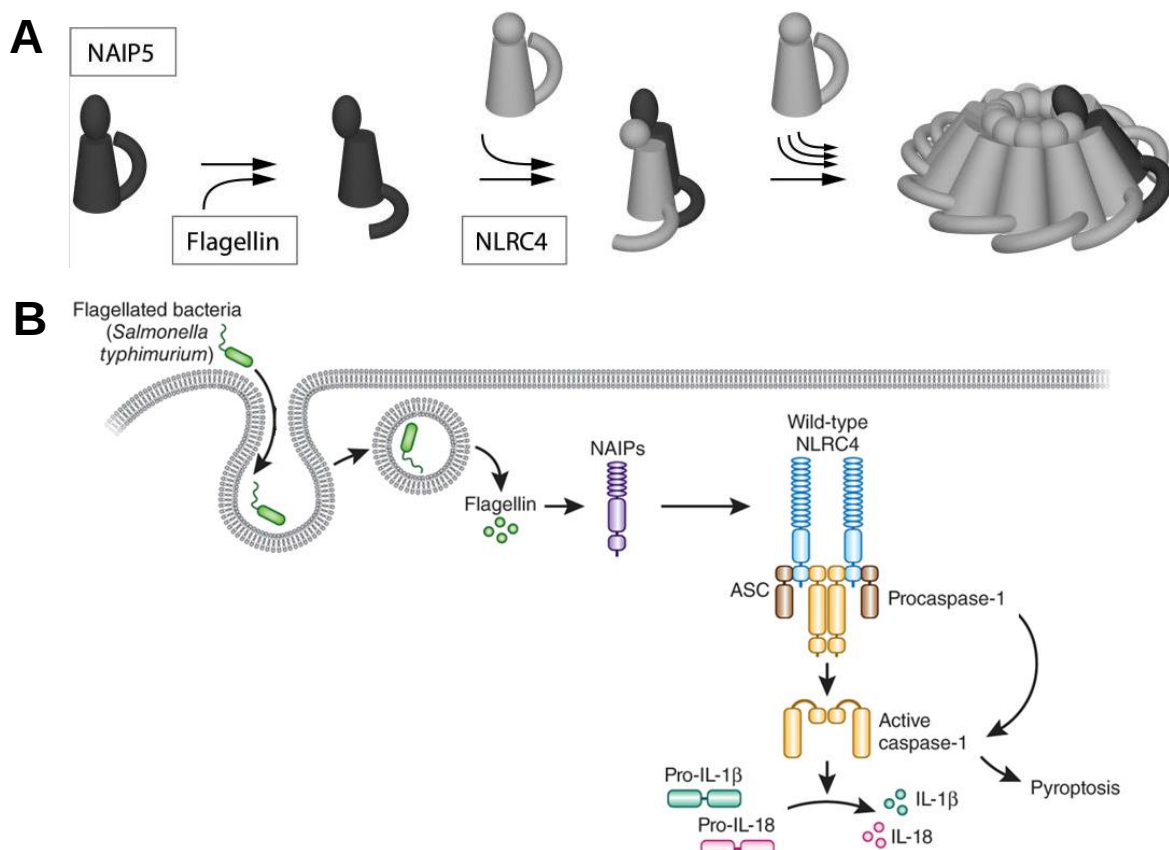


Figure 10 : Modèle d'activation du complexe de reconnaissance de la flagelline cytosolique. (A) Modélisation des étapes de formation du complexe NAIP5/NLRC4 chez la souris. La reconnaissance de la flagelline par NAIP5 induit une modification conformationnelle de NAIP5, permettant son interaction avec NLRC4. L'association NAIP5/NLRC4 permet le recrutement d'autres molécules de NLRC4 afin de former un complexe circulaire capable de recruter les molécules nécessaires à la suite de l'activation (ASC et la pro-caspase-1). Schéma adapté des travaux de Halff *et al.* [141]. (B) Représentation schématique du complexe cytosolique reconnaissant la flagelline intracellulaire. Après la phagocytose d'une bactérie flagellée, telle que *S. Typhimurium*, la flagelline intracellulaire est reconnue par NAIP et permet l'activation du complexe NLRC4 qui recrute et active ASC et la pro-caspase-1. La caspase-1 ainsi activée exerce son activité protéolytique sur les précurseurs des cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-18. L'activation de la caspase-1 permet également l'induction du phénomène de pyroptose pour certaines cellules. Schéma adapté de l'article de Khameneh et Mortellaro [194].

La pyroptose permet la libération extracellulaire des bactéries phagocytées afin qu'elles soient éliminées par les PNN et les radicaux oxygénés présents dans l'environnement de la cellule morte [195]. Une étude récente a mis en évidence que la caspase-1 clivait la gasdermine, dont l'activité est responsable de l'induction de la pyroptose macrophagique [196].

Depuis la découverte de NLRC4, des études ont mis en évidence le rôle du complexe flagelline-NAIP-NLRC4 dans des infections *in vitro* et *in vivo* par des pathogènes intracellulaires tels que *L. monocytogenes*, *L. pneumophila* et *S. enterica* [181, 195, 197-201].

C. Les TLR comme cibles thérapeutiques dans des approches anti-infectieuses

Au 19^{ème} siècle, William Coley a identifié l'activité antitumorale d'une répétition d'injections de toxines provenant de bactéries tuées (*Streptococcus pyogenes* et *Serratia marcescens*) [202]. Il s'est avéré que l'activité antitumorale de la toxine de Coley provenait du LPS et d'ADN de la préparation bactérienne [203].

L'étude des TLR a permis d'envisager de nouvelles stratégies de prévention et de traitement de pathologies comme les cancers, les maladies inflammatoires et les maladies infectieuses. Ces stratégies visent pour certaines à cibler l'activation de TLR via l'utilisation d'agonistes, et pour d'autres à bloquer l'activité de ces récepteurs en utilisant de molécules antagonistes ou d'anticorps.

I. TLR7 et TLR8

A l'heure actuelle, l'imiquimod (Aldara™, 3M Pharmaceuticals), reconnu par TLR7 et TLR8, est le seul agoniste de TLR approuvé pour le traitement de pathologies humaines (**Figure 11**). En 1997, l'imiquimod a été autorisé pour le traitement par voie cutanée de verrues ano-génitales causées par le papillomavirus. Depuis, l'indication de l'imiquimod a été élargie au traitement des kératites actiniques et des carcinomes basocellulaires [204]. Des études cliniques ont démontré une activité de l'imiquimod sur le traitement d'autres lésions comme les verrues planes, les verrues plantaires et les papillomes malpighiens dues au papillomavirus [205-207]. Au cours d'une étude clinique de phase II, l'imiquimod s'est révélé efficace dans le traitement de verrues cutanées récurrentes [208]. Les études sur les modèles animaux ont décrit une activité antivirale contre le HSV, le CMV, le virus Influenza, le virus *West Nile* et le virus de la fièvre jaune [204, 209-211].

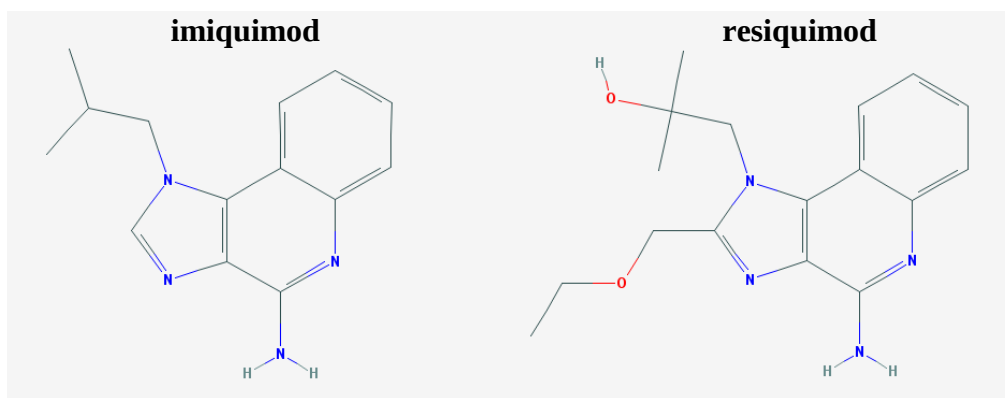


Figure 8 : Représentations structurales de l'imiquimod et du resiquimod, agonistes de TLR7 et TLR8.

Le resiquimod est un autre agoniste de TLR7 et TLR8 largement étudié (**Figure 11**). Sa capacité à induire la synthèse de cytokines inflammatoires comme l'IFN- α , l'IL-12 et le TNF par les cellules dendritiques et les macrophages, est décrite comme plus importante que celle de l'imiquimod [212]. De plus, son application chez l'Homme montre un effet thérapeutique sur la récurrence de l'herpès génital et des études chez l'animal soulignent son activité contre les infections par HSV [213, 214]. Cependant un essai clinique de phase IIa rapporte des effets secondaires importants malgré une efficacité antivirale [215].

D'autres composés agonistes de TLR7 et TLR8 sont actuellement en cours d'études cliniques pour leurs diverses activités. Le composé ANA773 (Anadys Pharmaceuticals) induit la production importante d'IFN de type I et son utilisation chez des patients présentant une infection chronique par le virus de l'hépatite C (VHC) induit une réduction du taux de virus dépendant de la dose d'ANA773 [216]. Une autre molécule, CL097, restaure la production de cytokines proinflammatoires par les cellules dendritiques myéloïdes provenant de patients infectés par le VIH [217].

II. TLR9

La stimulation des pDC par les agonistes de TLR9 produit une grande quantité d'IFN de type I, cytokines inhibant la réplication virale et activant l'immunité innée et adaptative. Ainsi, plusieurs agonistes de TLR9 sont à l'étude, notamment pour leur activité immuno-modulatrice, dans le traitement des infections virales chroniques par le VHC. Des essais cliniques de phase I ont été réalisés démontrant l'activité antivirale de l'agoniste CPG10101 (ACTILON, Coley Pharmaceuticals/Pfizer) chez des patients atteints d'infections chroniques par le VHC, sans effets secondaires importants [218]. De plus les patients ont montré une bonne tolérance à l'utilisation de CPG10101 à forte dose [219]. Un essai de phase II étudie l'efficacité de la molécule sur des sujets infectés par le VHC de génotype 1 [220]. Un autre agoniste de TLR9, SD-101, a été testé seul ou combiné à la ribavirine dans un essai clinique de phase Ib anti-VHC. Les résultats indiquent que SD-101 induit une diminution importante de la charge virale associée à l'induction de gènes antiviraux dépendant des IFN de type I [220]. Enfin, le composé MGN1703, principalement étudié dans des études cliniques pour ses propriétés antitumorales, est actuellement testé en phase I/II comme traitement contre le VIH [221].

Des études chez l'animal démontrent des résultats prometteurs quant à l'utilisation de CpG dans différents modèles de sepsis, mais à l'heure actuelle, aucun essai clinique n'est en cours pour traiter ce type de pathologie chez l'Homme [222-224].

L'activation de TLR9 par ses agonistes a également démontré des capacités stimulatrices de l'immunité adaptative dans des modèles murins [204]. Depuis, des essais sont en cours chez l'Homme et présentent des résultats encourageants avec le CpG7909 utilisé comme adjuvant dans des vaccins dirigés contre la malaria, les infections par le virus Influenza et les hépatites virales chez les patients infectés par le VIH [225-228]. D'autres agonistes de TLR9 sont également à l'étude en tant qu'adjuvants dans le développement de vaccins thérapeutiques contre le VIH [204].

III. TLR3

Le rintatolimod (Ampligen[®], Hemispherx Biopharma), dérivé du polyI:C, a été développé pour le traitement de diverses infections (**Figure 12**). Malgré des résultats prometteurs observés *in vitro* sur des cellules infectées par le VIH, l'étude clinique de phase I cherchant à évaluer l'effet du rintatolimod sur des sujets infectés n'a jamais abouti [229]. Les résultats les

plus prometteurs du rintatolimod sont observés lorsqu'il est combiné en tant qu'adjuvant avec le vaccin antigrippal FluMist[®] (MedImmune) qui contient le virus Influenza H5N1 vivant atténué. La combinaison a démontré de bonnes capacités protectrices contre des infections de différentes souches du virus Influenza [230]. Cette observation a mené à la mise en place d'un essai clinique de phase I/II visant à déterminer l'innocuité et l'immunogénicité de la combinaison vaccinale.

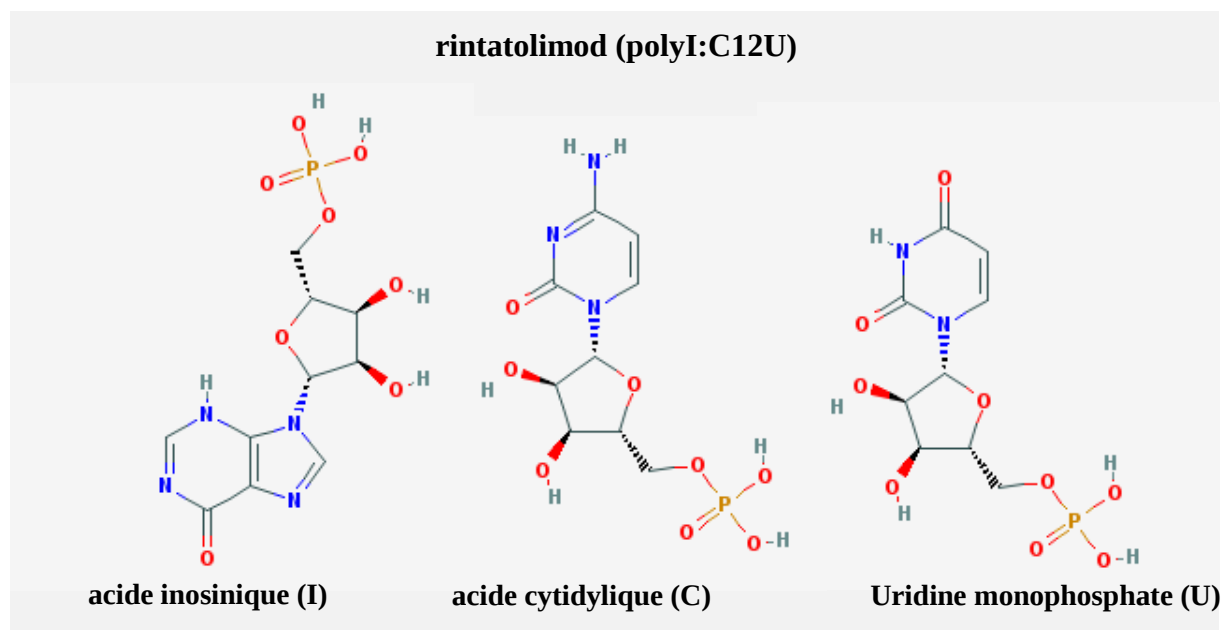


Figure 9 : Représentations structurales des composés formant le rintatolimod (polyI:C12U), agoniste de TLR3. Le rintatolimod représente une structure double brins (un premier brin composé d'acide inosinique [I] et un second brin hétéromère composé d'acide cytidylique [C] et d'uridine monophosphate [U]).

Chez la souris, le traitement par le polyI:C ou ses dérivés protège contre des infections par le VIH, le virus de l'hépatite B, le virus coxsackie B3, certains flavivirus, mais également contre des infections bactériennes, notamment contre *P. aeruginosa* [231, 232].

IV. TLR4

Une signalisation incontrôlée de TLR4 est associée au choc septique lors de la dissémination des bactéries à Gram négatif pathogènes. L'inhibition de l'interaction du LPS avec TLR4 ou de la signalisation en aval s'avère être une approche potentielle dans le traitement du sepsis. Le développement d'antagoniste du lipide A, composant toxique du LPS, a débuté bien avant la découverte de TLR4. L'utilisation dans les années 1990 du E5531, un antagoniste du lipide A dérivé de *Rhodobacter capsulatus*, a démontré une protection lors d'une infection systémique par *E. coli* chez la souris [233]. Une étude chez des sujets sains volontaires a rapporté que cet antagoniste inhibait l'apparition de symptômes suite à l'injection de LPS [234]. Cependant des problèmes de biodisponibilité du E5531 ont stoppé le développement thérapeutique. L'eritoran (E5564, Eisai) est un autre composé dérivé du lipide A de *Rhodobacter sphaeroides* qui a été testé chez l'homme comme antagoniste de TLR4 (**Figure 13**) [235]. Une première étude de phase I a montré chez des sujets sains volontaires traités par du LPS un effet inhibiteur de l'eritoran sur la production cytokinique et sur les symptômes. Ces résultats encourageants ont été immédiatement suivis par le développement de nouveaux essais cliniques de phase II et III sur des patients atteints de sepsis sévères. Ces essais cliniques n'ont montré aucun effet thérapeutique entre les patients traités par l'eritoran et les patients ayant reçu le placebo [236]. Des études récentes suggèrent qu'un repositionnement de l'eritoran dans une nouvelle indication thérapeutique est envisageable. En effet, un effet thérapeutique de l'eritoran a été démontré contre des infections virales *in vitro* et dans des modèles murins [237, 238].

Un autre antagoniste de TLR4, le resatorvid (TAK-242, Takeda Pharmaceuticals) a montré des capacités protectrices *in vivo* dans des modèles de sepsis [239, 240] (**Figure 13**). Les études de phase III qui ont été réalisées sur des patients atteints de sepsis sévères n'ont pas démontré d'efficacité du traitement.

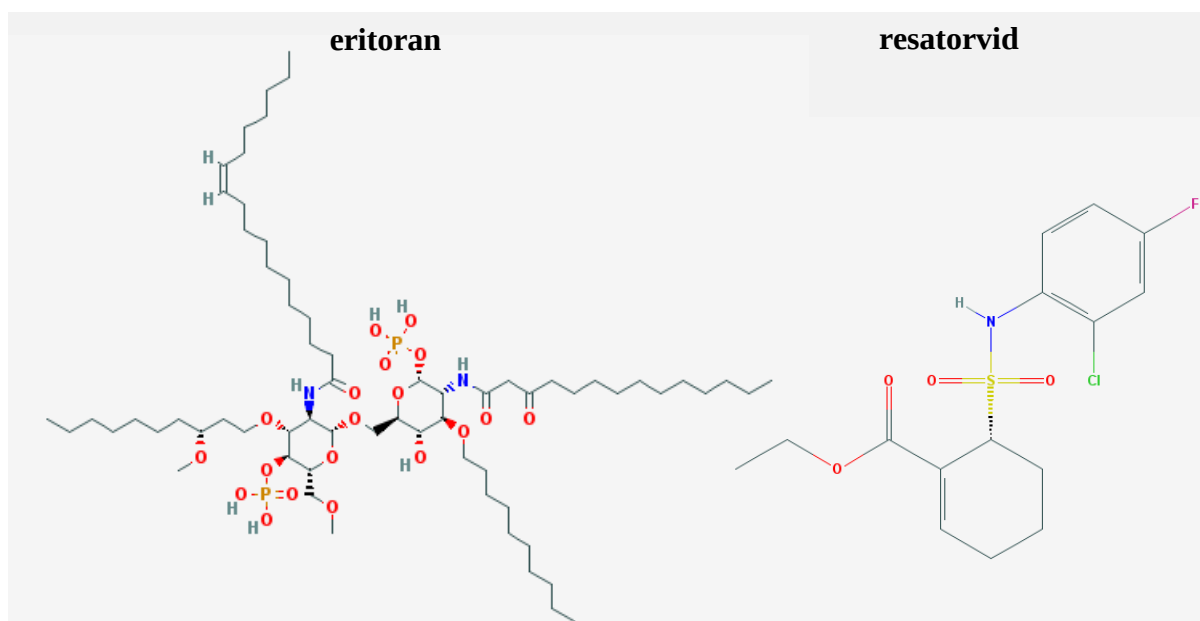


Figure 10 : Représentations structurales de l'eritoran et du resatorvid, antagonistes de TLR4.

L'utilisation des anticorps monoclonaux dirigés contre TLR4 ou le complexe TLR4/MD-2 a démontré des effets prometteurs contre le sepsis dans des modèles animaux [241-244]. Actuellement une étude de phase I caractérise l'innocuité d'un traitement avec un anticorps monoclonal dirigé contre TLR4 (NI-0101, NovImmune) sur des sujets sains volontaires.

A l'inverse, la stimulation du TLR4 a été établie comme un atout dans les stratégies vaccinales. En effet, le MPL (*Monophosphoryl lipid A*), ligand de TLR4 dérivé du lipide A de *Salmonella minnesota* et significativement moins toxique que le LPS, est approuvé par l'EMA (*European Medicines Agency*) et par la FDA (*Food and Drug Administration*) comme adjuvant d'un vaccin de l'Hépatite B (Fendrix[®], GlaxoSmithKline) et d'un vaccin dirigé contre des souches du papillomavirus responsables de cancers du col de l'utérus (Cervarix[™], GlaxoSmithKline).

V. TLR2

L'inhibition de TLR2 au cours du sepsis est également étudiée comme stratégie thérapeutique. Des études précliniques ont montré que l'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisant TLR2 protègent des chocs septiques [243, 245, 246]. Une étude clinique de phase I a déterminé récemment la dose effective de cet anticorps nécessaire au blocage de TLR2 chez des sujets volontaires sains [247].

Différents agonistes de TLR2 ont démontré des effets protecteurs dans des modèles animaux d'infections bactériennes, virales ou parasitaires [248-253]. A ce jour, aucun essai clinique utilisant un agoniste de TLR2 n'a été proposé dans des approches anti-infectieuses.

VI. TLR5

L'entolimod (CBLB502, Cleveland Biolabs) est une molécule dérivée de la flagelline de *S. Dublin* tronquée des résidus 177 à 401 [254]. Les études précliniques et cliniques utilisant l'entolimod ont principalement décrit des effets antitumoraux [254-258]. Par ailleurs, des études chez l'animal ont montré que l'agoniste de TLR5 possédait des propriétés radioprotectrices, notamment contre les irradiations γ [167, 254, 259, 260]. Actuellement, les autorités nord-américaines montrent un intérêt pour les molécules radioprotectrices en cas d'attaques terroristes ou d'accidents nucléaires. Compte tenu du contexte international actuel, une demande de préapprobation d'urgence de l'entolimod a été déposée à la FDA par la société Cleveland Biolabs en 2014.

La flagelline peut être également utilisée comme adjuvant vaccinal. Des fusions protéiques entre la flagelline de *Salmonella* et l'ectodomaine de la protéine de matrice 2 ou l'hémagglutinine du virus Influenza A (VAX102, VAX125, VAX128, VaxInnate) démontre une forte immunogénicité contre la grippe saisonnière chez l'Homme [261-264]. La même équipe a récemment publié des résultats *in vitro* et *in vivo* prometteurs pour le développement de ces vaccins antigrippaux appliqués au virus Influenza B [265]. Par ailleurs, la flagelline est actuellement testée comme adjuvant dans des études précliniques dans le cadre du développement de nombreux vaccins [266].

Le rôle anti-infectieux de la flagelline n'a été démontré à ce jour que dans des modèles animaux (**Tableau 3**). Une première étude a montré en 2006 qu'une souche non flagellée de *S. Typhimurium* était capable d'échapper aux défenses immunitaires innées de l'organisme et induisait l'apoptose des macrophages *in vivo*. Cette souche présentait alors une pathogénicité plus élevée chez la souris qu'une souche flagellée de *S. Typhimurium*. De façon remarquable, l'administration de flagelline recombinante a permis d'améliorer la clairance et la survie lors d'une infection intestinale par la souche non flagellée de *S. Typhimurium* [165, 167].

Tableau 3 : Modèles infectieux pour lesquels l'administration de flagelline a démontré une activité protectrice.

Pathogènes / infections	Voie d'administration de la flagelline	Références
<i>Salmonella</i> Typhimurium infection intestinale	systémique (intrapéritonéale) 2h avant l'infection	[165, 167]
<i>Enterococcus faecalis</i> infection intestinale	systémique (intrapéritonéale) quotidiennement pendant 3 jours avant l'infection	[173]
<i>Clostridium difficile</i> infection intestinale	systémique (intrapéritonéale) 24h avant, au moment de l'infection et 24h après l'infection	[267]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection respiratoire	locale (intranasale) 24h avant l'infection	[92]
<i>Streptococcus pneumoniae</i> infection respiratoire	locale (intranasale) au moment de l'infection	[162]
<i>Burkholderia cepacia</i> infection respiratoire	locale (intranasale) 4h avant l'infection	[163]
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> infections respiratoires	locale (intranasale) 4h avant l'infection	[268]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection de la cornée	locale (directement sur la cornée) 6h avant l'infection	[269-271]
<i>Candida albicans</i> infection de la cornée	locale (directement sur la cornée) 24h avant l'infection	[272, 273]
MCMV infection systémique	systémique (intrapéritonéale) 12h à 72h avant l'infection	[274]
Rotavirus infection intestinale	systémique (intrapéritonéale) au moment de l'infection puis quotidiennement pendant 8 à 18 jours	[275]

Dans un autre modèle d'infection intestinale, l'équipe de Pamer a démontré la capacité d'une stimulation systémique par la flagelline à réduire la colonisation de l'iléon par *Enterococcus faecalis*. Dans cette étude, un traitement antibiotique est réalisé sur l'animal préalablement à l'infection afin d'éliminer la flore intestinale. L'antibiothérapie induit une diminution de l'expression de RegIII γ , un composé antimicrobien fortement exprimé dans l'iléon, permettant ainsi la colonisation par *E. faecalis*. L'expression de RegIII γ est restaurée à un niveau similaire à celui à l'homéostasie par l'administration de flagelline. Cette activité de RegIII γ induite par la flagelline nécessite la production d'IL-22 [173]. Ces mêmes auteurs ont également décrit une protection induite par la flagelline dans un modèle d'infection intestinale par *Clostridium difficile* [267].

Les effets protecteurs de la flagelline ne sont pas restreints aux infections intestinales puisque le potentiel antibactérien de la flagelline a été démontré dans des modèles d'infections respiratoires (**Tableau 3**). Une première étude a montré une protection après l'instillation intranasale de flagelline lors d'une infection respiratoire par *P. aeruginosa*. L'activité antibactérienne induite par la flagelline est associée à la production de cathélicidine (*cathelicidin-related antimicrobial peptide*, CRAMP chez la souris). Par ailleurs, cette protection est observée chez les animaux dépourvus de PNN suggérant un rôle mineur de ces cellules [92]. Notre équipe a démontré que la co-administration de flagelline avec l'inoculum bactérien permettait d'améliorer la survie des souris et la clairance bactérienne au cours d'une infection létale par *S. pneumoniae*. Cette étude a mis en évidence l'importance des PNN dans la protection anti-infectieuse [162]. L'importance des PNN recrutés par la flagelline a également été montré dans d'autres modèles d'infections respiratoires par *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *S. aureus* [163, 268].

L'équipe de Yu a contribué à la caractérisation des capacités protectrices de la flagelline dans des modèles d'infections de la cornée. Des travaux réalisés dans un modèle d'infection par *P. aeruginosa* ont mis en évidence une diminution de la charge bactérienne au niveau de la cornée après une application locale de flagelline (6h avant l'infection). Le traitement avec la flagelline est associé à la production de CRAMP et au recrutement de PNN. Cependant, ces PNN ne jouent pas un rôle déterminant puisque la protection est effective chez des souris dépourvues de ces cellules [269]. Une seconde étude a décrit la réponse transcriptionnelle de la cornée après la stimulation locale par la flagelline, et a démontré l'importance de deux molécules antimicrobiennes membres de l'hétérocomplexe de calprotectine (S100A8 et

S100A9) pour la mise en place de la protection anti-infectieuse contre *P. aeruginosa* [270]. Récemment, l'expression du facteur de transcription IRF1 et de CXCL10 ainsi que les cellules NK sont apparues essentielles pour induire l'effet antimicrobien associé à la flagelline [271]. Des mécanismes de protection similaires ont été décrits pour des infections de la cornée par *Candida albicans* traitées par la flagelline suggérant un effet antifongique [272, 273, 276].

Des études récentes ont révélé les capacités protectrices de la stimulation de TLR5 sur des infections virales. La première a mis en évidence que l'entolimod administré par voie systémique, permettait d'activer les cellules NK et de protéger les souris d'une infection létale par le MCMV. Cette protection dépendante de TLR5 n'a été observée que si l'entolimod était administré 12h à 72h avant l'infection [274]. La seconde étude a démontré que l'administration quotidienne de flagelline par la voie systémique protégeait les souris d'une infection intestinale par le rotavirus. Cette protection dépend non seulement de la stimulation du TLR5 des cellules dendritiques conduisant à la production d'IL-22, mais également de la stimulation de l'inflammasome NLRC4 qui précède la production d'IL-18 [275].

Enfin, une étude démontre l'activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* d'une protéine de fusion combinant la flagelline et la β -défensine 3 murine dans le traitement de bactéries à Gram positif et négatif. Ces travaux mettent en évidence pour la première fois la capacité de la flagelline à exercer son potentiel anti-infectieux lorsqu'elle est physiquement conjuguée avec une autre molécule [277].

Globalement, ces études démontrent le potentiel anti-infectieux de la flagelline surtout lorsqu'elle est administrée en prophylaxie, préalablement ou concomitamment au challenge infectieux. Même dans l'étude de Zhang *et al.* qui démontre un effet thérapeutique de la flagelline, la première administration de l'agoniste TLR5 se fait au moment de l'infection avec le rotavirus [275]. Il n'y a pas à ce jour de démonstration de protection par la flagelline dans des infections établies, qu'elles soient virales ou bactériennes.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les muqueuses constituent des interfaces entre l'organisme et le milieu extérieur et représentent donc la porte d'entrée majeure pour des micro-organismes infectieux. Nous nous sommes donc intéressé au potentiel antimicrobien de la flagelline sur des infections intestinales et respiratoires dans le but de définir les facteurs moléculaires et cellulaires mobilisés pour protéger contre les infections.

Dans une première partie nous avons analysé les capacités anti-infectieuses de la flagelline dans un modèle d'infection intestinale. Pour cela nous avons choisi un pathogène bactérien infectant l'intestin grêle, *Yersinia pseudotuberculosis*. L'objectif de ces travaux a été d'apprécier l'impact d'une administration prophylactique systémique de flagelline sur le déroulement de l'infection et d'évaluer le rôle de l'IL-22 dans la réponse antibactérienne. Les résultats obtenus sont rassemblés dans un manuscrit en préparation (Article I : *Flagellin-mediated protection against intestinal Yersinia pseudotuberculosis infection does not require IL-22*) pour soumission dans *Infection and Immunity*.

L'objectif de la seconde partie a été de tester l'efficacité de la flagelline administrée en thérapeutique en association avec différents antibiotiques pour le traitement d'infections respiratoires. Pour cela nous avons mis en place un modèle de pneumonie pneumococcique invasive chez la souris. Les premiers résultats ont été récemment publiés (Article II : *A toll-like receptor 5 agonist improves the efficacy of antibiotics in the treatment of primary and influenza-associated pneumococcal mouse infections*). Des résultats complémentaires caractérisant les mécanismes responsables de la protection par la combinaison thérapeutique seront également présentés.

La flagelline protège contre une infection intestinale par *Yersinia pseudotuberculosis* dans un mécanisme indépendant de l'IL-22.

A. Article I

Flagellin-mediated protection against intestinal *Yersinia pseudotuberculosis* infection does not require interleukin-22.

Porte *et al.* Manuscrit en cours de finalisation pour soumission à *Infection and Immunity*.

L'IL-22 est une cytokine membre de la famille des IL-10 découverte en 2000 et associée aux lymphocytes Th17 et à l'immunité innée [278-280]. Largement étudiée pour son activité dans les maladies inflammatoires comme le psoriasis et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, l'IL-22 est également un élément majeur dans le contrôle des infections muqueuses et du contrôle du microbiote intestinal [281-284]. L'IL-22 active (i) l'expression de mucines et la survie des cellules caliciformes, empêchant le contact direct des bactéries de la lumière avec l'épithélium, (ii) la synthèse de molécules antimicrobiennes, (iii) les mécanismes réduisant l'apoptose des cellules épithéliales ciblées par certains micro-organismes pathogènes et (iv) la régénération tissulaire par la production de métalloprotéinases, de facteurs de croissance stimulant ainsi la prolifération des cellules souches. De plus l'induction de l'expression de l'IL-22, par certaines bactéries pathogènes, entraîne des mécanismes protecteurs anti-infectieux suggérant un potentiel thérapeutique de l'IL-22 dans le développement de stratégies anti-infectieuses [285-289].

L'administration de flagelline a été associée chez la souris à une forte expression d'IL-22 dans les compartiments systémiques et muqueux. En effet, nos travaux et ceux de l'équipe de Pamer ont décrit, après la stimulation par la flagelline, des mécanismes anti-infectieux impliquant les cellules hématopoïétiques (cellules dendritiques et ILC3), l'IL-22 et l'épithélium [164, 173, 174, 290]. Cette production d'IL-22 dans la muqueuse a été associée à la protection antimicrobienne de la flagelline dans des modèles d'infections bactériennes et virales [173, 174, 275].

Le but de cette étude a donc été d'évaluer les propriétés protectrices de la flagelline dans un modèle d'infection de la muqueuse intestinale par *Y. pseudotuberculosis* et d'évaluer le rôle de l'IL-22. Afin de caractériser également les voies de signalisation impliquées dans

notre modèle, nous avons utilisé des flagellines recombinantes ayant perdu leur capacité à signaler via TLR5 ou le complexe NAIP5/NLRC4 (**Figure 14**). Nous avons également utilisé une flagelline dépourvue de la majeure partie de son domaine hypervariable (Article II).

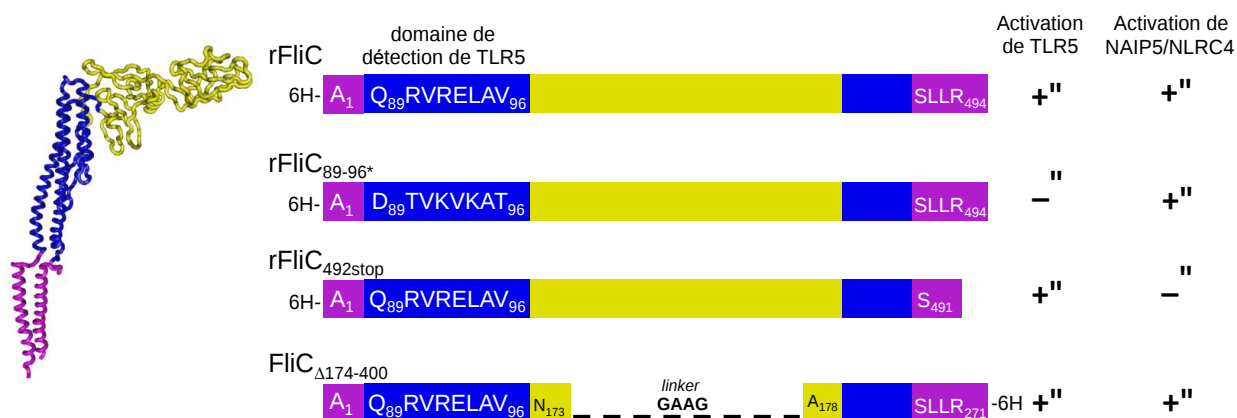


Figure 14 : Représentation structurale des flagellines utilisées au cours de nos études.

Les flagellines recombinantes présentent un motif composé de 6 résidus histidine (6H) à l'extrémité N-terminale pour rFliC, rFliC_{89-96*} et rFliC_{492stop}, ou à l'extrémité N-terminale pour FliC_{Δ174-400}. La modification du domaine 89-96 de rFliC par les résidus correspondant de la flagelline de *H. pylori* aboutit à rFliC_{89-96*}, incapable d'activer la signalisation TLR5. L'élimination des trois acides aminés en C-terminale de rFliC conduit au composé rFliC_{492stop} qui n'est pas reconnu par le complexe NAIP5/NLRC4. Finalement la flagelline FliC_{Δ174-400}, utilisée dans l'article II, est tronquée des résidus 174 à 400 des domaines D2 et D3, et possède les mêmes propriétés stimulatrices que la flagelline sauvage.

Y. pseudotuberculosis est un bacille à Gram négatif responsable d'infections intestinales chez de nombreuses espèces animales. L'infection, consécutive à l'ingestion d'aliments souillés ou à un contact avec un animal domestique infecté, se manifeste le plus souvent par une adénite mésentérique dont la symptomatologie clinique simule une appendicite [291]. La souris représente un modèle pertinent de l'infection à *Y. pseudotuberculosis* car, comme pour l'Homme, elle est responsable d'infections de l'intestin grêle (**Figure 15 A**). Cette bactérie possède un tropisme pour les organes lymphoïdes secondaires. Elle infecte l'iléon par l'intermédiaire des cellules M présentes au niveau des plaques de Peyer, dissémine dans la circulation sanguine en empruntant le réseau lymphatique et colonise les ganglions mésentériques, la rate et le foie (**Figure 15 B**).

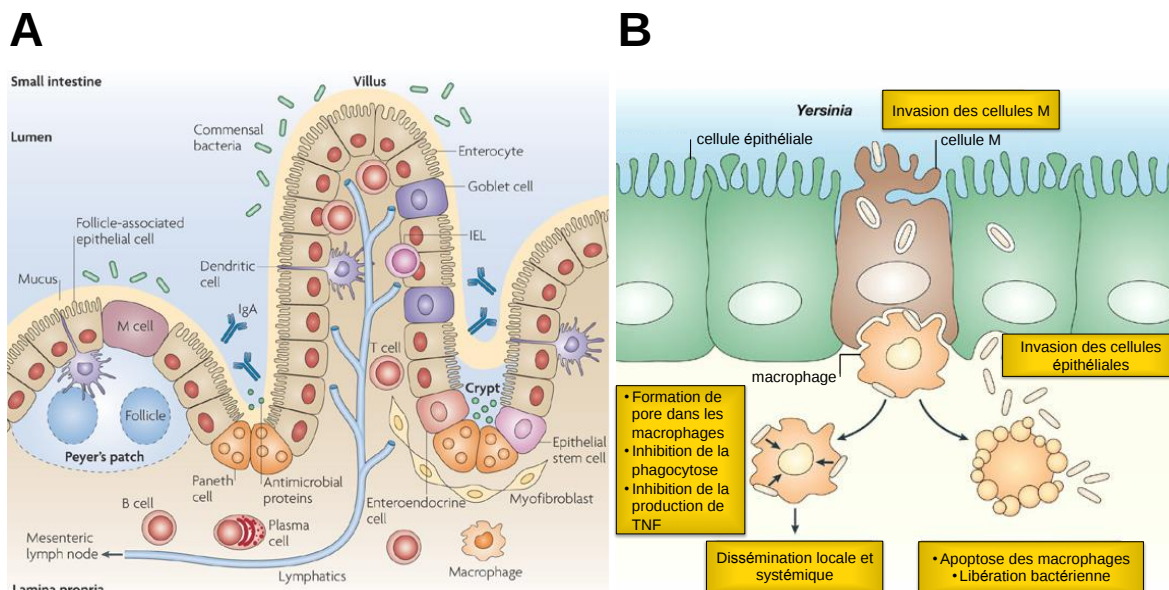


Figure 15: Organisation cellulaire de l'intestin grêle et infection de l'épithélium intestinal par *Y. pseudotuberculosis*. (A) Organisation structurale et composition de la muqueuse de l'intestin grêle. Cette muqueuse constitue une barrière physique entre l'organisme et le microbiote, composée majoritairement d'entérocytes, mais également de cellules caliciformes (*goblet cells*) assurant la production du mucus et de cellules de Paneth localisées au fond des cryptes des villosités qui assurent la production de molécules antimicrobiennes (**Tableau 4 Annexe I**). La muqueuse de l'iléon présente des plaques de Peyer, structures lymphoïdes secondaires, composées de cellules M à l'interface parenchyme/lumière intestinale [292]. (B) *Y. pseudotuberculosis* est une bactérie invasive avec un tropisme pour l'iléon. Elle infecte l'organisme en passant par les cellules M puis dissémine dans l'organisme en empruntant le réseau lymphatique. *Y. pseudotuberculosis* exprime des facteurs de virulence (*Yersinia outer proteins*, Yops) qui permettent à la bactérie de résister aux phagocytes. Schéma adapté de Sansonetti 2004 [293].

La bactérie reste extracellulaire grâce à nombreux facteurs de virulence parmi lesquels les *Yersinia outer proteins*. Ces protéines, associées à un système de sécrétion de type III, sont responsables notamment des propriétés anti-phagocytaires et pro-apoptotiques de *Y. pseudotuberculosis* [293].

Flagellin-mediated protection against intestinal *Yersinia pseudotuberculosis* infection does not require interleukin-22

Rémi PORTE¹, Laurye VAN MAELE¹, Laure DUMOUTIER², Benoît FOLIGNÉ¹, Natalia MUÑOZ-WOLF³, Julien TABAREAU¹, Delphine CAYET¹, Pierre GOSSET⁴, Nicolas DEJONCKERE⁵, José A. CHABALGOITY³, Michel SIMONET^{1, 6}, Mohamed LAMKANFI⁷, Jean-Christophe RENAULD², Jean-Claude SIRARD¹, and Christophe CARNOY¹

¹Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR8204 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France;

²Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels branch; de Duve Institute, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium Belgium;

³Laboratory for Vaccine Research, Department of Biotechnology, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay;

⁴Hopital Saint Vincent, Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Université Catholique de Lille, F-59020 Lille, France;

⁵Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S 1172 - JPArc - Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, F-59000 Lille, France;

⁶Laboratoire de Bactériologie Hygiène, Institut de Microbiologie, Centre de Biologie Pathologie, CHRU Lille, Lille, France;

⁷Department of Medical Protein Research, VIB, Ghent B-9000, Belgium and Department of Biochemistry, Ghent University, Ghent B-9000, Belgium

Running title : IL-22-independent flagellin-mediated protection

Keywords : *Yersinia pseudotuberculosis*, IL-22, TLR5, flagellin, intestine, mouse infection

Corresponding author : christophe.carnoy@univ-lille2.fr

Abstract.

Signaling through Toll-like Receptors (TLR), the major receptors of innate immunity is essential to protect the mucosal surfaces. Systemic TLR5 stimulation by bacterial flagellin was recently shown to induce immediate and transient interleukin-22 (IL-22)-dependent antimicrobial defenses against bacterial or viral mucosal infections. This process depends on the activation of innate lymphoid cells (ILC), particularly ILC3. The aim of this work was to analyze the effects of a treatment with flagellin in an infection model with *Yersinia pseudotuberculosis*, an invasive Gram-negative enteropathogenic bacterium that targets the small intestine. We found that systemic administration of flagellin significantly increases animal survival after intestinal infection but not against systemic infection by *Y. pseudotuberculosis* that mimics sepsis-like disease. In contrast, no protection was afforded by administration of lipopolysaccharide, a TLR4 agonist, suggesting a flagellin-specific effect. We also demonstrated that the flagellin-mediated protection was associated with a reduction of bacterial number in the gut lumen and the spleen. Our data indicated that TLR5 and MyD88 signaling was required for therapeutic effects. Finally, our experiments showed that IL-22 was not involved in the protective effect of flagellin and suggest that ILCs are unnecessary for the protection.

Introduction

The crosstalk between mucosal immune cells and intestinal epithelial cells is essential to control gut bacterial flora and protect against pathogenic microbes (1, 2). Numerous studies have demonstrated the role of interleukin 22 (IL-22) in innate host defense, and tissue protective and regenerative functions in the gastro-intestinal tract (3, 4). IL-22 is a cytokine of the IL-10 family that can be produced by T helper 17 (Th17) lymphocytes. However, in the gut mucosa the major source of IL-22 are the type 3 innate lymphoid cells (ILC3) (5-9). IL-22 targets epithelial cells and mesenchymal stromal cells but not immune cells since the IL-22R1 subunit of the IL-22 receptor is not expressed by haematopoietic cells (10). IL-22, which production is under the control of IL-23 and IL-1 β , induces a signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) pathway leading to the induction of antimicrobial molecules like type C lectin RegIII γ or calgranulin S100A9 (11), protective mucin production (12) and intestinal wound healing (13, 14). Innate IL-22 production by ILC3 has been associated with colonization resistance and protection against *Citrobacter rodentium* through the production of RegIII γ (8, 15-18). On the contrary, it was recently showed that IL-22 promotes *Salmonella* colonization by suppressing commensal *Enterobacteriaceae* (19).

Previous studies showed that stimulation of innate immunity could promote production of IL-22 in the gut and antibacterial defenses. Indeed, systemic administration of flagellin, the main component of the bacterial flagella, induces IL-22 production by ILC3 both in the spleen and in the intestinal mucosa (20, 21). Flagellin is a microbe-associated molecular pattern that binds Toll-like receptor 5 (TLR5), an innate receptor expressed at the surface of epithelial and dendritic cells (22). Flagellin can also be sensed by NAIP5, a cytosolic protein associated with the NLRC4 inflammasome (23, 24). It was demonstrated that IL-22 production induced by flagellin administration was related to the production of IL-23 by intestinal lamina propria CD103⁺CD11b⁺ dendritic cells and TLR5 signaling (21). Interestingly, flagellin administration induces an IL-22-dependent protection against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* infection and against rotavirus infection (11, 25). Systemic flagellin administration also protects against *Clostridium difficile* colitis or *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection, but whether the protection required IL-22 has not yet been defined (26, 27). The protective properties of flagellin are not restricted to the gastro-intestinal tract since intranasal administration of flagellin can also protect against respiratory infections (28-32). Similarly to what occurs in intestine, flagellin-mediated protection against respiratory *Streptococcus pneumoniae* infection is associated with IL-22 production by lung ILC3 (29).

In this study we hypothesized that flagellin treatment could protect against intestinal infection with *Yersinia pseudotuberculosis*, a Gram negative enteropathogen responsible for enteritis

and mesenteric lymphadenitis that can induce chronic yersiniosis in patients deficient in both TLR5 and NOD2 (33). *Y. pseudotuberculosis* is an invasive bacterium targeting the ileum and which actively translocates across the intestinal barrier through M cells and infects the Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and disseminate in the spleen and the liver (34). Here we showed that pre-exposure of mice to flagellin protects against intestinal but not systemic infection with *Y. pseudotuberculosis*, and that this protection is independent of IL-22.

Material and Methods

Bacterial preparation

The *Yersinia pseudotuberculosis* IP32777 inoculum was prepared as previously described (35, 36). Briefly, Luria–Bertani Lennox (LB) (AthenaES, Baltimore, MD) plates were streaked from -80°C culture stock. Bacterial inocula were prepared from overnight cultures in LB broth at 28°C. This culture was followed by OD_{600nm} spectrometry and diluted to the appropriate concentration. Number of bacteria (colony forming unit [CFU]) was confirmed by plating serial dilutions on LB agar plates.

Mouse model of infection

Six to 20 weeks-old BALB/cJ or C57BL/6J mice (Janvier Laboratories, Saint-Berthevin, France) and *Tlr5*^{-/-}, *Myd88*^{-/-}, *Il22*^{-/-}, *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice (all backcrossed on C57BL/6J) as well as *Il22*^{-/-} backcrossed on BALB/cJ were maintained in individually ventilated cages and handled in a vertical laminar flow cabinet (class II A2, ESCO). All experiments complied with current national and institutional regulations and ethical guidelines (B59-350009, Institut Pasteur de Lille). Mice were infected with *Y. pseudotuberculosis* by intravenous, or intragastric route as previously described (35, 36). Briefly, animals were orally challenged with 5 x 10⁸ bacteria in 200 µl H₂O or intravenously infected with 10³ bacteria in 100 µl phosphate buffered saline (PBS). Mice survival was recorded daily for signs of illness. For determination of bacterial numbers in stools and spleen, mice were sacrificed at selected times by intraperitoneal injection of 5.47 mg of sodium pentobarbital. Stools and spleens were weighted and collected in PBS. Samples were then homogenized with an UltraTurrax homogenizer (IKA-Werke) and viable counts were determined by plating serial dilutions onto LB agar plates for spleens and LB agar plates containing vancomycin (50 µg/ml) and irgasan (1 µg/ml) for stools in order to specifically enable *Yersinia* growth. CFU were counted after 48 hours of culture at 28°C.

Flagellin and LPS administration

Native flagellin FliC from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as well as the recombinant flagellins rFliC and rFliC_{89-96*}, harboring an amino-terminal histidine Tag were produced as described previously (37, 38). rFliC is equivalent to native protein whereas rFliC_{89-96*} contains TLR5 non signaling residues at position 89 to 96. The recombinant flagellin FliC_{492stop} was generated by site-directed mutagenesis on the plasmid harboring rFliC cloned into the expression vector pET22b⁺. A premature stop codon was introduced in the plasmid coding for FliC_{492stop} in order to truncate the last two C-terminal residues, involved in NAIP5/NLRC4 complex recognition (39). Recombinant flagellins were produced in *E. coli*

BL21(DE3), purified by Fast Protein Liquid Chromatography (GE Healthcare) and depleted of lipopolysaccharide (LPS) using Triton X-114 extraction and polymyxin B columns (Pierce). Using the *Limulus* assay (Associates of Cape Cod Inc.), the residual LPS concentration was determined to be less than 20 pg per µg of flagellin. To ensure that flagellins were mostly monomers, they were heated for 10 min at 65°C before use. Flagellins (5 µg in 200 µl PBS), ultrapure LPS from *E. coli* (5 µg in 200 µl PBS; serotype 0111:B4, InvivoGen, Toulouse, France) or PBS alone were administrated intraperitoneally 30 min prior bacterial challenge.

Gene expression

Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) and reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). The cDNA was amplified using SYBR Green-based real-time PCR on a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). For high-throughput analysis, TaqMan Low Density Arrays (Applied Biosystems) were used. Analysis was carried out using Real-Time StatMiner software (Integromics) or ThermoCloud RQ software. Relative mRNA levels ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) were determined by comparing first, the PCR cycle thresholds (C_t) for the gene of interest and *Actb* (ΔC_t) and second, the ΔC_t values for flagellin-treated and untreated groups ($\Delta\Delta C_t$). C_t upper limit was fixed to 33 cycles.

Determination of cytokine production

CXCL2 and CCL20 levels were measured by ELISA following manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Statistical analysis

Results were expressed as median or mean $\pm$ SD as indicated. Statistical differences were analyzed using the Mann-Whitney test and the log rank test (GraphPad Prism 5.0a). The Limma test with Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) correction was used for high-throughput PCR with TaqMan Low Density Arrays as previously described (20). Results were considered significant for $p < 0.05$.

Results

Flagellin administration protects against intestinal but not systemic infection with *Y. pseudotuberculosis*

We first investigated whether the TLR5 agonist flagellin could induce resistance against oral infection with *Y. pseudotuberculosis*. To this aim, BALB/c mice were injected intraperitoneally with TLR agonists and intragastrically infected 30 min later with lethal dose of *Y. pseudotuberculosis*. While all animals that received PBS died within 11 days, 67 % of the animals survived when they were injected with flagellin (**Fig.1A**). Consistently with the results for survival, the bacterial burden in stools of flagellin-treated animals decreased by a factor of 6 when compared with samples from untreated animals (**Fig.1C**) and the dissemination of *Y. pseudotuberculosis* into the spleen of animals treated with flagellin was 7 fold lower than in untreated animals (**Fig.1D**). In contrast, LPS, the TLR4 agonist, was not able to induce any protection since LPS-treated animals rapidly died after oral *Y. pseudotuberculosis* infection and only 1 out of 9 treated animals survived (**Fig.1A**). These results indicated that the protection is specific of flagellin and is not due to an overall stimulation of innate defense mechanisms. When animals were infected intravenously with *Y. pseudotuberculosis* to bypass the intestinal tissue invasion, flagellin did not elicit any protective effect (**Fig.1B**). These results showed that systemic administration of flagellin protects against mucosal *Y. pseudotuberculosis* infection but not against systemic infection.

It was previously shown that BALB/c and C57BL/6 mice had different susceptibility to *Yersinia* infection (40). BALB/c mice have been classified as “susceptible” and C57BL/6 as “resistant” due to their ability to mount strong IL-12, IFN γ , and Th1 responses. We therefore analyzed the potency of flagellin to promote protection in C57BL/6 animals (**Fig.2**). Interestingly, flagellin injection in C57BL/6 mice improves survival and clearance of bacteria as the bacterial counts in stools and spleen of mice treated with flagellin was decreased 20- and 65-fold, respectively, (**Fig. 2A-D**). The time course of *Y. pseudotuberculosis* colonization of the stools and spleen of C57BL/6 mice showed that the flagellin-associated protection was not observed before 72h hours post-infection (**FigS1**). In addition, the protection was specific for the oral route of infection (**Fig.2B**). In conclusion, the flagellin-mediated protection against *Y. pseudotuberculosis* is independent on the intrinsic resistance of animals to oral infection.

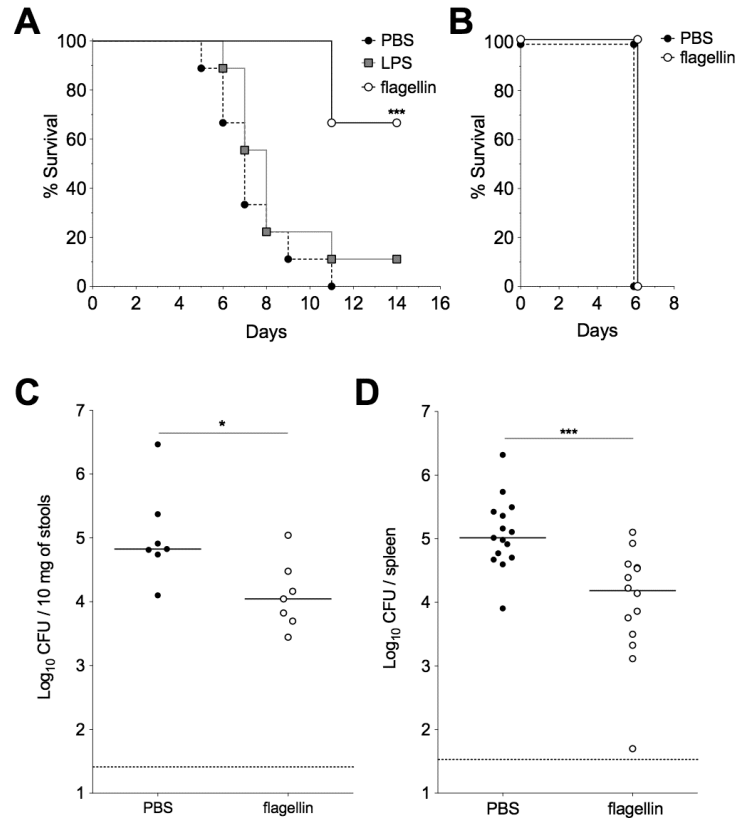


FIGURE 1: Flagellin protects against *Y. pseudotuberculosis* intestinal but not systemic infection. Female BALB/c mice were treated intraperitoneally with flagellin (5µg) or LPS (5µg) in phosphate-buffered saline (PBS) or with PBS and challenged 30 min later by an intragastric inoculation with 5×10^8 *Y. pseudotuberculosis* (A, C, and D) or an intravenous injection of 10^3 *Y. pseudotuberculosis* (B). (A) Survival of mice (n=9) after oral challenge was monitored for 14 days. One representative survival experiment out of 3 is shown. Statistical significance was determined in log rank test compared to the untreated mice. (B) Survival of mice (n=10) after intravenous challenge was monitored for 7 days. Bacterial counts were determined 72 hours after oral challenge in the stools (C) and the spleen (D). Colony-forming unit (CFU) counts for individual mice (n=7-14) are shown. The solid line corresponds to the median value, and the dashed line represents the detection threshold. Statistical significance was assessed in a Mann-Whitney test (* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$).

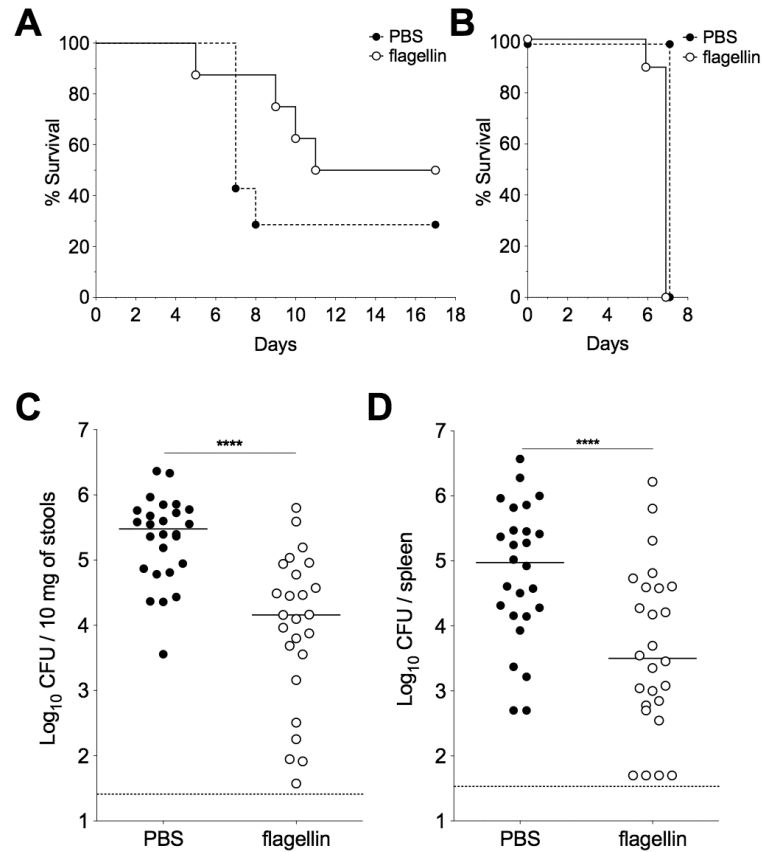


FIGURE 2: Flagellin protects against *Y. pseudotuberculosis* intestinal infection in *Yersinia*-resistant C57BL/6 mice. Female C57BL/6 mice were treated intraperitoneally with flagellin (5 μ g) in phosphate-buffered saline (PBS) or with PBS, 30 min before an intragastric challenge with 5×10^8 *Y. pseudotuberculosis* (A, C-D) or an intravenous challenge with 10^3 *Y. pseudotuberculosis* (B). Survival was monitored daily for 17 days (n=7-8) (A) and for 7 days (n=10) (B). Statistical significance was determined in log rank test. Bacterial counts were determined in the stools (C) and the spleen (D). Colony-forming unit (CFU) counts for individual mice (n=25-26) at 72 hours post-infection are shown. The solid bar corresponds to the median value, and the dashed line represents the detection threshold. Statistical significance was assessed in a Mann-Whitney test (**** $P < 0.0001$).

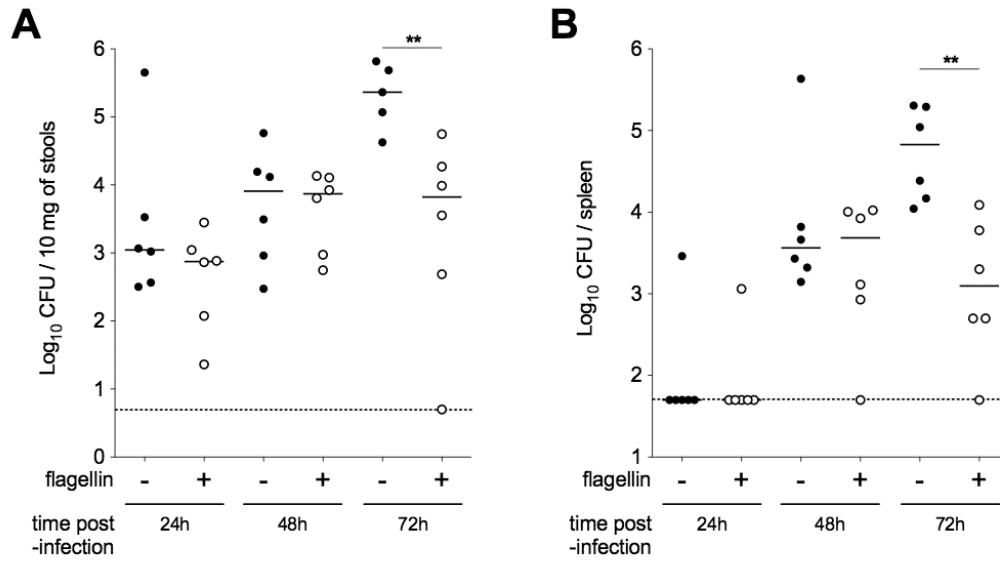


FIGURE S1: Flagellin reduces *Y. pseudotuberculosis* intestinal colonization and dissemination three days after challenge. Female C57BL/6 mice were treated intraperitoneally with phosphate-buffered saline (PBS) or flagellin (5µg) in PBS 30 min before an intragastric challenge with 5×10^8 *Y. pseudotuberculosis*. Bacterial counts were determined in the stools (A) and the spleen (B). Colony-forming unit (CFU) counts for individual mice (n=5-6) at 24, 48 and 72 hours post-infection are shown. The solid line corresponds to the median value, and the dashed bar represents the detection threshold. Statistical significance was assessed in a Mann-Whitney test (** $P < 0.01$).

TLR5 signaling is specifically required for flagellin-mediated protection against *Y. pseudotuberculosis*

Two innate receptors are able to recognize flagellin: TLR5 detects extracellular molecule whereas intracellular flagellin can be recognized by the cytoplasmic receptor NLRC4. To define the contribution of these receptors in the flagellin-mediated protection, we took advantage of recombinant flagellins that were signaling similarly to the native protein (rFliC) or that were mutated for their ability to stimulate TLR5 (rFliC_{89-96*}) or the complex NAIP5/NLRC4 (rFliC_{492stop}) (**Fig.S2**) (38). As expected, rFliC_{89-96*} was unable to trigger TLR5-specific responses, i.e. systemic production of CXCL2 and CCL20 after intravenous injection in contrast to rFliC or rFliC_{492stop} (**FigS2A-B**). In addition, unlike rFliC and rFliC_{89-96*}, rFliC_{492stop} was unable to induce the NLRC4-dependent processing of pro-caspase-1 (**FigS2C-D**). Treatment of mice with rFliC recapitulated the protection against *Y. pseudotuberculosis* infection since bacterial counts in stools and spleen were reduced (20- and 28-fold, respectively) compared to untreated infected animals (**Fig.3A-B**). Similar effects were obtained after treatment with the flagellin mutated for its recognition of NLRC4 : compared with untreated animals, bacterial counts in stools and spleen of mice treated with rFliC_{492stop} were 29- and 10-fold lower (**Fig.3A-B**). In contrast, protection was abrogated when mice were treated with rFliC_{89-96*} prior to infection.

We next found that flagellin treatment did not elicit any decrease of bacterial counts in *Tlr5*^{-/-} mice compared to C57BL/6 animals, thus demonstrating the requirement of the TLR5 signaling for the protection (**Fig.3A-B**). The flagellin-mediated protection was also abolished in mice deficient for the myeloid differentiation factor 88 (MyD88), which is required for the TLR5 signaling (**Fig.3A-B**). It is noticeable that high bacterial counts were found in the spleen of *Myd88*^{-/-} mice infected with *Y. pseudotuberculosis* confirming that MyD88 is critical against natural *Yersinia* infection (41). Altogether these results showed that flagellin exerts its protective effect through activation of TLR5.

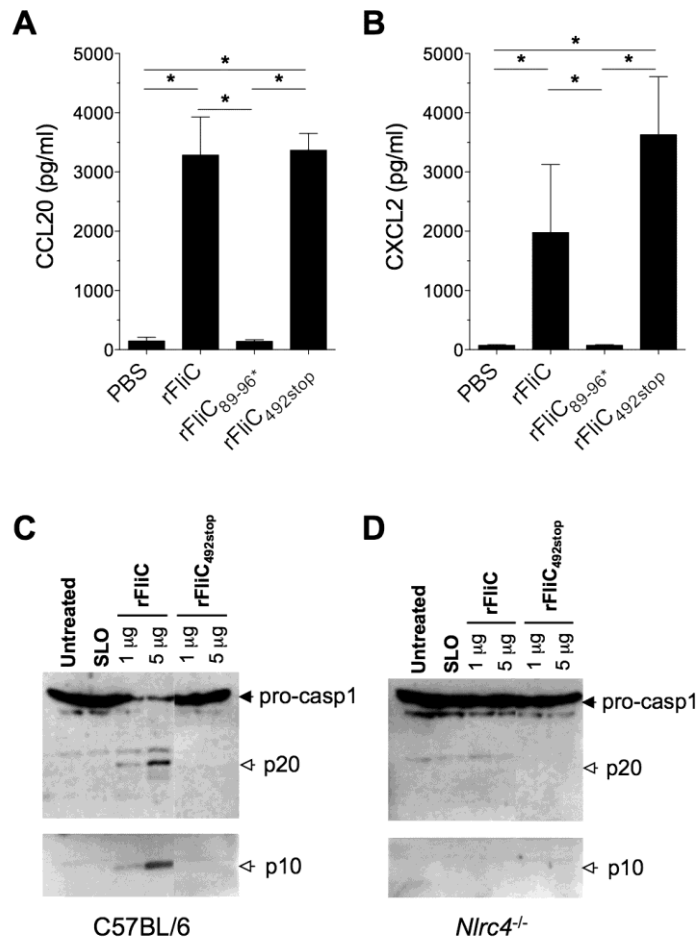


FIGURE S2: Biological activity of recombinant flagellins. (A-B) Female C57BL/6 mice (n=3-4) were injected intravenously with 5 µg of flagellins (histidine-tagged flagellin rFliC, histidine-tagged mutant flagellin rFliC_{89/96*}, histidine-tagged mutant flagellin rFliC_{492stop}). Two hours post-injection, sera were analyzed for CXCL2 and CCL20 production by ELISA. Data are represented as mean ± SEM. Statistical significance was assessed in a Mann-Whitney test (* $P < 0.05$). (C-D) Flagellin-specific caspase 1 activation. Bone marrow-derived macrophages from C57BL/6 (C) and *Nlrp4*^{-/-} (D) were left untreated or incubated with streptolysin O (SLO, 25 µg/ml) in the presence or absence of rFliC or rFliC_{492stop} (1 or 5 µg/ml). Macrophages were washed extensively and incubated for 2 h before cell extracts were prepared and immunoblotted for caspase-1. Arrows denote procaspase-1 (p45) and its processed subunits (p10 and p20).

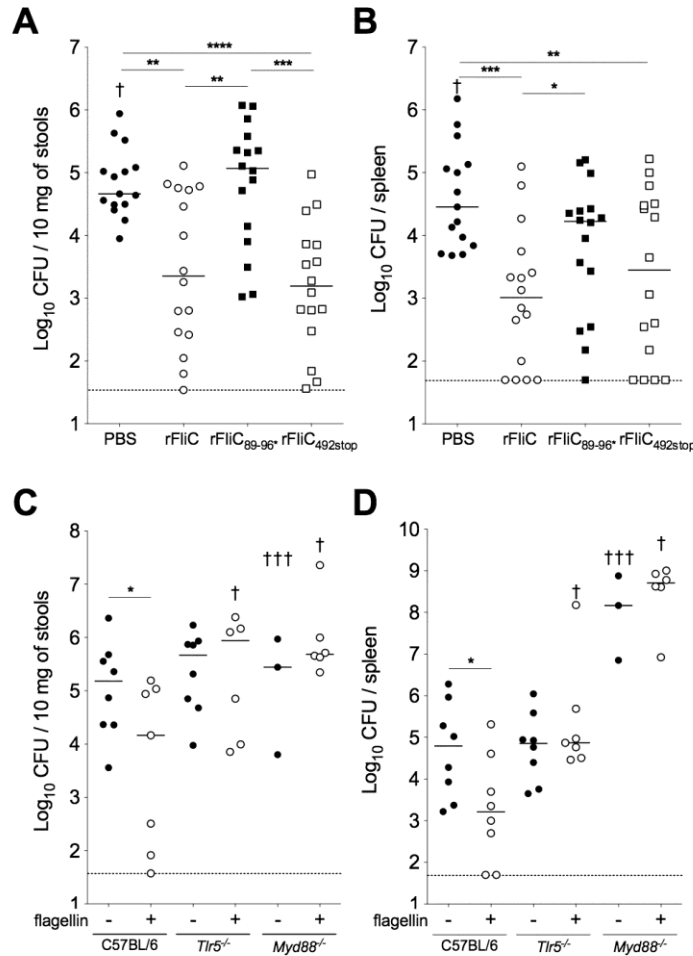


FIGURE 3: Flagellin-mediated antibacterial defenses requires TLR5 signaling. C57BL/6, *Tlr5*^{-/-} or *Myd88*^{-/-} mice were treated intraperitoneally with 5 µg of histidine-tagged flagellin rFliC (A-B), histidine-tagged mutant flagellin rFliC_{89/96}* (A-B), histidine-tagged mutant flagellin rFliC_{492stop} (A-B), 5 µg flagellin (C-D) or with phosphate-buffered saline (PBS) (A-D) 30 min before an intragastric challenge with 5×10^8 *Y. pseudotuberculosis*. Bacterial counts were determined in the stools (A-C) and the spleen (B-D). Colony-forming unit (CFU) counts for individual mice (n=7-16) at 72 hours post-infection are shown. The solid bar corresponds to the median value, and the dashed line represents the detection threshold. “†” represents dead animals. Statistical significance was assessed in a Mann-Whitney test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$).

Flagellin induces a transient inflammatory response independent of *Y. pseudotuberculosis* infection

To characterize the flagellin-mediated response, we performed a gene expression analysis in the ileum of C57BL/6 mice treated with flagellin and infected or not with *Y. pseudotuberculosis*. Two hours post-flagellin treatment, we observed a strong induction of expression of genes encoding inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , IL-17F...), chemokines (CCL20, CXCL10...), remodeling protein (MMP13) and antimicrobial molecules (S100A9, Lipocalin-2, Hepcidin) (**Fig.4A**). As expected, flagellin administration triggered within 2h about 100-fold increase of *Il22* mRNA levels. Interestingly, the flagellin-dependent gene expression occurs in infected and non-infected animals, indicating that *Y. pseudotuberculosis* infection does not impact the biological activity of the flagellin. We then analyzed the dynamic of the flagellin-mediated transcriptional response (**Fig.4B**). Both in infected and uninfected mice, flagellin upregulated a swift and transient transcription of *Cxcl2*, *Il22*, *Il6*, *Hamp*, *S100a9* genes with a strong decrease of the mRNA levels 8 h post-treatment and a complete return to baseline after 24 h (**Fig.4B**). The expression of the *RegIII γ* encoding gene displayed a different profile with a delayed expression starting 8 h post-treatment and maintained until 24 h, thus confirming a previous study (20). In summary, the kinetic of the flagellin-induced signaling in the ileum was not altered (increased or suppressed) by *Y. pseudotuberculosis*. We previously showed that unlike flagellin, LPS was unable to induce a protection against *Y. pseudotuberculosis* oral infection (**Fig.1A**). The transcriptional response to LPS treatment was then compared to flagellin treatment. Whereas both flagellin and LPS similarly activated expression of genes related to IL-22 signature in spleen, flagellin was 10-100 fold more potent than LPS to do so in the ileum (**Fig.S3**). These data suggested that flagellin-mediated protection correlated with a specific intestinal innate response.

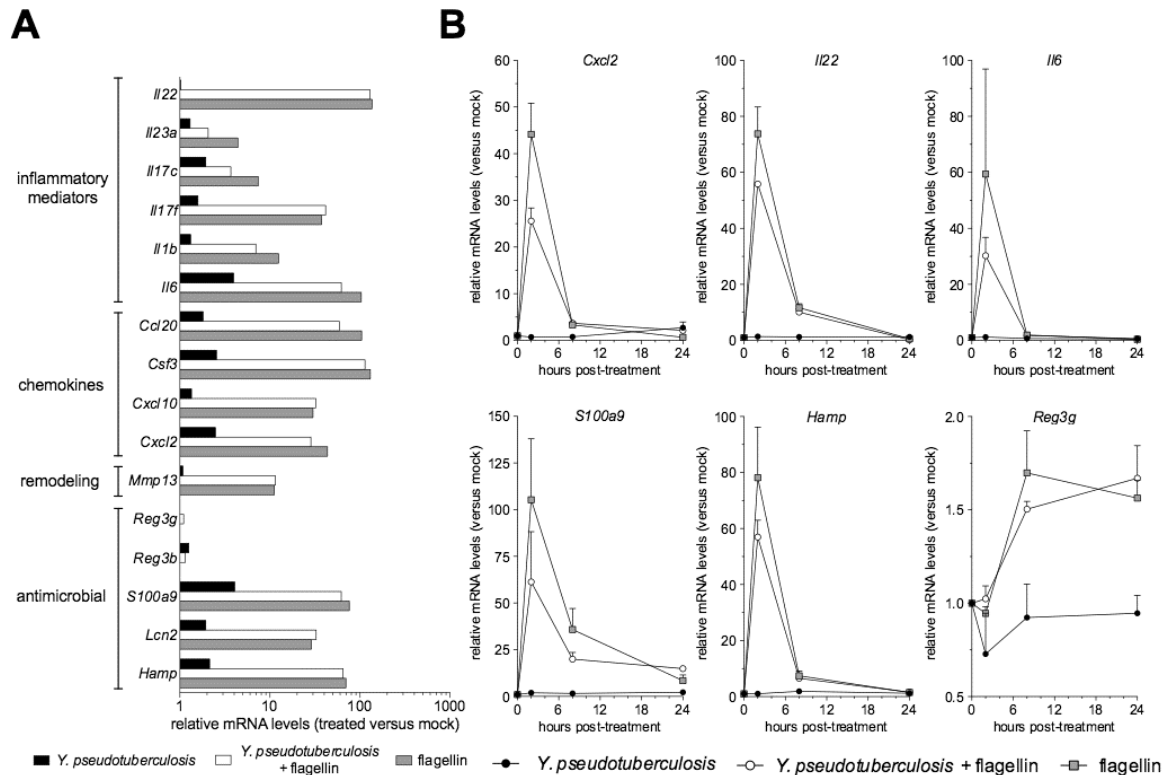


FIGURE 4: *Y. pseudotuberculosis* infection does not influence flagellin-specific gene expression signature. (A-B) Female C57BL/6 mice (n=4) were treated intraperitoneally with flagellin (5μg) in phosphate-buffered saline (PBS) or with PBS (mock). Animals were challenged intragastrically 30 min later with 5×10^8 *Y. pseudotuberculosis*. A group of mice were treated with flagellin and left uninfected. Ileums were sampled post-infection for quantification of mRNA levels by qRT-PCR. (A) Analysis of gene expression at 2h post-treatment. (B) Time course analysis of gene expression. mRNA levels were expressed relative to those of the uninfected and PBS-treated animals (mock group, arbitrarily set to a value of 1) and shown as mean (A) or mean $\pm$ SEM (B).

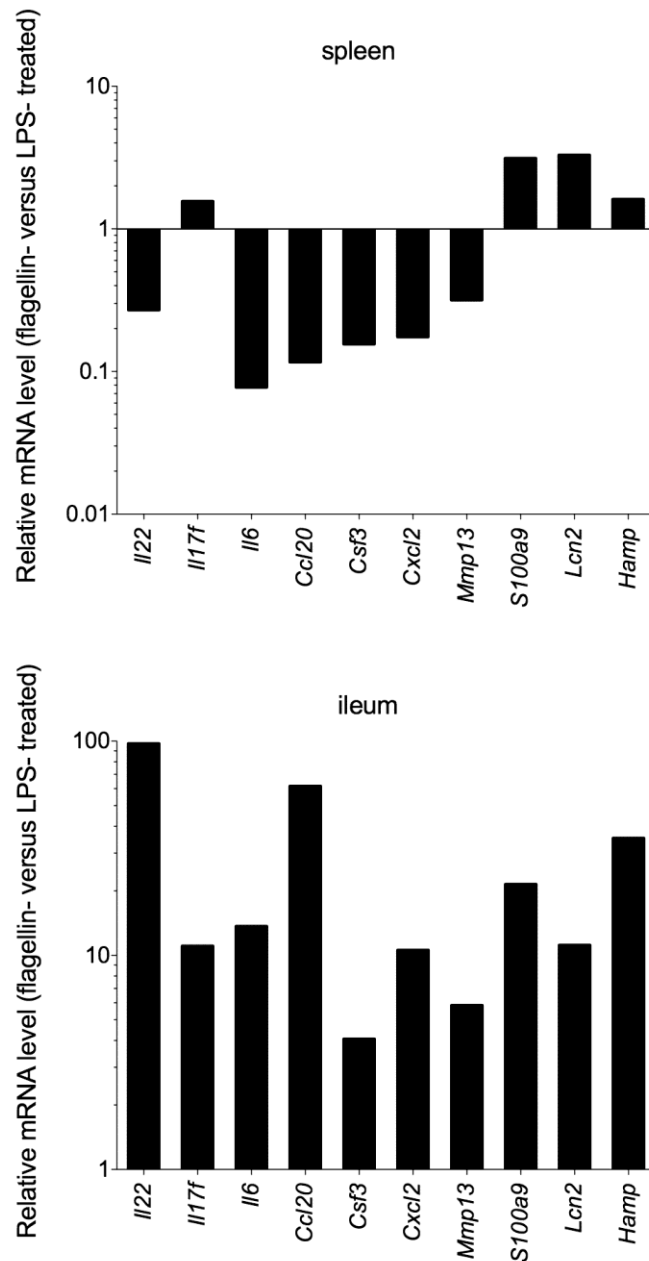


FIGURE S3: Flagellin but not LPS mediates intestinal IL-22-specific response. BALB/c mice (n=2-4) were treated i.p. with PBS alone or flagellin (5 μ g) or LPS (5 μ g) in PBS. The transcriptional response in spleen, and ileum was then analyzed by RT-qPCR 2 h after treatment. The results are expressed as mRNA levels in flagellin-treated mice relative to those in LPS-treated animals as mean $\pm$ SEM.

IL-22 is not required for flagellin-mediated protection

Given that TLR5 stimulation strongly enhanced intestinal production of IL-22 (**Fig.4**) (11, 20, 21, 25, 26), a cytokine critical for mucosal defense, we investigated the role of this cytokine in flagellin-mediated protection against *Y. pseudotuberculosis*. We then evaluated the flagellin biological activity in *Il22*^{-/-} mice (**Fig.5**). First, transcriptional analysis of ileum samples two hours after flagellin injection indicated that the signature was mostly the same in wild type BALB/c and *Il22*^{-/-} mice (**Fig.5A**). However, the flagellin-mediated gene expression was fully impaired with regards to *Il22* gene and consistently decreased for the three well-defined IL-22 target genes (*Reg3b*, *Reg3g* and *S100a9*) (21). Next, control and flagellin-treated animals were inoculated with *Y. pseudotuberculosis*, and the bacterial counts were assessed in spleen and stools. Similarly to the BALB/c (IL-22 proficient) mice, the bacterial counts were significantly lowered in *Il22*^{-/-} counterpart when the animals received flagellin (**Fig.5B-C**). The flagellin-mediated protection was confirmed in *Il22*^{-/-} C57BL/6 mice (data not shown). Altogether these results indicated that IL-22 is not required for the flagellin-mediated protection. It also suggests that RegIII β , RegIII γ and S100A9 are not involved in the flagellin effects.

Finally, the flagellin-mediated protection was also studied in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice (**Fig. 6**). These mice lack T and B lymphocytes as well as cells that depend on the common γ -chain (NK, NKT, and all subsets of ILCs). Innate production of IL-22 is known to be impaired in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice due to specific absence of ILC3 (8)(20). In *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} animals that received systemic injection of flagellin, the bacterial counts were 5.6- and 9-fold lower in stools and spleen, respectively compared to infected but mock-treated animals. These data indicate that lymphoid cells including ILC3 are not required of the flagellin-mediated protection. Altogether, we showed that flagellin-stimulated innate defense mechanisms against *Y. pseudotuberculosis* were independent of IL-22 and ILC3.

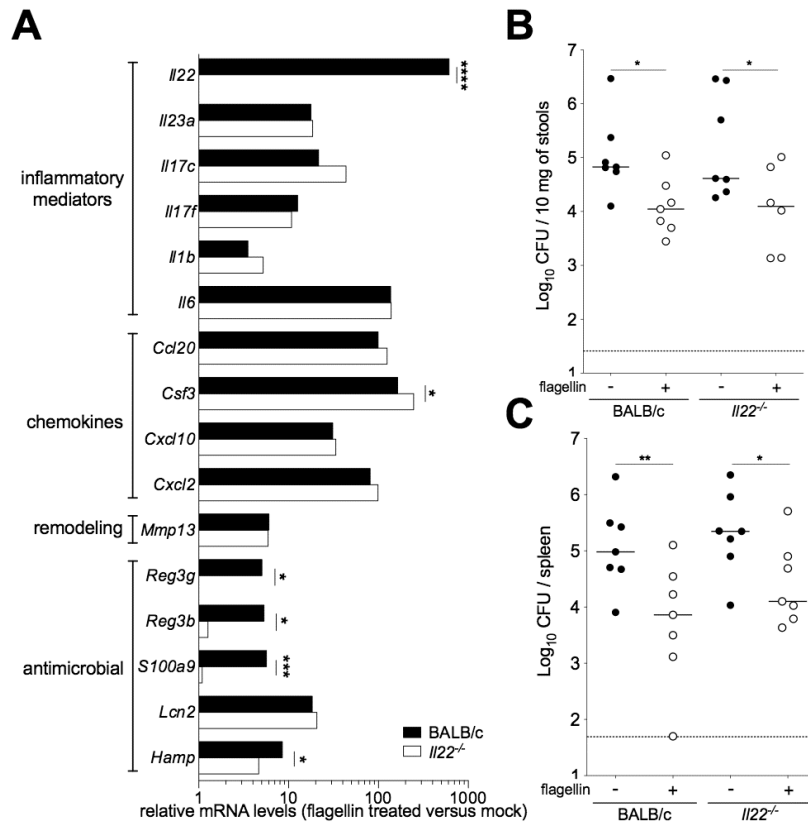


FIGURE 5: Flagellin-mediated protection does not require IL-22. (A) Wild type female BALB/c and *Il22*^{-/-} mice (n=3) were treated intraperitoneally with PBS or flagellin (5μg) and ileum were sampled at 2 h for quantification of mRNA levels by qRT-PCR. mRNA levels are expressed as relative level compared to PBS group. N.D. = Not Detected. Statistical significance was assessed in a Limma test with Benjamini-Hochberg FDR correction (* *P*<0.05, *** *P*<0.001 and **** *P*<0.0001). (B-C) BALB/c and *Il22*^{-/-} mice were treated intraperitoneally with flagellin (5μg) in phosphate-buffered saline (PBS) or with PBS, 30 min before an intragastric challenge with 5×10^8 *Y. pseudotuberculosis*. Bacterial counts were determined in the stools (B) and the spleen (C). Colony-forming unit (CFU) counts for individual mice (n=7) at 72 hours post-infection are shown. The solid line corresponds to the median value, and the dashed line represents the detection threshold. Statistical significance was assessed in a Mann-Whitney test (* *P*<0.05 and ** *P*<0.01).

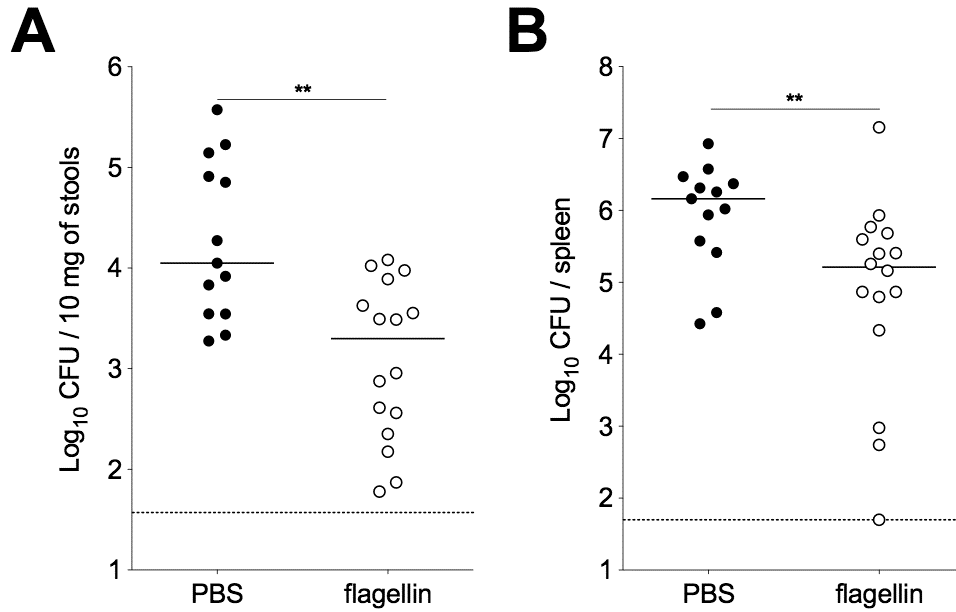


FIGURE 6: Flagellin protection does not require B, T, NK and innate lymphoid cells. *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice were treated intraperitoneally with flagellin (5μg) in phosphate-buffered saline (PBS) or with PBS, 30 min before an intragastric challenge with 5×10^8 *Y. pseudotuberculosis*. Bacterial counts were determined in the stools (A) and the spleen (B). Colony-forming unit (CFU) counts for individual mice (n=13-16) at 72 hours post-infection are shown. The solid bar corresponds to the median value, and the dashed line represents the detection threshold. Statistical significance was assessed in a Mann-Whitney test (** $P < 0.01$).

Discussion

In the present study, we found that flagellin administration protects against oral but not systemic infection with *Y. pseudotuberculosis*. We previously showed that TLR5 signaling induces a strong systemic and mucosal innate expression of the Th17-related IL-22 cytokine by stimulating ILC3 in a dendritic cell-dependent manner (20). Since a protective role against intestinal and respiratory pathogens has been attributed to IL-22 (15, 42), we hypothesized that this cytokine was also involved in flagellin-mediated protection against *Y. pseudotuberculosis*. Surprisingly, our data showed that IL-22 is not required for flagellin-mediated, mucosal protection of mice against *Y. pseudotuberculosis* and suggest that ILC3 and the IL-22-dependent antimicrobial agents S100A9, RegIII β and RegIII γ are dispensable for the protection

These observations contrast with experimental infections with enteric bacteria *C. rodentium* where IL-22 and RegIII γ proteins are essential for intestinal protection (11, 15). The difference of immune response between the *Citrobacter* and *Yersinia* experimental models might reside in the difference in the pathogenesis of these two Gram negative microorganisms. *C. rodentium* is an extracellular attaching/effacing pathogen related to enteropathogenic *Escherichia coli* which causes lesions to the epithelium layer (15). On the contrary, *Y. pseudotuberculosis* does not colonize the epithelial surface but rather invades the mucosal tissues and displays a pronounced tropism for Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and spleen (34). This tropism for secondary lymphoid tissues and organs might make *Y. pseudotuberculosis* resistant to the IL-22-mediated epithelial anti-bacterial response.

The present work also showed that the protection against *Y. pseudotuberculosis* infection was specific for flagellin since the TLR4 agonist was unable to induce any protection. The difference of protection can be attributed to the distinct cellular expression patterns between TLR4 and TLR5, the former being mainly expressed by haematopoietic cells while the latter is preferentially epithelium-associated (43). Moreover, responsiveness of haematopoietic cells and epithelial cells to TLR4 and TLR5 agonists display some specificities related to the gut. For instance, tolerance to LPS of gut epithelium is a hallmark due to the absence (or lack of function) of signaling molecules like IRAK-1 or co-receptors such as CD14 (44). Furthermore it has been shown that the intestinal *lamina propria* contains dendritic cells expressing TLR5 and TLR4, but the response to TLR5 stimulation is significantly higher compared to that of TLR4 (45). As a confirmation, we observed that, unlike LPS, flagellin

induces a strong innate response in the ileum (**Fig.S3**). Overall these data strongly suggest a role of the epithelium in the flagellin-mediated protection against *Y. pseudotuberculosis*.

Since IL-22-related antibacterial components seem not to be involved, the question of the flagellin-mediated mechanism remains unanswered. Neutrophils represent the first inducible defense against infection. In the present study, we confirmed that flagellin administration induces in the intestine a rapid and transient transcriptional activation of genes encoding chemokines involved in chemoattraction of neutrophils (20). A recruitment of neutrophils was already associated with flagellin stimulation but mainly in models of respiratory instillation of flagellin in mice (28, 38, 46-48). Furthermore, *in vivo* and *in vitro* studies have shown that *Y. pseudotuberculosis* was partially resistant to killing by human neutrophils suggesting that neutrophils might not have a major contribution in the flagellin-mediated protection (49-51). We also showed that flagellin stimulates transcription of genes encoding antimicrobial molecules confirming previous studies (20, 21, 30, 52). Although RegIII β was associated to the intestinal resistance to *Y. pseudotuberculosis* (41), the present study suggests that this C-type lectin and other IL-22-associated antimicrobial molecules S100A9 and RegIII γ are not required for flagellin-mediated protection. Other antimicrobial compounds, not associated with IL-22 activation, have been identified in our study and might have a role in the clearance of *Y. pseudotuberculosis*. It is the case of lipocalin-2 which binds bacterial siderophores and hepcidin which influences the outcome of infections through the control of levels and distribution of iron and whose gene expression seems moderately affected in *Il22*^{-/-} mice. Other antimicrobial candidates can be suggested like the cathelicidin-related antimicrobial peptide or the β -defensins which have been also associated with TLR5 signaling (53-55). Understanding the anti-*Yersinia* mechanisms which are primed by TLR5 signaling and which contribute to mucosal protection remains an important topic for future investigation.

References

1. **Caballero S, Pamer EG.** 2015. Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine. *Annual review of immunology* **33**:227-256.
2. **Abreu MT.** 2010. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* **10**:131-144.
3. **Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MR.** 2015. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annual review of immunology* **33**:747-785.
4. **Eidenschenk C, Rutz S, Liesenfeld O, Ouyang W.** 2014. Role of IL-22 in microbial host defense. *Current topics in microbiology and immunology* **380**:213-236.
5. **Sanos SL, Bui VL, Mortha A, Oberle K, Heners C, Johnner C, Diefenbach A.** 2009. RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* **10**:83-91.
6. **Luci C, Reynders A, Ivanov II, Cognet C, Chiche L, Chasson L, Hardwigsen J, Anguiano E, Banchereau J, Chaussabel D, Dalod M, Littman DR, Vivier E, Tomasello E.** 2009. Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol* **10**:75-82.
7. **Sonnenberg GF, Artis D.** 2015. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nature medicine* **21**:698-708.
8. **Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, Mention JJ, Thiam K, Cerf-Bensussan N, Mandelboim O, Eberl G, Di Santo JP.** 2008. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* **29**:958-970.
9. **Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK, Doherty JM, Mills JC, Colonna M.** 2009. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* **457**:722-725.
10. **Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R.** 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* **21**:241-254.
11. **Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG.** 2010. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J Infect Dis* **201**:534-543.
12. **Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, Blumberg RS, Xavier RJ, Mizoguchi A.** 2008. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation* **118**:534-544.
13. **Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV, West ML, Jenq RR, Holland AM, Kappel LW, Ghosh A, Tsai JJ, Rao UK, Yim NL, Smith OM, Velardi E, Hawryluk EB, Murphy GF, Liu C, Fouser LA, Kolesnick R, Blazar BR, van den Brink MR.** 2012. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* **37**:339-350.
14. **Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Lehr HA, Hirth S, Weigmann B, Wirtz S, Ouyang W, Neurath MF, Becker C.** 2009. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *The Journal of experimental medicine* **206**:1465-1472.
15. **Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ, Ouyang W.** 2008. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature medicine* **14**:282-289.

16. **Sonnenberg GF, Monticelli LA, Elloso MM, Fouser LA, Artis D.** 2011. CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. *Immunity* **34**:122-134.
17. **Guo X, Liang Y, Zhang Y, Lasorella A, Kee BL, Fu YX.** 2015. Innate Lymphoid Cells Control Early Colonization Resistance against Intestinal Pathogens through ID2-Dependent Regulation of the Microbiota. *Immunity* **42**:731-743.
18. **Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, Shibata N, Grunberg S, Sinha R, Zahm AM, Tardif MR, Sathaliyawala T, Kubota M, Farber DL, Collman RG, Shaked A, Fouser LA, Weiner DB, Tessier PA, Friedman JR, Kiyono H, Bushman FD, Chang KM, Artis D.** 2012. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science (New York, N.Y)* **336**:1321-1325.
19. **Behnsen J, Jellbauer S, Wong CP, Edwards RA, George MD, Ouyang W, Raffatellu M.** 2014. The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. *Immunity* **40**:262-273.
20. **Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Songhet P, Dumoutier L, Ferrero I, Janot L, Erard F, Bertout J, Leger H, Sebbane F, Benecke A, Renaud JC, Hardt WD, Ryffel B, Sirard JC.** 2010. TLR5 Signaling Stimulates the Innate Production of IL-17 and IL-22 by CD3negCD127+ Immune Cells in Spleen and Mucosa. *J Immunol* **185**:1177-1185.
21. **Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, Zenewicz LA, Leiner I, Hohl TM, Flavell RA, Littman DR, Pamer EG.** 2012. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* **36**:276-287.
22. **Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A.** 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**:1099-1103.
23. **Kofoed EM, Vance RE.** 2011. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* **477**:592-595.
24. **Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, Liu L, Shao F.** 2011. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* **477**:596-600.
25. **Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, Denning TL, Crawford SE, Puijssers AJ, Iskarpatyoti JA, Estes MK, Dermody TS, Ouyang W, Williams IR, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT.** 2014. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science (New York, N.Y)* **346**:861-865.
26. **Jarchum I, Liu M, Lipuma L, Pamer EG.** 2011. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infection and immunity* **79**:1498-1503.
27. **Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, Frias A, Sloane VM, Xu J, Neish AS, Rojas M, Gewirtz AT.** 2008. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol* **180**:8280-8285.
28. **Munoz N, Van Maele L, Marques JM, Rial A, Sirard JC, Chabalgoity JA.** 2010. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infection and immunity* **78**:4226-4233.
29. **Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov S, Porte R, Deruy E, Chabalgoity JA, Renaud JC, Eberl G, Benecke AG, Trottein F, Faveeuw C, Sirard JC.** 2014. Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs

- during *Streptococcus pneumoniae* infection. J Infect Dis **210**:493-503.
30. **Yu FS, Cornicelli MD, Kovach MA, Newstead MW, Zeng X, Kumar A, Gao N, Yoon SG, Gallo RL, Standiford TJ.** 2010. Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide. J Immunol **185**:1142-1149.
 31. **Zgair AK.** 2012. Flagellin administration protects respiratory tract from *Burkholderia cepacia* infection. Journal of microbiology and biotechnology **22**:907-916.
 32. **Zgair AK, Chhibber S.** 2012. *Stenotrophomonas maltophilia* flagellin restricts bacterial colonization in BALB/c mouse lung in vivo. FEMS immunology and medical microbiology **66**:191-200.
 33. **Netea MG, van der Leij F, Drenth JP, Joosten LA, te Morsche R, Verweij P, de Jong D, Kullberg BJ, van der Meer JW.** 2010. Chronic yersiniosis due to defects in the TLR5 and NOD2 recognition pathways. The Netherlands journal of medicine **68**:310-315.
 34. **Smego RA, Frean J, Koornhof HJ.** 1999. Yersiniosis I: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague *Yersinia* infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **18**:1-15.
 35. **Carnoy C, Mullet C, Muller-Alouf H, Leteurtre E, Simonet M.** 2000. Superantigen YPMa exacerbates the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. Infection and immunity **68**:2553-2559.
 36. **Goubard A, Loiez C, Abe J, Fichel C, Herwegh S, Faveeuw C, Porte R, Cayet D, Sebbane F, Penet S, Foligne B, Desreumaux P, Saito H, Sirard JC, Simonet M, Carnoy C.** 2015. Superantigenic *Yersinia pseudotuberculosis* induces the expression of granzymes and perforin by CD4⁺ T cells. Infection and immunity **83**:2053-2064.
 37. **Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard JC.** 2008. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. J Immunol **181**:2036-2043.
 38. **Porte R, Fougeron D, Munoz-Wolf N, Tabareau J, Georgel AF, Wallet F, Paget C, Trottein F, Chabalgoity JA, Carnoy C, Sirard JC.** 2015. A toll-like receptor 5 agonist improves the efficacy of antibiotics in the treatment of primary and influenza-associated pneumococcal mouse infections. Antimicrob Agents Chemother **59**:6064-6072.
 39. **Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, Leaf IA, Aderem A.** 2010. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. Proc Natl Acad Sci U S A **107**:3076-3080.
 40. **Autenrieth IB, Beer M, Bohn E, Kaufmann SH, Heesemann J.** 1994. Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. Infection and immunity **62**:2590-2599.
 41. **Dessein R, Gironella M, Vignal C, Peyrin-Biroulet L, Sokol H, Secher T, Lacas-Gervais S, Gratadoux JJ, Lafont F, Dagorn JC, Ryffel B, Akira S, Langella P, Nunez G, Sirard JC, Iovanna J, Simonet M, Chamailard M.** 2009. Toll-like receptor 2 is critical for induction of Reg3 beta expression and intestinal clearance of *Yersinia pseudotuberculosis*. Gut **58**:771-776.
 42. **Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler JL, Dubin PJ, Pilewski JM, Myerburg MM, Mason CA, Iwakura Y, Kolls JK.** 2008. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. Nature medicine **14**:275-281.
 43. **Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL.** 2001. Cutting edge:

- bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* **167**:1882-1885.
44. **Lotz M, Gutle D, Walther S, Menard S, Bogdan C, Hornef MW.** 2006. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* **203**:973-984.
 45. **Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S.** 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* **9**:769-776.
 46. **Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebie M, Lawrence T, van Rijt LS, Lambrecht BN, Sirard JC, Hussell T.** 2008. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *The Journal of experimental medicine* **205**:323-329.
 47. **Honko AN, Mizel SB.** 2004. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infection and immunity* **72**:6676-6679.
 48. **Janot L, Sirard JC, Secher T, Noulin N, Fick L, Akira S, Uematsu S, Didierlaurent A, Hussell T, Ryffel B, Erard F.** 2009. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur J Immunol* **39**:1587-1596.
 49. **Laws TR, Davey MS, Green C, Cooper IA, Titball RW, Lukaszewski RA.** 2011. *Yersinia pseudotuberculosis* is resistant to killing by human neutrophils. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **13**:607-611.
 50. **Thorslund SE, Ermert D, Fahlgren A, Erttmann SF, Nilsson K, Hosseinzadeh A, Urban CF, Fallman M.** 2013. Role of YopK in *Yersinia pseudotuberculosis* resistance against polymorphonuclear leukocyte defense. *Infection and immunity* **81**:11-22.
 51. **Westermarck L, Fahlgren A, Fallman M.** 2014. *Yersinia pseudotuberculosis* efficiently escapes polymorphonuclear neutrophils during early infection. *Infection and immunity* **82**:1181-1191.
 52. **Gao N, Kumar A, Jyot J, Yu FS.** 2010. Flagellin-induced corneal antimicrobial peptide production and wound repair involve a novel NF-kappaB-independent and EGFR-dependent pathway. *PLoS one* **5**:e9351.
 53. **Tukhvatulin AI, Gitlin, II, Shcheblyakov DV, Artemicheva NM, Burdelya LG, Shmarov MM, Naroditsky BS, Gudkov AV, Gintsburg AL, Logunov DY.** 2013. Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF-kappaB, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infection and immunity* **81**:3855-3864.
 54. **Ogushi K, Wada A, Niidome T, Mori N, Oishi K, Nagatake T, Takahashi A, Asakura H, Makino S, Hojo H, Nakahara Y, Ohsaki M, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Moss J, Hirayama T.** 2001. *Salmonella enteritidis* FlhC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J Biol Chem* **276**:30521-30526.
 55. **Takahashi A, Wada A, Ogushi K, Maeda K, Kawahara T, Mawatari K, Kurazono H, Moss J, Hirayama T, Nakaya Y.** 2001. Production of beta-defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by *Salmonella enteritidis* flagella filament structural protein. *FEBS Lett* **508**:484-488.

B. Résumé de l'article I

Dans cette étude, nous avons démontré que l'administration systémique de flagelline augmente la survie des animaux et la clairance bactérienne au cours d'une infection intestinale létale par *Y. pseudotuberculosis*. Nous avons également observé l'inefficacité d'un traitement par le LPS suggérant une spécificité de la flagelline dans le développement de cette protection. L'utilisation de flagellines recombinantes et de modèles d'animaux déficients nous a permis de souligner la nécessité de TLR5 et de l'adaptateur MyD88 pour mettre en place les mécanismes antibactériens. De manière intéressante, la protection induite par la flagelline est retrouvée chez les animaux déficients en IL-22 (*Il22^{-/-}*) et les animaux *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* (i.e déficients en lymphocytes, cellules NK et ILC) excluant le rôle de ces composants dans la mise en place de la protection. L'originalité de ces travaux réside dans le fait que la protection n'est pas modulée par les ILC et l'IL-22, jusqu'alors considérées comme acteurs des mécanismes de la protection des muqueuses après une stimulation par la flagelline.

C. Discussion de l'article I

Les travaux présentés dans l'article I ont mis en évidence que l'administration de la flagelline en contexte infectieux induisait l'expression de chimiokines responsables du recrutement de cellules myéloïdes telles que les PNN (**Figure 4**, Article I). L'expression chimiokinique intestinale induite par la flagelline a d'ailleurs été associée avec le recrutement rapide des PNN au niveau de la *lamina propria* de l'intestin grêle [290]. Les PNN étant importants dans le contrôle des infections intestinales par *Y. pseudotuberculosis*, notamment au cours de la phase précoce de l'infection, nous émettons l'hypothèse que l'infiltration rapide de PNN pourrait améliorer le contrôle de l'infection par *Y. pseudotuberculosis* [294, 295]. Ainsi l'analyse par immunohistochimie et par cytométrie en flux permettrait d'évaluer l'infiltration de PNN au niveau de l'iléon des souris infectées par *Y. pseudotuberculosis* et traitées par la flagelline. Le dosage de la lactoferrine et de la myéloperoxydase, deux marqueurs des PNN, dans les selles ou les lavages intestinaux permettrait également d'évaluer la translocation des PNN dans la lumière intestinale [296]. L'élimination des PNN après l'administration d'anticorps « déplétants » permettrait de caractériser la contribution des PNN dans la mise en place de la protection anti-infectieuse induite par la stimulation de TLR5.

Notre étude suggère l'importance de l'épithélium dans la réponse anti-bactérienne induite par la flagelline. L'épithélium est un compartiment complexe constituée (i) d'une structure imperméable formée par les entérocytes liés par des jonctions serrées, (ii) d'une couche de mucus produite par les cellules caliciformes et concentrant les molécules antimicrobiennes produites par l'épithélium, (iii) de cellules de Paneth dont le contenu des granulations possède un potentiel antimicrobien [297]. Chacun de ces éléments pourrait être impliqué dans l'effet anti-infectieux de la flagelline. Il a été montré que les cellules structurales qui constituent l'épithélium intestinal expriment TLR5 et sont activées par la flagelline [164]. L'utilisation de souris chimères déficientes pour la signalisation TLR5 dans les cellules structurales ou hématopoïétiques nous permettrait de confirmer le rôle de l'épithélium dans la mise en place de cette protection anti-infectieuse. Les souris $Tlr5^{\Delta IEC}$ qui ont une délétion sélective de TLR5 au niveau des cellules épithéliales intestinales et qui ont été récemment décrites serait également un outil précieux pour répondre à la question du rôle de l'épithélium [176]. Il serait également intéressant d'évaluer l'impact du traitement par la flagelline sur la perméabilité de la muqueuse intestinale d'une part en administrant oralement du dextran couplé à un fluorochrome puis en dosant la fluorescence dans le sérum et d'autre part en analysant l'expression des molécules de jonctions cellulaires. Le rôle de la stimulation de TLR5 sur la structure du mucus, dont l'expression semble stimulée par la flagelline (résultats non montrés), pourrait être caractérisé par l'analyse histologique de son épaisseur. Finalement, l'évaluation de la dégranulation des cellules de Paneth induite par l'administration systémique de la flagelline pourrait être analysée par histologie.

Nos résultats nous indiquent que la flagelline stimule l'expression transcriptionnelle de molécules d'activités antimicrobiennes au niveau de l'iléon (**Figure 4**, Article I) dont certaines ont été décrites comme étant sous la dépendance de l'IL-22 (RegIII γ , RegIII β , β -défensine 3, complexe de la calprotectine [S100A8/S100A9]) (**Figure 5**, Article I) [290, 298]. Nos travaux montrent que l'IL-22 ne contribue pas à la protection et suggèrent donc que ces effecteurs ne sont pas impliqués. Des résultats supplémentaires semblent indiquer que l'activation par la flagelline de l'expression de CRAMP, peptide antimicrobien produit par de nombreuses cellules (PNN et les cellules épithéliales), n'est pas modulée par la déficience en IL-22 (résultats non montrés) [299]. Une étude récente a décrit la capacité immunostimulatrice de CRAMP responsable du contrôle d'une infection bactérienne de la muqueuse respiratoire [300]. De plus, un modèle de protection induite par la flagelline au cours d'une infection respiratoire par *P. aeruginosa* a montré l'importance de CRAMP via

l'utilisation de souris déficientes (*Cnlp*^{-/-}) [92]. La cathélicidine pourrait être un candidat responsable de la protection antibactérienne mise en place dans notre modèle. Il serait donc intéressant de doser CRAMP dans le tissu intestinal et d'évaluer sa localisation intestinale par immunohistologie au cours de l'infection. Mais également d'étudier la protection chez les souris déficientes en CRAMP afin de caractériser l'importance de la cathélicidine chez les souris infectées par *Y. pseudotuberculosis* et traitées par la flagelline.

Nous avons également observé que l'administration systémique de flagelline induisait la stimulation de l'expression de l'hepcidine (**Figure 4**, article I). Cette molécule d'activité antimicrobienne séquestre le fer libre, élément indispensable au développement de toute vie microbienne. Bien que l'expression de l'hepcidine ait été récemment démontrée comme étant modulée par l'IL-22, les auteurs soulèvent le caractère partiel de cette régulation [301, 302]. En effet, ces études décrivent un autre mécanisme dépendant de l'IL-6 pour l'expression de l'hepcidine par les hépatocytes et les leucocytes suite à la stimulation des TLR et notamment du TLR5. Nous avons confirmé l'impact partiel de la déficience en IL-22 sur l'induction de l'expression de l'hepcidine (*hamp*) par la flagelline dans notre modèle (**Figure 5**, article I). Des souris déficientes en hepcidine (*Hepc1*^{-/-} ou *Hamp1*^{-/-}) ont été créées par une équipe parisienne [303]. Ainsi l'application de notre modèle chez ces souris infectées par *Y. pseudotuberculosis* établirait la contribution de l'hepcidine dans la protection induite par la flagelline.

L'IL-6 est exprimée de manière importante après l'administration systémique de flagelline dans le contexte de l'infection par *Y. pseudotuberculosis* (**Figure 4**, Article I). De plus nous avons également démontré que l'expression de l'IL-6 dans ce contexte est indépendante de l'IL-22 (**Figure 5**, Article I). L'IL-6 est une interleukine qui, comme l'IL-22, signale via la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*) [304]. Il a été démontré au cours d'infection par *L. monocytogenes*, bactérie intracellulaire infectant principalement les macrophages, un mécanisme de contrôle de l'infection dépendant de l'IL-6 et de sa signalisation [305]. Une autre étude sur *C. rodentium*, modèle murin de l'infection du colon mimant l'infection par *E. coli* entéropathogène et entérohémorragique chez l'Homme, démontre que l'IL-6 est indispensable au contrôle de ces infections [306]. Finalement un modèle d'infection intestinale par *Yersinia enterocolitica* a montré l'importance de l'IL-6 dans le contrôle de l'infection, et sur l'activité des macrophages [307]. Globalement, ces résultats suggèrent que l'IL-6 pourrait moduler les mécanismes de protection anti-infectieux indépendants de l'IL-22, probablement via

l'augmentation des capacités antibactériennes des macrophages présents ou recrutés au niveau du site infectieux. Il serait donc intéressant de tester notre modèle d'administration de la flagelline au cours de l'infection intestinale par *Y. pseudotuberculosis* chez des souris déficientes en IL-6 ou en l'un de ses récepteurs. De plus de nombreux outils (molécules et anticorps monoclonaux) ont été développés pour bloquer différents aspects de la signalisation de l'IL-6 [304].

L'administration respiratoire de la flagelline augmente le potentiel thérapeutique des antibiotiques dans le traitement de pneumonies ou de surinfections pneumococciques post-Influenza.

A. Article II

A toll-like receptor 5 agonist improves the efficacy of antibiotics in the treatment of primary and influenza-associated pneumococcal mouse infections.

Porte *et al.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Octobre 2015, 59(10):6064-72

Les infections bactériennes pulmonaires représentent un problème de santé publique majeur tant au niveau des pneumonies communautaires que des pneumonies nosocomiales [308]. Les bactéries les plus fréquentes dans les pneumonies communautaires sont *S. pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*, alors que les pneumonies nosocomiales sont plus fréquemment associées à *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Les approches thérapeutiques actuelles à base d'antibiotiques présentent une grande efficacité dans le contexte d'infections par des bactéries sensibles. Cependant, l'émergence de germes multi-résistants aux antibiotiques conduit à une fréquence de plus en plus importante d'échecs thérapeutiques. En parallèle, le nombre restreint de nouvelles molécules antibiotiques ne permet pas de lutter efficacement contre ces infections [309]. De même, le traitement antibiotique de patients atteints de pathologies aggravantes (coinfections, traitements immunosuppresseurs, broncho-pneumopathies chroniques obstructives...) reste difficile. L'utilisation d'immunostimulants tels que la flagelline pour compléter l'activité des antibiotiques pourrait représenter une approche thérapeutique innovante.

Notre objectif a été d'évaluer le potentiel thérapeutique de combinaisons associant un antibiotique avec la flagelline (FliC_{Δ174-400}, **Figure 14**) au cours d'infections respiratoires par *S. pneumoniae*.

S. pneumoniae (pneumocoque), est un diplocoque à Gram positif comprenant 93 sérotypes déterminés par la composition de la capsule polysaccharidique. Cette bactérie peut causer des infections locales comme des pneumonies ou des otites. Toutefois, en fonction du sérotype et de la susceptibilité de l'hôte, elle peut également causer des infections invasives. Par ailleurs, *S. pneumoniae* est associé au développement de surinfections bactériennes post-grippales dont

la sévérité est associée au taux de mortalité importants observés lors des grandes pandémies grippales [310]. Dans notre étude, nous avons utilisé une souche invasive de sérotype 1 capable d'infecter les voies respiratoires basses (bronchioles et alvéoles, **Figure 17**) puis de disséminer, en empruntant la circulation sanguine [162].

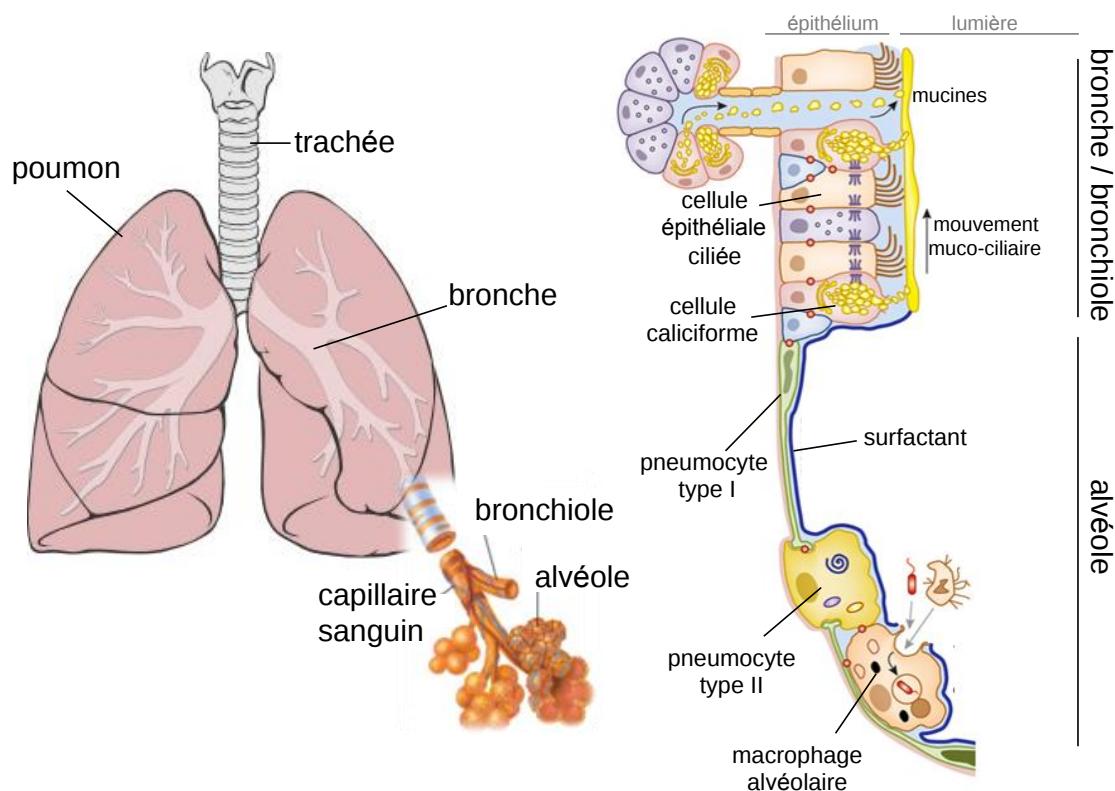


Figure 11 : Le poumon et l'organisation cellulaire de la muqueuse respiratoire.

(A) Anatomie de l'arbre respiratoire qui s'étend de la trachée aux alvéoles. (B) Le tissu pulmonaire est composé d'une muqueuse structurée assurant une fonction respiratoire et de protection contre les micro-organismes environnementaux. Les bronches et bronchioles sont composées d'un épithélium, formé de cellules épithéliales ciliées, qui participent à l'élimination des agents environnementaux en réalisant le mouvement muco-ciliaire, et de cellules caliciformes productrices du mucus. Les alvéoles pulmonaires représentent une fine barrière physique entre l'organisme et la lumière. L'épithélium alvéolaire est composé de pneumocytes de type I qui assurent les échanges gazeux entre l'alvéole et la circulation sanguine, et de pneumocytes de type II produisant le surfactant. Figure inspirée de Whitsett *et al.* [311].

Nous avons choisi deux antibiotiques pour analyser la stratégie combinatoire. Dans un premier temps, nous avons étudié la combinaison de la flagelline avec l'amoxicilline, de la famille des β -lactamines, qui exerce un effet bactéricide en agissant sur la synthèse de la paroi des bactéries. L'amoxicilline est un antibiotique de première intention pour le traitement des pneumonies pneumococques [312]. Dans un second temps nous avons combiné la flagelline avec le co-trimoxazole. Cet antibiotique est une combinaison de deux molécules, le triméthoprime et le sulfaméthoxazole, agissant chacun sur la synthèse des acides nucléiques. Le co-trimoxazole est un antibiotique à spectre large utilisé principalement au cours d'infections urinaires et de certaines infections respiratoires. Cependant, cet antibiotique n'est pas indiqué en première intention pour traiter les pneumonies pneumococques [313].

Supplementary Data

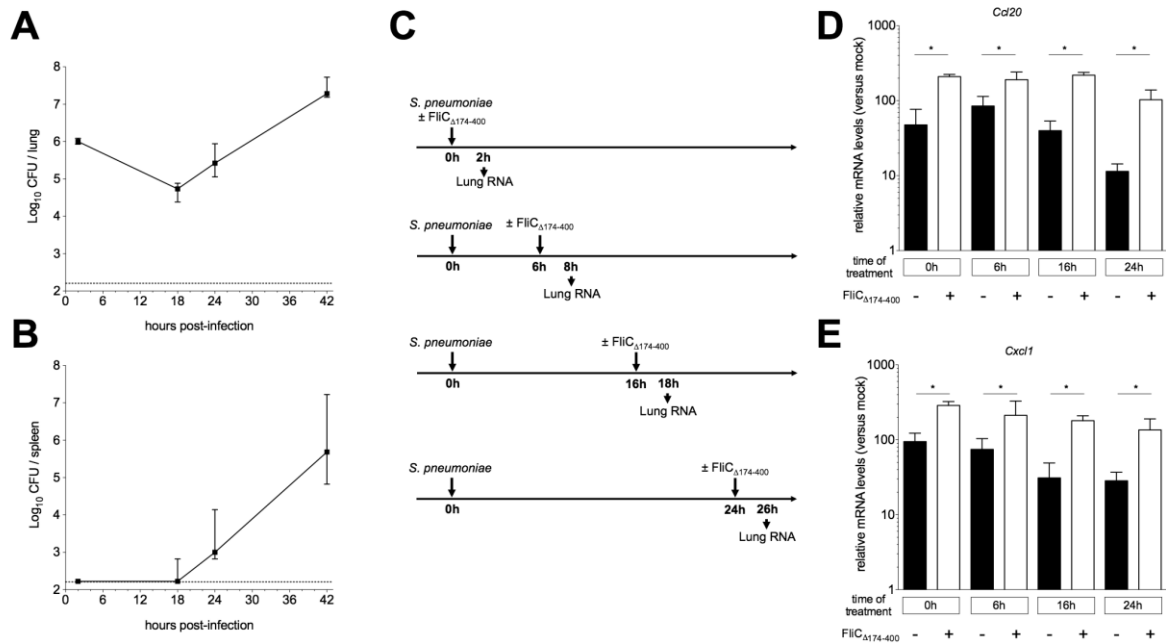


FIG S1. Flagellin stimulates proinflammatory gene expression during *S. pneumoniae* respiratory infection. (A-B) Female BALB/C mice were infected intranasally with 2×10^6 *S. pneumoniae*. Bacterial counts were determined in the lung (A) and spleen (B) at different time points. Colony-forming unit (CFU) counts for individual mice (n=4) are shown and expressed as median $\pm$ range. The dashed line represents the detection threshold. (C-E) Animals were treated intranasally with 2.5 μ g of flagellin FliC_{Δ174-400} at 0, 6, 16, or 24 hours post-infection. Two hours after administration of flagellin, lungs were collected for analysis of mRNA levels by quantitative RT-PCR. Messenger RNA levels of *Ccl20* (D) and *Cxcl1* (E) for individual mice (n=4) are expressed relative to those of the uninfected and untreated mock group (arbitrarily set to a value of 1) and shown as the mean $\pm$ SD. Statistically significant differences between the two groups at each time point were assessed in a Mann-Whitney test (* $P < 0.05$).

B. Résumé de l'article II

Ce travail a mis en évidence qu'il est possible d'améliorer l'index thérapeutique d'un antibiotique par l'immunostimulation de la muqueuse au cours d'infections respiratoires. Nous avons démontré dans un premier temps qu'un traitement, combinant une instillation intranasale de flagelline avec une administration intragastrique d'amoxicilline, améliorait la protection contre une infection pneumococcique létale par rapport au traitement par l'amoxicilline seule. Nous avons également mis en évidence que cette protection peut être induite en combinant la flagelline avec un autre antibiotique (le co-trimoxazole) rarement utilisé pour ce type d'infections. La protection, se traduit dans les deux cas par une augmentation de la survie, une réduction de la charge bactérienne pulmonaire et systémique, et par la préservation du poids des animaux. De façon notable, la protection a été associée à une infiltration de PNN au niveau des voies respiratoires. Le traitement combinant l'amoxicilline avec la flagelline a été appliqué dans le contexte de pneumonies bactériennes post-grippales (virus Influenza A) et a montré une importante efficacité. De plus, l'étude chez des souris déficientes en TLR5 (*Tlr5^{-/-}*) ainsi que l'utilisation d'une flagelline recombinante mutée pour le site de reconnaissance de TLR5, nous ont permis de définir le rôle essentiel de TLR5 dans la mise en place de la protection induite par la thérapie combinée. Ces travaux montrent la plus-value que peut apporter la stimulation de l'immunité innée sur le traitement antibiotique de pneumonies bactériennes.

C. Résultats complémentaires de l'article II

Des expériences supplémentaires ont été réalisées dans le but de définir les mécanismes protecteurs mis en place par le traitement combiné. Pour définir ces mécanismes, nous avons décidé d'utiliser la combinaison d'amoxicilline (AMX) et de flagelline (FliC₁₇₄₋₄₀₀) dans notre modèle d'infection à *S. pneumoniae*.

Nous avons choisi d'analyser la réponse immunitaire après un traitement unique par la combinaison de l'amoxicilline et de la flagelline à 12h (**Figure 18 A**), le but étant de définir la réponse précoce associée au traitement. Dans un premier temps nous avons mesuré la charge bactérienne dans les poumons d'animaux infectés par *S. pneumoniae* et traités avec l'amoxicilline, la flagelline ou la combinaison des deux (**Figure 18 B**). La diminution de la charge bactérienne au cours des 8 premières heures quel que soit le traitement confirme la cinétique de croissance bactérienne précédemment observée (**FIG S1A**, article II). Douze

heures suivant le traitement, les animaux non traités voient leur charge bactérienne fortement augmentée dans les poumons. Les animaux traités par la flagelline contrôlent l'infection jusqu'à 12h mais plus à 18h. Les animaux ayant reçu l'amoxicilline maintiennent la charge bactérienne pendant les 18h suivant le traitement. Enfin, les souris ayant reçu le traitement combiné présentent une chute de la charge bactérienne pulmonaire dès 12h après le traitement.

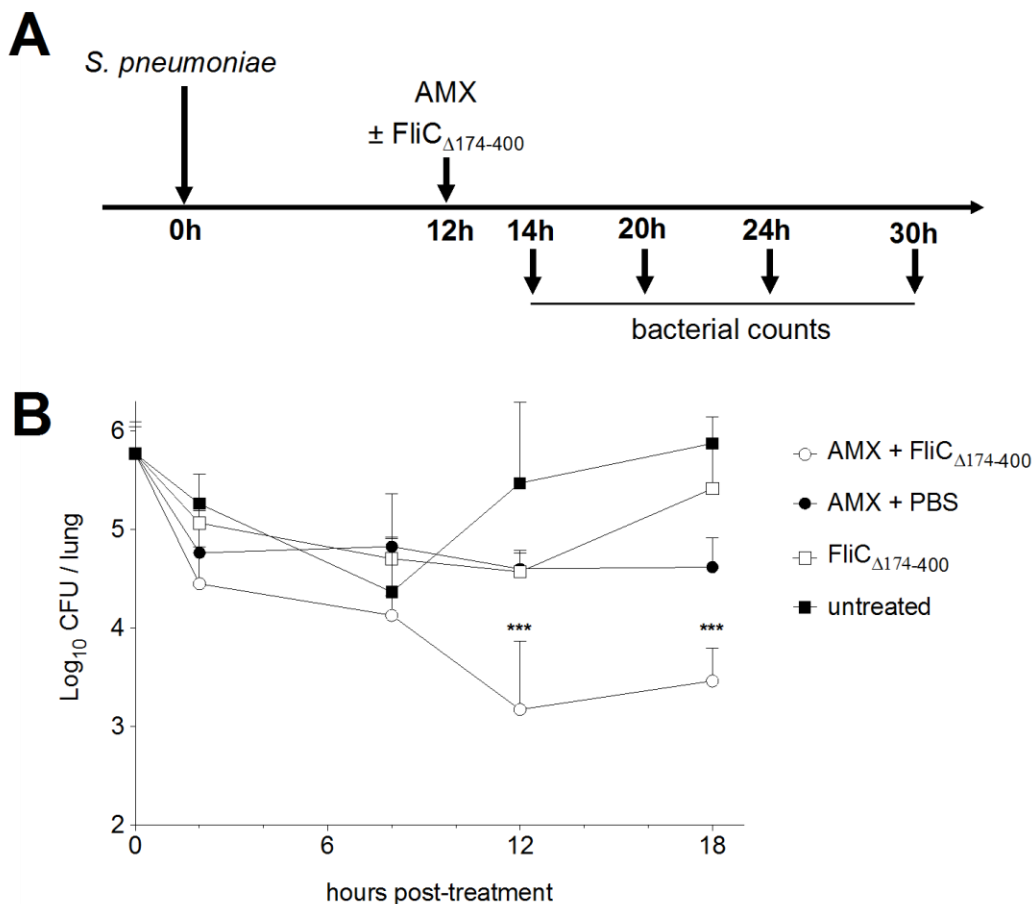


Figure 18 : Un traitement unique combinant l'amoxicilline et la flagelline induit une réduction de la charge bactérienne pulmonaire. (A) Les souris BALB/c femelles ont été infectées par la voie intranasale avec une dose létale de pneumocoque (2.10^6 *S. pneumoniae* sérotype 1). Les animaux ont alors été traités 12h post-infection par (i) 2,5 μg de flagelline (FliC $_{\Delta 174-400}$) par la voie intranasale, (ii) 5 μg d'amoxicilline (AMX) par la voie intragastrique et du PBS par la voie intranasale, (iii) la combinaison des deux traitements (AMX + FliC $_{\Delta 174-400}$) ou (iv) laissés non traités (untreated). (B) La charge bactérienne pulmonaire a été mesurée 2h, 8h, 12h et 18h après le traitement des animaux infectés. L'analyse statistique ANOVA de Kruskal-Wallis a été réalisée en comparant les différents groupes au groupe de souris infectées mais non-traitées (PBS) : ***, $P < 0,001$.

Ces résultats nous indiquent l'efficacité du traitement combiné après un unique traitement. La diminution de la charge bactérienne entre 8h et 12h induite par le traitement combiné suggère la mise en place d'un mécanisme effecteur au cours de cette période.

Nous avons démontré que la combinaison antibiotique/flagelline était associée à une infiltration importante de PNN (**FIG 5**, article II). Ces cellules immunitaires ayant un rôle important dans le contrôle des infections bactériennes et notamment des infections pneumococciques, nous nous sommes donc intéressé à leur recrutement après l'application du traitement unique. Ainsi nous avons étudié l'expression des chimiokines CCL20 et CXCL2, toutes deux caractéristiques de l'activation de TLR5 par la flagelline, et capables de recruter les leucocytes exprimant leurs récepteurs, respectivement CCR6 et CXCR2 [174].

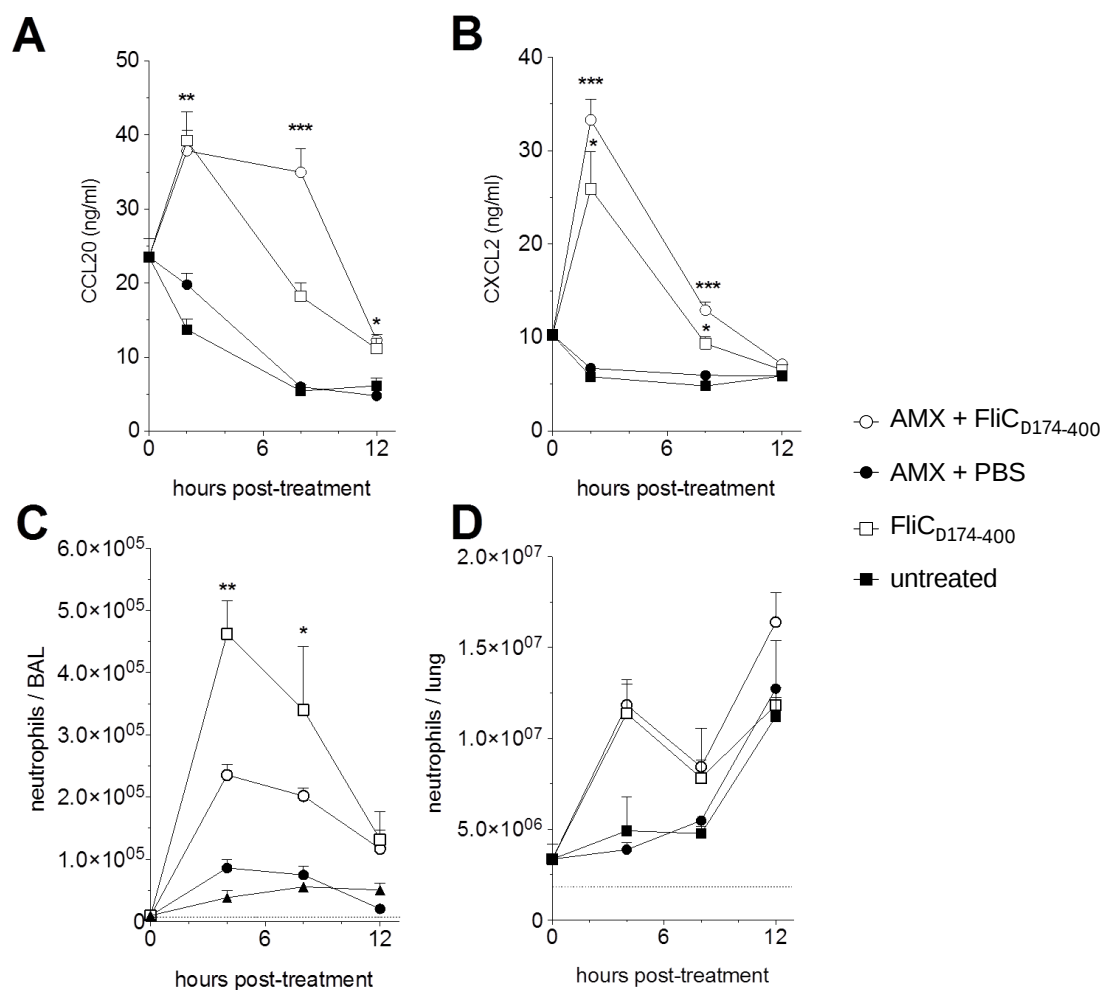


Figure 19 : Le traitement combinant l'amoxicilline et la flagelline induit la synthèse rapide et transitoire de chimiokines et l'infiltration de PNN. Les souris BALB/c femelles ont été infectées par la voie intranasale avec une dose létale de pneumocoque (2.10^6 *S. pneumoniae* sérotype 1). Ces animaux ont alors été traités 12h post-infection par (i) 2,5 µg de flagelline (FliC_{Δ174-400}) par la voie intranasale, (ii) 5 µg d'amoxicilline (AMX) par la voie intragastrique et du PBS par la voie intranasale, (iii) la combinaison des deux traitements (AMX + FliC_{Δ174-400}) ou (iv) laissés non traités (untreated). (A-B) La production des chimiokines CCL20 (A) et CXCL2 (B) a été mesurée par la technique ELISA sur les poumons prélevés 2h, 8h et 12h après le traitement des animaux infectés. (C-D) Le nombre de PNN (*neutrophils*) a été évalué par cytométrie en flux sur les cellules isolées de lavage bronchoalvéolaires (BAL) (C) ou de poumons (*lung*) (D) prélevés 4h, 8h et 12h après les traitements des animaux infectés. Les PNN murins ont été sélectionnés suivant l'expression des marqueurs phénotypiques CD45, CD11b, Ly6C et Ly6G. L'analyse statistique ANOVA de Kruskal-Wallis a été réalisée en comparant les différents groupes au groupe de souris infectées mais non-traitées (PBS) : *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

Le traitement combiné ainsi que le traitement par la flagelline seule induisent une augmentation rapide, dès 2h post-traitement, des taux de CCL20 et CXCL2 (**Figure 19 A-B**) par rapport aux souris traitées par l'amoxicilline seule ou non traitées. La production de CXCL2 est transitoire puisque le taux de ces chimiokines retrouve une concentration similaire aux souris non traitées 12h post-traitement. Pour CCL20, la concentration à 12h post-traitement est toujours significativement supérieure pour les animaux traités par l'amoxicilline et/ou la flagelline. Toutefois, des dosages supplémentaires nous révèlent le retour, à 18h, à des concentrations similaires à celles observées chez les souris non traitées (résultats non montrés). La flagelline induit donc l'expression rapide et transitoire de ces chimiokines.

Nous avons ensuite analysé le recrutement des PNN dans les lavages bronchoalvéolaires (*bronchoalveolar lavage*, BAL) et les poumons durant les 12h suivant le traitement (**Figure 19 C-D**). La flagelline en combinaison ou non avec l'amoxicilline, induit une infiltration locale importante et rapide, dès 4h post-traitement, de PNN par rapport aux animaux traités par l'amoxicilline seule ou non traités. Par ailleurs, le recrutement associé à la flagelline dans le BAL semble suivre une vague transitoire puisque le taux de PNN diminue chez ces animaux jusqu'à atteindre des niveaux proches du taux des animaux n'ayant pas reçu de flagelline. Cependant, les taux pulmonaires de ces cellules semblent suivre un profil différent. En effet, la flagelline seule ou combinée à l'amoxicilline induit une augmentation de plus de deux fois du nombre de PNN par rapport aux animaux traités par l'amoxicilline ou uniquement infectés, et cela dès 4h après le traitement. Cependant cette différence s'amenuise 8h après le traitement. Une seconde vague de recrutement, cette fois indépendante du traitement apparaît à 12h. Cela suggère une infiltration pulmonaire de PNN induite par l'état invasif de l'infection.

Nous avons ensuite mesuré la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF, l'IL-1 β et l'IFN- γ dans les poumons des animaux infectés traités ou non par l'amoxicilline et/ou la flagelline (**Figure 20 A-D**). Ces cytokines ont différents rôles dans la phase aiguë comme l'augmentation de l'adhérence des parois vasculaires au niveau du site infecté favorisant le recrutement de cellules inflammatoires, ou encore l'activation des macrophages.

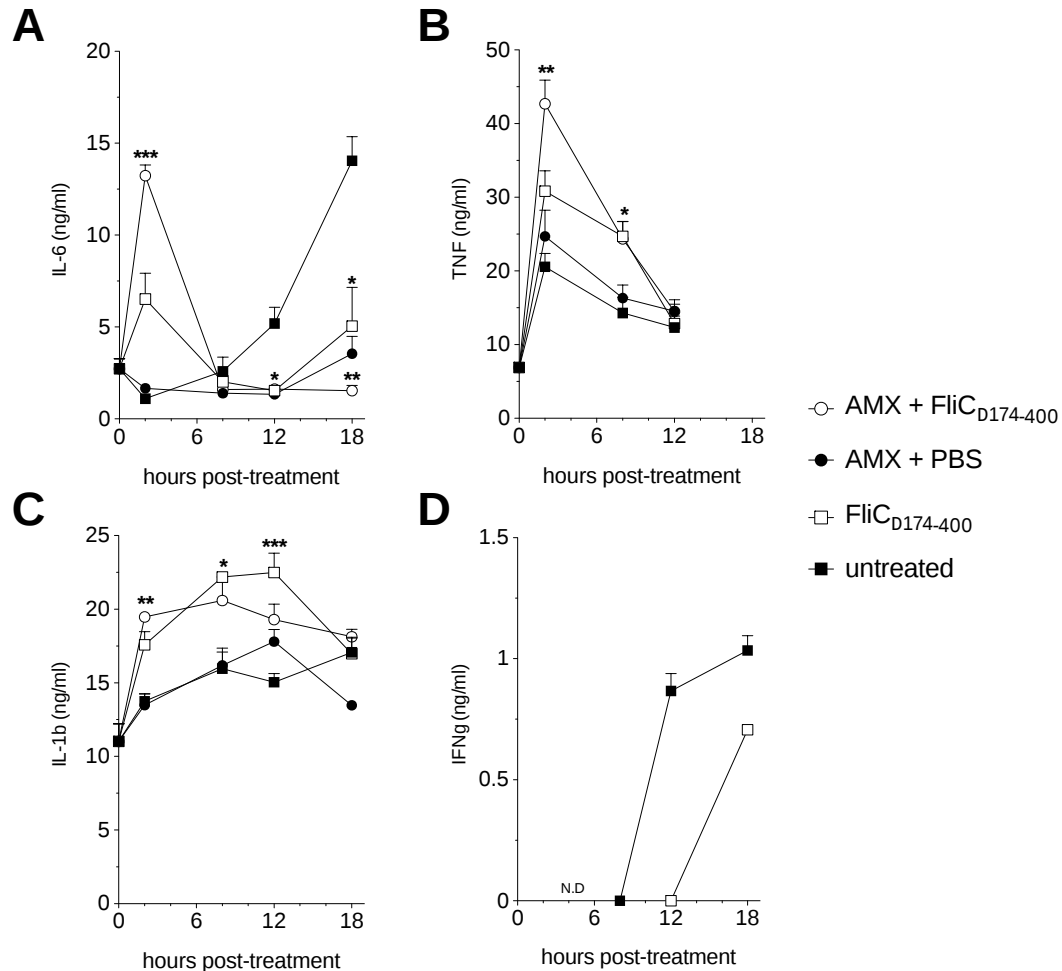


Figure 20 : Le traitement combinant l'amoxicilline et la flagelline induit la synthèse d'IL-6, de TNF et d'IL-1β ; toutefois l'expression d'IFN-γ n'est dépendante que de l'infection. Les souris BALB/c femelles ont été infectées par la voie intranasale avec une dose létale de pneumocoque (2.10^6 *S. pneumoniae* sérotype 1). Ces animaux ont alors été traités 12h post-infection par (i) 2,5 µg de flagelline (FliC_{Δ174-400}) par la voie intranasale, (ii) 5 µg d'amoxicilline (AMX) par la voie intragastrique et du PBS par la voie intranasale, (iii) la combinaison des deux traitements (AMX + FliC_{Δ174-400}) ou (iv) laissés non traités (untreated). La production de l'IL-6 (A), du TNF (B), de l'IL-1β (C) et de l'IFN-γ (D) a été mesurée par la technique ELISA sur les poumons prélevés 2h, 8h, 12h et 18h après le traitement des animaux infectés. L'analyse statistique ANOVA de Kruskal-Wallis a été réalisée en comparant les différents groupes au groupe de souris infectées mais non-traitées (PBS) : *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

L'expression de l'IL-6 est rapidement augmentée chez les souris ayant reçu le traitement combiné et à moindre mesure pour le groupe ayant reçu la flagelline seule (**Figure 20 A**). Cette augmentation est rapide et transitoire puisqu'elle atteint un pic dès 2h post traitement et revient au niveau initial 6h plus tard. Pour les souris non traitées nous avons une augmentation franche à 12h, au moment où la charge bactérienne augmente dans le tissu pulmonaire suggérant que l'expression d'IL-6 est liée à l'augmentation de la charge bactérienne. Pour le TNF, quelque soit le traitement administré aux souris, sa concentration augmente dans les 2h suivant le traitement, pour ensuite diminuer. Cependant les souris traitées par la flagelline, associée ou non à l'amoxicilline, expriment plus de TNF à 2h. Comme pour l'IL-6, la production du TNF est transitoire puisqu'à 12h, le niveau de TNF est

identique pour les différents groupes (**Figure 20 B**). Le traitement combiné est donc capable d'amplifier la production du TNF liée au processus infectieux.

La cinétique de production de l'IL-1 β est différente de celle observée pour l'IL-6 et le TNF puisque le pic de production est plus tardif (12h post-traitement) (**Figure 20 C**). Néanmoins, comme pour les autres cytokines, l'IL-1 β est produit de manière plus importante par les animaux traités par la flagelline associée ou non à l'antibiotique.

L'IFN- γ n'est pas détectable chez les animaux ayant reçu l'amoxicilline quel que soit le temps analysé et n'est dosable qu'à partir de 12h chez les animaux traités par la flagelline seule ou non traités (**Figure 20 D**). Cette cytokine semble donc être un marqueur de l'état infectieux des animaux puisque l'IFN- γ n'est détecté qu'à partir d'un seuil de charge bactérienne pulmonaire autour de 10⁵ CFU (**Figure 18 B**).

Le caractère transitoire de la synthèse des cytokines inflammatoires et de l'infiltration des PNN est associé à l'absence d'exacerbation de l'inflammation du tissu des animaux traités par la combinaison antibiotique/flagelline observé en histologie (**FIG 2**, Article II). Le développement d'un traitement immunomodulateur nécessite de mettre à profit ses capacités biologiques tout en évitant le caractère néfaste de l'inflammation. Ces résultats semblent donc encourageants pour le développement d'un traitement basé sur l'utilisation de la flagelline.

D. Discussion de l'article II et des résultats complémentaires

Les travaux de l'équipe d'Evans démontrent que l'infiltration des PNN induite par l'utilisation d'agonistes de TLR ne joue qu'un rôle mineur dans la protection antibactérienne [314]. Toutefois, le recrutement de ces cellules dans nos modèles de combinaison antibiotique/flagelline associé à l'importance de ces cellules dans le contrôle des infections pneumococciques nous incitent à analyser le rôle de PNN dans la mise en place de la protection par la flagelline [315]. Pour cela nous évaluerons l'impact des PNN sur la protection anti-infectieuse après un traitement combinant l'amoxicilline et la flagelline en développant deux approches complémentaires. La première approche à base d'anticorps « déplétants » consistera à éliminer les PNN après l'infection et non préalablement au challenge pour éviter la sensibilisation à l'infection [315]. Dans la seconde approche, nous évaluerons l'impact d'un recrutement de PNN, indépendant de la flagelline, sur la protection contre les infections pneumococciques. Des expériences préliminaires ont montré que l'instillation intranasale des chimiokines CXCL1, CXCL2 et CXCL5, permettait de mobiliser

rapidement une importante quantité de PNN dans le BAL et dans les poumons (résultats non montrés). Ainsi, il sera possible d'évaluer si l'effet du traitement combiné amoxicilline/chimiokines récapitule l'effet du traitement amoxicilline/flagelline.

Les macrophages alvéolaires représentent des cellules immunitaires nécessaires au contrôle des infections respiratoires en phagocytant les microorganismes et en produisant des cytokines nécessaires à l'activation des défenses immunitaires innées de la muqueuse pulmonaire [316]. Nous avons pu observer à l'aide de nos différents modèles (amoxicilline/flagelline et co-trimoxazole/flagelline) que le nombre de macrophages alvéolaires n'était affecté ni par le traitement, ni par l'infection (résultats non montrés). Cependant les macrophages alvéolaires sont décrits pour exprimer TLR5, suggérant que l'instillation intranasale de flagelline pourrait stimuler ces cellules et modifier leur activité antimicrobienne [317]. Il serait donc intéressant de caractériser les capacités antibactériennes *ex vivo* des macrophages alvéolaires après une stimulation par la flagelline. Par ailleurs, il serait important d'évaluer l'implication des macrophages alvéolaires dans la protection. La caractérisation pourrait se faire en traitant les animaux, préalablement à la thérapie combinatoire, avec des liposomes de clodronate qui induit l'apoptose des macrophages alvéolaires [318].

Dans le but d'avoir une observation directe de la localisation des différents acteurs cellulaires dans notre modèle d'infections pneumococciques, nous avons modifié génétiquement notre souche de *S. pneumoniae* de sérotype 1 pour induire l'expression constitutive d'un puissant signal fluorescent (*Green Fluorescent Protein*, GFP sous le contrôle du promoteur du gène codant une *histone-like protein* [319]) par cette bactérie. Nos premières expérimentations nous ont permis d'évaluer la présence *in situ* de *S. pneumoniae*-GFP dans des coupes de poumons provenant de souris infectées (**Figure 21 A-B**). La prochaine étape de cette investigation consistera à analyser, par microscopie à fluorescence, des coupes de poumons de souris infectées et traitées par la combinaison amoxicilline/flagelline afin d'évaluer la co-localisation de la bactérie fluorescente avec les PNN et les macrophages alvéolaires (marqués par des anticorps couplés à des fluorochromes).

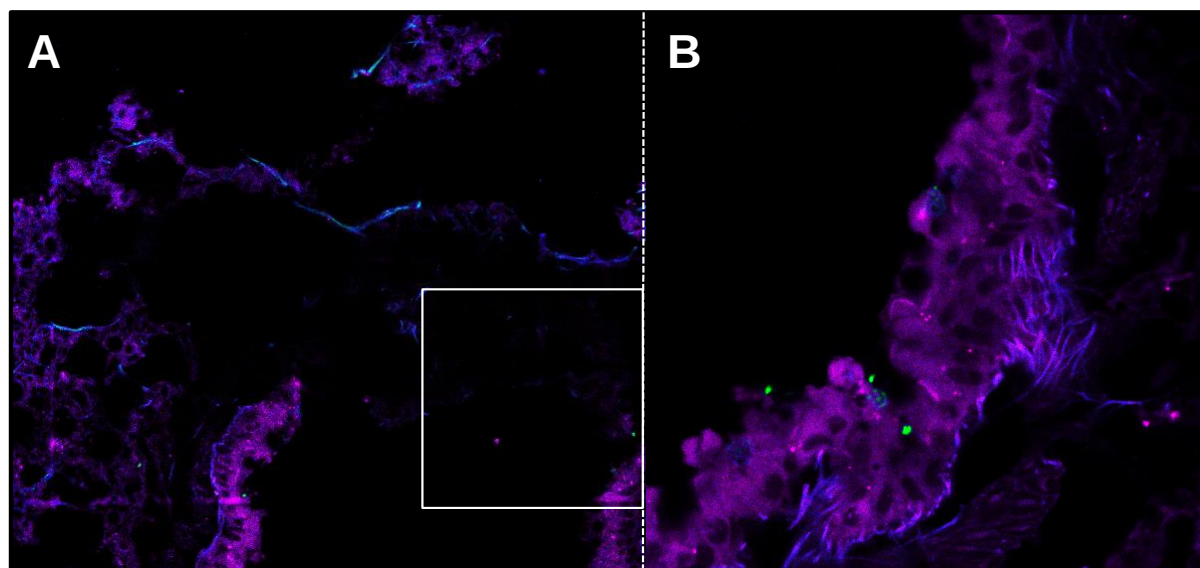


Figure 21 : Localisation de *S. pneumoniae*-GFP dans les poumons. Les souris BALB/c femelles ont été infectées par la voie intranasale avec une dose létale de pneumocoque fluorescent (2.10^6 *S. pneumoniae*-GFP). L'observation a été réalisée sur des coupes de poumons (15 μ m d'épaisseur), prélevés 30h après l'infection, par microscopie confocale (ZEISS LSM-880) en utilisant le mode « *spectral overlay* » permettant de distinguer avec le même laser la fluorescence GFP bactérienne (vert) de l'autofluorescence tissulaire (bleu et violet). Différents champs ont été associés (A) ou agrandis (B) afin de distinguer la présence du *S. pneumoniae*-GFP.

Nous avons observé que le pneumocoque fluorescent se localise au niveau des épithéliums alvéolaires et bronchiques. L'activation de l'épithélium est décrite comme étant essentielle dans d'autres modèles de protections anti-infectieuses induites par des agonistes de TLR [314]. De surcroît, une étude a décrit une activation distincte des compartiments alvéolaires et bronchiques suite à une instillation intranasale de flagelline [320]. Nous voyons donc une importance à investir la réponse de l'épithélium suite au traitement combiné amoxicilline/flagelline. Pour cela nous avons séparé l'épithélium alvéolaire de l'épithélium bronchique par microdissection laser chez des animaux infectés et ayant reçu le traitement combiné. Nous avons alors analysé la réponse transcriptionnelle induite par le traitement et nos premiers résultats nous indiquent que les deux compartiments répondent à la flagelline (associée ou non à l'amoxicilline) en exprimant de manière plus importante les transcrits de gènes caractéristiques de l'activation de TLR5 (*Ccl20*, *Cxcl1*, *Il6*) par rapport au animaux traités par l'amoxicilline seule ou non traités (résultats non montrés). La suite de cette investigation consistera à analyser l'expression de certains gènes codant pour des molécules à potentiel antimicrobien et d'analyser les différences d'expression entre le compartiment alvéolaire et le compartiment bronchique.

La combinaison de la flagelline avec l'amoxicilline améliore l'index thérapeutique de l'amoxicilline, antibiotique de première intention contre le pneumocoque. Les résultats sont même plus probant pour la combinaison co-trimoxazole/flagelline en terme de clairance

bactérienne, de survie et de préservation du poids (**FIG 4**, article II). Ceci peut être expliqué par la capacité décrite du co-trimoxazole à activer les propriétés bactéricides des PNN et des macrophages tout en diminuant la prolifération des lymphocytes [313]. Ainsi, sa combinaison avec la flagelline pourrait stimuler les mécanismes de défenses innées de manière encore plus importante qu'au cours d'une combinaison de la flagelline avec un antibiotique inactif sur l'immunité. L'efficacité de la combinaison du co-trimoxazole avec la flagelline souligne un nouveau concept qui consisterait à réaffecter des antibiotiques non prescrits dans le traitement de certaines pathologies infectieuses.

Par ailleurs, l'efficacité de la combinaison du co-trimoxazole avec la flagelline permet de proposer un nouveau concept qui consisterait à réaffecter des antibiotiques non prescrits dans le traitement de certaines pathologies infectieuses.

Il serait également important de confirmer cette preuve de concept dans des modèles infectieux par des pathogènes fréquemment retrouvés lors d'infections des voies respiratoires telles que *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou encore *Klebsiella pneumoniae* en combinant la stimulation par la flagelline avec d'autres antibiotiques. Cela nous permettrait, dans le cas d'une efficacité du traitement dans différents modèles infectieux, de démontrer le caractère universel de la thérapie combinée (antibiotique/flagelline). De plus, ces bactéries pathogènes sont sujettes à des difficultés thérapeutiques dues au développement de résistances contre les antibiotiques prescrits. C'est le cas notamment de *P. aeruginosa* combinant parfois plusieurs résistances aux β -lactamines et aux aminoglycosides ou encore de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) qui posent des problèmes de santé publique. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'efficacité des thérapies combinant la flagelline avec des antibiotiques dans le traitement de germes résistants aux antibiotiques.

La mise en évidence de l'efficacité de la combinaison antibiotique/flagelline dans le modèle de surinfections bactériennes post-grippales soulève un autre point intéressant. En effet, durant un épisode grippal, le statut inflammatoire et les défenses immunitaires sont perturbés. Le risque de développer une pneumonie bactérienne est alors augmenté rendant le traitement antibiotique essentiel [310]. Nos travaux ont montré que la stimulation des défenses immunitaires est effective dans un contexte d'infection virale. De plus la combinaison de l'immunostimulant et de l'antibiotique augmente significativement l'efficacité du traitement antibiotique des surinfections bactériennes. Ces observations nous encouragent à étudier l'efficacité de la combinaison antibiotique/flagelline, pour le traitement

d'infections au cours d'autres perturbations immunologiques comme celles observées chez les patients présentant des exacerbations de broncho-pneumopathies chroniques obstructives, sous immunosuppresseurs ou sous corticothérapies.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Une récente revue de Quinton et Mizgerd définit un concept distinguant deux types de mécanismes permettant le contrôle des infections des muqueuses. Il s'agit des principes de « résistance » et de « résilience » de l'immunité innée. La résistance immunitaire inclut les effecteurs agissant directement ou indirectement dans l'élimination du pathogène. La résilience immunitaire se caractérise par des processus visant à supporter (« tolérer ») les dommages causés par l'infection ou par les défenses anti-infectieuses. Différents composants cellulaires et moléculaires de l'immunité innée agissent en collaboration sur ces deux aspects dans les muqueuses. Tout d'abord, les macrophages résidents sont essentiels à l'élimination du pathogène et à la protection tissulaire au travers de (i) la phagocytose, (ii) la capacité à produire des cytokines afin d'« alarmer » l'épithélium et les cellules inflammatoires, (iii) leur propre apoptose ou (iv) l'élimination des cellules inflammatoires. Par ailleurs, les PNN recrutés dans les muqueuses représentent le meilleur exemple de cellules effectrices antimicrobiennes. La synthèse par ces cellules de composés oxygénés et de peptides antimicrobiens ainsi que leur capacité phagocytaire participent aussi de manière considérable à la résistance de la muqueuse. De plus, les capacités des PNN à produire des composés immunomodulateurs et à interagir avec les autres cellules des muqueuses, leur confèrent un rôle dans la résilience immunitaire. Finalement, les cellules structurales des muqueuses interviennent également dans l'activité antibactérienne et dans la protection du tissu. En effet, leur capacité à produire le mucus et des molécules antimicrobiennes, en association avec la production d'antiprotéases ou de molécules de remodelage tissulaire démontrent leur relation avec les phénomènes de résistance et de résilience immunitaire des muqueuses. Par ailleurs, des études ont montré les relations entre ces acteurs de l'immunité innée soulignant leur complémentarité dans la protection des muqueuses [316, 321, 322].

L'immunostimulation par un agoniste de TLR, comme la flagelline peut agir sur la résistance et la résilience en modulant l'expression et l'activité des différents acteurs de l'immunité innée [162, 164, 173, 290, 316, 317, 323]. Ainsi, la caractérisation du rôle de la flagelline dans l'activation de ces mécanismes représente une perspective importantes afin d'envisager son utilisation dans le développement de thérapies anti-infectieuses.

Les récentes démonstrations des capacités à induire les défenses antivirales de la flagelline nous poussent également à étudier les mécanismes induits au cours d'infections virales [274, 275]. Une étude réalisée actuellement par notre équipe, analyse l'expression de gènes codant

pour des effecteurs antiviraux après la stimulation de la flagelline. Ces travaux ont démontré que l'administration intranasale de flagelline induit l'expression rapide de 22 gènes codant pour des composés possédant un potentiel antiviral (récepteurs cytosoliques, inhibiteurs de la fusion membranaire, inhibiteurs de la réplication...). Certains de ces composés stimulés, comme l'enzyme cholestérol 25-hydrolase, présentent une activité antivirale importante au cours des infections grippales [324]. Il serait donc intéressant de confirmer cette analyse transcriptionnelle préliminaire dans le modèle d'infection grippale chez la souris établi au laboratoire [325, 326].

Il est maintenant établi que la flagelline possède des capacités anti-infectieuses (**Tableau 3**). De plus des essais cliniques décrivent l'innocuité de l'administration de flagelline dans le cadre de stratégies vaccinales [261-264, 327]. Il serait donc intéressant de réaliser une étude translationnelle chez l'Homme. Dans cette perspective, notre équipe en collaboration avec le groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille développe un projet permettant la collection d'échantillons respiratoires humains dans le but d'étudier leur réponse à la stimulation par la flagelline. Ce projet nommé ASTRAL (nouvelles Approches Thérapeutiques immunomodulatrices contre les infections Respiratoires chez l'homme : une ALternative aux antibiotiques) vise dans un premier temps à vérifier l'activation par la flagelline des cellules issues d'aspirations endotrachéales. Il est envisagé par la suite d'évaluer les capacités antibactériennes et antivirales des surnageants de cultures de cellules épithéliales des prélèvements, ainsi que les capacités phagocytaires des macrophages, après stimulation par la flagelline.

Les données de la littérature et nos travaux démontrent l'activité anti-infectieuse de la flagelline pour des indications prophylactiques (Article I) et thérapeutiques (Article II). L'application en prophylaxie de la flagelline pourrait principalement cibler les patients susceptibles au développement d'infections tels que des patients immunodéprimés sous traitements immunosuppresseurs, sous corticoïdes ou greffés. La stimulation de l'immunité innée par la flagelline permettrait donc de réduire l'incidence des infections dans ces cas cliniques sensibles. Par ailleurs, les traitements antibiotiques en modifiant la flore microbienne des muqueuses, sensibilisent aux infections opportunistes en milieu hospitalier. Ainsi, la stimulation de l'immunité innée par la flagelline pourrait permettre de réduire la colonisation par des germes opportunistes tels que *C. difficile* ou *C. albicans* [267].

A ce jour et compte tenu de nos résultats, l'utilisation de la flagelline en thérapeutique ne peut s'envisager qu'en association avec un antibiotique. L'application des traitements combinés flagelline / antibiotique sera à considérer pour des cas cliniques faisant face à des difficultés thérapeutiques dues à la réduction de l'efficacité des traitements anti-infectieux actuels.

En conclusion, les travaux présentés au cours de cette thèse ont souligné le potentiel antibactérien de la flagelline dans le cadre d'infections muqueuses. L'utilisation de la flagelline, et plus largement des agonistes des TLR, dans des approches thérapeutiques représente une stratégie innovante. Cependant, il reste à définir les mécanismes effecteurs liés à leur activité (résistance) et au retour de l'homéostasie immunitaire (résilience), essentielle pour une utilisation en thérapeutique chez l'Homme. Le développement de cette stratégie passe également par des études d'efficacité chez l'Homme et surtout la détermination des modalités de son utilisation.

BIBLIOGRAPHIE

1. Janeway CA, Jr.: **Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989, **54 Pt 1**:1-13.
2. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H: **Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex.** *J Immunol* 2000, **164**(2):558-561.
3. Kawai T, Akira S: **The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.** *Nat Immunol* 2010, **11**(5):373-384.
4. Motta V, Soares F, Sun T, Philpott DJ: **NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels.** *Physiol Rev* 2015, **95**(1):149-178.
5. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M *et al*: **Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.** *Nature* 2001, **411**(6837):599-603.
6. Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W: **Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease.** *Annu Rev Immunol* 1996, **14**:301-331.
7. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T: **The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses.** *Nat Immunol* 2004, **5**(7):730-737.
8. Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE: **The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(49):17264-17269.
9. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M, Jr., Akira S *et al*: **Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity.** *J Immunol* 2005, **175**(5):2851-2858.
10. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C: **Cytosolic sensing of viruses.** *Immunity* 2013, **38**(5):855-869.
11. Abdullah Z, Schlee M, Roth S, Mraheil MA, Barchet W, Bottcher J, Hain T, Geiger S, Hayakawa Y, Fritz JH *et al*: **RIG-I detects infection with live Listeria by sensing secreted bacterial nucleic acids.** *EMBO J* 2012, **31**(21):4153-4164.
12. Bruns AM, Horvath CM: **LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling.** *Cytokine* 2015, **74**(2):198-206.
13. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K *et al*: **DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response.** *Nature* 2007, **448**(7152):501-505.
14. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ: **RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway.** *Cell* 2009, **138**(3):576-591.
15. Yang P, An H, Liu X, Wen M, Zheng Y, Rui Y, Cao X: **The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway.** *Nat Immunol* 2010, **11**(6):487-494.
16. Zhang X, Brann TW, Zhou M, Yang J, Oguariri RM, Lidie KB, Imamichi H, Huang DW, Lempicki RA, Baseler MW *et al*: **Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN.** *J Immunol* 2011, **186**(8):4541-4545.
17. Pandey S, Kawai T, Akira S: **Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015, **7**(1):a016246.
18. Ishikawa H, Barber GN: **STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates**

- innate immune signalling.** *Nature* 2008, **455**(7213):674-678.
19. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN: **STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity.** *Nature* 2009, **461**(7265):788-792.
 20. Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, Hayakawa Y, Vance RE: **STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP.** *Nature* 2011, **478**(7370):515-518.
 21. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ: **Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway.** *Science* 2013, **339**(6121):786-791.
 22. Ablasser A, Schmid-Burgk JL, Hemmerling I, Horvath GL, Schmidt T, Latz E, Hornung V: **Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP.** *Nature* 2013, **503**(7477):530-534.
 23. Kim T, Pazhoor S, Bao M, Zhang Z, Hanabuchi S, Facchinetti V, Bover L, Plumas J, Chaperot L, Qin J *et al*: **Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(34):15181-15186.
 24. Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, Liu YJ: **The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells.** *Nat Immunol* 2011, **12**(10):959-965.
 25. Roth S, Rottach A, Lotz-Havla AS, Laux V, Muschaweckh A, Gersting SW, Muntau AC, Hopfner KP, Jin L, Vanness K *et al*: **Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1 β production.** *Nat Immunol* 2014, **15**(6):538-545.
 26. Dempsey A, Bowie AG: **Innate immune recognition of DNA: A recent history.** *Virology* 2015, **479-480**:146-152.
 27. Drickamer K, Taylor ME: **Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system.** *Curr Opin Struct Biol* 2015, **34**:26-34.
 28. Plato A, Willment JA, Brown GD: **C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways.** *Int Rev Immunol* 2013, **32**(2):134-156.
 29. Drummond RA, Saijo S, Iwakura Y, Brown GD: **The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity.** *Eur J Immunol* 2011, **41**(2):276-281.
 30. Hutter J, Eriksson M, Johannssen T, Klopffleisch R, von Smolinski D, Gruber AD, Seeberger PH, Lepenies B: **Role of the C-type lectin receptors MCL and DCIR in experimental colitis.** *PLoS One* 2014, **9**(7):e103281.
 31. Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM *et al*: **cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily.** *Science* 1988, **241**(4865):585-589.
 32. Gay NJ, Keith FJ: **Drosophila Toll and IL-1 receptor.** *Nature* 1991, **351**(6325):355-356.
 33. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C: **Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product.** *Cell* 1985, **42**(3):791-798.
 34. Ip YT, Reach M, Engstrom Y, Kadalayil L, Cai H, Gonzalez-Crespo S, Tatei K, Levine M: **Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in Drosophila.** *Cell* 1993, **75**(4):753-763.
 35. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA: **The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults.** *Cell* 1996, **86**(6):973-983.
 36. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr.: **A human homologue of the Drosophila**

- Toll protein signals activation of adaptive immunity.** *Nature* 1997, **388**(6640):394-397.
37. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF: **A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(2):588-593.
 38. Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ: **Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling.** *Nature* 1998, **395**(6699):284-288.
 39. Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X *et al*: **Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region.** *Blood Cells Mol Dis* 1998, **24**(3):340-355.
 40. Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D: **Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4).** *J Exp Med* 1999, **189**(4):615-625.
 41. Chang ZL: **Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways.** *Inflamm Res* 2010, **59**(10):791-808.
 42. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO: **Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide.** *Cell* 2007, **130**(6):1071-1082.
 43. Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, Davies DR: **Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA.** *Science* 2008, **320**(5874):379-381.
 44. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO: **The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex.** *Nature* 2009, **458**(7242):1191-1195.
 45. Peter ME, Kubarenko AV, Weber AN, Dalpke AH: **Identification of an N-terminal recognition site in TLR9 that contributes to CpG-DNA-mediated receptor activation.** *J Immunol* 2009, **182**(12):7690-7697.
 46. Tanji H, Ohto U, Shibata T, Miyake K, Shimizu T: **Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands.** *Science* 2013, **339**(6126):1426-1429.
 47. Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, Kuroki Y: **Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors.** *BMC Genomics* 2007, **8**:124.
 48. Takeda K, Akira S: **Toll-like receptors.** *Curr Protoc Immunol* 2015, **109**:14 12 11-14 12 10.
 49. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE: **Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes.** *Nat Rev Immunol* 2014, **14**(8):546-558.
 50. Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM: **Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors.** *Trends Immunol* 2003, **24**(10):528-533.
 51. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, Miyake K: **Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages.** *J Immunol* 2000, **164**(7):3471-3475.
 52. Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K *et al*: **Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling.** *J Exp Med* 2001, **194**(1):79-88.
 53. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: **CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.** *Science* 1990, **249**(4975):1431-1433.

54. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ *et al*: **Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus.** *Nat Immunol* 2000, **1**(5):398-401.
55. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT: **Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(4):1966-1971.
56. Debierre-Grockiego F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, Mansur DS, Weingart R, Schmidt RR, Golenbock DT *et al*: **Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from Toxoplasma gondii.** *J Immunol* 2007, **179**(2):1129-1137.
57. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M: **Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol.** *J Biol Chem* 2000, **275**(4):2251-2254.
58. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ: **Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2.** *J Biol Chem* 1999, **274**(25):17406-17409.
59. Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D: **Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2.** *J Immunol* 1999, **163**(1):1-5.
60. Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik SG, Lee JO: **Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer.** *Immunity* 2009, **31**(6):873-884.
61. Oosting M, Cheng SC, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschueren IC, Arts P, Garritsen A, van Eenennaam H, Sturm P *et al*: **Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(42):E4478-4484.
62. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A: **The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5.** *Nature* 2001, **410**(6832):1099-1103.
63. Yoon SI, Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL, Wilson IA: **Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling.** *Science* 2012, **335**(6070):859-864.
64. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: **Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.** *Nature* 2001, **413**(6857):732-738.
65. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S: **Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.** *Nat Immunol* 2002, **3**(2):196-200.
66. Colak E, Leslie A, Zausmer K, Khatamzas E, Kubarenko AV, Pichulik T, Klimosch SN, Mayer A, Siggs O, Hector A *et al*: **RNA and imidazoquinolines are sensed by distinct TLR7/8 ectodomain sites resulting in functionally disparate signaling events.** *J Immunol* 2014, **192**(12):5963-5973.
67. Hanagata N: **Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system.** *Int J Nanomedicine* 2012, **7**:2181-2195.
68. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM *et al*: **Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12.** *Eur J Immunol* 2001, **31**(10):3026-3037.
69. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O,

- Itagaki S, Kumar N *et al*: **Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin.** *J Exp Med* 2005, **201**(1):19-25.
70. Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden MS, Akira S, Sher A, Ghosh S: **Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*.** *Immunity* 2013, **38**(1):119-130.
 71. Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S *et al*: **TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein.** *Science* 2005, **308**(5728):1626-1629.
 72. Li XD, Chen ZJ: **Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13.** *Elife* 2012, **1**:e00102.
 73. Oldenburg M, Kruger A, Ferstl R, Kaufmann A, Nees G, Sigmund A, Bathke B, Lauterbach H, Suter M, Dreher S *et al*: **TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification.** *Science* 2012, **337**(6098):1111-1115.
 74. Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA: **Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6.** *Oncogene* 1990, **5**(7):1095-1097.
 75. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S: **Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling.** *J Immunol* 2002, **169**(12):6668-6672.
 76. Choi YJ, Im E, Chung HK, Pothoulakis C, Rhee SH: **TRIF mediates Toll-like receptor 5-induced signaling in intestinal epithelial cells.** *J Biol Chem* 2010, **285**(48):37570-37578.
 77. Choi YJ, Im E, Pothoulakis C, Rhee SH: **TRIF modulates TLR5-dependent responses by inducing proteolytic degradation of TLR5.** *J Biol Chem* 2010, **285**(28):21382-21390.
 78. Kondo T, Kawai T, Akira S: **Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling.** *Trends Immunol* 2012, **33**(9):449-458.
 79. Whitmore MM, Iparraguirre A, Kubelka L, Weninger W, Hai T, Williams BR: **Negative regulation of TLR-signaling pathways by activating transcription factor-3.** *J Immunol* 2007, **179**(6):3622-3630.
 80. Carmody RJ, Ruan Q, Palmer S, Hilliard B, Chen YH: **Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade.** *Science* 2007, **317**(5838):675-678.
 81. Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H *et al*: **Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay.** *Nature* 2009, **458**(7242):1185-1190.
 82. Coll RC, O'Neill LA: **New insights into the regulation of signalling by toll-like receptors and nod-like receptors.** *J Innate Immun* 2010, **2**(5):406-421.
 83. Palsson-McDermott EM, Doyle SL, McGettrick AF, Hardy M, Husebye H, Banahan K, Gong M, Golenbock D, Espevik T, O'Neill LA: **TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway.** *Nat Immunol* 2009, **10**(6):579-586.
 84. Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG: **The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling.** *Nat Immunol* 2006, **7**(10):1074-1081.
 85. Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R: **Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88.** *Curr Biol* 2002, **12**(6):467-471.

86. Mendoza-Barbera E, Corral-Rodriguez MA, Soares-Schanoski A, Velarde M, Macieira S, Messerschmidt A, Lopez-Collazo E, Fuentes-Prior P: **Contribution of globular death domains and unstructured linkers to MyD88-IRAK-4 heterodimer formation: an explanation for the antagonistic activity of MyD88s.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **380**(1):183-187.
87. Xia X, Cui J, Wang HY, Zhu L, Matsueda S, Wang Q, Yang X, Hong J, Songyang Z, Chen ZJ *et al*: **NLRX1 negatively regulates TLR-induced NF-kappaB signaling by targeting TRAF6 and IKK.** *Immunity* 2011, **34**(6):843-853.
88. Cui J, Zhu L, Xia X, Wang HY, Legras X, Hong J, Ji J, Shen P, Zheng S, Chen ZJ *et al*: **NLRC5 negatively regulates the NF-kappaB and type I interferon signaling pathways.** *Cell* 2010, **141**(3):483-496.
89. Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X: **Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b.** *Nat Immunol* 2010, **11**(8):734-742.
90. Shi M, Deng W, Bi E, Mao K, Ji Y, Lin G, Wu X, Tao Z, Li Z, Cai X *et al*: **TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation.** *Nat Immunol* 2008, **9**(4):369-377.
91. Zhao W, Wang L, Zhang M, Yuan C, Gao C: **E3 ubiquitin ligase tripartite motif 38 negatively regulates TLR-mediated immune responses by proteasomal degradation of TNF receptor-associated factor 6 in macrophages.** *J Immunol* 2012, **188**(6):2567-2574.
92. Yu FS, Cornicelli MD, Kovach MA, Newstead MW, Zeng X, Kumar A, Gao N, Yoon SG, Gallo RL, Standiford TJ: **Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide.** *J Immunol* 2010, **185**(2):1142-1149.
93. Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA: **Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility.** *Nat Immunol* 2012, **13**(6):535-542.
94. Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C *et al*: **Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency.** *Science* 2003, **299**(5615):2076-2079.
95. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J *et al*: **Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity.** *J Exp Med* 2007, **204**(10):2407-2422.
96. von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, Chrabieh M, Mustapha IB, Ghandil P, Camcioglu Y *et al*: **Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency.** *Science* 2008, **321**(5889):691-696.
97. Hawn TR, Dunstan SJ, Thwaites GE, Simmons CP, Thuong NT, Lan NT, Quy HT, Chau TT, Hieu NT, Rodrigues S *et al*: **A polymorphism in Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein is associated with susceptibility to meningeal tuberculosis.** *J Infect Dis* 2006, **194**(8):1127-1134.
98. Wurfel MM, Gordon AC, Holden TD, Radella F, Strout J, Kajikawa O, Ruzinski JT, Rona G, Black RA, Stratton S *et al*: **Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2008, **178**(7):710-720.
99. Johnson CM, Lyle EA, Omueti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsoy E, Hamann L, Schumann RR, Tapping RI: **Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy.** *J Immunol* 2007, **178**(12):7520-7524.
100. Hawn TR, Scholes D, Li SS, Wang H, Yang Y, Roberts PL, Stapleton AE, Janer M, Aderem A, Stamm WE *et al*: **Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract**

- infections in adult women.** *PLoS One* 2009, **4**(6):e5990.
101. Taylor BD, Darville T, Ferrell RE, Kammerer CM, Ness RB, Haggerty CL: **Variants in toll-like receptor 1 and 4 genes are associated with Chlamydia trachomatis among women with pelvic inflammatory disease.** *J Infect Dis* 2012, **205**(4):603-609.
 102. Hamann L, Bedu-Addo G, Eggelte TA, Schumann RR, Mockenhaupt FP: **The toll-like receptor 1 variant S248N influences placental malaria.** *Infect Genet Evol* 2010, **10**(6):785-789.
 103. Ferwerda G, Kullberg BJ, de Jong DJ, Girardin SE, Langenberg DM, van Crevel R, Ottenhoff TH, Van der Meer JW, Netea MG: **Mycobacterium paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2.** *J Leukoc Biol* 2007, **82**(4):1011-1018.
 104. Verstraelen H, Verhelst R, Nuytinck L, Roelens K, De Meester E, De Vos D, Van Thielen M, Rossau R, Delva W, De Backer E *et al*: **Gene polymorphisms of Toll-like and related recognition receptors in relation to the vaginal carriage of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae.** *J Reprod Immunol* 2009, **79**(2):163-173.
 105. Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, Jaffe D, Hsu K, M VDB, O'Reilly R, Pamer E, Satagopan J, Papanicolaou GA: **TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation.** *Ann N Y Acad Sci* 2005, **1062**:95-103.
 106. Kang TJ, Chae GT: **Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001, **31**(1):53-58.
 107. Ben-Ali M, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K: **Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2004, **11**(3):625-626.
 108. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA: **A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection.** *Infect Immun* 2000, **68**(11):6398-6401.
 109. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O: **The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease.** *Eur Respir J* 2004, **23**(2):219-223.
 110. Bustamante J, Tamayo E, Florez S, Telleria JJ, Bustamante E, Lopez J, San Roman JA, Alvarez FJ: **[Toll-like receptor 2 R753Q polymorphisms are associated with an increased risk of infective endocarditis].** *Rev Esp Cardiol* 2011, **64**(11):1056-1059.
 111. Schroder NW, Schumann RR: **Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease.** *Lancet Infect Dis* 2005, **5**(3):156-164.
 112. Junpee A, Tencomnao T, Sanprasert V, Nuchprayoon S: **Association between Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms and asymptomatic bancroftian filariasis.** *Parasitol Res* 2010, **107**(4):807-816.
 113. Thuong NT, Hawn TR, Thwaites GE, Chau TT, Lan NT, Quy HT, Hieu NT, Aderem A, Hien TT, Farrar JJ *et al*: **A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis.** *Genes Immun* 2007, **8**(5):422-428.
 114. Gorbea C, Makar KA, Pauschinger M, Pratt G, Bersola JL, Varela J, David RM, Banks L, Huang CH, Li H *et al*: **A role for Toll-like receptor 3 variants in host susceptibility to enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy.** *J Biol Chem* 2010, **285**(30):23208-23223.
 115. Sironi M, Biasin M, Cagliani R, Forni D, De Luca M, Saulle I, Lo Caputo S, Mazzotta F, Macias J, Pineda JA *et al*: **A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection.** *J Immunol* 2012, **188**(2):818-823.

116. Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, Segal D, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A *et al*: **TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis.** *Science* 2007, **317**(5844):1522-1527.
117. Awomoyi AA, Rallabhandi P, Pollin TI, Lorenz E, Szein MB, Boukhvalova MS, Hemming VG, Blanco JC, Vogel SN: **Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children.** *J Immunol* 2007, **179**(5):3171-3177.
118. Mockenhaupt FP, Hamann L, von Gaertner C, Bedu-Addo G, von Kleinsorgen C, Schumann RR, Bienzle U: **Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy.** *J Infect Dis* 2006, **194**(2):184-188.
119. Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M, Rodrigues SD, Li S, Hansen JA, Zhao LP *et al*: **Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation.** *N Engl J Med* 2008, **359**(17):1766-1777.
120. Carvalho A, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Romani L, Denning DW, Rodrigues F: **Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis.** *J Infect Dis* 2008, **197**(4):618-621.
121. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF: **Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections.** *J Infect Dis* 2002, **186**(10):1522-1525.
122. Lorenz E, Patel DD, Hartung T, Schwartz DA: **Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient murine macrophage cell line as an in vitro assay system to show TLR4-independent signaling of Bacteroides fragilis lipopolysaccharide.** *Infect Immun* 2002, **70**(9):4892-4896.
123. Hawn TR, Verbon A, Janer M, Zhao LP, Beutler B, Aderem A: **Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(7):2487-2489.
124. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, Beutler B, Schroeder L, Nachman A *et al*: **A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease.** *J Exp Med* 2003, **198**(10):1563-1572.
125. Oh DY, Baumann K, Hamouda O, Eckert JK, Neumann K, Kucherer C, Bartmeyer B, Poggensee G, Oh N, Pruss A *et al*: **A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression.** *AIDS* 2009, **23**(3):297-307.
126. Oh DY, Taube S, Hamouda O, Kucherer C, Poggensee G, Jessen H, Eckert JK, Neumann K, Storek A, Pouliot M *et al*: **A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction.** *J Infect Dis* 2008, **198**(5):701-709.
127. Wang CH, Eng HL, Lin KH, Chang CH, Hsieh CA, Lin YL, Lin TM: **TLR7 and TLR8 gene variations and susceptibility to hepatitis C virus infection.** *PLoS One* 2011, **6**(10):e26235.
128. Bharti D, Kumar A, Mahla RS, Kumar S, Ingle H, Shankar H, Joshi B, Raut AA, Kumar H: **The role of TLR9 polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis.** *Immunogenetics* 2014, **66**(12):675-681.
129. Bochud PY, Hersberger M, Taffe P, Bochud M, Stein CM, Rodrigues SD, Calandra T, Francioli P, Telenti A, Speck RF *et al*: **Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection.** *AIDS* 2007, **21**(4):441-446.
130. Wu H, Yang L: **Arg753Gln Polymorphisms in Toll-Like Receptor 2 Gene are Associated with Tuberculosis Risk: A Meta-Analysis.** *Med Sci Monit* 2015, **21**:2196-2202.
131. Grube M, Loeffler J, Mezger M, Kruger B, Echtenacher B, Hoffmann P, Edinger M, Einsele H, Andreessen R, Holler E: **TLR5 stop codon polymorphism is associated with invasive**

- aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation.** *Med Mycol* 2013, **51**(8):818-825.
132. Gu W, Shan YA, Zhou J, Jiang DP, Zhang L, Du DY, Wang ZG, Jiang JX: **Functional significance of gene polymorphisms in the promoter of myeloid differentiation-2.** *Ann Surg* 2007, **246**(1):151-158.
 133. Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G: **Flagella and bacterial pathogenicity.** *J Basic Microbiol* 2013, **53**(1):1-8.
 134. Crawford RW, Reeve KE, Gunn JS: **Flagellated but not hyperfimbriated Salmonella enterica serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces.** *J Bacteriol* 2010, **192**(12):2981-2990.
 135. Rossez Y, Wolfson EB, Holmes A, Gally DL, Holden NJ: **Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms.** *PLoS Pathog* 2015, **11**(1):e1004483.
 136. Haiko J, Westerlund-Wikstrom B: **The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence.** *Biology (Basel)* 2013, **2**(4):1242-1267.
 137. Pallen MJ, Matzke NJ: **From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella.** *Nat Rev Microbiol* 2006, **4**(10):784-790.
 138. Macnab RM: **How bacteria assemble flagella.** *Annu Rev Microbiol* 2003, **57**:77-100.
 139. Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC: **Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa.** *Trends Microbiol* 2004, **12**(11):509-517.
 140. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, Logan SM, Aderem A: **Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(26):9247-9252.
 141. Halff EF, Diebolder CA, Versteeg M, Schouten A, Brondijk TH, Huizinga EG: **Formation and structure of a NAIP5-NLRC4 inflammasome induced by direct interactions with conserved N- and C-terminal regions of flagellin.** *J Biol Chem* 2012, **287**(46):38460-38472.
 142. Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard JC: **Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity.** *J Immunol* 2008, **181**(3):2036-2043.
 143. Wyant TL, Tanner MK, Sztein MB: **Salmonella typhi flagella are potent inducers of proinflammatory cytokine secretion by human monocytes.** *Infect Immun* 1999, **67**(7):3619-3624.
 144. Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RL: **Enterotoxigenic Escherichia coli expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells.** *J Clin Invest* 2000, **105**(12):1769-1777.
 145. Feuillet V, Medjane S, Mondor I, Demaria O, Pagni PP, Galan JE, Flavell RA, Alexopoulou L: **Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(33):12487-12492.
 146. Song WS, Yoon SI: **Crystal structure of FliC flagellin from Pseudomonas aeruginosa and its implication in TLR5 binding and formation of the flagellar filament.** *Biochem Biophys Res Commun* 2014, **444**(2):109-115.
 147. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL: **Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression.** *J Immunol* 2001, **167**(4):1882-1885.
 148. Bambou JC, Giraud A, Menard S, Begue B, Rakotobe S, Heyman M, Taddei F, Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V: **In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain.** *J Biol Chem* 2004, **279**(41):42984-42992.

149. Eaves-Pyles T, Bu HF, Tan XD, Cong Y, Patel J, Davey RA, Strasser JE: **Luminal-applied flagellin is internalized by polarized intestinal epithelial cells and elicits immune responses via the TLR5 dependent mechanism.** *PLoS One* 2011, **6**(9):e24869.
150. Schuller S, Lucas M, Kaper JB, Giron JA, Phillips AD: **The ex vivo response of human intestinal mucosa to enteropathogenic Escherichia coli infection.** *Cell Microbiol* 2009, **11**(3):521-530.
151. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A: **Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, **30**(5):627-634.
152. Shikhagaie MM, Andersson CK, Mori M, Kortekaas Krohn I, Bergqvist A, Dahl R, Ekblad E, Hoffmann HJ, Bjermer L, Erjefalt JS: **Mapping of TLR5 and TLR7 in central and distal human airways and identification of reduced TLR expression in severe asthma.** *Clin Exp Allergy* 2014, **44**(2):184-196.
153. Chuquimia OD, Petursdottir DH, Rahman MJ, Hartl K, Singh M, Fernandez C: **The role of alveolar epithelial cells in initiating and shaping pulmonary immune responses: communication between innate and adaptive immune systems.** *PLoS One* 2012, **7**(2):e32125.
154. Maaser C, Heidemann J, von Eiff C, Luger A, Spahn TW, Binion DG, Domschke W, Luger N, Kucharzik T: **Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin.** *J Immunol* 2004, **172**(8):5056-5062.
155. Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, Guo Z, Kumagai Y, Yamamoto M, Kato H, Sougawa N, Matsui H, Kuwata H *et al*: **Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells.** *Nat Immunol* 2006, **7**(8):868-874.
156. Shibata T, Takemura N, Motoi Y, Goto Y, Karuppuhamy T, Izawa K, Li X, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Kunisawa J *et al*: **PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells.** *Int Immunol* 2012, **24**(10):613-623.
157. Simonin-Le Jeune K, Le Jeune A, Jouneau S, Belleguic C, Roux PF, Jaguin M, Dimanche-Boitre MT, Lecureur V, Leclercq C, Desrues B *et al*: **Impaired functions of macrophage from cystic fibrosis patients: CD11b, TLR-5 decrease and sCD14, inflammatory cytokines increase.** *PLoS One* 2013, **8**(9):e75667.
158. Applequist SE, Rollman E, Wareing MD, Liden M, Rozell B, Hinkula J, Ljunggren HG: **Activation of innate immunity, inflammation, and potentiation of DNA vaccination through mammalian expression of the TLR5 agonist flagellin.** *J Immunol* 2005, **175**(6):3882-3891.
159. Silva SC, Baggio-Zappia GL, Brunialti MK, Assuncao MS, Azevedo LC, Machado FR, Salomao R: **Evaluation of Toll-like, chemokine, and integrin receptors on monocytes and neutrophils from peripheral blood of septic patients and their correlation with clinical outcomes.** *Braz J Med Biol Res* 2014, **47**(5):384-393.
160. Koller B, Kappler M, Latzin P, Gaggar A, Schreiner M, Takyar S, Kormann M, Kabesch M, Roos D, Griesse M *et al*: **TLR expression on neutrophils at the pulmonary site of infection: TLR1/TLR2-mediated up-regulation of TLR5 expression in cystic fibrosis lung disease.** *J Immunol* 2008, **181**(4):2753-2763.
161. Janot L, Sirard JC, Secher T, Noulin N, Fick L, Akira S, Uematsu S, Didierlaurent A, Hussell T, Ryffel B *et al*: **Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin.** *Eur J Immunol* 2009, **39**(6):1587-1596.
162. Munoz N, Van Maele L, Marques JM, Rial A, Sirard JC, Chabalgoity JA: **Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection.**

- Infect Immun* 2010, **78**(10):4226-4233.
163. Zgair AK: **Flagellin administration protects respiratory tract from Burkholderia cepacia infection.** *J Microbiol Biotechnol* 2012, **22**(7):907-916.
 164. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Songhet P, Dumoutier L, Ferrero I, Janot L, Erard F, Bertout J, Leger H *et al*: **TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa.** *J Immunol* 2010, **185**(2):1177-1185.
 165. Vijay-Kumar M, Wu H, Jones R, Grant G, Babbitt B, King TP, Kelly D, Gewirtz AT, Neish AS: **Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection.** *Am J Pathol* 2006, **169**(5):1686-1700.
 166. Neish AS: **TLRS in the gut. II. Flagellin-induced inflammation and antiapoptosis.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, **292**(2):G462-466.
 167. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, Frias A, Sloane VM, Xu J, Neish AS, Rojas M, Gewirtz AT: **Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation.** *J Immunol* 2008, **180**(12):8280-8285.
 168. Ogushi K, Wada A, Niidome T, Mori N, Oishi K, Nagatake T, Takahashi A, Asakura H, Makino S, Hojo H *et al*: **Salmonella enteritidis FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells.** *J Biol Chem* 2001, **276**(32):30521-30526.
 169. Clark JG, Kim KH, Basom RS, Gharib SA: **Plasticity of airway epithelial cell transcriptome in response to flagellin.** *PLoS One* 2015, **10**(2):e0115486.
 170. McDermott PF, Ciacci-Woolwine F, Snipes JA, Mizel SB: **High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation.** *Infect Immun* 2000, **68**(10):5525-5529.
 171. Bates JT, Uematsu S, Akira S, Mizel SB: **Direct stimulation of *tlr5*^{+/+} CD11c⁺ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin.** *J Immunol* 2009, **182**(12):7539-7547.
 172. Moors MA, Li L, Mizel SB: **Activation of interleukin-1 receptor-associated kinase by gram-negative flagellin.** *Infect Immun* 2001, **69**(7):4424-4429.
 173. Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG: **Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant Enterococcus infection.** *J Infect Dis* 2010, **201**(4):534-543.
 174. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov S, Porte R, Deruy E, Chabalgoity JA, Renauld JC, Eberl G, Benecke AG *et al*: **Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during Streptococcus pneumoniae infection.** *J Infect Dis* 2014, **210**(3):493-503.
 175. Gupta SK, Bajwa P, Deb R, Chellappa MM, Dey S: **Flagellin a toll-like receptor 5 agonist as an adjuvant in chicken vaccines.** *Clin Vaccine Immunol* 2014, **21**(3):261-270.
 176. Chassaing B, Ley RE, Gewirtz AT: **Intestinal epithelial cell toll-like receptor 5 regulates the intestinal microbiota to prevent low-grade inflammation and metabolic syndrome in mice.** *Gastroenterology* 2014, **147**(6):1363-1377 e1317.
 177. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM: **Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf.** *Nature* 2004, **430**(6996):213-218.
 178. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A *et al*: **Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages.** *Nat Immunol* 2006, **7**(6):576-582.

179. Amer A, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Ozoren N, Brady G, Meshinchi S, Jagirdar R, Gewirtz A, Akira S *et al*: **Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf.** *J Biol Chem* 2006, **281**(46):35217-35223.
180. Franchi L, Stoolman J, Kanneganti TD, Verma A, Ramphal R, Nunez G: **Critical role for Ipaf in Pseudomonas aeruginosa-induced caspase-1 activation.** *Eur J Immunol* 2007, **37**(11):3030-3039.
181. Warren SE, Mao DP, Rodriguez AE, Miao EA, Aderem A: **Multiple Nod-like receptors activate caspase 1 during Listeria monocytogenes infection.** *J Immunol* 2008, **180**(11):7558-7564.
182. Wright EK, Goodart SA, Gowney JD, Hadinoto V, Endrizzi MG, Long EM, Sadigh K, Abney AL, Bernstein-Hanley I, Dietrich WF: **Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen Legionella pneumophila.** *Curr Biol* 2003, **13**(1):27-36.
183. Diez E, Lee SH, Gauthier S, Yaraghi Z, Tremblay M, Vidal S, Gros P: **Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to Legionella pneumophila.** *Nat Genet* 2003, **33**(1):55-60.
184. Lightfield KL, Persson J, Brubaker SW, Witte CE, von Moltke J, Dunipace EA, Henry T, Sun YH, Cado D, Dietrich WF *et al*: **Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin.** *Nat Immunol* 2008, **9**(10):1171-1178.
185. Kofoed EM, Vance RE: **Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity.** *Nature* 2011, **477**(7366):592-595.
186. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, Liu L, Shao F: **The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus.** *Nature* 2011, **477**(7366):596-600.
187. Tenthorey JL, Kofoed EM, Daugherty MD, Malik HS, Vance RE: **Molecular basis for specific recognition of bacterial ligands by NAIP/NLRC4 inflammasomes.** *Mol Cell* 2014, **54**(1):17-29.
188. Zhao Y, Shao F: **The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type III secretion apparatus.** *Immunol Rev* 2015, **265**(1):85-102.
189. Man SM, Hopkins LJ, Nugent E, Cox S, Gluck IM, Tourlomousis P, Wright JA, Cicuta P, Monie TP, Bryant CE: **Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(20):7403-7408.
190. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE *et al*: **Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature.** *Nat Rev Immunol* 2013, **13**(2):145-149.
191. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A: **The interleukin-1 family: back to the future.** *Immunity* 2013, **39**(6):1003-1018.
192. Afonina IS, Muller C, Martin SJ, Beyaert R: **Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme.** *Immunity* 2015, **42**(6):991-1004.
193. Franchi L, Kamada N, Nakamura Y, Burberry A, Kuffa P, Suzuki S, Shaw MH, Kim YG, Nunez G: **NLRC4-driven production of IL-1beta discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense.** *Nat Immunol* 2012, **13**(5):449-456.
194. Khameneh HJ, Mortellaro A: **NLRC4 gets out of control.** *Nat Genet* 2014, **46**(10):1048-1049.
195. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A: **Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism**

- against intracellular bacteria.** *Nat Immunol* 2010, **11**(12):1136-1142.
196. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F: **Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death.** *Nature* 2015, **526**(7575):660-665.
 197. Molofsky AB, Byrne BG, Whitfield NN, Madigan CA, Fuse ET, Tateda K, Swanson MS: **Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts Legionella pneumophila infection.** *J Exp Med* 2006, **203**(4):1093-1104.
 198. Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, Kuida K, Mariathasan S, Dixit VM, Flavell RA *et al*: **The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection.** *Nat Immunol* 2006, **7**(3):318-325.
 199. Lara-Tejero M, Sutterwala FS, Ogura Y, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Flavell RA, Galan JE: **Role of the caspase-1 inflammasome in Salmonella typhimurium pathogenesis.** *J Exp Med* 2006, **203**(6):1407-1412.
 200. Sellin ME, Muller AA, Felmy B, Dolowschiak T, Diard M, Tardivel A, Maslowski KM, Hardt WD: **Epithelium-intrinsic NAIP/NLRC4 inflammasome drives infected enterocyte expulsion to restrict Salmonella replication in the intestinal mucosa.** *Cell Host Microbe* 2014, **16**(2):237-248.
 201. Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM: **Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella.** *J Exp Med* 2010, **207**(8):1745-1755.
 202. Coley WB: **The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893.** *Clin Orthop Relat Res* 1991(262):3-11.
 203. Wei MQ, Mengesha A, Good D, Anne J: **Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era.** *Cancer Lett* 2008, **259**(1):16-27.
 204. Meyer T, Stockfleth E: **Clinical investigations of Toll-like receptor agonists.** *Expert Opin Investig Drugs* 2008, **17**(7):1051-1065.
 205. Sparling JD, Checketts SR, Chapman MS: **Imiquimod for plantar and periungual warts.** *Cutis* 2001, **68**(6):397-399.
 206. Cutler K, Kagen MH, Don PC, McAleer P, Weinberg JM: **Treatment of facial verrucae with topical imiquimod cream in a patient with human immunodeficiency virus.** *Acta Derm Venereol* 2000, **80**(2):134-135.
 207. Rinne D, Linhart C, Schofer H: **Lip papillomatosis in immunodeficiency: therapy with imiquimod.** *Br J Dermatol* 2000, **142**(1):196-197.
 208. Hengge UR, Esser S, Schultewolter T, Behrendt C, Meyer T, Stockfleth E, Goos M: **Self-administered topical 5% imiquimod for the treatment of common warts and molluscum contagiosum.** *Br J Dermatol* 2000, **143**(5):1026-1031.
 209. Harrison GP, Miele G, Hunter E, Lever AM: **Functional analysis of the core human immunodeficiency virus type 1 packaging signal in a permissive cell line.** *J Virol* 1998, **72**(7):5886-5896.
 210. Miller RL, Imbertson LM, Reiter MJ, Gerster JF: **Treatment of primary herpes simplex virus infection in guinea pigs by imiquimod.** *Antiviral Res* 1999, **44**(1):31-42.
 211. Morrey JD, Day CW, Julander JG, Blatt LM, Smee DF, Sidwell RW: **Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models.** *Antivir Chem Chemother* 2004, **15**(2):101-109.
 212. Tomai MA, Gibson SJ, Imbertson LM, Miller RL, Myhre PE, Reiter MJ, Wagner TL, Tamulinas CB, Beaurline JM, Gerster JF *et al*: **Immunomodulating and antiviral activities**

- of the imidazoquinoline S-28463.** *Antiviral Res* 1995, **28**(3):253-264.
213. Bernstein DI, Harrison CJ, Tomai MA, Miller RL: **Daily or weekly therapy with resiquimod (R-848) reduces genital recurrences in herpes simplex virus-infected guinea pigs during and after treatment.** *J Infect Dis* 2001, **183**(6):844-849.
 214. Spruance SL, Tyring SK, Smith MH, Meng TC: **Application of a topical immune response modifier, resiquimod gel, to modify the recurrence rate of recurrent genital herpes: a pilot study.** *J Infect Dis* 2001, **184**(2):196-200.
 215. Pockros PJ, Guyader D, Patton H, Tong MJ, Wright T, McHutchison JG, Meng TC: **Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind phase IIa studies.** *J Hepatol* 2007, **47**(2):174-182.
 216. Bergmann JF, de Bruijne J, Hotho DM, de Knecht RJ, Boonstra A, Weegink CJ, van Vliet AA, van de Wetering J, Fletcher SP, Bauman LA *et al*: **Randomised clinical trial: anti-viral activity of ANA773, an oral inducer of endogenous interferons acting via TLR7, in chronic HCV.** *Aliment Pharmacol Ther* 2011, **34**(4):443-453.
 217. Cardoso EC, Pereira NZ, Mitsunari GE, Oliveira LM, Ruocco RM, Francisco RP, Zugaib M, da Silva Duarte AJ, Sato MN: **TLR7/TLR8 Activation Restores Defective Cytokine Secretion by Myeloid Dendritic Cells but Not by Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV-Infected Pregnant Women and Newborns.** *PLoS One* 2013, **8**(6):e67036.
 218. McHutchison JG, Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Shiffman M, Afdhal NH, Jacobson IM, Muir A, Al-Adhami M, Morris ML *et al*: **Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus.** *Hepatology* 2007, **46**(5):1341-1349.
 219. Vicari AP, Schmalbach T, Lekstrom-Himes J, Morris ML, Al-Adhami MJ, Laframboise C, Leese P, Krieg AM, Efler SM, Davis HL: **Safety, pharmacokinetics and immune effects in normal volunteers of CPG 10101 (ACTILON), an investigational synthetic toll-like receptor 9 agonist.** *Antivir Ther* 2007, **12**(5):741-751.
 220. Savva A, Roger T: **Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases.** *Front Immunol* 2013, **4**:387.
 221. Weihrauch MR, Richly H, von Bergwelt-Baildon MS, Becker HJ, Schmidt M, Hacker UT, Shimabukuro-Vornhagen A, Holtick U, Nokay B, Schroff M *et al*: **Phase I clinical study of the toll-like receptor 9 agonist MGN1703 in patients with metastatic solid tumours.** *Eur J Cancer* 2015, **51**(2):146-156.
 222. Gao M, Ha T, Zhang X, Wang X, Liu L, Kalbfleisch J, Singh K, Williams D, Li C: **The Toll-like receptor 9 ligand, CpG oligodeoxynucleotide, attenuates cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis, involving activation of both phosphoinositide 3 kinase/Akt and extracellular-signal-related kinase signaling.** *J Infect Dis* 2013, **207**(9):1471-1479.
 223. Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Bamboat ZM, DeMatteo RP: **Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis.** *J Exp Med* 2008, **205**(6):1277-1283.
 224. Yasuda H, Leelahavanichkul A, Tsunoda S, Dear JW, Takahashi Y, Ito S, Hu X, Zhou H, Doi K, Childs R *et al*: **Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, **294**(5):F1050-1058.
 225. Ellis RD, Wu Y, Martin LB, Shaffer D, Miura K, Aebig J, Orcutt A, Rausch K, Zhu D, Mogensen A *et al*: **Phase 1 study in malaria naive adults of BSAM2/Alhydrogel(R)+CPG 7909, a blood stage vaccine against P. falciparum malaria.** *PLoS One* 2012, **7**(10):e46094.
 226. Sagara I, Ellis RD, Dicko A, Niambele MB, Kamate B, Guindo O, Sissoko MS, Fay MP, Guindo MA, Kante O *et al*: **A randomized and controlled Phase 1 study of the safety and immunogenicity of the AMA1-C1/Alhydrogel + CPG 7909 vaccine for Plasmodium**

- falciparum malaria in semi-immune Malian adults.** *Vaccine* 2009, **27**(52):7292-7298.
227. Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Krieg AM, Li Y, Laframboise C, Al Adhami MJ, Khaliq Y, Seguin I *et al*: **Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluarix influenza vaccine.** *Vaccine* 2004, **22**(23-24):3136-3143.
 228. Cooper CL, Angel JB, Seguin I, Davis HL, Cameron DW: **CPG 7909 adjuvant plus hepatitis B virus vaccination in HIV-infected adults achieves long-term seroprotection for up to 5 years.** *Clin Infect Dis* 2008, **46**(8):1310-1314.
 229. Essey RJ, McDougall BR, Robinson WE, Jr.: **Mismatched double-stranded RNA (polyI-polyC(12)U) is synergistic with multiple anti-HIV drugs and is active against drug-sensitive and drug-resistant HIV-1 in vitro.** *Antiviral Res* 2001, **51**(3):189-202.
 230. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M *et al*: **Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge.** *Microbes Infect* 2007, **9**(11):1333-1340.
 231. Davis CG, Chang K, Osborne D, Walton AH, Ghosh S, Dunne WM, Hotchkiss RS, Muenzer JT: **TLR3 agonist improves survival to secondary pneumonia in a double injury model.** *J Surg Res* 2013, **182**(2):270-276.
 232. Ribes S, Adam N, Ebert S, Regen T, Bunkowski S, Hanisch UK, Nau R: **The viral TLR3 agonist poly(I:C) stimulates phagocytosis and intracellular killing of Escherichia coli by microglial cells.** *Neurosci Lett* 2010, **482**(1):17-20.
 233. Christ WJ, Asano O, Robidoux AL, Perez M, Wang Y, Dubuc GR, Gavin WE, Hawkins LD, McGuinness PD, Mullarkey MA *et al*: **E5531, a pure endotoxin antagonist of high potency.** *Science* 1995, **268**(5207):80-83.
 234. Bunnell E, Lynn M, Habet K, Neumann A, Perdomo CA, Friedhoff LT, Rogers SL, Parrillo JE: **A lipid A analog, E5531, blocks the endotoxin response in human volunteers with experimental endotoxemia.** *Crit Care Med* 2000, **28**(8):2713-2720.
 235. Barochia A, Solomon S, Cui X, Natanson C, Eichacker PQ: **Eritoran tetrasodium (E5564) treatment for sepsis: review of preclinical and clinical studies.** *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011, **7**(4):479-494.
 236. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M *et al*: **Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial.** *JAMA* 2013, **309**(11):1154-1162.
 237. Shirey KA, Lai W, Scott AJ, Lipsky M, Mistry P, Pletneva LM, Karp CL, McAlees J, Gioannini TL, Weiss J *et al*: **The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection.** *Nature* 2013, **497**(7450):498-502.
 238. Bahraoui E, Briant L, Chazal N: **E5564 inhibits immunosuppressive cytokine IL-10 induction promoted by HIV-1 Tat protein.** *Virol J* 2014, **11**:214.
 239. Kuno M, Nemoto K, Ninomiya N, Inagaki E, Kubota M, Matsumoto T, Yokota H: **The novel selective toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor tak-242 prevents endotoxaemia in conscious Guinea-pigs.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009, **36**(5-6):589-593.
 240. Sha T, Iizawa Y, Ii M: **Combination of imipenem and TAK-242, a Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis.** *Shock* 2011, **35**(2):205-209.
 241. Roger T, Calandra T: **TLR2-mediated neutrophil depletion exacerbates bacterial sepsis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(17):6889-6890.
 242. Daubeuf B, Mathison J, Spiller S, Hugues S, Herren S, Ferlin W, Kosco-Vilbois M, Wagner

- H, Kirschning CJ, Ulevitch R *et al*: **TLR4/MD-2 monoclonal antibody therapy affords protection in experimental models of septic shock**. *J Immunol* 2007, **179**(9):6107-6114.
243. Spiller S, Elson G, Ferstl R, Dreher S, Mueller T, Freudenberg M, Daubeuf B, Wagner H, Kirschning CJ: **TLR4-induced IFN-gamma production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice**. *J Exp Med* 2008, **205**(8):1747-1754.
 244. He Z, Chen X, Wang S, Zou Z: **Toll-like receptor 4 monoclonal antibody attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice**. *Exp Ther Med* 2014, **8**(3):871-876.
 245. Meng G, Rutz M, Schiemann M, Metzger J, Grabiec A, Schwandner R, Lippa PB, Ebel F, Busch DH, Bauer S *et al*: **Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes**. *J Clin Invest* 2004, **113**(10):1473-1481.
 246. Arslan F, Houtgraaf JH, Keogh B, Kazemi K, de Jong R, McCormack WJ, O'Neill LA, McGuirk P, Timmers L, Smeets MB *et al*: **Treatment with OPN-305, a humanized anti-Toll-Like receptor-2 antibody, reduces myocardial ischemia/reperfusion injury in pigs**. *Circ Cardiovasc Interv* 2012, **5**(2):279-287.
 247. Reilly M, Miller RM, Thomson MH, Patris V, Ryle P, McLoughlin L, Mutch P, Gilboy P, Miller C, Broekema M *et al*: **Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating phase I, healthy subjects study of intravenous OPN-305, a humanized anti-TLR2 antibody**. *Clin Pharmacol Ther* 2013, **94**(5):593-600.
 248. Huang L, Hinchman M, Mendez S: **Coinjection with TLR2 agonist Pam3CSK4 reduces the pathology of leishmanization in mice**. *PLoS Negl Trop Dis* 2015, **9**(3):e0003546.
 249. Drake MG, Evans SE, Dickey BF, Fryer AD, Jacoby DB: **Toll-like receptor-2/6 and Toll-like receptor-9 agonists suppress viral replication but not airway hyperreactivity in guinea pigs**. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013, **48**(6):790-796.
 250. Tan AC, Mifsud EJ, Zeng W, Edenborough K, McVernon J, Brown LE, Jackson DC: **Intranasal administration of the TLR2 agonist Pam2Cys provides rapid protection against influenza in mice**. *Mol Pharm* 2012, **9**(9):2710-2718.
 251. Kochan T, Singla A, Tosi J, Kumar A: **Toll-like receptor 2 ligand pretreatment attenuates retinal microglial inflammatory response but enhances phagocytic activity toward Staphylococcus aureus**. *Infect Immun* 2012, **80**(6):2076-2088.
 252. Rose WA, 2nd, McGowin CL, Pyles RB: **FSL-1, a bacterial-derived toll-like receptor 2/6 agonist, enhances resistance to experimental HSV-2 infection**. *Virol J* 2009, **6**:195.
 253. Palma C, Iona E, Ebensen T, Guzman CA, Cassone A: **The toll-like receptor 2/6 ligand MALP-2 reduces the viability of Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages**. *Open Microbiol J* 2009, **3**:47-52.
 254. Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC, Strom E, Gleiberman AS, Gupta D, Kurnasov OV, Fort FL, Osterman AL, Didonato JA *et al*: **An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models**. *Science* 2008, **320**(5873):226-230.
 255. Sfondrini L, Rossini A, Besusso D, Merlo A, Tagliabue E, Menard S, Balsari A: **Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer**. *J Immunol* 2006, **176**(11):6624-6630.
 256. Burdelya LG, Brackett CM, Kojouharov B, Gitlin, II, Leonova KI, Gleiberman AS, Aygun-Sunar S, Veith J, Johnson C, Haderski GJ *et al*: **Central role of liver in anticancer and radioprotective activities of Toll-like receptor 5 agonist**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**(20):E1857-1866.
 257. Leigh ND, Bian G, Ding X, Liu H, Aygun-Sunar S, Burdelya LG, Gudkov AV, Cao X: **A flagellin-derived toll-like receptor 5 agonist stimulates cytotoxic lymphocyte-mediated tumor immunity**. *PLoS One* 2014, **9**(1):e85587.

258. Kojouharov BM, Brackett CM, Veith JM, Johnson CP, Gitlin, II, Toshkov IA, Gleiberman AS, Gudkov AV, Burdelya LG: **Toll-like receptor-5 agonist Entolimod broadens the therapeutic window of 5-fluorouracil by reducing its toxicity to normal tissues in mice.** *Oncotarget* 2014, 5(3):802-814.
259. Singh VK, Romaine PL, Seed TM: **Medical Countermeasures for Radiation Exposure and Related Injuries: Characterization of Medicines, FDA-Approval Status and Inclusion into the Strategic National Stockpile.** *Health Phys* 2015, 108(6):607-630.
260. Krivokrysenko VI, Shakhov AN, Singh VK, Bone F, Kononov Y, Shyshynova I, Cheney A, Maitra RK, Purmal A, Whitnall MH *et al*: **Identification of granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6 as candidate biomarkers of CBLB502 efficacy as a medical radiation countermeasure.** *J Pharmacol Exp Ther* 2012, 343(2):497-508.
261. Turley CB, Rupp RE, Johnson C, Taylor DN, Wolfson J, Tussey L, Kavita U, Stanberry L, Shaw A: **Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults.** *Vaccine* 2011, 29(32):5145-5152.
262. Treanor JJ, Taylor DN, Tussey L, Hay C, Nolan C, Fitzgerald T, Liu G, Kavita U, Song L, Dark I *et al*: **Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125) in healthy young adults.** *Vaccine* 2010, 28(52):8268-8274.
263. Taylor DN, Treanor JJ, Strout C, Johnson C, Fitzgerald T, Kavita U, Ozer K, Tussey L, Shaw A: **Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI).** *Vaccine* 2011, 29(31):4897-4902.
264. Taylor DN, Treanor JJ, Sheldon EA, Johnson C, Umlauf S, Song L, Kavita U, Liu G, Tussey L, Ozer K *et al*: **Development of VAX128, a recombinant hemagglutinin (HA) influenza-flagellin fusion vaccine with improved safety and immune response.** *Vaccine* 2012, 30(39):5761-5769.
265. Song L, Liu G, Umlauf S, Liu X, Li H, Tian H, Reiserova L, Hou F, Bell R, Tussey L: **A rationally designed form of the TLR5 agonist, flagellin, supports superior immunogenicity of Influenza B globular head vaccines.** *Vaccine* 2014, 32(34):4317-4323.
266. Tarahomjoo S: **Utilizing bacterial flagellins against infectious diseases and cancers.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 2014, 105(2):275-288.
267. Jarchum I, Liu M, Lipuma L, Pamer EG: **Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis.** *Infect Immun* 2011, 79(4):1498-1503.
268. Zgair AK, Chhibber S: ***Stenotrophomonas maltophilia* flagellin restricts bacterial colonization in BALB/c mouse lung in vivo.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012, 66(2):191-200.
269. Kumar A, Gao N, Standiford TJ, Gallo RL, Yu FS: **Topical flagellin protects the injured corneas from *Pseudomonas aeruginosa* infection.** *Microbes Infect* 2010, 12(12-13):978-989.
270. Gao N, Sang Yoon G, Liu X, Mi X, Chen W, Standiford TJ, Yu FS: **Genome-wide transcriptional analysis of differentially expressed genes in flagellin-pretreated mouse corneal epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of S100A8/A9.** *Mucosal Immunol* 2013, 6(5):993-1005.
271. Yoon GS, Dong C, Gao N, Kumar A, Standiford TJ, Yu FS: **Interferon regulatory factor-1 in flagellin-induced reprogramming: potential protective role of CXCL10 in cornea innate defense against *Pseudomonas aeruginosa* infection.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, 54(12):7510-7521.
272. Gao N, Kumar A, Guo H, Wu X, Wheeler M, Yu FS: **Topical flagellin-mediated innate**

- defense against *Candida albicans* keratitis.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011, 52(6):3074-3082.
273. Liu X, Gao N, Dong C, Zhou L, Mi QS, Standiford TJ, Yu FS: **Flagellin-induced expression of CXCL10 mediates direct fungal killing and recruitment of NK cells to the cornea in response to *Candida albicans* infection.** *Eur J Immunol* 2014, 44(9):2667-2679.
 274. 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.
 275. Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, Denning TL, Crawford SE, Puijssers AJ, Iskarpatyoti JA, Estes MK *et al*: **Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18.** *Science* 2014, 346(6211):861-865.
 276. Gao N, Yu FS: **Chitinase 3-Like 1 Promotes *Candida albicans* Killing and Preserves Corneal Structure and Function by Controlling Host Antifungal Responses.** *Infect Immun* 2015, 83(10):4154-4164.
 277. Sabag O, Lorberboum-Galski H: **Combining flagellin and human beta-defensin-3 to combat bacterial infections.** *Front Microbiol* 2014, 5:673.
 278. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, Wood WI, Goddard AD, Gurney AL: **Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R.** *J Biol Chem* 2000, 275(40):31335-31339.
 279. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA: **Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides.** *J Exp Med* 2006, 203(10):2271-2279.
 280. Chung Y, Yang X, Chang SH, Ma L, Tian Q, Dong C: **Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4⁺ T lymphocytes.** *Cell Res* 2006, 16(11):902-907.
 281. Zenewicz LA, Yin X, Wang G, Elinav E, Hao L, Zhao L, Flavell RA: **IL-22 deficiency alters colonic microbiota to be transmissible and colitogenic.** *J Immunol* 2013, 190(10):5306-5312.
 282. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, Shibata N, Grunberg S, Sinha R, Zahm AM *et al*: **Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria.** *Science* 2012, 336(6086):1321-1325.
 283. Rutz S, Wang X, Ouyang W: **The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis.** *Nat Rev Immunol* 2014, 14(12):783-795.
 284. Eidenschenk C, Rutz S, Liesenfeld O, Ouyang W: **Role of IL-22 in microbial host defense.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2014, 380:213-236.
 285. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Elloso MM, Fouser LA, Artis D: **CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut.** *Immunity* 2011, 34(1):122-134.
 286. Schulz SM, Kohler G, Schutze N, Knauer J, Straubinger RK, Chackerian AA, Witte E, Wolk K, Sabat R, Iwakura Y *et al*: **Protective immunity to systemic infection with attenuated *Salmonella enterica* serovar enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22, but not IL-17.** *J Immunol* 2008, 181(11):7891-7901.
 287. Siegemund S, Schutze N, Schulz S, Wolk K, Nasilowska K, Straubinger RK, Sabat R, Alber G: **Differential IL-23 requirement for IL-22 and IL-17A production during innate immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.** *Int Immunol* 2009, 21(5):555-565.
 288. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F,

- Edeal J, Gaus K *et al*: **IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia.** *Nat Med* 2008, **14**(3):275-281.
289. Kudva A, Scheller EV, Robinson KM, Crowe CR, Choi SM, Slight SR, Khader SA, Dubin PJ, Enelow RI, Kolls JK *et al*: **Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice.** *J Immunol* 2011, **186**(3):1666-1674.
 290. Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, Zenewicz LA, Leiner I, Hohl TM, Flavell RA, Littman DR, Pamer EG: **Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense.** *Immunity* 2012, **36**(2):276-287.
 291. Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E: **Yersinia pestis, the cause of plague, is a recently emerged clone of Yersinia pseudotuberculosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(24):14043-14048.
 292. Abreu MT: **Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function.** *Nat Rev Immunol* 2010, **10**(2):131-144.
 293. Sansonetti PJ: **War and peace at mucosal surfaces.** *Nat Rev Immunol* 2004, **4**(12):953-964.
 294. Westermarck L, Fahlgren A, Fallman M: **Yersinia pseudotuberculosis efficiently escapes polymorphonuclear neutrophils during early infection.** *Infect Immun* 2014, **82**(3):1181-1191.
 295. Carter PB: **Pathogenicity of Yersinia enterocolitica for mice.** *Infect Immun* 1975, **11**(1):164-170.
 296. Logsdon LK, Mecsas J: **A non-invasive quantitative assay to measure murine intestinal inflammation using the neutrophil marker lactoferrin.** *J Immunol Methods* 2006, **313**(1-2):183-190.
 297. Hooper LV: **Epithelial cell contributions to intestinal immunity.** *Adv Immunol* 2015, **126**:129-172.
 298. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R: **IL-22 increases the innate immunity of tissues.** *Immunity* 2004, **21**(2):241-254.
 299. Kopp ZA, Jain U, Van Limbergen J, Stadnyk AW: **Do antimicrobial peptides and complement collaborate in the intestinal mucosa?** *Front Immunol* 2015, **6**:17.
 300. Beaumont PE, McHugh B, Gwyer Findlay E, Mackellar A, Mackenzie KJ, Gallo RL, Govan JR, Simpson AJ, Davidson DJ: **Cathelicidin host defence peptide augments clearance of pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection by its influence on neutrophil function in vivo.** *PLoS One* 2014, **9**(6):e99029.
 301. Wallace DF, Subramaniam VN: **Analysis of IL-22 contribution to hepcidin induction and hypoferremia during the response to LPS in vivo.** *Int Immunol* 2015, **27**(6):281-287.
 302. Armitage AE, Eddowes LA, Gileadi U, Cole S, Spottiswoode N, Selvakumar TA, Ho LP, Townsend AR, Drakesmith H: **Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli.** *Blood* 2011, **118**(15):4129-4139.
 303. Lesbordes-Brion JC, Viatte L, Bennoun M, Lou DQ, Ramey G, Houbon C, Hamard G, Kahn A, Vaulont S: **Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis.** *Blood* 2006, **108**(4):1402-1405.
 304. Hunter CA, Jones SA: **IL-6 as a keystone cytokine in health and disease.** *Nat Immunol* 2015, **16**(5):448-457.
 305. Hoge J, Yan I, Janner N, Schumacher V, Chalaris A, Steinmetz OM, Engel DR, Scheller J, Rose-John S, Mittrucker HW: **IL-6 controls the innate immune response against Listeria monocytogenes via classical IL-6 signaling.** *J Immunol* 2013, **190**(2):703-711.

306. Jain U, Cao Q, Thomas NA, Woodruff TM, Schwaebler WJ, Stover CM, Stadnyk AW: **Properdin provides protection from *Citrobacter rodentium*-induced intestinal inflammation in a C5a/IL-6-dependent manner.** *J Immunol* 2015, **194**(7):3414-3421.
307. Matteoli G, Fahl E, Warnke P, Muller S, Bonin M, Autenrieth IB, Bohn E: **Role of IFN-gamma and IL-6 in a protective immune response to *Yersinia enterocolitica* in mice.** *BMC Microbiol* 2008, **8**:153.
308. **World Health Organization - The Top 10 causes of death** [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>]
309. Schaberle TF, Hack IM: **Overcoming the current deadlock in antibiotic research.** *Trends Microbiol* 2014, **22**(4):165-167.
310. Campigotto A, Mubareka S: **Influenza-associated bacterial pneumonia; managing and controlling infection on two fronts.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015, **13**(1):55-68.
311. Whitsett JA, Alenghat T: **Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity.** *Nat Immunol* 2015, **16**(1):27-35.
312. Varon E: **Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*.** *Med Mal Infect* 2012, **42**(8):361-365.
313. Church JA, Fitzgerald F, Walker AS, Gibb DM, Prendergast AJ: **The expanding role of co-trimoxazole in developing countries.** *Lancet Infect Dis* 2015, **15**(3):327-339.
314. Cleaver JO, You D, Michaud DR, Pruneda FA, Juarez MM, Zhang J, Weill PM, Adachi R, Gong L, Moghaddam SJ *et al*: **Lung epithelial cells are essential effectors of inducible resistance to pneumonia.** *Mucosal Immunol* 2014, **7**(1):78-88.
315. Garvy BA, Harmsen AG: **The importance of neutrophils in resistance to pneumococcal pneumonia in adult and neonatal mice.** *Inflammation* 1996, **20**(5):499-512.
316. Quinton LJ, Mizgerd JP: **Dynamics of lung defense in pneumonia: resistance, resilience, and remodeling.** *Annu Rev Physiol* 2015, **77**:407-430.
317. Descamps D, Le Gars M, Balloy V, Barbier D, Maschalidi S, Tohme M, Chignard M, Ramphal R, Manoury B, Sallenave JM: **Toll-like receptor 5 (TLR5), IL-1beta secretion, and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophage phagocytosis and bacterial killing.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(5):1619-1624.
318. Ivanov S, Fontaine J, Paget C, Macho Fernandez E, Van Maele L, Renneson J, Maillet I, Wolf NM, Rial A, Leger H *et al*: **Key role for respiratory CD103(+) dendritic cells, IFN-gamma, and IL-17 in protection against *Streptococcus pneumoniae* infection in response to alpha-galactosylceramide.** *J Infect Dis* 2012, **206**(5):723-734.
319. Kjos M, Aprianto R, Fernandes VE, Andrew PW, van Strijp JA, Nijland R, Veening JW: **Bright fluorescent *Streptococcus pneumoniae* for live-cell imaging of host-pathogen interactions.** *J Bacteriol* 2015, **197**(5):807-818.
320. Van Maele L, Fougeron D, Janot L, Didierlaurent A, Cayet D, Tabareau J, Rumbo M, Corvo-Chamaillard S, Boulennouar S, Jeffs S *et al*: **Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity.** *Mucosal Immunol* 2014, **7**(3):489-500.
321. Cakarova L, Marsh LM, Wilhelm J, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S: **Macrophage tumor necrosis factor-alpha induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair.** *Am J Respir Crit Care Med* 2009, **180**(6):521-532.
322. Steinwede K, Henken S, Bohling J, Maus R, Ueberberg B, Brumshagen C, Brincks EL, Griffith TS, Welte T, Maus UA: **TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) exerts therapeutic efficacy for the treatment of pneumococcal pneumonia in mice.** *J Exp Med* 2012, **209**(11):1937-1952.

323. Salamone GV, Petracca Y, Fuxman Bass JI, Rumbo M, Nahmod KA, Gabelloni ML, Vermeulen ME, Matteo MJ, Geffner JR, Trevani AS: **Flagellin delays spontaneous human neutrophil apoptosis.** *Lab Invest* 2010, **90**(7):1049-1059.
324. Gold ES, Diercks AH, Podolsky I, Podyminogin RL, Askovich PS, Treuting PM, Aderem A: **25-Hydroxycholesterol acts as an amplifier of inflammatory signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(29):10666-10671.
325. Ivanov S, Renneson J, Fontaine J, Barthelemy A, Paget C, Fernandez EM, Blanc F, De Trez C, Van Maele L, Dumoutier L *et al*: **Interleukin-22 reduces lung inflammation during influenza A virus infection and protects against secondary bacterial infection.** *J Virol* 2013, **87**(12):6911-6924.
326. Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Renneson J, Blanc F, Pichavant M, Dumoutier L, Ryffel B, Renauld JC, Gosset P *et al*: **Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: potential role in protection against lung epithelial damages.** *J Biol Chem* 2012, **287**(12):8816-8829.
327. Talbot HK, Rock MT, Johnson C, Tussey L, Kavita U, Shanker A, Shaw AR, Taylor DN: **Immunopotential of trivalent influenza vaccine when given with VAX102, a recombinant influenza M2e vaccine fused to the TLR5 ligand flagellin.** *PLoS One* 2010, **5**(12):e14442.
328. Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK: **Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin.** *Lancet* 1990, **336**(8718):763-765.
329. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T: **Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver.** *J Biol Chem* 2001, **276**(11):7806-7810.
330. Garcia-Montoya IA, Cendon TS, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q: **Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1820**(3):226-236.
331. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A: **Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron.** *Nature* 2004, **432**(7019):917-921.
332. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV: **Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin.** *Science* 2006, **313**(5790):1126-1130.
333. Royet J, Gupta D, Dziarski R: **Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation.** *Nat Rev Immunol* 2011, **11**(12):837-851.
334. Ridley F: **Lysozyme: An Antibacterial Body present in Great Concentration in Tears, and its Relation to Infection of the Human Eye.** *Proc R Soc Med* 1928, **21**(9):1495-1506.
335. Ouellette AJ: **Paneth cell alpha-defensins in enteric innate immunity.** *Cell Mol Life Sci* 2011, **68**(13):2215-2229.
336. Semple F, Dorin JR: **beta-Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more?** *J Innate Immun* 2012, **4**(4):337-348.
337. Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ: **Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity.** *J Leukoc Biol* 2003, **74**(3):448-455.
338. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L: **A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide.** *Cell Immunol* 2012, **280**(1):22-35.
339. Meyer-Hoffert U: **Neutrophil-derived serine proteases modulate innate immune responses.** *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009, **14**:3409-3418.
340. Sallenave JM: **Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010,

42(6):635-643.

341. Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE: **Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease.** *Annu Rev Med* 2010, **61**:105-119.

ANNEXE I

Tableau 4 : Principales molécules antibactériennes exprimées dans l'intestin et dans le poumon.

Molécules antibactériennes	Tissus	Sources cellulaires	Fonctions	Spectre d'action	
<u>Molécules altérant la disponibilité en ions</u>					
calprotectine (S100A8/9)	intestin et poumon	PNN, monocytes, macrophages, cellules endothéliales, cellules épithéliales	lie le calcium, chélate le zinc et le manganèse, et régule l'inflammation	Gram + et Gram -	[328]
hepcidine	intestin et poumon	hépatocytes	séquestre le fer, forme des radicaux oxygénés, empêche la formation de biofilm	Gram + et Gram -	[329]
lactoferrine	poumon	PNN, pneumocytes II, cellules épithéliales	chélate le fer, réduit la formation de biofilm, perméabilise la membrane	Gram + et Gram -	[330]
lipocaline	intestin et poumon	PNN, macrophages, cellules épithéliales	bloque les sidérophores bactériens	Gram -	[331]
<u>Molécules ciblant le peptidoglycane</u>					
lectines de type C (RegIIIβ/γ)	intestin et poumon	cellules épithéliales, cellules de Paneth	perturbent l'intégrité de la paroi bactérienne	Gram +	[332]
protéine reconnaissant le peptidoglycane (PGRP)	intestin et poumon	PNN, polynucléaires éosinophiles, cellules épithéliales	se fixe à la surface des bactéries et induisent la mort bactérienne programmée	Gram + et Gram -	[333]
lysozyme	intestin et poumon	PNN, macrophages, monocytes, cellules épithéliales	lyse la paroi bactérienne et perméabilise la membrane	Gram + et Gram -	[334]

Molécules antibactériennes	Tissus	Sources cellulaires	Fonctions	Spectre d'action	
<u>Peptides formant des pores</u>					
α -défensines	intestin et poumon	PNN, macrophages, monocytes, cellules épithéliales, cellules de Paneth	perméabilisent la membrane, activent le complément, recrutent et activent les cellules immunitaires	Gram + et Gram -	[335]
β -défensines	intestin et poumon	PNN, macrophages, monocytes, cellules épithéliales		Gram + et Gram -	[336]
CCL20	intestin et poumon	PNN, monocytes, macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, cellules épithéliales	perméabilise la membrane, chimioattractant	Gram + et Gram -	[337]
cathélicidine	intestin et poumon	PNN, macrophages, mastocytes, cellules épithéliales	perméabilisent la membrane, rôle dans la réparation tissulaire, chimioattractant	Gram + et Gram -	[338]
<u>Protéases / antiprotéases</u>					
protéinase 3	intestin et poumon	PNN	perméabilisent la membrane, recrutent et activent les monocytes, améliorent l'activité phagocytaire	Gram + et Gram -	[339]
azurocidine					
cathepsine G					
Elastase					
Elafin	poumon	macrophages alvéolaires, lymphocytes $T\gamma\delta$, cellules épithéliales	perméabilisent la membrane (protéines cationiques), opsonisent les bacteries, chimioattractants, inhibent les protéases (anti-inflammatoire), immunorégulateurs	Gram + et Gram -	[340]
inhibiteur de protéases sécrétées par les leukocytes (SLPI)	poumon	PNN, macrophages alvéolaires, cellules épithéliales			
<u>Opsonines</u>					
protéines du surfactant	poumon	pneumocytes II	potentialisent la phagocytose (opsonines), activent les macrophages, modulent la production cytokinique	Gram -	[341]

ANNEXE II

A. Brevets

Sirard JC, Carnoy C, Trottein F, **Porte R**. *Methods and pharmaceutical composition for the treatment of bacterial superinfections post-influenza*. Brevet déposé EP14307154.6 - Décembre 2014.

B. Communications scientifiques

I. Présentation orale

Séminaire du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (Juin 2015) :

“A Toll-like receptor 5 agonist improves the efficacy of antibiotics in the treatment of primary and Influenza-associated pneumococcal infections”

II. Présentations de posters

“International Congress of Mucosal Immunology” à Berlin (Juillet 2015) :

Porte R, Fougeron D, Muñoz N, Tabareau J, Georgel AF, Wallet F, Chabagoilty JA, Carnoy C and Sirard JC.

“A Toll-like receptor 5 agonist improves the efficacy of antibiotics in the treatment of primary and influenza-associated pneumococcal infections”

Congrès annuel de la Société Française de l'Immunologie à Lille (Novembre 2014) :

• **Porte R**, Fougeron D, Muñoz N, Tabareau J, Georgel AF, Wallet F, Chabagoilty JA, Sirard JC and Carnoy C.

“Toll-like receptor 5 agonist improves antibiotic treatments of pneumococcal infections”

• Van Maele L, Carnoy C, **Porte R**, Trottein F, Faveeuw C and Sirard JC.

“Activation of type 3 Innate Lymphoid Cells in the lung during bacterial infection”

14^{ème} journée André Verbert - Colloque annuel des doctorants à Lille (Septembre 2014) :

Porte R, Tabareau J, Foligné B, Jonckheere N, Gosset P, Simonet M, Sirard JC and Carnoy C.

“IL-22-independant flagellin-mediated protection against Yersinia pseudotuberculosis intestinal infection”

ANNEXE III

Autres contributions scientifiques

Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Ivanov S, **Porte R**, Deruy E, Chabalgoity JA, Renauld JC, Eberl G, Benecke AG, Trottein F, Faveeuw C, Sirard JC. *Activation of type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lung during Streptococcus pneumoniae infection. Journal of Infectious Diseases* - Août **2014**. 210(3): 493-503.

Mucosal sites are continuously exposed to pathogenic microorganisms and are therefore equipped to control respiratory infections. Type 3 innate lymphoid cells (ILC3) are key players in antimicrobial defense in intestinal mucosa, through interleukin 17 and interleukin 22 (IL-22) production. The present study aimed at analyzing the distribution and function of ILC3 in the respiratory tract. We first observed that lung mucosa harbors a discrete population of ILC3 expressing CD127, CD90, CCR6, and the transcriptional factor ROR γ t. In addition, lung ILC3 were identified as a major source of IL-22 in response to interleukin 23 stimulation. During *Streptococcus pneumoniae* infection, ILC3 rapidly accumulated in the lung tissue to produce IL-22. In response to *S. pneumoniae*, dendritic cells and MyD88, an important adaptor of innate immunity, play critical functions in IL-22 production by ILC3. Finally, administration of the Toll-like receptor 5 agonist flagellin during *S. pneumoniae* challenge exacerbated IL-22 production by ILC3, a process that protects against lethal infection. In conclusion, boosting lung ILC3 might represent an interesting strategy to fight respiratory bacterial infections.

Goubard A, Loiez C, Abe J, Fichel C, Herwegh S, Faveeuw C, **Porte R**, Cayet D, Sebbane F, Penet S, Foligné B, Desreumaux P, Saito H, Sirard JC, Simonet M and Carnoy C. *Superantigenic Yersinia pseudotuberculosis induces the expression of granzymes and perforin by CD4+ T cells. Infection and Immunity* - Mars **2015**. 83(5): 2053-64.

Bacterial superantigens (SAGs) are immunostimulatory toxins that induce acute diseases mainly through the massive release of inflammatory cytokines. *Yersinia pseudotuberculosis* is the only Gram-negative bacterium known to produce a SAG (*Y. pseudotuberculosis*-derived mitogen [YPM]). This SAG binds major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T cell receptors (TcR) bearing the variable region V β 3, V β 9, V β 13.1, or V β 13.2 (in humans) and V β 7 or V β 8 (in mice). We have previously shown that YPM exacerbates the virulence of *Y. pseudotuberculosis* in mice. With a view to understanding the mechanism of YPM's toxicity, we compared the immune response in BALB/c mice infected with a YPM-producing *Y. pseudotuberculosis* or the corresponding isogenic, SAG-deficient mutant. Five days after infection, we observed strong CD4(+) V β 7(+) T cell expansion and marked interleukin-4 (IL-4) production in mice inoculated with SAG-producing *Y. pseudotuberculosis*. These phenomena were correlated with the activation of ypm gene transcription in liver and spleen. A transcriptomic analysis revealed that the presence of YPM also increased expression of granzyme and perforin genes in the host's liver and spleen. This expression was attributed to a CD4(+) T cell subset, rather than to natural killer T (NKT) cells that display a TcR with a V β region that is potentially recognized by YPM. Increased production of cytotoxic molecules was correlated with hepatotoxicity, as demonstrated by an increase in plasma alanine aminotransferase activity. Our results demonstrate that YPM activates a potentially hepatotoxic CD4(+) T cell population.

Caractérisation des propriétés anti-infectieuses de la flagelline, agoniste du *Toll-like receptor* 5

RÉSUMÉ

De par sa capacité à détecter les microorganismes et à mettre en place une défense anti-infectieuse rapide, l'immunité innée représente la première ligne de défense de l'hôte. La réponse immunitaire innée est déclenchée par des motifs microbiens moléculaires universels et conservés reconnus par des récepteurs innés parmi lesquels les "*Toll-like Receptors*" (TLR). L'activation de ces récepteurs induit une inflammation locale et une réponse antimicrobienne adaptée au pathogène. Ces propriétés biologiques ont permis d'envisager l'utilisation des TLR comme cible thérapeutique anti-infectieuse. Dans ce contexte il a été montré que la flagelline, le composant majeur des flagelles bactériens et agoniste de TLR5, possédait des propriétés anti-infectieuses. Toutefois, les mécanismes moléculaires et cellulaires effecteurs responsables des effets antimicrobiens de l'agoniste de TLR5 restent à définir.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié les capacités anti-infectieuses de la flagelline dans deux modèles infectieux chez la souris. Nous avons tout d'abord montré que l'administration systémique de flagelline, en prophylaxie, permettait de protéger d'une infection intestinale par *Yersinia pseudotuberculosis*. L'effet protecteur de la flagelline est dépendant de l'expression de TLR5 et indépendant de l'IL-22. Cette étude suggère donc un mécanisme original de protection induit par la flagelline.

Nous avons également analysé la capacité anti-infectieuse de la flagelline dans un modèle murin d'infection respiratoire à *Streptococcus pneumoniae*. Nous avons notamment montré l'efficacité thérapeutique de la flagelline lorsqu'elle était associée à un antibiotique. En effet, l'association d'amoxicilline ou de co-trimoxazole avec l'administration intranasale de flagelline améliore la protection contre une infection pneumococcique létale par rapport au traitement par l'antibiotique seul. L'efficacité de cette thérapie combinatoire est dépendante de l'activation de TLR5 et est associée à une infiltration pulmonaire importante de polynucléaires neutrophiles. Ce traitement améliore également la protection dans un modèle de surinfection pneumococcique post-grippale. Ces résultats permettent d'envisager de nouvelles stratégies antibactériennes associant une immunostimulation avec une antibiothérapie.

Mots-clés : Immunité innée, TLR5, agoniste, flagelline, infection intestinale, infection respiratoire, antibiotique, thérapie, prophylaxie, IL-22, muqueuse