



**HAL**  
open science

# Impact d'une $\beta$ -lactamine sur les neutrophiles au cours de la pneumonie à *Streptococcus pneumoniae*

Mélanie Mondemé

► **To cite this version:**

Mélanie Mondemé. Impact d'une  $\beta$ -lactamine sur les neutrophiles au cours de la pneumonie à *Streptococcus pneumoniae*. Immunologie. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILS033 . tel-04390840

**HAL Id: tel-04390840**

**<https://theses.hal.science/tel-04390840>**

Submitted on 12 Jan 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Lille  
École Doctorale Biologie Santé



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

Présentée et soutenue publiquement par

**Mélanie MONDEME**

Le 27 octobre 2023

**Impact d'une  $\beta$ -lactamine sur les neutrophiles au cours de la  
pneumonie à *Streptococcus pneumoniae***

Devant le jury composé de :

M. Le Professeur <b>Benoît FOLIGNE</b>	<b>Président du jury</b>
Mme Le Docteur <b>Nathalie WINTER</b>	<b>Rapporteur</b>
M. Le Docteur <b>Luc DE CHAISEMARTIN</b>	<b>Rapporteur</b>
Mme Le Docteur <b>Bénédicte MACHIELS</b>	<b>Examineur</b>
M. Le Docteur <b>Christophe PAGET</b>	<b>Examineur</b>
Mme Le Docteur <b>Christelle FAVEEUW</b>	<b>Co-directrice de thèse</b>
M. Le Professeur <b>Christophe CARNOY</b>	<b>Co-directeur de thèse</b>

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille,  
INSERM U1019, CNRS UMR9017, Université de Lille  
Équipe « Bactéries, Antibiotiques et Immunité »



# Remerciements

## **Au Professeur Benoît Foligné,**

Je tiens à vous exprimer ma plus profonde gratitude pour avoir accepté de présider ma soutenance de thèse.

## **Aux Docteurs Nathalie Winter et Luc Dechaisemartin,**

Je tiens à vous remercier sincèrement pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteurs de mon travail.

## **Aux Docteurs Bénédicte Machiels et Christophe Paget,**

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail de recherche et pour l'intérêt que vous avez manifesté à son égard.

## **Aux membres de mon Comité de Suivi de Thèse,**

Je tiens à exprimer mes remerciements profonds au **Professeur Delphine Allorge** et **aux Docteurs Alexandre Boissonnas** et **Pierre Guermonprez** pour nos échanges qui ont été d'une grande contribution pour l'avancée de ce projet.

## **A ma directrice de thèse, le Docteur Christelle Faveeuw,**

Je désire exprimer toute ma gratitude pour ta constante présence, tes enseignements, et ton précieux accompagnement tout au long de ma recherche. On ne peut pas ignorer que ce projet de thèse n'a pas été tout rose. Après de nombreuses hypothèses, des moments de doute, des expérimentations, et des ajustements, nous sommes finalement parvenus à publier cet article, qui, à mes yeux, incarne un bel équilibre entre la science et la pharmacie. C'est une source de grande fierté après tout le chemin parcouru ! Même si je sais qu'il me reste encore beaucoup à apprendre, ta profonde expertise en immunologie m'a permis de construire des bases solides pour mon avenir professionnel. Je tiens également à te remercier pour ta patience et ton soutien lors des moments de rédaction et de stress intense. Je garderai d'excellents souvenirs de notre collaboration. Je souhaite t'exprimer toute ma reconnaissance et mon plus profond respect.

## **A mon co-directeur de thèse, le Professeur Christophe Carnoy,**

Je souhaite vous exprimer ma plus profonde gratitude pour m'avoir accompagnée tout au long de ce parcours de recherche. Votre positivité et votre bienveillance ont été un soutien exceptionnel pendant ces années consacrées à ma thèse. Je tiens également à vous remercier chaleureusement pour votre précieuse aide dans la correction de mémoires, de projets, de demandes de bourse de recherche, ainsi que pour vos conseils avisés lors de nos sessions de brainstorming, qui ont été d'une grande valeur pour moi. Votre présence a indéniablement été un pilier essentiel durant ces cinq années de recherche.

**Au Docteur Jean-Claude Sirard,**

Je tiens à vous remercier pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe dès le Master 2. J'ai pu évoluer scientifiquement grâce à la diversité des projets au sein de l'équipe BAI et du CIIL. Je tiens également à vous remercier pour tous ces brainstormings qui ont contribué à l'avancée de mes travaux mais également pour vos conseils pour les choix d'avenir. Vous avez mon plus profond respect.

**A l'ensemble de l'équipe BAI**, qui s'est bien agrandie au fil de ces quatre années de thèse. **Laurye, Delphine, Anne, Farouk, Mara, Charlotte, Yasmine, Daphnée, Xing**, aux étudiants et techniciens que j'ai pu croiser, je tiens tous à vous remercier pour la bonne humeur au sein du groupe ! Chacun d'entre vous avez contribué à mon intégration au sein de l'équipe et à ma progression dans le domaine de la recherche. Aux anciens de l'équipe Li3, **Laura et Valentin**, je vous remercie pour les bons souvenirs dans mes premiers pas dans la recherche, qui remontent à loin déjà !

**A Yasmine**, je tiens à te remercier pour ton expertise sur les analyses transcriptomiques. Ton aide a été d'une grande avancée pour déceler le langage du codage !

**A Daphnée**, ma coloc de bureau et ma précieuse aide technique, je ne te remercierai jamais assez pour le gain de temps que tu m'as donné au cours des préparations Facs ! Ta bonne humeur a été d'un grand soutien au cours de ces années de thèse. Tu resteras l'une de mes plus belles rencontres.

**Dearest Mara**, a huge thank you for your unfailing support. You always have the right words to give me a boost. It's been a real pleasure to share our time together.

**A Charlotte**, c'était un vrai plaisir de faire quelques manip avec toi ! Je te remercie d'avoir les mots justes quand il le faut. Merci pour ces bons moments au labo et en dehors.

**A Xing**, ma partenaire de M2 et mon amie, tu as toujours su trouver les mots et les encouragements au bon moment, un grand merci !

**Aux copains IPR**, je tiens à vous remercier pour ces rdv de copains pharma ! **A Fethi**, je tiens à t'exprimer mes profonds remerciements pour toujours avoir été à l'écoute dans mes moments de doute, pour ton soutien et ton optimisme lors de n'importe quelle situation ! **A Laura N.**, je ne te remercierai jamais assez pour ton aide si précieuse depuis le début de ce parcours lillois ! **A Pauline**, je te remercie pour ta folie qui surpasse tous les problèmes ! Je suis ravie d'avoir pu te connaître un peu plus lors du congrès de la SFI. **A Julie** que je peux compter parmi les IPR, voire la maman des IPR ☺ Je tiens à te remercier. Notre rencontre a été le fruit d'une belle amitié qui s'est construite au fil du temps, même si on aimerait se voir plus souvent. Tu m'as fait l'honneur de participer à mon jury de thèse de pharmacie et aujourd'hui d'être présente pour me soutenir, une nouvelle fois. Je suis certaine que nous partagerons de bons moments par la suite, et pourquoi pas de nouveaux challenges sportifs ?!

**A mes rencontres lilloises**, qui m'ont permis de « sortir la tête » de la thèse. Je tiens à vous remercier pour tous nos moments de partage, de joie, de jeux, de balades à vélos, de courses à pied, de restaurants et verres partagés !

**A ma bande de pharma préférée**, mes amis, vous me faites l'honneur d'assister à cette soutenance. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout le soutien que vous m'avez apporté, même à des kilomètres loin de vous tous ! Nos moments de rassemblement ont été de véritables bouffées d'oxygène, merci pour toute la folie que vous me faites vivre ! A mes amies **Marine, Béré, Estelle L.** et **Estelle C.**, un immense merci pour votre présence, toujours, aux étapes les plus importantes de ma vie.

**A ma famille, ma belle-famille**, une chance pour moi d'être aussi bien entourée... Merci pour tout.

**A mes parents**, le plus grand des soutiens. Vous m'avez accompagné pendant ces longues années d'études, à Dijon comme à Lille. Je ne saurais vous remercier pour m'avoir toujours soutenue et d'avoir cru en moi. C'est grâce à vous que j'en suis arrivée là, grâce à la persévérance et le courage nécessaires pour surmonter n'importe quelle épreuve... et quelles épreuves ! Je suis si heureuse de mettre un point final à ce long chemin en votre présence. Enfin la vie d'adulte me direz-vous et, je l'espère, plus de temps à partager ensemble. Je vous aime très fort.

**A mon frère**, merci merci merci. Malgré tes trois années en moins, ta réussite a été un vrai moteur pour moi.

**A toi, Adrien**, mon doudou, mon amour, mon meilleur, mon tout. Nous y voilà, enfin, après des mois à penser au début d'un nouveau chapitre. Quelle vie nous avons eue ! Une vie à trois dès nos débuts : toi, moi et « LA thèse » comme tu dis si bien. Je ne répéterai jamais assez la chance que j'ai eu de t'avoir rencontrée ou plutôt que tu m'aies couru après (il fallait bien l'écrire dans les mémoires). Malgré des réveils très tôt, des retours à la maison parfois (souvent) tard, des week-end à travailler, tu m'as toujours épaulé. Ton énergie et ta joie de vivre ont été un réel moteur pendant ces quatre années. Il est impossible de trouver suffisamment de mots pour t'exprimer ma gratitude pour tout le soutien que tu m'as offert. Il me tarde de découvrir l'après-thèse à tes côtés et de réaliser nos rêves d'évasion. Je t'aime.



# Résumé

Le pneumocoque, également connu sous le nom de *Streptococcus pneumoniae*, constitue un problème majeur de santé publique en tant que principale cause de décès liés aux pneumonies aiguës communautaires dans le monde. Le traitement de première intention pour cette infection implique l'utilisation de  $\beta$ -lactamines, des antibiotiques aux propriétés bactéricides. De façon intéressante, la littérature prône fortement l'hypothèse d'une interaction entre ces antibiotiques et le système immunitaire de l'hôte. En effet, le traitement par les  $\beta$ -lactamines conduit à la libération de molécules microbiennes qui pourrait déclencher l'activation des composantes de l'immunité innée. Parmi celles-ci, les neutrophiles représentent une cible idéale étant donné leur rôle crucial dans les réponses anti-infectieuses et notamment au cours de l'infection à *S. pneumoniae*.

L'objectif de ma thèse a été d'étudier l'impact d'un traitement à l'amoxicilline, une  $\beta$ -lactamine couramment utilisée en première ligne, sur les neutrophiles, au cours de l'infection à *S. pneumoniae*.

Pour ce faire, nous avons (i) mis en place un modèle murin de pneumonie secondaire à une infection par le virus Influenza et (ii) déterminé une dose efficace d'amoxicilline. Le traitement à l'amoxicilline conduit 12h après son administration à une clairance de la bactérie chez les animaux surinfectés, une diminution de la réponse inflammatoire et du recrutement de neutrophiles dans les poumons et le sang par rapport aux animaux non traités. En revanche, lorsque nous examinons la moelle osseuse, le traitement à l'amoxicilline n'impacte pas le nombre de progéniteurs des neutrophiles et s'accompagne d'une augmentation du nombre de neutrophiles matures. Les analyses transcriptomiques et protéomiques des neutrophiles matures de moelle osseuse montrent des différences significatives caractérisées entre autres par une diminution de l'expression de gènes inflammatoires (*Mmp8*, *SI00a8*, *Lcn2*) et de gènes (*Nos2*, *Qsox1*) et protéines (NCF4, SOD1) associées au stress oxydatif après le traitement. L'étude des marqueurs de surface CD11b, CD62L et CXCR2, ainsi que les études fonctionnelles ont confirmé le profil moins activé des neutrophiles matures issus des souris traitées. Ces neutrophiles matures conditionnés par l'amoxicilline conservent en revanche leur capacité à migrer en périphérie au cours d'une inflammation aiguë, tout en affichant un phénotype caractéristique des neutrophiles âgés.

En conclusion, nos résultats établissent pour la première fois des bases solides sur l'activité immunomodulatrice *in vivo* d'un traitement à base de  $\beta$ -lactamines. Bien que les mécanismes impliqués dans l'effet du traitement à l'amoxicilline sur le développement des neutrophiles restent à élucider, la compréhension des relations entre l'immunité innée et les  $\beta$ -lactamines ouvrirait la voie à de nouvelles opportunités pour améliorer l'efficacité des traitements.

Mots clés : pneumonie à pneumocoques, amoxicilline, neutrophile mature, granulopoïèse, moelle osseuse, antibiotique

**Titre en anglais: Impact of a  $\beta$ -lactam on neutrophil in *Streptococcus pneumoniae* pneumonia**

**Résumé en anglais:**

Pneumococcus, also known as *Streptococcus pneumoniae*, is a major public health problem as the leading cause of death from acute community-acquired pneumonia worldwide. The first-line treatment for this infection involves the use of  $\beta$ -lactams, antibiotics with bactericidal properties. Interestingly, the literature strongly supports the hypothesis of an interaction between these antibiotics and the host immune system. Indeed, treatment with  $\beta$ -lactam antibiotics leads to the release of microbial molecules that could trigger the activation of components of innate immunity. Among these, neutrophils represent an ideal target given their crucial role in anti-infectious responses, particularly during *S. pneumoniae* infection.

The aim of my thesis was to study the impact of treatment with amoxicillin, a  $\beta$ -lactam commonly used as first-line treatment, on neutrophils during *S. pneumoniae* infection.

To do this, we (i) set up a mouse model of pneumonia secondary to influenza virus infection and (ii) determined an effective dose of amoxicillin. Treatment with amoxicillin led 12 hours after its administration to clearance of the bacteria in superinfected animals, a reduction in the inflammatory response and neutrophil recruitment in the lungs and blood compared with untreated animals. In contrast, when we examined the bone marrow, amoxicillin treatment had no impact on the number of neutrophil progenitors and was accompanied by an increase in the number of mature neutrophils. Transcriptomic and proteomic analyses of mature bone marrow neutrophils showed significant differences, characterized by a reduction in the expression of inflammatory genes (*Mmp8*, *S100a8*, *Lcn2*) and genes (*Nos2*, *Qsox1*) and proteins (NCF4, SOD1) associated with oxidative stress after treatment. Studies of the surface markers CD11b, CD62L and CXCR2, as well as functional studies, confirmed the less activated profile of mature neutrophils from treated mice. However, these mature neutrophils conditioned with amoxicillin retained their ability to migrate to the periphery during acute inflammation, while displaying a phenotype characteristic of aged neutrophils.

In conclusion, our results establish for the first time a solid basis for the *in vivo* immunomodulatory activity of  $\beta$ -lactams treatment. Although the mechanisms involved in the indirect effect of amoxicillin treatment on neutrophil development remain to be elucidated, an understanding of the relationships between innate immunity and  $\beta$ -lactams would open up new opportunities for improving the efficacy of treatments.

Key words: pneumococcal pneumonia, amoxicillin, mature neutrophil, granulopoiesis, bone marrow, antibiotic

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>1</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des figurations</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>11</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>15</b>
<b>I. Les infections respiratoires basses : implication de la bactérie <i>Streptococcus pneumoniae</i></b> .....	<b>16</b>
A. Infections respiratoires basses : focus sur la pneumonie infectieuse .....	16
B. Prévention et traitements de la pneumonie à <i>S. pneumoniae</i> .....	23
C. Les $\beta$ -lactamines, traitement de première intention de la pneumonie à <i>S. pneumoniae</i> .....	26
<b>II. Réponse immunitaire innée au cours de l'infection pulmonaire aiguë à <i>S. pneumoniae</i></b> .....	<b>31</b>
A. La barrière épithéliale, aux portes de l'immunité innée .....	32
B. Implication du complément .....	33
C. Reconnaissance de <i>S. pneumoniae</i> par les récepteurs de l'immunité innée : les PRR .....	35
D. Réponses moléculaires et cellulaires au cours de l'infection aiguë à <i>S. pneumoniae</i> .....	40
<b>III. Le polynucléaire neutrophile, cycle de vie et importance au cours de l'infection à <i>S. pneumoniae</i></b> .....	<b>45</b>
A. Développement des neutrophiles.....	45
B. Devenir des neutrophiles matures de la MO.....	53
C. Migration tissulaire et activation des neutrophiles en contexte infectieux.....	55
D. Importance du neutrophile au cours de l'infection pulmonaire à <i>S. pneumoniae</i> ....	62
<b>Objectifs</b> .....	<b>65</b>
<b>Matériels et Méthodes</b> .....	<b>69</b>
A. Culture bactérienne de <i>S. pneumoniae</i> .....	71
B. Modèle murin d'infection et de traitement antibiotique .....	71
C. Quantification de l'AMX par LC-MS/MS (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem).....	73
D. Analyses transcriptionnelles par RT-qPCR.....	73
E. Analyses des protéines par dosages ELISA.....	75
F. Analyses par cytométrie en flux.....	76

G. Identification intravasculaire des neutrophiles pulmonaires .....	79
H. Tests fonctionnels des neutrophiles de MO.....	80
I. Analyse RNA-sequencing (RNA-seq).....	80
J. Analyse protéomique par spectrométrie de masse.....	81
K. Tests statistiques.....	82
<b>Résultats .....</b>	<b>83</b>
A. L'administration d'une dose unique d'AMX protège contre la surinfection par <i>S. pneumoniae</i> .....	84
B. L'administration d'AMX réduit la réponse inflammatoire pendant l'infection par <i>S. pneumoniae</i> .....	85
C. Le traitement à AMX favorise la maturation des neutrophiles de la MO .....	87
D. Les neutrophiles matures de la MO ont des profils transcriptionnels et protéomiques spécifiques au cours du traitement de la surinfection par AMX. ....	89
E. Le traitement à l'AMX impacte l'activation et les fonctions des neutrophiles matures de la MO.....	92
F. Les neutrophiles matures de la MO conditionnés par le traitement AMX sont rapidement mobilisés en réponse à une inflammation systémique. ....	94
<b>Discussion .....</b>	<b>101</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>114</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>115</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>139</b>
<b>Annexe I : Revue de la littérature.....</b>	<b>140</b>
<b>Annexe II : Version originale de l'article de thèse .....</b>	<b>141</b>
<b>Annexe III : Communications scientifiques.....</b>	<b>175</b>

# Liste des figurations

## Liste des figures :

Figure 1. Répartition mondiale des infections respiratoires basses en fonction de l'âge. ....	18
Figure 2. Éléments structuraux de <i>S. pneumoniae</i> et facteurs de virulence. ....	21
Figure 3. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines.....	27
Figure 4. Effet temps-dépendant des $\beta$ -lactamines. ....	29
Figure 5. Vue d'ensemble des défenses structurales et immunologiques dans les poumons...	31
Figure 6. Voies du complément impliquées au cours de l'infection à <i>S. pneumoniae</i> .....	34
Figure 7. Principaux PRR impliqués dans la reconnaissance de <i>S. pneumoniae</i> et voies de signalisation.....	37
Figure 8. Schéma de l'hématopoïèse chez la souris.....	46
Figure 9. Développement des neutrophiles et formation de leurs granules. ....	48
Figure 10. Voie de différenciation des neutrophiles de la MO. ....	51
Figure 11. Étapes de migration des neutrophiles à travers l'endothélium des tissus infectieux. ....	56
Figure 12. Étapes de maturation du phagosome du neutrophile. ....	58
Figure 13. Formation du complexe NADPH oxydase. ....	60
Figure 14. Une dose unique d'AMX protège contre la surinfection par <i>S. pneumoniae</i> . ....	85
Figure 15. Le traitement à l'AMX des animaux infectés réduit la réponse inflammatoire.....	86
Figure 16. Le traitement à l'AMX des animaux infectés favorise la maturation des neutrophiles de la MO.....	88
Figure 17. Le traitement à l'AMX modifie le profil transcriptionnel des neutrophiles matures de la MO.....	92
Figure 18. Le traitement à l'AMX impacte l'activation et les fonctions des neutrophiles matures de la MO.....	93
Figure 19. Le traitement à l'AMX favorise le recrutement des neutrophiles dans les tissus après l'administration de LPS <i>in vivo</i> .....	95

## Liste des figures supplémentaires :

Figure S1. Détermination des concentrations d'AMX dans le sérum des animaux surinfectés. ....	96
Figure S2. La surinfection par <i>S. pneumoniae</i> impacte modérément les réponses pulmonaires et médullaires 12 h après l'infection. ....	97
Figure S3. Stratégie de <i>gating</i> par cytométrie en flux. ....	98
Figure S4. Analyse transcriptomique et protéomique des neutrophiles de MO traités par AMX par rapport aux neutrophiles non traités. ....	99
Figure S5. Inhibition de la phagocytose à 4°C et niveau basal de production des ROS par les neutrophiles matures de la MO. ....	99

## Liste des tableaux :

Tableau 1. Liste des amorces utilisées pour les analyses transcriptionnelles par RT-qPCR ...	75
Tableau 2. Liste des anticorps monoclonaux utilisés pour la cytométrie en flux. ....	78

# Liste des abréviations

AIM2 : *Absent in melanoma 2*

AMX : Amoxicilline

ARNm : Acide ribonucléique messenger

C3G : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération

CBP : *Choline-binding protein*

CCL : *C-C motif Chemokine Ligand*

CFU : *Colony Forming Unit*

CLR : *C-type lectin receptor*

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CR1 : *Complement receptor 1*

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

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FQAP : Fluoroquinolone anti-pneumococcique

FPR1 ou FPR2 : *Formyl peptide receptor 1 ou 2*

G-CSF : *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*

GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*

GMP : *Granulocyte Monocyte progenitor*

GP : *Granulocyte progenitor*

HAS : Haute Autorité de Santé

IAV : *Influenza virus A*

Ig : Immunoglobuline

IFN : interféron

IL : *Interleukin*

iNOS : *Inducible nitric oxyde synthase*

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

LC-MS/MS : *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

LPS : lipopolysaccharide

LTA : acide lipoteichoïque

M-CSF : *Macrophage-Colony stimulating factor*

MO : moelle osseuse  
MYD88 : *myeloid differentiation primary response gene 88*  
NAC : *N-acetyl cysteine*  
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène  
NAG : N-acétylglucosamine  
NAM : N-acétylmuraminique  
NET : *Neutrophil extracellular trap*  
NF- $\kappa$ B : Nuclear factor-kappa B  
NLR : *NOD-like receptor*  
OMA : otite moyenne aiguë  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PAC : Pneumonie aiguë communautaire  
PAMP : *Pathogen associated molecular pattern*  
PBS : Phosphate-buffered saline  
PCR : *Polymerase chain reaction*  
PD : Pharmacodynamique  
Peni-Strepto : Pénicilline-Streptomycine  
PK : Pharmacocinétique  
PLP : Protéine liant les pénicillines  
PRR : *Pattern Recognition Receptor*  
PSPA : Protéine de surface pneumococcique A  
RLR : *Retinoic like receptor*  
RNA-seq: *RNA-sequencing*  
ROS : *Reactive oxygen species*  
RT-qPCR : *quantitative reverse transcription PCR*  
scRNA-seq : *single cell RNA-sequencing*  
Sp : *S. pneumoniae*  
SP-A : *Surfactant protein A*  
SVF : sérum de veau fœtal  
TA : acide teichoïque  
TBHP : *tert-butyl hydroperoxide*  
TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phosphine

THYB : Todd Hewitt Yeast Broth

TLR : *Toll-like receptor*

VPC13 : Vaccin pneumococcique conjugué 13-valent

VPP23 : Vaccin pneumococcique 23-valent



# **Introduction**

# I. Les infections respiratoires basses : implication de la bactérie *Streptococcus pneumoniae*

## A. Infections respiratoires basses : focus sur la pneumonie infectieuse

Constamment exposé à l'environnement extérieur et aux pathogènes aérotransmissibles, le système respiratoire est sujet à un risque accru d'infections. On distingue les infections respiratoires hautes touchant les fosses nasales, le pharynx et le larynx, des infections respiratoires basses plutôt localisées au niveau de la trachée, des bronches et du parenchyme pulmonaire. Les infections respiratoires basses sont responsables d'une importante morbidité et mortalité à l'échelle mondiale, se classant au quatrième rang des principales causes de décès selon les dernières données de l'Organisation Mondiale de la Santé (Troeger et al. 2017). Les infections respiratoires basses comprennent la bronchite aiguë, l'exacerbation de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la pneumonie aiguë (Demoré et Charmillon 2018). La pneumonie atteint une partie ou l'ensemble du parenchyme pulmonaire, et est la plus meurtrière des infections respiratoires, entraînant plus de trois millions de décès chaque année dans le monde. De manière alarmante, il s'agit de la première cause de mortalité par maladie infectieuse dans les pays industrialisés (Grief et Loza 2018).

En fonction du lieu où la maladie a été contractée, trois types de pneumonies sont distingués :

- La pneumonie aiguë communautaire (PAC), contractée dans la vie quotidienne en dehors des soins hospitaliers.
- La pneumonie associée aux soins, acquise après un séjour à l'hôpital.
- La pneumonie acquise sous ventilation, qui survient après une procédure de chirurgie trachéale.

Les symptômes de la pneumonie peuvent varier mais les personnes atteintes présentent généralement des signes respiratoires tels que la toux, l'essoufflement, une respiration irrégulière ainsi que d'autres symptômes tels qu'une fièvre soudaine, des frissons, des douleurs thoraciques ou un rythme cardiaque rapide et faible (Quinton, Walkey, et Mizgerd 2018). Le diagnostic est souvent difficile en raison de la non-spécificité des symptômes. Habituellement, la confirmation de la pneumonie est réalisée par une radiographie du thorax montrant la présence de liquide dans les poumons.

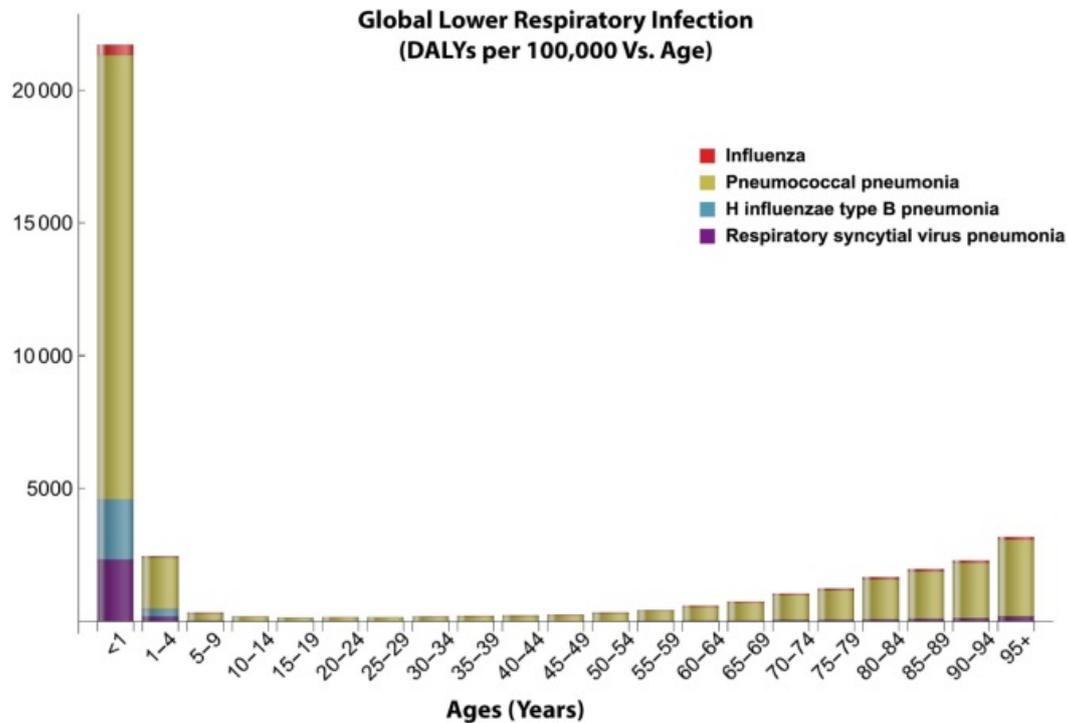
Les causes des pneumonies sont multiples mais le plus souvent elles sont la conséquence soit d'une infection virale, bactérienne mais également fongique (Quinton, Walkey, et Mizgerd 2018). Parmi les pathogènes bactériens en cause, *Streptococcus pneumoniae* (ou communément appelé pneumocoque) est la bactérie la plus fréquemment retrouvée dans le cas de pneumonie aiguë communautaire, ce qui représente 30 à 47 % des cas, et augmente considérablement le risque de décès (Wahl et al. 2018 ; Brooks et Mias 2018 ; « Maladie pneumococcique | CDC » 2022). Dernièrement, en 2019, l'étude épidémiologique « Global Burden of Disease » a recensé plus de 500 000 décès dans le monde dus aux infections à *S. pneumoniae*, la majorité étant liée à des infections respiratoires (Ikuta et al. 2022).

Par ailleurs, *S. pneumoniae* est un redoutable agent pathogène capable d'infecter différents tissus et de provoquer des infections graves. En plus de la pneumonie, il peut également être responsable d'autres affections localisées telles que la sinusite et l'otite moyenne aiguë (OMA). 80% des enfants de moins de 3 ans ont au moins connu un épisode d'OMA dont un tiers est lié à une surinfection à *S. pneumoniae* (Bergenfelz et Hakansson 2017). Le pneumocoque est également impliqué dans des infections dites invasives telles que la méningite et la septicémie, entraînant chaque année un nombre important d'hospitalisations et de décès dans le monde (Weiser, Ferreira, et Paton 2018).

## 1. Facteurs de risque de la pneumonie à *S. pneumoniae*

L'immaturation du système immunitaire et l'immunosénescence représentent les principaux facteurs de risque de développer une infection à *S. pneumoniae*. Cela est respectivement observé chez la population infantile et les personnes âgées, pour qui les défenses immunitaires nécessaires pour combattre les infections bactériennes semblent être moins protectrices (Brooks et Mias 2018). Il est important de noter que la pneumonie à pneumocoque est la principale cause de décès dans le monde chez les enfants de moins de 5 ans, avec plus de 800 000 décès enregistrés chaque année (Quinton, Walkey, et Mizgerd 2018; McAllister et al. 2018). Une incidence plus élevée de pneumonies au pneumocoque est également rapportée chez les adultes âgés de plus de 65 ans par rapport aux adultes d'âge moyen (Brooks et Mias 2018) (**Figure 1**). Le terrain pathologique prédispose également aux maladies pneumococciques. En effet, l'incidence des infections à *S. pneumoniae* est considérablement plus élevée chez les patients atteints de maladies chroniques (maladies cardiovasculaires, diabète, alcoolisme), et chez ceux présentant un déficit immunitaire ou une immunosuppression (Azoulay et al. 2020). Il a

également été démontré que la cigarette affaiblit les défenses de l'organisme, prédisposant ainsi les fumeurs à une plus grande susceptibilité de développer une pneumonie bactérienne (Quinton, Walkey, et Mizgerd 2018).



**Figure 1. Répartition mondiale des infections respiratoires basses en fonction de l'âge.**

La pneumonie au pneumocoque demeure la cause principale des infections respiratoires basses. La prévalence de ces infections apparaît supérieure chez les enfants de moins de 5 ans et les personnes âgées de plus de 65 ans (d'après Brooks et Mias 2018).

*S. pneumoniae* est également l'agent bactérien le plus retrouvé lors des surinfections virales. Le pneumocoque représente la première cause de surinfection post-grippale (Joseph, Togawa, et Shindo 2013). En effet, 95% des formes sévères et mortelles durant les pandémies de grippe sont liées à une surinfection bactérienne, en particulier une pneumonie ou une méningite à *S. pneumoniae*. Ce constat a été établi suite à l'une des pandémies les plus mortelles de l'histoire, la grippe espagnole de 1918, causant plus de 50 millions de morts (Chien, Klugman, et Morens 2009). Des études rétrospectives ont montré que 71% des cas étaient porteurs de *S. pneumoniae*. Sa présence a considérablement augmenté la sévérité de l'infection virale et le taux de mortalité. Ce phénomène a également été observé lors des pandémies de grippe en 1957, 1968 et 2009, (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2009 ; McCullers 2014 ; Morris, Cleary, et Clarke 2017).

## 2. Transmission bactérienne et physiopathologie de la pneumonie à *S. pneumoniae*

La bactérie *S. pneumoniae* fait partie de la flore commensale du nasopharynx, où il colonise de façon transitoire les individus. En effet, le pneumocoque peut rester dans le nasopharynx pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois, sans causer de maladie (Almeida et al., 2021). Cependant, il peut devenir pathogène, en particulier chez les personnes les plus à risque. La colonisation asymptomatique du nasopharynx, connue sous le nom de portage, augmente le risque de transmission de la bactérie à d'autres personnes (Bogaert, de Groot, et Hermans 2004). Bien qu'une récente étude ait révélé une prévalence plus élevée chez les adultes d'âge moyen (Almeida et al., 2021), les enfants restent les principaux vecteurs de transmission du pneumocoque, 20 à 50% d'entre eux étant porteurs, contre seulement 10% des adultes (Tvedskov et al. 2022; Adegbola et al. 2014). De plus, la probabilité de transmission augmente considérablement lorsque la charge bactérienne est élevée dans le nez (Zafar et al. 2017). La bactérie se transmet par voie aérienne, via de petites gouttelettes provenant soit du nez ou de la gorge des personnes porteuses, en particulier pendant l'hiver et le début du printemps (Weiser, Ferreira, et Paton 2018).

La colonisation du nasopharynx par *S. pneumoniae* constitue une étape préliminaire essentielle à sa propagation vers les voies respiratoires inférieures. La structure de cette bactérie et ses nombreux composés moléculaires jouent un rôle crucial dans la pathogénèse de la pneumonie à pneumocoque. Pour commencer, le pneumocoque adhère aux cellules épithéliales grâce à ces protéines de surface, facilitant ainsi son passage à travers l'épithélium tout en évitant les défenses associées à la muqueuse respiratoire (Brooks et Mias 2018). Une fois la défense épithéliale surmontée, le pneumocoque peut se répandre dans le parenchyme pulmonaire, déclenchant ainsi une réaction inflammatoire qui se manifeste par l'apparition de symptômes tels qu'une fièvre soudaine, un malaise, des difficultés respiratoires à type de dyspnée ainsi qu'une toux excessive (Brooks et Mias 2018; Weiser, Ferreira, et Paton 2018). A noter, la lésion de l'épithélium des voies respiratoires représente un des phénomènes majeurs de l'infection virale, en particulier suite au virus de la grippe, ce qui favorise l'envahissement du tissu pulmonaire par le pneumocoque (Chien, Klugman, et Morens 2009).

Les pneumonies à pneumocoque peuvent se compliquer et entraîner la dissémination de la bactérie dans la circulation sanguine, provoquant une bactériémie. Il est important de noter que cette dissémination peut résulter directement de la virulence des composés de la bactérie sur les effecteurs tissulaires, mais elle peut également être une conséquence indirecte des processus

inflammatoires de l'hôte visant à éliminer le pathogène. La dissémination de la bactérie dans la circulation sanguine favorise des cas graves de septicémie et permet également à la bactérie de migrer et d'envahir d'autres tissus, entraînant une inflammation des zones du cerveau responsables de méningites (Weiser, Ferreira, et Paton 2018).

### 3. Structure et composés du pneumocoque participant à la pathogénèse de la pneumonie

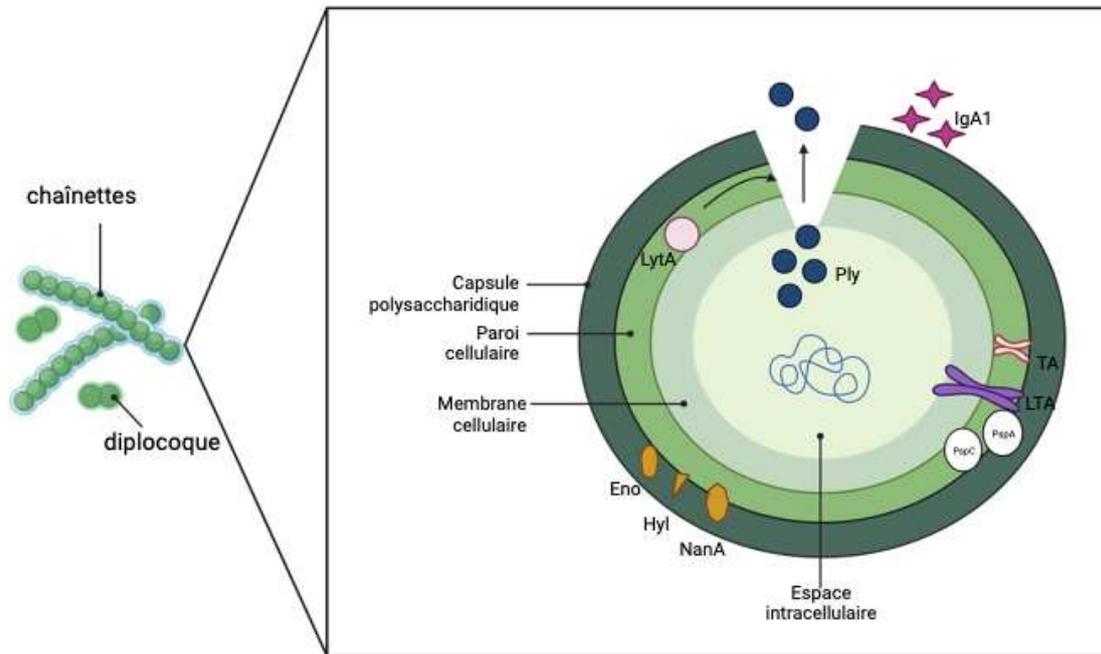
#### (a) La capsule polysaccharidique

La bactérie *S. pneumoniae* est une bactérie à Gram positif extracellulaire qui peut s'associer sous forme de diplocoques ou de chaînettes (**Figure 2**). Le pneumocoque est entouré d'une couche externe appelée capsule qui est attachée de manière covalente au peptidoglycane de sa membrane cellulaire (**Figure 2**). Depuis sa première découverte en 1881, plus de 100 sérotypes ont été identifiés en fonction de la nature de leurs antigènes capsulaires polysaccharidiques (Stuertz et al. 1998; Ganaie et al. 2020). Ces antigènes capsulaires sont les premiers antigènes non protéiques découverts et sont ciblés par les vaccins anti-pneumococciques décrits ultérieurement.

En général, la capsule du pneumocoque est présentée comme l'un des facteurs les plus virulents du pneumocoque (Geno et al. 2015). En effet, une bactérie capsulée est capable de provoquer une bactériémie chez la souris, contrairement à une souche bactérienne dépourvue de capsule (Morona, Morona, et Paton 2006). De plus, il est suggéré que les sérotypes présentant une capsule fine semblent être principalement impliqués dans la colonisation et la transmission de la bactérie. En revanche, une capsule plus épaisse contenant une plus grande quantité de polysaccharides capsulaires représente un risque plus important d'invasion des tissus (par exemple, les sérotypes 1, 2, 7, 9, 19A) (Brueggemann et al. 2003; Fuji, Pichichero, et Kaur 2021).

Toutefois, quel que soit le type de capsule, il est largement accepté que cet élément confère un avantage majeur à la survie de la bactérie en la protégeant des défenses immunitaires de l'hôte. Dès les premiers stades de la colonisation, la capsule empêche, par effet électrostatique, l'interaction avec le mucus sécrété par les cellules épithéliales des voies respiratoires, ce qui facilite l'adhésion du pneumocoque à l'épithélium (Nelson et al. 2007). Elle confère également une résistance considérable face au mécanisme de phagocytose, principal mode d'élimination des microorganismes en limitant l'opsonisation de *S. pneumoniae* par des composants du

système du complément et par les immunoglobulines, des éléments importants qui favorisent l'activité phagocytaire des macrophages et des neutrophiles (Hyams et al. 2010). Il a également été démontré que la capsule empêche la NETose, une fonction bactéricide supplémentaire des neutrophiles (Geno et al. 2015).



**Figure 2. Éléments structuraux de *S. pneumoniae* et facteurs de virulence.**

*S. pneumoniae* est une bactérie disposée en diplocoque ou en chaînettes dont l'enveloppe est composée de trois couches successives : la capsule polysaccharidique, la paroi cellulaire composée de peptidoglycane, d'acides teichoïques (LTA : acide lipoteichoïque et TA : acide teichoïque) et de protéines de surface (PspA et PspC) et la membrane cellulaire. La présence d'une autolysine (LytA) au niveau de la paroi permet la lyse de la bactérie et la libération du contenu toxique intracellulaire comme la toxine pneumolysine (Ply). *S. pneumoniae* possède également une protéase IgA1 à sa surface et des enzymes (Eno : Enolase ; Hyl : hyaluronidase ; NanA : neuraminidase A) (Adaptée de Kadioglu et al. 2008; Brooks et Mias 2018; Bogaert, de Groot, et Hermans 2004).

### (b) La paroi cellulaire et ses protéines de surface

L'enveloppe cellulaire de *S. pneumoniae* se compose d'une membrane et d'une paroi cellulaire. La paroi cellulaire est composée de peptidoglycane, d'acides teichoïques et de protéines (**Figure 2**), chacun de ces éléments jouant un rôle dans la pathogénèse de la bactérie chez son hôte. Le peptidoglycane représente l'élément principal de la paroi cellulaire qui lui confère sa rigidité. Sa structure est fondée sur l'enchaînement et l'alternance de deux sucres, la N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N-acétylmuraminique (NAM), substrats des enzymes PgdA et OatA du pneumocoque (Sarkar et al. 2017). En conséquence, la présence de résidus modifiés confère une protection à la bactérie contre le lysozyme, une enzyme clivant les liaisons

entre les sucres NAG et NAM, libérée par les cellules épithéliales respiratoires et également présente dans les phagosomes des macrophages et neutrophiles (Davis et Weiser 2011; Rajagopal et Walker 2017).

Deux types d'acides teichoïques existent : l'acide lipoteichoïque (LTA) et l'acide teichoïque (TA). Le LTA est localisé à la surface de la membrane cytoplasmique via sa partie lipidique tandis que le TA est attaché de façon covalente au peptidoglycane (Rajagopal et Walker 2017). Ces composants ont été décrits comme facteurs importants lors de la colonisation et de la dissémination du pneumocoque (H. Xu et al. 2015; Heß et al. 2017). En effet, une étude menée *in vitro* a montré que la perte de LTA diminuait l'adhérence du pneumocoque aux cellules épithéliales humaines, suggérant une diminution de la capacité de la bactérie à coloniser les voies respiratoires. *In vivo*, l'infection de modèles murins avec une souche de *S. pneumoniae* déplétée en LTA induisait une pneumonie moins sévère et une survie significativement augmentée par rapport à une infection avec la souche sauvage (Heß et al. 2017).

Les protéines de surface du pneumocoque représentent des cibles potentielles dans le développement de nouvelles stratégies vaccinales étant donné leur implication au cours de l'infection (Aceil et Avci 2022). Parmi elles, les "*choline-binding protein*" (Cbp) sont les protéines de surface majeures de *S. pneumoniae* et favorisent l'adhérence du pneumocoque aux cellules de l'hôte (Pérez-Dorado, Galan-Bartual, et Hermoso 2012). Les protéines de surface pneumococciques A et C (PspA et PspC) jouent un rôle important pendant la colonisation et la phase invasive du pneumocoque en empêchant l'activation du complément et l'opsonophagocytose (J et al. 2007; Quin et al. 2007; Kerr et al. 2006). Une autre protéine, CbpE diminue l'activité des neutrophiles en inactivant PAF (*platelet-activating factor*), un phospholipide inflammatoire dérivé de l'hôte qui stimule l'activité phagocytaire des neutrophiles et leurs fonctions bactéricides (Hergott et al. 2015).

### (c) Principales enzymes pneumococciques

Le pneumocoque est également armé d'enzymes telles que les neuraminidases, des protéases sériques et des hyaluronidases capables de dégrader le mucus, inhiber l'élimination mucociliaire et adhérer au tissu mucosal (Kadioglu et al. 2008). Parmi ces enzymes, la neuraminidase A (NanA) empêche l'opsonisation du pneumocoque par le complément et par conséquent la phagocytose, en particulier par les neutrophiles (Dalia, Standish, et Weiser 2010).

Pour maintenir sa survie dans les voies pulmonaires et permettre l'invasion d'autres compartiments, *S. pneumoniae* possède également d'autres facteurs d'évasion immunitaire. Parmi eux, le pneumocoque exprime à sa surface une métalloprotéase à zinc ZmpA (également nommée protéase IgA1) capable de cliver la région charnière d'IgA1, anticorps le plus retrouvé dans le tractus respiratoire et impliqué dans l'opsonophagocytose (Roche et al. 2015).

#### (d) La pneumolysine

La croissance de *S. pneumoniae* se déroule selon une phase exponentielle avant d'atteindre sa phase stationnaire. Une fois cette dernière phase atteinte, la bactérie déclenche simultanément sa propre destruction grâce à l'activation d'une enzyme à sa surface appelée auto-lysine ou LytA. Ce processus permet ainsi la libération de son contenu intracellulaire comprenant notamment une toxine nommée pneumolysine, qui représente un facteur de virulence majeur (Martner et al. 2008). A faibles concentrations, la pneumolysine empêche le battement des cils de l'épithélium bronchique et diminue l'activité bactéricide des neutrophiles. A hautes concentrations, la pneumolysine est capable de lyser les cellules de l'hôte en formant des pores dans leur membrane (Lemon et Weiser 2015). La toxicité de la pneumolysine a également été reliée à son importante activité inflammatoire. En effet, des souris infectées avec *S. pneumoniae* déficiente en pneumolysine présentaient une invasion pulmonaire et une inflammation moins marquées par rapport à des souris infectées par la souche sauvage (Canvin et al. 1995). Ceci a été confirmé plus tard par l'équipe de Kadioglu *et al.* Ce phénotype était associé à un recrutement moins important de neutrophiles dans le poumon de souris infectées par une souche de *S. pneumoniae* déficiente en pneumolysine (Kadioglu et al. 2000). La pneumolysine stimule d'autres réponses immunitaires de l'organisme, mais de manière anormale, telles qu'une activation excessive du système du complément, une surproduction toxique de dérivés réactifs de l'oxygène (ERO ou ROS – *Reactive oxygen species*) par les neutrophiles, et une activation de la réponse inflammatoire, qui semble être nocive et entraîner des lésions tissulaires (Martner et al. 2008; Zafar et al. 2017; Nishimoto, Rosch, et Tuomanen 2020).

## B. Prévention et traitements de la pneumonie à *S. pneumoniae*

Ces facteurs de virulence représentent d'excellentes cibles thérapeutiques. Divers moyens sont utilisés pour prévenir ou traiter l'infection à *S. pneumoniae*.

## 1. Prévention des infections à *S. pneumoniae* par les vaccins

La prévention des infections à *S. pneumoniae* est possible grâce à l'existence de vaccins anti-pneumococciques, recommandés en particulier pour les personnes à risque de développer des infections invasives. A l'heure actuelle, deux vaccins ciblant les antigènes polysaccharidiques capsulaires du pneumocoque sont disponibles. Le premier est un vaccin polysidique non conjugué (VPP23 ou Pneumovax®) qui cible 23 sérotypes de *S. pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F). Il s'agit des sérotypes les plus impliqués dans les formes invasives de la maladie. Bien que l'incidence de ces infections ait diminué depuis l'introduction de ce vaccin, il s'est avéré moins efficace chez les enfants de moins de 5 ans car les polysaccharides ne stimulent pas de réponse immunitaire dépendante des cellules T, qui sont essentielles pour induire une réponse immunitaire durable, rendant ainsi ces polysaccharides vaccinaux peu immunogènes (Aceil et Avci 2022).

Afin d'améliorer l'efficacité vaccinale, un vaccin conjugué (VPC13 ou Prevenar 13®) a été développé, ciblant les 13 sérotypes les plus invasifs chez les enfants (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F). La conjugaison des polysaccharides à une protéine a permis d'améliorer la qualité de la réponse immunitaire en induisant un taux plus élevé d'IgG. Ainsi, le VPC confère une plus grande immunogénicité et une réponse dépendante des cellules T, ce qui s'est avéré efficace chez les enfants (Bonten et al. 2015).

Depuis le 1er janvier 2018, la vaccination anti-pneumocoque est devenue obligatoire chez les enfants de moins de 2 ans selon un schéma vaccinal de 2 doses de VPC13 administrées à deux mois d'intervalle suivies d'une dose de rappel à 11 mois. De manière intéressante, des études épidémiologiques ont montré que le VPC protège non seulement les enfants contre les maladies invasives, mais limite également le portage et la transmission des sérotypes inclus dans le vaccin (O'Brien et Dagan 2003). Chez l'adulte présentant des comorbidités, un schéma impliquant une primovaccination par le VPC13 suivie d'une dose de VPP23 8 semaines plus tard s'est révélé plus efficace et fait désormais partie des recommandations du calendrier vaccinale (Aliberti et al. 2014). Un vaccin conjugué VPC20 contenant sept valences supplémentaires (8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F, 33F) par rapport au VPC13, a récemment reçu une autorisation européenne de mise sur le marché et, en France, un avis favorable de la Haute Autorité de Santé (HAS) pour une intégration dans le schéma vaccinal de l'adulte (EMA 2021; HAS, 2023). Les données d'essais cliniques ont mis en évidence une efficacité similaire à celle des deux vaccins existants, mais avec l'avantage notable que le VPC20 nécessite une seule dose.

Ainsi, cette nouvelle directive de la HAS vise à augmenter la protection de la population en réduisant le nombre de doses administrées, tout en améliorant la couverture vaccinale globale (HAS, 2023).

En effet, la protection vaccinale d'un plus large public devient de plus en plus nécessaire. Pour cause, l'incapacité des vaccins à protéger contre tous les sérotypes a conduit à l'émergence des sérotypes non vaccinaux, qui sont généralement plus virulents et présentent une résistance accrue aux antibiotiques (O'Brien et Dagan 2003). L'objectif de développer un vaccin capable de prévenir les infections causées par un plus large éventail de sérotypes de pneumocoques représente un véritable défi. Dans cette perspective, de nouveaux vaccins ciblant des antigènes protéiques importants dans l'étape de colonisation bactérienne ou la virulence de la bactérie sont actuellement à l'étude (Masomian et al. 2020). A titre d'exemple, le développement d'un vaccin ciblant la pneumolysine est très pertinent étant donné son implication au cours de l'infection (Aceil et Avci 2022). Des IgA dirigés contre la pneumolysine ont été détectées dans des prélèvements nasaux d'enfants dont la culture bactérienne étaient positifs à *S. pneumoniae* par rapport à des enfants non porteurs, renforçant ainsi l'intérêt de la pneumolysine en tant que nouvelle cible vaccinale (Simell et al. 2001).

## 2. Recommandations thérapeutiques générales de la pneumonie à *S. pneumoniae*

La prise en charge thérapeutique doit obligatoirement être initiée dès le diagnostic d'une pneumonie infectieuse, de préférence dans les 4 heures suivant le diagnostic afin d'obtenir un pronostic favorable de guérison (Daniel et al. 2016). En effet, le traitement précoce des PAC augmente considérablement les chances de survie par rapport à un traitement instauré trop tardivement (Daniel et al. 2016; Berger et al. 2018). En tout état de cause, *S. pneumoniae* est systématiquement et prioritairement pris en compte du fait de la fréquence et de la gravité potentielle de l'infection (Quinton, Walkey, et Mizgerd 2018). Dans ce but, l'amoxicilline (AMX) par voie orale, une pénicilline de la famille des  $\beta$ -lactamines, représente le traitement de premier choix selon les dernières recommandations de l'Agence régionale de Santé du médicament, anciennement nommée AFSSAPS (AFSSAPS, 2010; Postma et al. 2015). Dans certains cas de comorbidités et lors d'une surinfection grippale, l'association avec l'acide clavulanique, est préconisée afin de prévenir l'apparition de souches bactériennes productrices de  $\beta$ -lactamases (Bush et Bradford 2016). En seconde intention, la co-administration de l'AMX

avec une fluoroquinolone anti-pneumococcique (FQAP) telle que la lévofloxacine ou d'une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) comme la ceftriaxone ou le céfotaxime peut être envisagée (Pateron, Raphaël, et Trinh-Duc 2019). En revanche, en cas d'hospitalisation, une bithérapie intraveineuse associant une C3G et un macrolide ou une FQAP est administrée en urgence (AFSSAPS, 2010).

L'utilisation excessive et inappropriée des antibiotiques depuis leur découverte a conduit à l'émergence de bactéries résistantes. Bien que naturellement sensible aux antibiotiques, les souches de *S. pneumoniae* ont développé de nombreuses résistances aux antibiotiques, y compris aux pénicillines, aux macrolides, aux tétracyclines et aux fluoroquinolones (Cillóniz et al. 2018). Il est préoccupant de constater que la France présente la plus forte proportion de souches de *S. pneumoniae* résistantes à la pénicilline et aux antibiotiques en Europe, selon le rapport de 2019 du réseau de surveillance européen de la résistance aux antibiotiques (« EARS-Net Report, 2019 »). Par conséquent, cette situation constitue une réelle menace pour la santé humaine et compromet la capacité à traiter les infections bactériennes et la sécurité/l'efficacité des procédures chirurgicales, telle la transplantation. En plus d'améliorer les mesures comportementales concernant l'utilisation des antibiotiques, il est crucial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques au « tout antibiotique ».

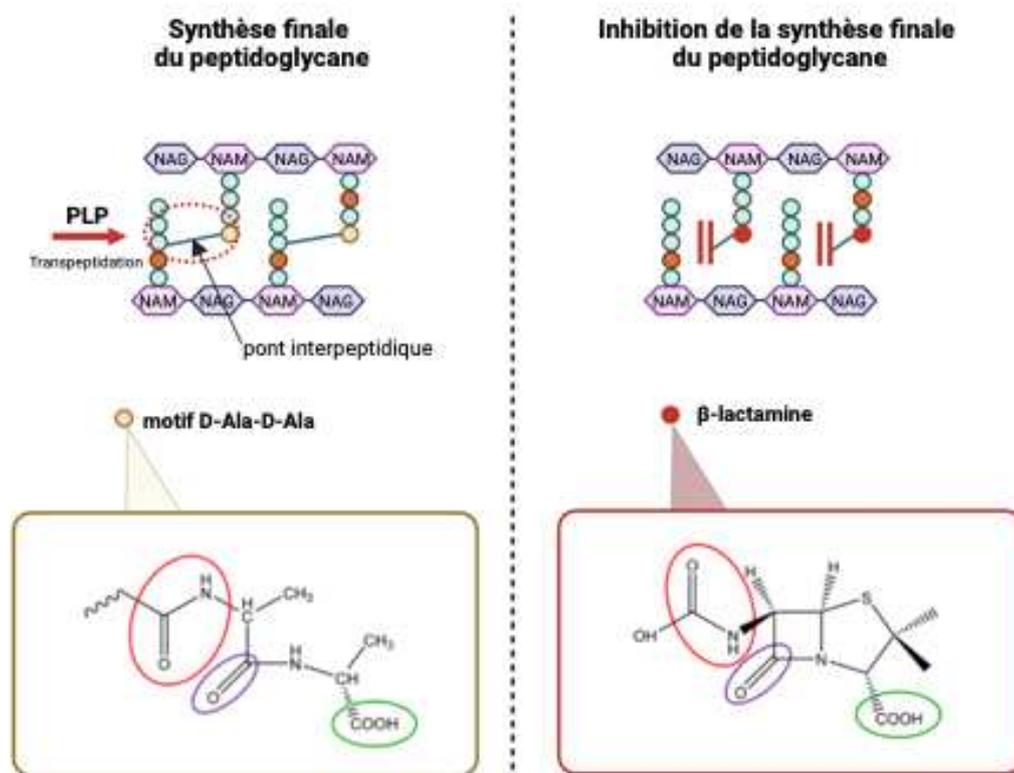
## C. Les $\beta$ -lactamines, traitement de première intention de la pneumonie à *S. pneumoniae*

### 1. Mécanisme d'action

Les  $\beta$ -lactamines représentent la famille d'antibiotiques la plus largement prescrite dans le monde avec de nombreuses indications thérapeutiques (Bush et Bradford 2016; Dolk et al. 2018). Ces molécules sont toutes constituées d'un noyau  $\beta$ -lactame à l'origine de leur activité antibactérienne. La structure du noyau permet de différencier cette grande famille qui inclut les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les carbacéphèmes. Cette diversité représente un avantage puisqu'elle permet de couvrir un très large spectre bactérien (Bush et Bradford 2016).

L'activité antibiotique est variable selon la classe mais le mécanisme d'action reste commun à toutes les molécules de la famille des  $\beta$ -lactamines. Ces antibiotiques inhibent la dernière étape de synthèse du peptidoglycane qui consiste en une réaction de désacétylation catalysée par des

enzymes appelées protéines liant les pénicillines (PLP) ou transpeptidases qui permettent la formation de liaisons covalentes entre les différentes chaînes du peptidoglycane (Sarkar et al. 2017). Le noyau  $\beta$ -lactame a une analogie structurale avec l'un des composants du peptidoglycane et substrat naturel des PLP, le dipeptide D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-ala) (**Figure 3**). Cette similarité permet aux  $\beta$ -lactamines de se fixer sur les PLP et d'entraver la réaction enzymatique. Par conséquent, l'architecture du peptidoglycane est déstabilisée, ce qui rend la croissance bactérienne très sensible à la lyse et à la mort cellulaire. Cela confère aux  $\beta$ -lactamines la classification d'agents bactéricides (Bush et Bradford 2016).



**Figure 3. Mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines.**

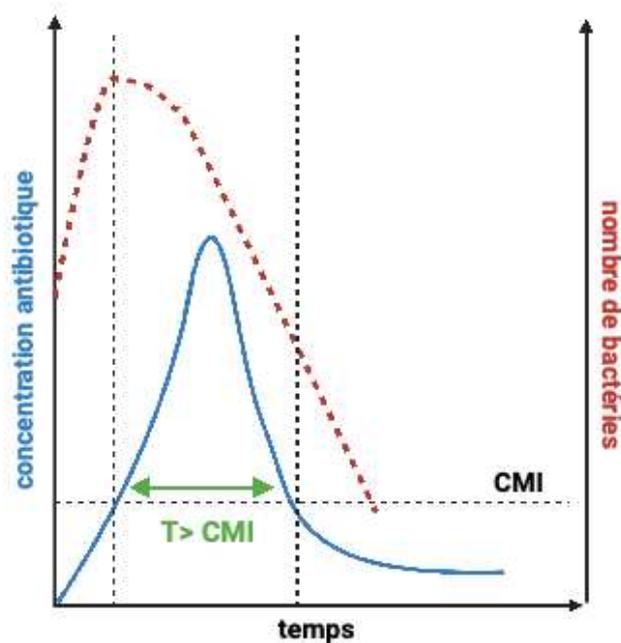
Les transpeptidases ou communément appelées protéines liant les pénicillines (PLP), induisent la formation de chaînes peptidiques par transpeptidation des motifs D-Ala-D-Ala (structure chimique figurant à gauche du schéma) des composants du peptidoglycane, permettant sa synthèse finale. Par analogie structurale avec le motif D-Ala-D-Ala (structure chimique figurant à droite du schéma), la  $\beta$ -lactamine va agir comme un leurre en tant que substrat des PLP pour inhiber la réaction enzymatique et in fine empêcher la synthèse du peptidoglycane. NAG : N-acétylglucosamine ; NAM : N-acétylmuraminique.

## 2. Paramètres pharmacologiques des $\beta$ -lactamines

L'efficacité des antibiotiques est conditionnée par différents paramètres pharmacologiques. Les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques fournissent un ensemble de données relativement importantes dans l'optimisation du traitement chez le patient. La composante pharmacocinétique (PK) qui évalue le devenir de l'antibiotique au sein de l'organisme dès son administration, rassemble les paramètres d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination. Ces données peuvent varier en fonction des facteurs individuels tels que le poids et l'âge mais également de facteurs physiopathologiques qui pourraient être à l'origine d'un dysfonctionnement d'un organe et limiter l'efficacité de l'antibiotique. Ainsi, la réévaluation individuelle en lien avec les paramètres PK est essentielle pour adapter le traitement au patient. L'un des paramètres PK les plus importants est la demi-vie d'élimination ( $t_{1/2}$ ) du médicament qui correspond au temps au bout duquel la moitié de sa concentration est éliminée de l'organisme. Dans le cas des  $\beta$ -lactamines, la demi-vie est relativement courte (généralement de l'ordre de 1 à 2 heures chez l'homme, sauf exception : 8 h pour la ceftriaxone, une molécule de la famille des C3G).

La composante pharmacodynamique (PD) détermine l'activité de l'antibiotique sur la bactérie. Parmi les paramètres étudiés, l'évaluation de la sensibilité de la bactérie à l'antibiotique est un paramètre crucial pour optimiser le traitement, en particulier pour les patients atteints de pathologies chroniques déjà traités avec une large gamme d'antibiotiques et qui ont eu des échecs thérapeutiques. La sensibilité bactérienne est évaluée par la mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) c'est-à-dire la concentration minimale d'antibiotique qui permet l'inhibition de la croissance bactérienne. Pour cela, différentes méthodes *in vitro* sont exploitées telles que la méthode de dilution en milieu liquide ou sur gélose ou la méthode des bandelettes E-test imprégnées d'un gradient de concentration d'antibiotique, qui restent néanmoins la méthode la moins utilisée en raison de son manque de sensibilité (Kowalska-Krochmal et Dudek-Wicher 2021). Une faible CMI est généralement favorable à un traitement antibiotique efficace. A noter, lorsque la valeur de la CMI se rapproche de celle de la CMB (Concentration Minimale Bactéricide) soit la concentration minimale d'antibiotique capable de tuer 99,9% des colonies bactériennes, l'effet de l'antibiotique est dit bactéricide, comme pour les  $\beta$ -lactamines. Ainsi, chaque paramètre PK/PD d'un traitement antibiotique donné détermine son efficacité sur la bactérie cible. Le critère d'efficacité des  $\beta$ -lactamines est défini par le temps (T) au cours duquel la concentration demeure supérieure à la valeur de la CMI de la souche bactérienne

(Figure 4), qui correspond par définition à une activité dite « temps-dépendante » (W. A. Craig 1998). Généralement, la durée de l'efficacité de l'antibiotique est optimale, c'est-à-dire égale à 100%, lorsque les concentrations de l'antibiotique sont 4 à 8 fois supérieures à la CMI qui est préalablement déterminée (William A. Craig 1996). Par conséquent, plus le paramètre  $T > CMI$  est proche de 100%, plus la probabilité d'efficacité est grande. Pour exemple, une étude a recensé toutes les données relatives à l'efficacité d'un traitement avec une pénicilline ou une céphalosporine (W. A. Craig 1998). Un taux plus faible, signe d'un temps insuffisant de concentrations au-dessus de la CMI, était associé à une survie altérée des animaux.



**Figure 4. Effet temps-dépendant des  $\beta$ -lactamines.**

L'effet bactéricide (diminution du nombre de bactéries, en rouge) par les  $\beta$ -lactamines est observé pendant le temps au cours duquel la concentration de l'antibiotique (en bleu) est supérieure à la CMI.

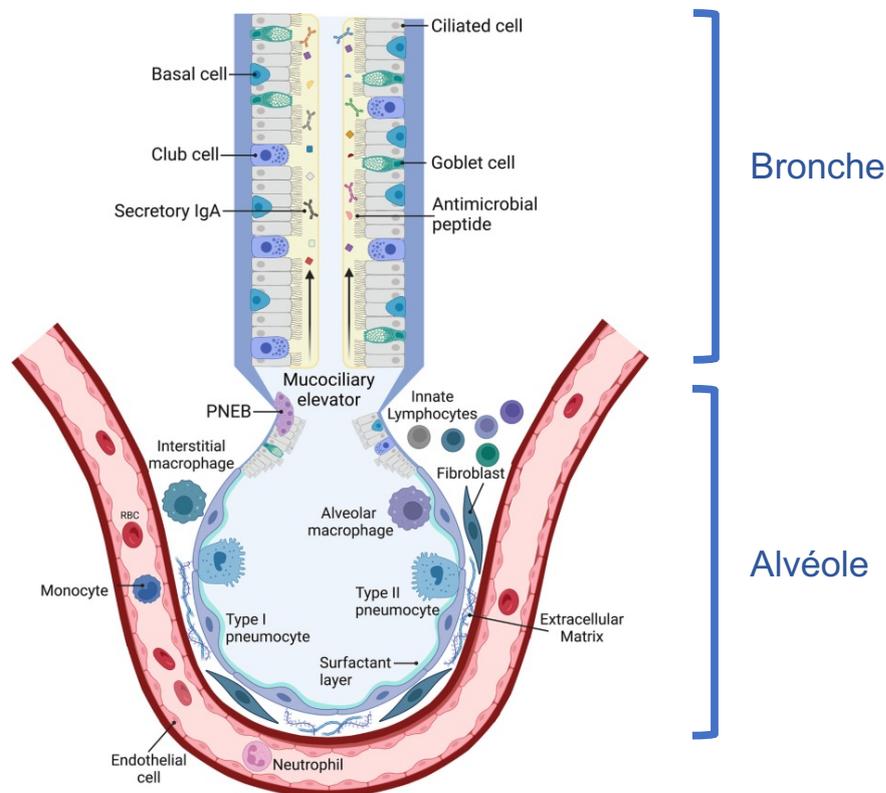
Ainsi, le maintien le plus longtemps possible de concentrations des  $\beta$ -lactamines au sein de l'intervalle thérapeutique représente un critère crucial. Tenant compte de la courte demi-vie des  $\beta$ -lactamines, une administration répétée et prolongée est préconisée pour obtenir une élimination totale de la bactérie (William A. Craig 1996 ; W. A. Craig 1998). Dans le cas de l'infection à *S. pneumoniae* sans complication, le schéma thérapeutique impose une administration unique par voie orale d'AMX trois fois par jour pendant 14 jours (AFSSAPS, 2010).

De manière remarquable, des études ont révélé que l'action bactéricide des  $\beta$ -lactamines s'accompagnait d'une libération de composés microbiens par les bactéries lysées (pour revue Mondemé et al. 2023) (Annexe I). Dans le contexte de *S. pneumoniae*, des expériences principalement réalisées *in vitro* ont démontré que l'exposition d'une  $\beta$ -lactamine entraînait la libération de fragments du peptidoglycane, de la pneumolysine ainsi que des acides TA et LTA (Stuertz et al. 1998; Spreer et al. 2003; Mattie et al. 2005). Comme précédemment décrit, ces composés ont la capacité d'influencer les mécanismes de défense immunitaire impliqués dans la réaction contre le pneumocoque.

L'hypothèse actuelle repose sur la possibilité d'un effet indirect résultant du traitement aux  $\beta$ -lactamines lors d'une infection bactérienne, impactant ainsi les réponses immunitaires anti-infectieuses. De plus, il est courant de constater une inefficacité de l'antibiothérapie lorsque le système immunitaire est affaibli, renforçant ainsi l'idée qu'il existe une interaction synergique entre les antibiotiques et le système immunitaire dans la lutte contre les infections (Wolf, Liu, et Underhill 2017; Anuforum, Wallace, et Piddock 2015).

## II. Réponse immunitaire innée au cours de l'infection pulmonaire aiguë à *S. pneumoniae*

L'invasion des voies pulmonaires par des agents pathogènes tels que *S. pneumoniae* représente une véritable menace qui nécessite une élimination efficace dans le but de prévenir une propagation incontrôlée. La barrière épithéliale et les mécanismes de la réponse immunitaire innée constituent les premières lignes de défense du système immunitaire contre les agents pathogènes cherchant à envahir les poumons (**Figure 5**).



**Figure 5. Vue d'ensemble des défenses structurales et immunologiques dans les poumons.**

L'épithélium respiratoire confère une barrière physique importante. L'épithélium bronchique est constitué d'un épithélium pseudostratifié composé de différentes cellules étroitement liées par des jonctions serrées. Les cellules caliciformes sécrètent du mucus qui, en coopération avec les cils vibratiles des cellules ciliées, éliminent les agents pathogènes grâce à un mouvement mucociliaire. La production de molécules solubles (peptides antimicrobiens) et d'anticorps tels que des IgA sécrétoires participent également à la protection pulmonaire. L'épithélium alvéolaire est composé de pneumocytes de type I, responsables de la régulation des échanges gazeux avec le compartiment sanguin. Les pneumocytes de type II, bien qu'en nombre moins élevé, sont essentiels pour la réparation des alvéoles et produisent également un surfactant qui maintient la structure alvéolaire. Les macrophages alvéolaires, cellules majoritaires, jouent un rôle de cellules sentinelles en patrouillant activement dans les voies respiratoires pour détecter et éliminer les agents pathogènes. Lors d'une infection, les cellules épithéliales et les macrophages induisent leurs mécanismes de défense dont la réponse est essentielle pour stimuler le recrutement de cellules circulantes telles que les neutrophiles et les monocytes qui vont traverser la paroi endothéliale. PNEB : *pulmonary neuroendocrine body*. Adapté de (Korkmaz et Traber 2023).

En plus de leur rôle vital dans la régulation des échanges gazeux pour la survie de notre corps, les poumons constituent un environnement immunologique unique. En étant constamment exposées à l'environnement extérieur, les voies respiratoires sont dotées de défenses immunitaires essentielles pour éliminer les pathogènes présents dans l'air.

L'immunité innée fait partie des deux composantes de notre système immunitaire qui représente un vaste système rempli d'entités structurales et cellulaires, permettant d'intervenir très rapidement après une infection. Elle comprend des mécanismes humoraux dont font partie les immunoglobulines naturelles et le système du complément, ainsi que des mécanismes cellulaires qui impliquent notamment les cellules épithéliales et les cellules myéloïdes parmi lesquelles les cellules phagocytaires telles que les macrophages, les neutrophiles et les monocytes sont indispensables au contrôle de l'infection (Korkmaz et Traber 2023).

Compte tenu de la complexité de la réponse innée, nous allons nous concentrer uniquement sur les aspects suivants : (i) les défenses structurales associées à la barrière épithéliale, (ii) l'implication du complément puis (iii) la reconnaissance du pneumocoque par les récepteurs innés. Enfin, nous aborderons les réponses moléculaires et cellulaires qui résultent de cette reconnaissance, en se concentrant sur les défenses immédiates contre l'infection pulmonaire aiguë à *S. pneumoniae* orchestrées par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires.

## A. La barrière épithéliale, aux portes de l'immunité innée

En première ligne de défense, l'épithélium respiratoire fournit des mécanismes de protection physiques et chimiques essentiels afin de limiter la propagation du pathogène dans les voies pulmonaires (**Figure 5**). De la trachée jusqu'aux bronches, les cellules épithéliales sont dotées de caractéristiques variées et sont maintenues ensemble par des jonctions serrées, d'adhérence et des desmosomes, conférant à cette barrière une relative imperméabilité (Eisele et Anderson 2011). Parmi ces cellules, les cellules caliciformes et les glandes sous-muqueuses sécrètent un liquide visqueux, le mucus, qui recouvre l'épithélium et empêche l'adhérence des pathogènes aux voies respiratoires. Pour cela, le mucus piège et retient les microbes, tandis que les cils vibratiles à la surface des cellules ciliées les déplacent vers l'extérieur dans un processus de « clairance mucociliaire ». Ce mouvement est facilité par les mucines, des glycoprotéines constituant le mucus, comme MUC5AC et MUC5B. Les pathogènes ainsi capturés sont ultérieurement éliminés par des mécanismes mécaniques tels que la déglutition et occasionnellement la toux (Mall 2008).

Au niveau alvéolaire, deux types de cellules épithéliales prédominent et contribuent à l'équilibre pulmonaire : les pneumocytes de type I et de type II. Les premiers assurent les échanges gazeux avec l'endothélium vasculaire tandis que les pneumocytes de type II font office de barrière en sécrétant un surfactant qui maintient la structure du poumon (**Figure 5**). Pour cela, ce surfactant pulmonaire, composé de lipides et protéines, réduit la tension pulmonaire lors des cycles de ventilation (Guillot et al. 2013; Whitsett et Alenghat 2014).

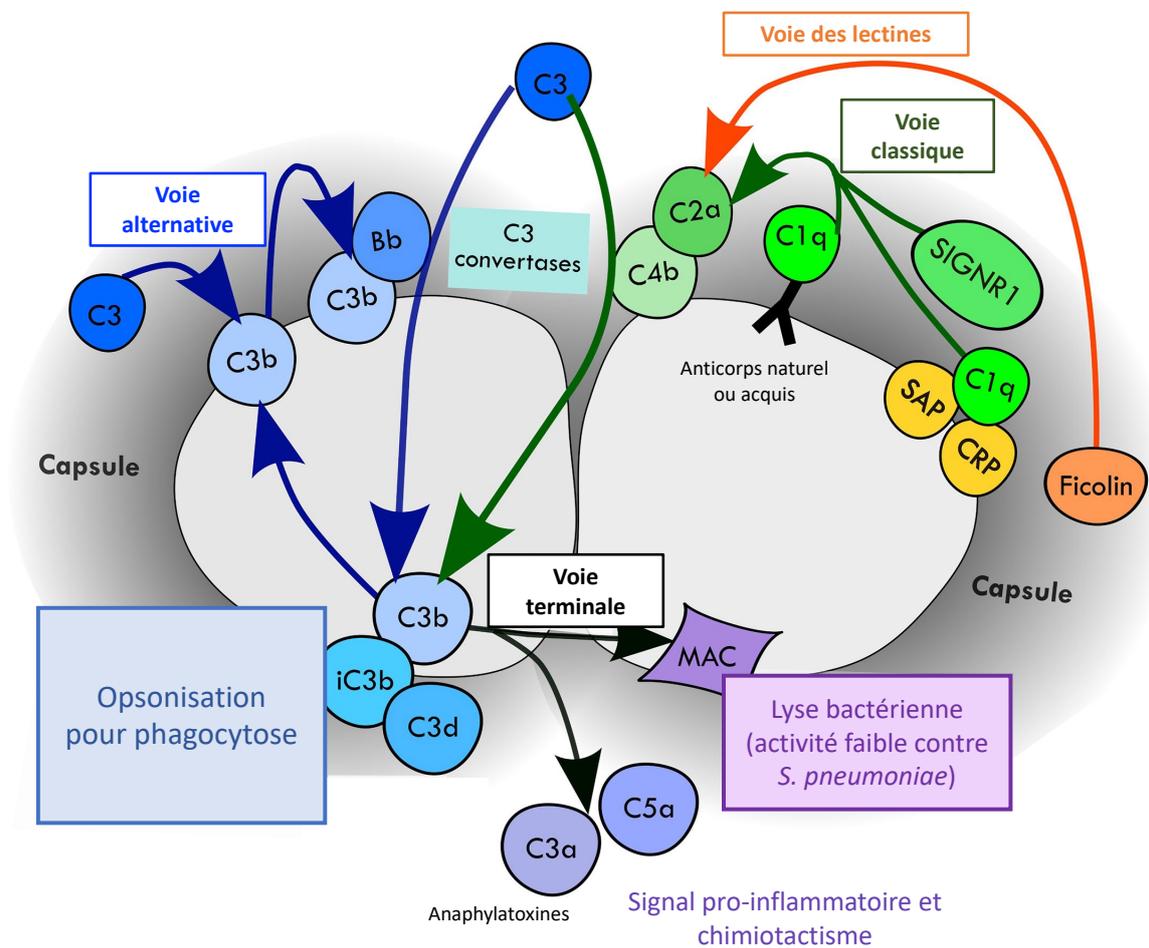
A l'état physiologique, une production continue de médiateurs solubles par les cellules épithéliales tels que les IgA sécrétoires, les mucines et certains peptides bactériens est nécessaire pour limiter la quantité de pathogènes au contact direct de la muqueuse (Korkmaz et Traber 2023) (**Figure 5**). L'ensemble de ces mécanismes physiques et chimiques permettent alors un maintien de l'homéostasie locale, en évitant d'induire une réponse inflammatoire importante. Lorsque la quantité de pneumocoques devient trop importante et/ou l'agent pathogène a franchi cette défense structurale, d'autres mécanismes innés sont alors impliqués.

## B. Implication du complément

Le système du complément représente un processus important dans la prévention de l'infection à *S. pneumoniae*. Une incidence élevée d'infections invasives au pneumocoque chez les personnes atteintes de déficits en complément a été mise en évidence (Jönsson et al. 2005; Sjöholm et al. 2006).

Par définition, le système du complément est un complexe de protéines plasmatiques qui s'active par l'intermédiaire de réactions enzymatiques en cascade, directement par le pathogène ou indirectement par des anticorps couvrant les microbes. Trois voies possibles existent en fonction du mécanisme de reconnaissance impliqué et ont été décrites dans l'opsonisation du pneumocoque (**Figure 6**) : (i) la voie classique, déclenchée par la liaison d'anticorps à la surface du pathogène reconnus par le fragment C1q du complément, le récepteur ou les protéines de phase aiguë comme la protéine C réactive (CRP) et la protéine sérique amyloïde A (SAP), et le récepteur SIGN-R1 à la surface des macrophages spléniques (ii) la voie des lectines déclenchée par la reconnaissance de polysaccharides capsulaires du pneumocoque par les récepteurs MBL (*Mannose Binding Lectin*), les collectines ou les ficolines et (iii) la voie alternative qui peut être activée par les deux voies précédentes ou directement par le dépôt spontané de fragments C3 sur les surfaces microbiennes (Gil, Noursadeghi, et Brown 2022). L'ensemble de ces voies aboutissent à la formation d'une C3 convertase qui clive le fragment C3 en facteurs solubles

C3b et iC3b, également appelées opsonines. Ces dernières vont pouvoir se fixer sur la paroi de la bactérie et être reconnues par les cellules phagocytaires exprimant les récepteurs du complément CR1 et/ou CR3 (correspondant à l'intégrine CD11b). A noter, le composé C3 de la voie alterne peut directement s'activer et provoquer le dépôt de fragments C3b à la surface de la bactérie. L'opsonisation est une étape essentielle puisqu'il a été démontré que la présence d'opsonines sur les bactéries favorisait le processus de phagocytose par les macrophages et les neutrophiles (Hyams et al. 2010). Une voie terminale commune aux trois voies est également initiée et aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (MAC) destiné à lyser les bactéries (Gil, Noursadeghi, et Brown 2022). Seulement ce complexe n'a montré aucune efficacité contre le pneumocoque.



**Figure 6. Voies du complément impliquées au cours de l'infection à *S. pneumoniae***  
(Adapté de Gil, Noursadeghi, et Brown 2022).

L'activation du système du complément induit également la libération de fragments inflammatoires de petite taille, C3a et C5a, nommés anaphylatoxines (**Figure 6**). Très récemment, une première étude épidémiologique a comparé les taux de fragments C3a dans le sérum de patients atteints de PAC, dont la majorité étaient positifs à *S. pneumoniae*, par rapport à des patients sains. De manière intéressante, les patients malades avaient un taux sérique de C3a considérablement plus important, qui corrélait avec une réponse inflammatoire relativement élevée et une maladie plus sévère (Z. Xu et al. 2023). Pour confirmer plus précisément l'impact du complément lors d'une infection à *S. pneumoniae*, l'utilisation d'un inhibiteur du complément sur des cellules épithéliales d'origine murine infectées avec une souche de *S. pneumoniae* a montré une diminution significative de la production de C3a, qui était en corrélation avec une diminution de l'expression d'ARNm de gènes inflammatoires (*Tnf*, *Il6*, *Il1β* et *CRP*) (Z. Xu et al. 2023). En plus de participer à la réponse inflammatoire, C3a et C5a favorisent le recrutement des cellules phagocytaires en les attirant sur le lieu infecté grâce à leurs propriétés chimioattractives (Syed et al. 2020).

Finalement, le système du complément représente un élément essentiel à la reconnaissance du pneumocoque et participe activement à la réponse immunitaire en attirant les cellules phagocytaires capables alors de reconnaître les bactéries opsonisées.

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

A l'homéostasie, les poumons abritent principalement des cellules sentinelles d'origine myéloïde tels que des macrophages alvéolaires qui sont présents en majorité dans la lumière alvéolaire et qui veillent sur l'homéostasie pulmonaire (Korkmaz et Traber 2023) (**Figure 5**). Comme les cellules épithéliales, ces cellules participent à la défense innée pulmonaire grâce à la détection des antigènes bactériens par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR – *Pattern Recognition Receptors*). Ces récepteurs innés proviennent de la lignée germinale et sont retrouvés chez les organismes des vertébrés, des invertébrés mais aussi des plantes. En raison d'un nombre relativement restreint de gènes codants, ces récepteurs ne varient pas au cours du temps, expliquant ainsi le terme anciennement utilisé d'immunité naturelle (Medzhitov 2007; Li et Wu 2021). Ainsi, la présence de cellules innées à l'homéostasie associée à un système de reconnaissance conservé permet des réponses immédiates pour limiter la prolifération de *S. pneumoniae*.

Ces récepteurs reconnaissent des éléments structuraux essentiels aux pathogènes qui sont peu sensibles aux mutations. Ces structures sont connues sous le nom de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou plus précisément, motifs moléculaires associés aux microbes (MAMPs – *Microbe Associated Molecular Patterns*) car ces éléments ont la particularité d’être conservés au sein d’une même famille de microorganismes, pathogène ou non. Les PAMPs représentent des cibles de reconnaissance idéales pour le système immunitaire de l’hôte qui peuvent aussi bien provenir des bactéries que des virus, des champignons ou encore des parasites (Medzhitov 2007). Dans le cas de *S. pneumoniae*, de telles structures incluent les éléments de la paroi bactérienne comme le peptidoglycane, les TA et LTA mais également des éléments intracellulaires comme la pneumolysine et des séquences CpG non méthylées, au sein de son ADN (Brooks et Mias 2018).

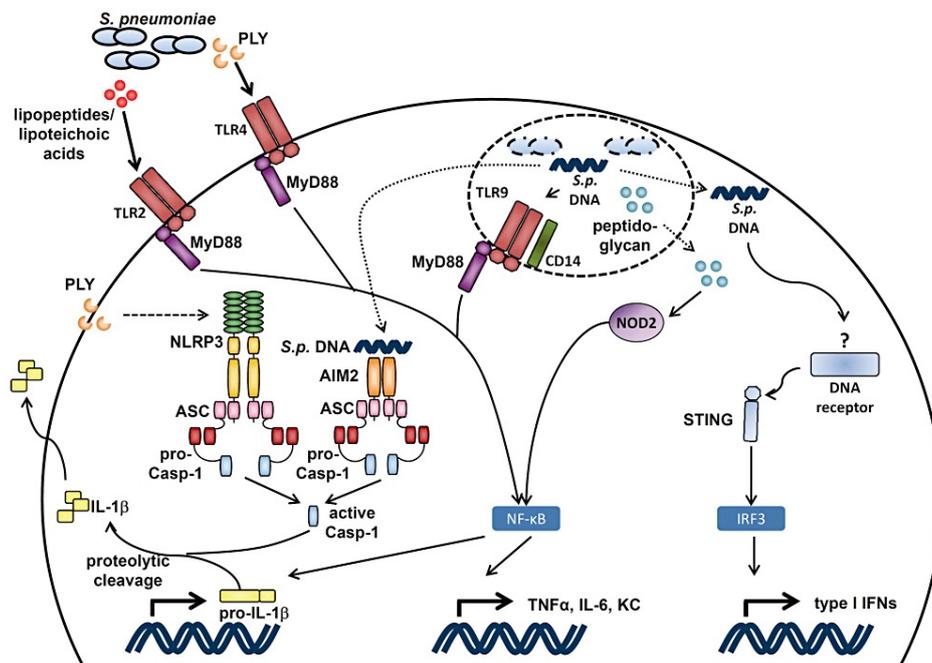
Les PRR peuvent également détecter des motifs de danger de l’hôte, nommés DAMP (*Damage-Associated Molecular Patterns*), qui ont la particularité de posséder des similitudes avec les motifs bactériens (Medzhitov 2007). Les DAMP peuvent être des composés du complément ou bien provenir de débris cellulaires apoptotiques libérés lors de contextes inflammatoires ou de dommages tissulaires (Li et Wu 2021).

L’implication des PRR varie en fonction de la nature et la localisation du PAMP détecté, parmi lesquels certains sont capables de reconnaître le pneumocoque (Li et Wu 2021). L’engagement de ces récepteurs active des voies de signalisation au sein des cellules qui les expriment, permettant leur activation.

### (a) Les *Toll-like receptors* (TLR)

Historiquement, les TLR sont probablement les mieux étudiés car il s’agit des premiers PRR identifiés. Suite à la découverte initiale du récepteur *Toll* chez la drosophile, la conservation de ces récepteurs chez d’autres espèces a révolutionné la compréhension des mécanismes de l’immunité innée. A ce jour, 13 molécules TLR sont retrouvées chez les mammifères : 10 TLR existent chez l’Homme (TLR 1 à 10) contre 12 chez la souris (TLR 1 à 9 et TLR 11 à 13) (Kawai et Akira 2011). Il s’agit de récepteurs transmembranaires qui peuvent être exprimés soit à la surface de la cellule (TLR-1, -2, -4, -5, -6, -10) soit au sein des endosomes (TLR-3, -7, -8, -9). Parmi eux, les TLR-2, -4 et -9 sont les principaux récepteurs impliqués dans la reconnaissance de *S. pneumoniae* (Koppe, Suttorp, et Opitz 2012) (**Figure 7**). Exprimé à la

surface des cellules épithéliales et des cellules myéloïdes, le récepteur TLR2 reconnaît les fragments du peptidoglycane, le TA et le LTA du pneumocoque (Tomlinson et al. 2014). En revanche, le TLR4, essentiellement décrit comme récepteur du LPS des bactéries à Gram négatif, reconnaît la pneumolysine de *S. pneumoniae*, qui a été soit libérée au cours de l'autolyse de la bactérie soit après phagocytose (Malley et al. 2003; Martner et al. 2008). Au sein des endosomes, le récepteur TLR9 reconnaît les séquences CpG non méthylées de l'ADN bactérien (Albiger et al. 2007) (Figure 7).



**Figure 7. Principaux PRR impliqués dans la reconnaissance de *S. pneumoniae* et voies de signalisation.**

A la surface de la cellule, TLR2 reconnaît les acides lipoteichoïques et teichoïques et TLR4, la pneumolysine. Au sein de l'endosome, le récepteur endosomal TLR9 détecte les séquences CpG non méthylées de l'ADN bactérien. L'activation des TLRs implique le recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 et l'activation de la voie inflammatoire NF-κB, qui est à l'origine de la transcription nucléaire de gènes codant pour les protéines inflammatoires TNF, IL-6 et KC (ou Cxcl1). Le récepteur NOD2, qui reconnaît des fragments du peptidoglycane libérés dans le cytosol, active également la voie NF-κB. Les récepteurs cytosoliques NLRP3 et AIM2 reconnaissent la pneumolysine et l'ADN bactérien, respectivement, dont l'activation sollicite la formation de l'inflammasome. Pour cela, la protéine ASC recrute la pro-caspase 1, clivée alors en caspase 1 active, et induit la transduction de la pro-IL-1β en IL-1β. Plus récemment, un détecteur de l'ADN cytosolique a été décrit dans la signalisation IRF3 via le recrutement de la protéine STING (*STimulator of INterferon Genes*) et conduit à la transcription de gènes IFN (*Interférons*) de type I (Koppe, Suttrop, et Opitz 2012).

La détection du pneumocoque peut activer différentes voies de signalisation selon le TLR impliqué. En général, la liaison des TLR à leurs ligands conduit au recrutement et à la fixation de la protéine adaptatrice MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response gene 88*) au

niveau de leurs domaines cytoplasmiques. La signalisation de MyD88 conduit ensuite à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*) dont sa translocation au niveau nucléaire est nécessaire pour la transcription de gènes inflammatoires tels que les cytokines TNF (*Tumor Necrosis Factor*), IL-1 $\beta$  et IL-6 (Koppe, Suttorp, et Opitz 2012). Toutefois, une exception pour TLR4 existe. En plus de MyD88, la signalisation TLR4 passe également par la voie TRIF (*Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$* ) à l'origine de la transcription des gènes de la famille des interférons (IFN) (Kawai et Akira 2011; Sánchez-Tarjuelo et al. 2020). Le rôle protecteur de MyD88 a été démontré au cours de l'infection à *S. pneumoniae* (Albiger et al. 2005). En effet, la délétion en MyD88 rend les souris plus sensibles à l'infection et est caractérisée par une réponse inflammatoire et un recrutement neutrophilique dans les poumons moins marqués (Albiger et al. 2005). De façon intéressante, la délétion de MyD88 uniquement au sein des macrophages et des neutrophiles conduit au même résultat, à savoir une réponse inflammatoire diminuée suggérant leur rôle important dans la reconnaissance du pneumocoque et le déclenchement de la réponse antibactérienne (Dudek et al. 2016).

### (b) Les *Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLR)*

D'autres PRR permettent de détecter les PAMPs à l'intérieur de la cellule dont les récepteurs de la famille des NLR, qui sont les second PRR découverts. Grâce à leur localisation au sein du cytosol, ces récepteurs sont capables de détecter les motifs microbiens intracellulaires.

En fonction de la signalisation qui en découle, la famille des NLRs se divise en deux groupes. Le premier groupe se compose des récepteurs NOD1 et NOD2 dont l'activation conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires via la voie NF- $\kappa$ B et à la libération de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales et les macrophages (Kumar et al. 2013). Dans le cas de *S. pneumoniae*, il a été démontré que le récepteur NOD2 a la capacité de reconnaître un motif conservé du peptidoglycane, le muramyl dipeptide, libéré suite à la dégradation enzymatique du lysosome (LYSM) au sein des phagosomes des macrophages, des neutrophiles et des cellules épithéliales (Davis, Nakamura, et Weiser 2011; Opitz et al. 2004).

Le second groupe de la famille des NLR assure quant à lui la formation d'un complexe multiprotéique, l'inflammasome. Parmi les membres de cette famille, le récepteur NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*) est le mieux décrit et contribue à la reconnaissance de la

pneumolysine du pneumocoque, et ceci indépendamment de TLR4 (McNeela et al. 2010; Fang et al. 2011; van Lieshout et al. 2018). Le complexe NLRP3 utilise la protéine adaptatrice ASC pour recruter la pro-caspase 1, induire sa polymérisation et libérer des fragments de caspase 1 actifs nécessaires pour la production des cytokines de la famille de l'IL-1 telles que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 (Kumar et al. 2013). L'importance de l'inflammasome NLRP3 au cours de l'infection à *S. pneumoniae* a été démontrée en utilisant des animaux déficients en NLRP3, ceux-ci ayant montré une plus grande susceptibilité à l'infection (McNeela et al. 2010).

### (c) Les détecteurs cytosoliques de l'ADN

L'activation de l'inflammasome peut également impliquer la famille des PYHIN (*Pyrin and HIN200 domain-containing protein family*). Parmi les protéines existantes de cette famille, AIM2 (*Absent in Melanoma 2*), est un récepteur cytosolique qui reconnaît l'ADN double brin du pneumocoque (Li et Wu 2021). La détection de l'ADN par le récepteur AIM2 a été observée suite à une perturbation cellulaire ou une agression pathogène (Sharma, Karki, et Kanneganti 2019). Comme NLRP3, la signalisation de AIM2 conduit à l'activation de la caspase 1 consécutivement à la formation de l'inflammasome et participe au contrôle de l'infection (Fang et al. 2011). Il a été démontré que des souris déficientes en AIM2 présentaient une charge bactérienne plus élevée dans les poumons et une survie diminuée par rapport aux souris sauvages lors d'une infection par voie intranasale avec une souche de *S. pneumoniae* (Feng et al. 2019).

En plus du TLR9, d'autres composants présents dans les cellules de l'hôte sont capables de détecter l'ADN du pneumocoque, notamment la famille de récepteurs cGAS (*cyclic-GMP-AMP synthase*) comme l'a démontré l'équipe de Ruiz-Morena *et al.* en 2018 (Ruiz-Moreno et al. 2018). Une fois lié à l'ADN bactérien dans le cytosol, le récepteur cGAS recrute la protéine adaptatrice STING (*STimulator of INterferon Genes*), ce qui déclenche la voie de signalisation IRF3 et conduit à la transcription des IFN de type I. Cependant, malgré la capacité des macrophages spléniques à induire la voie cGAS/STING, aucune contribution dans la réponse immunitaire contre le pneumocoque n'a été démontrée, tant dans des modèles murins que dans des expérimentations utilisant des échantillons humains (Ruiz-Moreno et al. 2018).

#### (d) Les *C-type lectin receptors* (CLR)

Les CLR représentent une vaste famille de récepteurs solubles ou transmembranaires qui reconnaissent des structures glucidiques chez les pathogènes mais également des éléments du soi. Ces récepteurs possèdent un domaine protéique spécifique appelé CRD (*C-type lectin domain*) qui permet la reconnaissance du ligand. Bien que principalement décrits dans la reconnaissance des virus, parasites et des champignons, une étude récente a révélé l'expression d'un récepteur CLR, nommé Mincle (*Macrophage inducible C-type lectin*) (ou Clec4e) par les macrophages, capable de reconnaître *S. pneumoniae*. En revanche, l'absence de Mincle n'a montré aucun effet sur la réponse inflammatoire et les fonctions bactéricides des macrophages au cours d'expériences *in vitro* suggérant que sa liaison avec la bactérie n'impacte pas la réponse immunitaire anti-pneumocoque (Rabes et al. 2015).

### D. Réponses moléculaires et cellulaires au cours de l'infection aiguë à *S. pneumoniae*

En première ligne de défense, les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection à *S. pneumoniae* associant (i) la production de molécules antimicrobiennes et inflammatoires et (ii) des mécanismes fonctionnels dans le but d'éliminer la bactérie et de contrôler l'inflammation.

#### 1. Réponses moléculaires

Au-delà de leur effet mécanique, les cellules épithéliales participent activement à la réponse immunitaire anti-infectieuse. En réponse à *S. pneumoniae*, celles-ci sont capables de libérer des molécules antimicrobiennes destinées à éliminer les bactéries pathogènes mais aussi des cytokines inflammatoires et des chimiokines pour recruter les cellules circulantes.

Au niveau alvéolaire, les pneumocytes sécrètent des protéines du surfactant, SP-A et SP-D importantes pour la défense antipneumocoque. En effet, des souris déficientes en SP-D étaient plus susceptibles à l'infection au pneumocoque (Jounblat et al. 2005). En revanche, la protéine SP-A semble plus impliquée dans l'opsonophagocytose de la bactérie. Ces protéines possèdent en effet des domaines lectines qui permettent l'activation du système du complément et ainsi favoriser l'opsonisation des pathogènes. De plus, il a été démontré que la protéine SP-A améliorait la phagocytose *in vitro* de *S. pneumoniae* par les macrophages alvéolaires,

notamment en favorisant l'expression de leur récepteur phagocytaire SR-A (*Scavenger Receptor A*) (Kuronuma et al. 2004).

L'activation des PRR exprimés par les cellules épithéliales entraîne la production d'une variété de peptides antimicrobiens. Les principaux sont les  $\beta$ -défensines et la cathélicidine LL-37 (également appelée CAMP), qui provient du clivage de la protéine hCAP-18 (*cathelin-related antimicrobial protein18*) (Scharf et al. 2012; Neshani et al. 2019). Ces peptides ont la capacité de lyser les membranes cellulaires de la bactérie (Eisele et Anderson 2011). Pour cela, ces molécules, possédant des charges positives, forment des pores après s'être fixées par interaction électrostatique sur les charges négatives des parois microbiennes (Robert Bals 2000). En plus du lysozyme, les cellules épithéliales libèrent également la lactoferrine, présente en grandes concentrations, et la calprotectine (un complexe formé des protéines S100A8 et S100A9) qui séquestrent respectivement le fer et le zinc, des éléments nécessaires à la croissance bactérienne (R. Bals et Hiemstra 2004). De plus, ces molécules ont la capacité d'attirer les neutrophiles circulants grâce à leurs propriétés chimioattractives, ce qui favorise leur migration pulmonaire au cours de l'infection à *S. pneumoniae* (Ryckman et al. 2003; Raquil et al. 2008).

La détection de cytokines inflammatoires comme le TNF, l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  dans des échantillons pulmonaires (lavages bronchoalvéolaires et homogénats de tissus pulmonaires) provenant d'animaux infectés à *S. pneumoniae* est un témoin crucial de l'infection aiguë (Y. Bergeron et al. 1998; Calbo et Garau 2010; Takashima et al. 1997). Des études ont montré la contribution de ces cytokines dans la protection contre le pneumocoque. Le blocage de l'expression et de l'activité de ces médiateurs inflammatoires par l'utilisation d'anticorps et de molécules inhibitrices au cours d'expérimentations animales ont conduit à une diminution des défenses immunitaires, de la clairance bactérienne mais également de la survie des animaux (Takashima et al. 1997; T van der Poll et al. 1997). A titre d'exemples, l'utilisation d'un anticorps anti-TNF a favorisé la progression en bactériémie chez des souris atteintes de pneumonie à *S. pneumoniae* (Takashima et al. 1997). Des souris déficientes en IL-1 $\beta$  ont présenté des dommages pulmonaires plus sévères et une survie diminuée par rapport à des souris sauvages (Kafka et al. 2008). Il a également été démontré que ces deux cytokines favorisaient le recrutement de neutrophiles et de monocytes inflammatoires en stimulant la voie NF- $\kappa$ B pour la production des chimiokines CXCL1 (KC) et CCL2 (MIP-1) au cours de l'infection pneumococcique (Jones et al. 2005). Concernant l'IL-6, sa sécrétion pulmonaire a aussi bien été observée dans les poumons de souris infectées que dans des échantillons sanguins de patients atteints de pneumonie à *S. pneumoniae* (Yves Bergeron et al. 1998; Jones et al.

2005). De manière importante, il s'agit de la première cytokine détectée dans le sang des souris au cours des infections bactériennes (Dehoux et al. 1994). L'IL-6 a de nombreuses propriétés notamment celle de participer activement à la production de la protéine inflammatoire hépatique de phase aiguë, la CRP. En revanche, l'IL-6 posséderait également des effets anti-inflammatoires en régulant la production des cytokines citées précédemment telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF afin de protéger les animaux infectés d'une inflammation trop importante voire délétère (Tom van der Poll et al. 1997). Seulement, les mécanismes par lesquels l'IL-6 influence la modulation de ces cytokines sont encore méconnus.

L'inflammation se caractérise également par la production de médiateurs anti-inflammatoires tel que l'IL-10, par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales. Sa libération atténue la réponse inflammatoire en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. En effet, l'infection de souris déficientes pour l'IL-10 avec *S. pneumoniae* conduit à une inflammation excessive ainsi qu'un recrutement pulmonaire de neutrophiles exacerbé (Peñaloza et al. 2015).

Les chimiokines, sont une famille de petites protéines qui contrôlent le déplacement et la migration des cellules immunitaires au niveau du site infectieux. Au cours de l'infection au pneumocoque, une libération de chimiokines CXCL1, CXCL2 ou encore CXCL5 est relativement importante pour attirer les neutrophiles circulants dans le tissu pulmonaire grâce au gradient de concentration qu'elles induisent (Yamamoto et al. 2014).

Enfin, des facteurs de croissance sont également libérés suite à la reconnaissance du pneumocoque tels que le GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) et le G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) qui sont cruciaux pour la production des monocytes/macrophages et des neutrophiles (Yamamoto et al. 2014).

## 2. Réponses cellulaires : rôle des macrophages alvéolaires

Leur position stratégique au sein des alvéoles confère aux macrophages alvéolaires un rôle de première ligne de défense contre le pneumocoque. Initialement dérivés de précurseurs embryonnaires du sac vitellin, les macrophages sont transportés par la circulation sanguine vers les tissus périphériques peu après la naissance (Woo, Jeong, et Chung 2021). Ils sont ensuite capables de s'auto-renouveler dans le but de maintenir un pool constant dans les poumons. Ces cellules sont identifiables grâce à la forte expression des marqueurs de surface Siglec F, CD11c et CD64 et une faible expression de l'intégrine CD11b (Misharin et al. 2013). Lors de

l'infection à *S. pneumoniae*, le pool de macrophages résidents diminue rapidement, nécessitant ainsi un renouvellement relativement rapide afin de restreindre la propagation de l'inflammation. Dans ce contexte, il a été prouvé que le pool de macrophages alvéolaires peut être rétabli par des monocytes inflammatoires recrutés depuis la circulation sanguine, qui peuvent se différencier en macrophages présentant des caractéristiques similaires à celles des macrophages alvéolaires (Woo, Jeong, et Chung 2021; Guilliams, Mildner, et Yona 2018).

Les macrophages alvéolaires jouent un rôle crucial dans l'éradication du pneumocoque. Pour cause, il a été démontré que la déplétion des macrophages alvéolaires induit la mort rapide de souris infectées par une souche de *S. pneumoniae*, en raison de l'accumulation des bactéries dans les poumons et le sang (Dockrell et al. 2003; Knapp et al. 2003). Leur rôle protecteur a également été évoqué dans le contexte de surinfection bactérienne. A titre d'exemple, la diminution de ces cellules due à l'infection par le virus de la grippe est l'une des principales raisons de l'augmentation de la susceptibilité à la surinfection par *S. pneumoniae* (Ghoneim, Thomas, et McCullers 2013).

Grâce à l'implication de leur PRR ou via la reconnaissance d'opsonines du complément, les macrophages peuvent activer leur mécanisme de phagocytose, qui représente le principal processus d'élimination des microbes par ces cellules. Ce mécanisme utilise la voie d'endocytose qui résulte de la fusion entre les lysosomes et les phagosomes pour former des phagolysosomes (Nordenfelt et Tapper 2011). Finalement, les macrophages détruisent les pneumocoques au sein de leur vacuole grâce aux contenu riches en enzymes de ses lysosomes et de molécules microbicides puissantes, les espèces réactives du nitrogène (RNS – *Reactive nitrogen species*), résultant de la réaction entre les ROS et l'acide nitrique (NO) (MacMicking, Xie, et Nathan 1997). L'apoptose des macrophages en elle-même est un mécanisme supplémentaire pour éliminer les bactéries au sein du phagosome lorsque les mécanismes phagocytaires sont épuisés (Marriott et al. 2005).

En tant que sources majeures des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$ , les macrophages contribuent à maintenir un équilibre cytokinique pour prévenir les dommages tissulaires, en particulier liés à l'activation fonctionnelle des neutrophiles. Dans ce contexte, leur puissante capacité phagocytaire leur permet d'éliminer les débris apoptotiques, comme les neutrophiles activés qui sont entrés en apoptose (Robb et al. 2016). Ce mécanisme de régulation apoptotique, appelé efferocytose, est crucial pour le contrôle de l'infection par *S. pneumoniae* (Dockrell et al. 2003).

En revanche, la capacité des macrophages à éliminer les bactéries est limitée. Au-delà d'une certaine charge bactérienne, il a été démontré que ces cellules ne contrôlaient plus la propagation du pneumocoque dans les voies respiratoires (Dockrell et al. 2003; Knapp et al. 2003). Dans ce contexte, un nombre considérablement plus élevé de neutrophiles était observé par rapport à des souris normales grâce aux molécules chimioattractives libérées suggérant une prise de relais par ces cellules dans l'élimination de la bactérie (Knapp et al. 2003).

### III. Le polynucléaire neutrophile, cycle de vie et importance au cours de l'infection à *S. pneumoniae*

Les polynucléaires neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine, représentant jusqu'à 70% du total des leucocytes circulants chez l'Homme et 25% chez la souris (Hidalgo et al. 2019). Après leur maturation dans la moelle osseuse (MO), ils acquièrent une structure granuleuse justifiant la dénomination de polynucléaires ou granulocytes neutrophiles (Cowland et Borregaard 2016). Chaque jour, environ  $10^{11}$  neutrophiles chez l'Homme sont produits (et  $10^7$  chez la souris) pour ensuite être mobilisés dans les tissus périphériques. Les neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées et les plus abondantes sur le site d'une infection et/ou d'une inflammation où ils jouent un rôle essentiel en détruisant les pathogènes grâce à leurs puissantes fonctions effectrices (Borregaard 2010; Kolaczowska et Kubes 2013; Kraus et Gruber 2021). Ainsi, avant d'aborder leur rôle au cours de l'infection à *S. pneumoniae*, il est nécessaire de comprendre d'où proviennent ces cellules et par quels mécanismes elles acquièrent ces fonctions.

#### A. Développement des neutrophiles

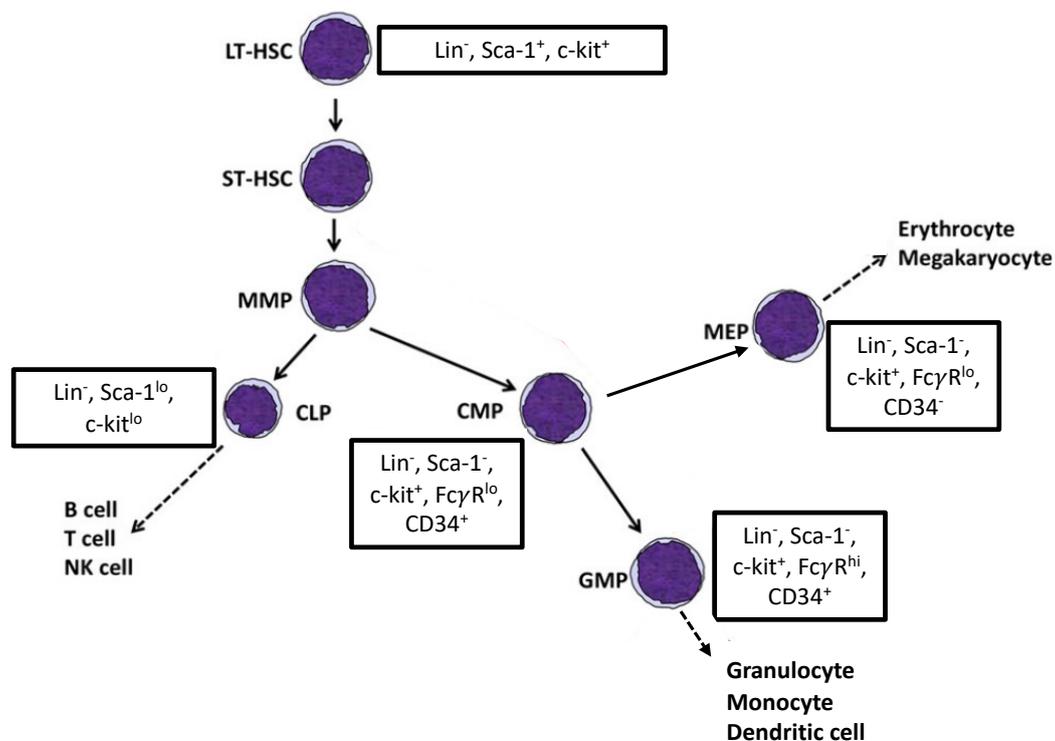
##### 1. Généralités sur l'hématopoïèse

La production des cellules sanguines commence initialement dans le sac vitellin et se poursuit dans le foie pendant la période fœtale. Après la naissance et tout au long de la vie, la MO située dans les os longs, certains os plats et dans les vertèbres devient le principal site tissulaire de l'hématopoïèse. Dans la MO, l'hématopoïèse suit une hiérarchie en cascade qui débute avec les cellules souches hématopoïétiques (CSH) localisées dans des niches (Pinho et Frenette 2019). Ces niches désignent un réseau complexe de cellules qui fournissent des signaux moléculaires et des interactions physiques permettant aux CSH de survivre, se multiplier et se différencier (Pinho et Frenette 2019). Différents sous-types de CSH ont été identifiés en fonction de l'expression de marqueurs de surface, notamment dans des études de cytométrie en flux (**Figure 8**).

En haut de la cascade se trouvent les « *long-term HSC* » (LT-HSC) caractérisées ( $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$ ), des cellules quiescentes capables de s'auto-renouveler pour maintenir leur propre population de cellules indifférenciées. D'autres CSH, appelées « *short-term HSC* » (ST-HSC),

ont une capacité d'auto-renouvellement limitée mais sont plutôt multipotentes, c'est-à-dire capables de se différencier en plusieurs lignées cellulaires. Les ST-HSC se différencient en progéniteurs multipotents MPP (*Multi-Potent Progenitor*) qui ont perdu la capacité d'auto-renouvellement caractéristique des cellules souches. A leur tour, les MPP évoluent en progéniteurs oligopotents (limités à quelques lignées cellulaires) tels que les CLP (*Common Lymphoid Progenitor*) et les CMP (*Common Myeloid Progenitor*). Collectivement, ces progéniteurs oligopotents donnent naissance à toutes les cellules effectrices hématopoïétiques.

La différenciation des CLP conduit à la formation des lymphocytes T et B et des cellules NK (*Natural killer*) (Nandakumar, Ulirsch, et Sankaran 2016). Les CMP se différencient (i) en GMP (*Granulocyte-Monocyte progenitor*) précurseur des cellules myéloïdes telles que les monocytes, les granulocytes (incluant les neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les mastocytes et les cellules dendritiques et (ii) en MEP (*Megakaryocyte Erythroid progenitors*) à l'origine des mégacaryocytes et des globules rouges. A ce stade, chez la souris, les progéniteurs peuvent être distingués en fonction de l'expression de deux marqueurs, le récepteur du fragment Fc des IgG FcγR-II/III (FcγR ou CD16/CD32) et le CD34, un marqueur caractéristique des cellules souches progénitrices (Akashi et al. 2000) (**Figure 8**).



**Figure 8. Schéma de l'hématopoïèse chez la souris**  
(Adapté de Cowland et Borregaard 2016)

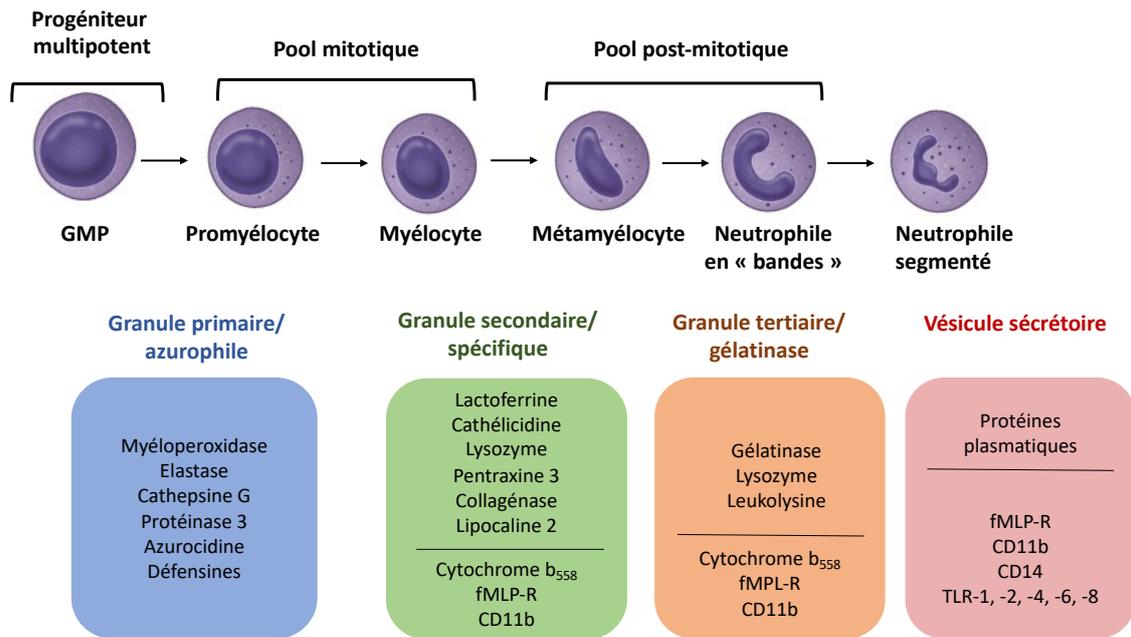
## 2. Voie de maturation des neutrophiles : la granulopoïèse

### (a) Étapes de maturation basée sur la morphologie des cellules

Historiquement, le développement des neutrophiles a été défini en utilisant un gradient de densité, suivi d'une analyse morphologique des différentes fractions après coloration au Giemsa (Dancey et al. 1976). Ainsi, la classification initiale des progéniteurs des neutrophiles a été fondée sur des critères morphologiques tels que la taille des cellules, la morphologie du noyau et le contenu des granules.

Le développement des neutrophiles débute à partir des myéloblastes, que sont les GMP. Ces cellules sont caractérisées par un noyau circulaire et progressent à travers un continuum de maturation, allant d'un pool prolifératif ou mitotique qui contient les précurseurs engagés dans la granulopoïèse (promyélocytes, myélocytes), à un pool non prolifératif ou post-mitotique comprenant les métamyélocytes, les neutrophiles « en bandes » et enfin les neutrophiles segmentés (Dancey et al. 1976). Au fur et à mesure de la différenciation, le rapport nucléocytoplasmique diminue en raison d'une déformation du noyau. D'une forme circulaire issue des cellules souches à une forme annulaire au stade de myélocyte, le noyau acquiert sa forme caractéristique, qui est segmentée en plusieurs lobes (= forme plurilobée), une fois le processus de maturation atteint. Parallèlement, le cytoplasme devient de plus en plus clair et progressivement enrichi en granules (Dancey et al. 1976)(**Figure 9**).

Les granules, caractéristiques des granulocytes, apparaissent séquentiellement selon un programme transcriptionnel dynamique au cours de la différenciation du neutrophile (Bjerregaard et al. 2003). Leur contenu varié en protéines permet de caractériser quatre types de granules. Des enzymes et protéines essentielles dans les mécanismes de défense sont formées dans la lumière granulaire. En revanche, des récepteurs, des protéines de signalisation et des protéines d'adhérence sont localisées au niveau de la membrane des granules permettant au neutrophile de les exprimer à leur surface lors du processus d'exocytose (Cowland et Borregaard 2016; Teng et al. 2017) (**Figure 9**).



**Figure 9. Développement des neutrophiles et formation de leurs granules.**

Les GMP sont les premiers précurseurs engagés de la lignée des neutrophiles. Ceux-ci se différencient en promyélocytes suivis de myélocytes, qui constituent le pool mitotique. Ces cellules donnent ensuite naissance à des métamyélocytes puis des neutrophiles en bandes, le pool post-mitotique, et enfin des neutrophiles segmentés. Au fur et à mesure de la maturation des neutrophiles, les granules se développent et diffèrent selon leur contenu. Les granules azurophiles apparaissent lorsque les GMP se différencient en promyélocytes. Les granules secondaires se forment dans les myélocytes et les métamyélocytes. Les granules tertiaires apparaissent au sein des neutrophiles en bandes. Enfin, les vésicules sécrétoires sont seulement présentes au sein des neutrophiles matures segmentés. fMLP-R : récepteur du *formyl-metionyl-leucyl-phenylalanine*. Adapté de (Hidalgo et al. 2019; Borregaard, Sørensen, et Theilgaard-Mönch 2007; Pham 2006)

- Les granules azurophiles

Dès le stade de myéloblaste, les **granules primaires** ou communément appelés **azurophiles** sont les premiers à apparaître et représentent les granules les plus toxiques en raison de leur contenu riche en molécules microbicides. Parmi elles, la myéloperoxidase (MPO) est la plus toxique, elle participe à la production de ROS au sein du phagosome et peut provoquer la dégranulation des neutrophiles voisins en se liant à l'intégrine CD11b lorsqu'elle est libérée dans le milieu extracellulaire (Lawrence, Corriden, et Nizet 2018). Les granules azurophiles sont également caractérisés par la présence de sérine protéases telles que la protéinase 3, la cathepsin G et l'élastase du neutrophile. Ces protéases exercent une importante activité protéolytique contre les composés de la matrice extracellulaire (Pham 2006). Des défensines exclusivement de type  $\alpha$  sont également retrouvées et exercent leur action microbicide en formant des pores à travers les parois membranaires des pathogènes (Borregaard, Sørensen, et Theilgaard-Mönch 2007).

- Les granules spécifiques

Les **granules secondaires** ou **spécifiques** sont caractéristiques du stade des myélocytes. Anciennement qualifiées de granules MPO négative, due à l'absence de cette protéine, ces granules sont riches en peptides antimicrobiens communs des cellules épithéliales pulmonaires, telles que la lactoferrine, le lysozyme et la cathélicidine LL-37. On y retrouve également d'autres protéines telles que la lipocaline associée aux gélatinases du neutrophile (ou lipocaline 2) et une métalloprotéinase, la collagénase (MMP8). Ces deux molécules favorisent la mobilisation des neutrophiles (Schroll et al. 2012; Lin et al. 2008) en plus d'empêcher la croissance bactérienne en séquestrant le fer (Nasioudis et Witkin 2015) et en dégradant la matrice extracellulaire (Lee et Kim 2022), de manière respective. A ce stade, des protéines d'adhérence comme l'intégrine CD11b, le complexe membranaire cytochrome b<sub>558</sub> composé des sous-unités gp91phox et p22phox importantes pour la formation de ROS et les récepteurs, FPR1 et FPR2 (*Formyl peptide receptors 1 et 2*), du composé bactérien *formyl-metionyl-leucyl-phenylalanine* (fMLP) font leur apparition au niveau de la membrane des granules spécifiques et sont également retrouvés dans les granules formés aux stades ultérieurs (Cowland et Borregaard 2016).

- Les granules tertiaires

Les granules tertiaires ou riches en **gélatinase**, constituent le troisième type de granule et représentent les plus petits granules du neutrophile. Ils apparaissent au cours de la formation des métamyélocytes et des neutrophiles en bandes. Ils présentent une plus grande capacité à être sécrétés dans le milieu extracellulaire pour fournir les protéines et récepteurs de la membrane granulaire à la surface des neutrophiles. Ils se caractérisent grâce à leur contenu riche en protéines matricielles telles que les métalloprotéinases comme la gélatinase (MMP-9) et la leukolysine (MMP-25) qui dégradent des composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, le collagène et des glycoprotéines membranaires (Lee et Kim 2022).

- Les vésicules sécrétoires

Enfin, les **vésicules sécrétoires** apparaissent au stade ultime de maturation du neutrophile. Contrairement aux granules classiques, celles-ci ne proviennent pas de la maturation de l'appareil de Golgi mais résultent d'un mécanisme d'endocytose au sein des neutrophiles matures. Ces vésicules contiennent essentiellement des protéines membranaires (Cowland et

Borregaard 2016). Il s'agit des premières vésicules à être sécrétées au cours de l'activation du neutrophile, ce qui permet l'incorporation des protéines membranaires des vésicules à la membrane de la cellule. Elles constituent un réservoir important de molécules de reconnaissance des pathogènes tels que le CR1, le fragment Fc des IgG (FcγIIIIR ou CD16) et FPR1 mais également l'intégrine CD11b. Ces vésicules contiennent également des protéines dérivées du plasma telle que l'albumine (Lawrence, Corriden, et Nizet 2018).

Ainsi, au terme de leur différenciation, les neutrophiles matures ont l'avantage d'être armés, même sans l'ombre d'un pathogène, grâce au stock de protéines antimicrobiennes prêt à être utilisé (Borregaard, Sørensen, et Theilgaard-Mönch 2007).

### (b) Étapes de maturation selon la variation d'expression de marqueurs de surface

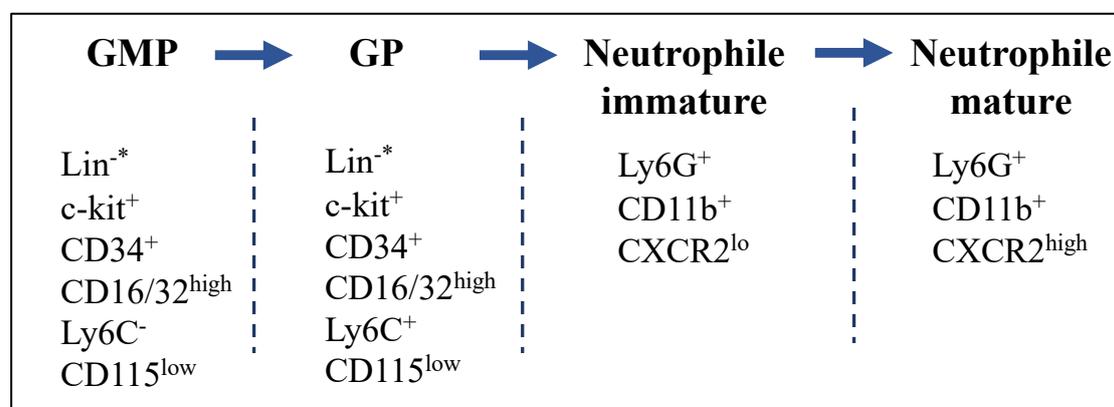
Grâce aux avancées technologiques dans l'analyse cellulaire, de plus en plus d'études ont révélé une diversité phénotypique et transcriptionnelle au cours du développement des neutrophiles, permettant l'identification de différentes populations dérivant des progéniteurs GMP. En complément des critères morphologiques, un nouveau modèle de maturation des neutrophiles a émergé.

En utilisant une approche non supervisée de cytométrie en flux, des chercheurs ont mis en évidence que les cellules GMP FcγR<sup>high</sup> CD34<sup>+</sup> donnaient lieu à des cellules qui maintenaient l'expression du marqueur de prolifération c-kit, mais présentaient également une expression du marqueur Ly6C (*Lymphocyte antigen 6 family*) (appelées GMP-Ly6C<sup>+</sup>). Au sein de cette population, les auteurs ont identifié deux sous-populations qui exprimaient différemment le CD115, le récepteur du facteur de croissance M-CSF (*Macrophage-Colony stimulating factor*), un acteur clé dans la différenciation des monocytes/macrophages. Lorsqu'ils ont transféré *in vivo* des cellules GMP-Ly6C<sup>+</sup>CD115<sup>low</sup> et GMP-Ly6C<sup>+</sup>CD115<sup>high</sup>, cela a entraîné respectivement le développement de neutrophiles et de monocytes matures, confirmant ainsi que ces populations représentaient des précurseurs granulocytaires (GP - *Granulocyte progenitors*) et monocytaires (MP - *Monocyte progenitors*) (Yáñez et al. 2015).

Plus tard, l'utilisation de la cytométrie de masse (CyTOF), couplée à des analyses transcriptomiques, a permis de différencier deux populations non prolifératives dans la MO de souris en fonction de l'expression de marqueurs de maturation des neutrophiles, le Ly6G et le CXCR2 (Evrard et al. 2018). Ces marqueurs permettaient la distinction entre des neutrophiles

immatures et des neutrophiles matures, respectivement identifiés comme  $\text{Ly6G}^+\text{CXCR2}^{\text{low}}$  et  $\text{Ly6G}^+\text{CXCR2}^{\text{high}}$ . Ces deux populations concordaient avec les deux derniers stades de maturation observés précédemment par gradient de densité. Les neutrophiles immatures se distinguaient par un noyau en forme de bande tandis que les neutrophiles matures présentaient un noyau segmenté en plusieurs lobes (Evrard et al. 2018). Les auteurs ont également observé une dynamique transcriptionnelle entre ces deux populations qui corrélait avec une maturation fonctionnelle en terme de phagocytose et de production de ROS (Evrard et al. 2018). L'équipe de Xie *et al.*, a également identifié plusieurs populations distinctes (G0, G1, G2, G3 et G4) dans la MO en séquençant l'ARN sur cellules uniques (scRNA-seq) (Xie et al. 2020). Comme prévu, les gènes liés au cycle cellulaire étaient fortement exprimés dans les premières phases de maturation. De manière intéressante, ils ont montré que les populations G3 et G4 avaient des profils qui corrélaient respectivement avec ceux des neutrophiles immatures et matures décrits par Evrard *et al.* Enfin, les neutrophiles isolés du sang de souris ou d'origine humaine présentaient des profils transcriptomiques et morphologiques similaires à ceux des neutrophiles matures issus de la granulopoïèse confirmant que les neutrophiles circulants proviennent du stade final de maturation de la MO (Xie et al. 2020).

Dans l'ensemble, ces recherches confirment l'existence d'une diversité de populations de neutrophiles dans la MO avant leur maturation complète. D'autres stades intermédiaires entre les GMP et les neutrophiles matures ont été fortement suggérés sur la base de changements d'expression moléculaire, bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour parvenir à un consensus (Ng, Ostuni, et Hidalgo 2019; Malengier-Devlies et al. 2021). Ainsi, dans le cadre de cette thèse, une voie de différenciation générale des neutrophiles a été établie au sein de la MO selon les travaux de l'équipe de Yanez *et al.* et d'Evrard *et al.* (**Figure 10**).



**Figure 10. Voie de différenciation des neutrophiles de la MO.**

Sur la base des travaux de (Yáñez et al. 2015) et (Evrard et al. 2018)

\* : parmi les cellules myéloïdes caractérisées  $\text{CD45}^+$ . Lin = Ter119, CD3, NK1.1, B220, CD11b. low = expression faible ; high = expression forte.

### 3. Régulation de la granulopoïèse

La différenciation des granulocytes est régulée par l'expression coordonnée de médiateurs tels que des facteurs de transcription et des facteurs de croissance (Ng, Ostuni, et Hidalgo 2019). Parmi ces facteurs, les membres de la famille de la protéine de liaison CCAAT/*Enhancing binding protein* (C/EBP) interviennent à différents stades de maturation du neutrophile dans la MO. Très tôt, il a été démontré que la protéine C/EBP $\alpha$  était essentielle pour la granulopoïèse. Chez des souris déficientes pour le gène *c/ebp $\alpha$* , aucun neutrophile mature n'était visible contrairement à des souris sauvages (D. E. Zhang et al. 1997). Plus tard, il a été confirmé que ce facteur agissait dès les premiers stades de maturation en stimulant les GMP vers la voie de maturation des neutrophiles (Cowland et Borregaard 2016). D'autres protéines de la famille des C/EBP sont également importantes dans le processus de maturation des neutrophiles, comme le montre l'augmentation des niveaux d'expression des protéines C/EBP- $\beta$ , C/EBP- $\delta$  et C/EBP- $\zeta$  au fur et à mesure de la granulopoïèse (Bjerregaard et al. 2003; Evrard et al. 2018). Les facteurs de transcription jouent également un rôle dans le processus de maturation des granules. Par exemple, dans le cas de C/EBP $\alpha$ , il favorise l'expression accrue de la MPO au sein des granules azurophiles (Ford et al. 1996). D'autre part, les facteurs C/EBP- $\epsilon$  et C/EBP- $\delta$  sont associés à la stimulation de la formation de granules secondaires et tertiaires, respectivement (Gombart et al. 2003).

De manière intéressante, la déficience de *c/ebp $\alpha$*  a conduit également à l'absence de signalisation médiée par le facteur de croissance granulocytaire, le G-CSF, dont le récepteur est normalement exprimé par les précurseurs myéloïdes et les cellules matures. L'expression de l'ARN messager du récepteur était considérablement diminuée chez les souris déficientes pour *c/ebp $\alpha$*  par rapport aux souris sauvages (D. E. Zhang et al. 1997). Le G-CSF est le principal régulateur de la granulopoïèse physiologique, en raison de son rôle polyvalent. A titre d'exemple, son absence induit une neutropénie sévère chez la souris (Roberts 2005). De plus, ce facteur de croissance est aujourd'hui utilisé en thérapeutique pour le prétraitement des donneurs de granulocytes ou à titre préventif de neutropénie au cours de pathologies cancéreuses (Welte 2014). Le G-CSF stimule à la fois l'engagement des cellules progénitrices dans la lignée myéloïde, la prolifération des précurseurs granulocytaires et la réduction du temps de maturation des neutrophiles (Richards et al. 2003).

## B. Devenir des neutrophiles matures de la MO

Une fois que les neutrophiles ont atteint leur maturité, seule une mineure partie migre vers la circulation sanguine, tandis que la partie restante constitue un pool de réserve au sein de la MO. Ce pool représente jusqu'à 5 à 6 fois le pool de neutrophiles circulants (Furze et Rankin 2008), ce qui constitue une réserve importante en cas de situation d'urgence.

### 1. Maintien des neutrophiles dans la MO

Les neutrophiles matures sont maintenus dans la MO grâce à l'expression, bien que faible, du récepteur CXCR4 à leur surface. Cependant, de forts taux intracellulaires ont été détectés suggérant que le CXCR4 est rapidement endocyté suite à la liaison avec son ligand à la surface de la cellule (Martin et al. 2003). Son principal et unique ligand est la chimiokine SDF-1 $\alpha$  (*Stromal Derived Factor 1*) ou CXCL12, qui est produite en très grande quantité par les cellules stromales de la MO telles que les ostéoblastes et les cellules endothéliales (Day et Link 2012). Le blocage du récepteur CXCR4 a induit une mobilisation accrue des neutrophiles de la MO vers le sang suggérant une implication de la signalisation CXCR4 :CXCL12 dans la rétention des neutrophiles (Martin et al. 2003). Cela a été confirmé avec des souris irradiées chez qui un transfert de cellules murines de MO déficientes en CXCR4 a été effectué. Les souris repeuplées avaient très peu de neutrophiles dans leur MO mais une quantité plus élevée dans le sang par rapport aux souris sauvages (Ma, Jones, et Springer 1999).

Les neutrophiles possèdent un autre récepteur impliqué dans la mobilisation extra-médullaire, et qui semble agir de manière antagoniste au CXCR4 (Eash et al. 2010). A l'aide de souris chimères, l'équipe de Eash *et al.* a montré que la déficience de CXCR2 induisait un nombre de neutrophiles plus élevé dans la MO et plus bas dans le sang suggérant un rôle important dans la mobilisation extramédullaire de ces cellules (Eash et al. 2010), en plus de son effet sur la maturation (Delobel et al. 2022). Ses ligands sont les chimiokines CXCL1 et CXCL2, dont la libération provenait initialement des cellules des tissus enflammés (Martin et al. 2003). Seulement, l'équipe de Eash *et al.* a démontré que les ostéoblastes étaient également capables de produire ces chimiokines en condition basale, en plus du CXCL12 (Eash et al. 2010). De manière intéressante, la double déficience (*Cxcr2*<sup>-/-</sup> et *Cxcr4*<sup>-/-</sup>) n'empêchait pas la mobilisation des neutrophiles vers le sang, ce qui suggère un rôle plus important de la liaison CXCR4: CXCL12 dans la rétention au sein de la MO.

En revanche, en condition de stress, la situation est inversée, notamment suite à l'action du G-CSF, produit en grande quantité. Les molécules libérées lors d'un contexte inflammatoire envoient un signal d'alerte pour qu'un nombre accru de neutrophiles migrent dans les tissus enflammés. Dans ce contexte, le G-CSF stimule la mobilisation des neutrophiles matures, d'une part en modulant à la baisse l'expression du CXCR4 à la surface des neutrophiles et d'autre part, en stimulant l'expression du CXCL2 (Semerad et al. 2002; Kim et al. 2006; Eash et al. 2010). De plus, cette mobilisation accrue des neutrophiles déclenche la granulopoïèse d'urgence pour assurer un approvisionnement suffisant de cellules matures prêtes à migrer (Manz et Boettcher 2014). A cette fin, les CSH et les précurseurs granulocytaires augmentent leur capacité de prolifération en détectant directement les PAMPs circulants grâce aux PRR qu'ils expriment ou indirectement en réponse aux cytokines inflammatoires (TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ ) et aux facteurs de croissance (G-CSF et GM-CSF) (Nagai et al. 2006; Manz et Boettcher 2014; Mitroulis et al. 2018).

## 2. Sortie des neutrophiles matures vers la circulation sanguine

Une fois dans la circulation sanguine en conditions d'homéostasie, les neutrophiles caractérisés par l'expression constante du Ly6G et du CD11b, ont une demi-vie relativement courte pouvant aller jusqu'à quelques heures chez la souris contre plusieurs jours chez l'homme, soulignant la nécessité d'une granulopoïèse continue (Hidalgo et al. 2019). Pour cause, une altération de leur production et de leur mobilisation induit un pronostic vital considérablement défavorable (Summers et al. 2010).

Une partie des neutrophiles circulants acquièrent un profil sénescence « âgé » qui se caractérise par une régulation à la hausse du récepteur CXCR4 les poussant ainsi à revenir dans la MO où ils entreront en apoptose puis seront détruits par les macrophages résidents (Hidalgo et al. 2019). Ils peuvent également être phagocytés par les macrophages au niveau du foie et de la rate, un mécanisme dépendant de la signalisation médiée par le récepteur LXR (*liver X receptor*) (A-Gonzalez et al. 2009). Il est important de noter que ce processus permet de réguler continuellement la granulopoïèse. En effet, les macrophages qui ont phagocyté les neutrophiles apoptotiques par efferocytose sécrètent moins d'IL-23, une interleukine qui favorise la production d'IL-17, elle-même à l'origine d'une stimulation de la production de G-CSF (Gaffen 2009). La voie de signalisation IL-23/IL-17/G-CSF est ainsi inhibée. Finalement, la

granulopoïèse est indirectement régulée par l'apoptose des neutrophiles âgés par les macrophages (Stark et al. 2005).

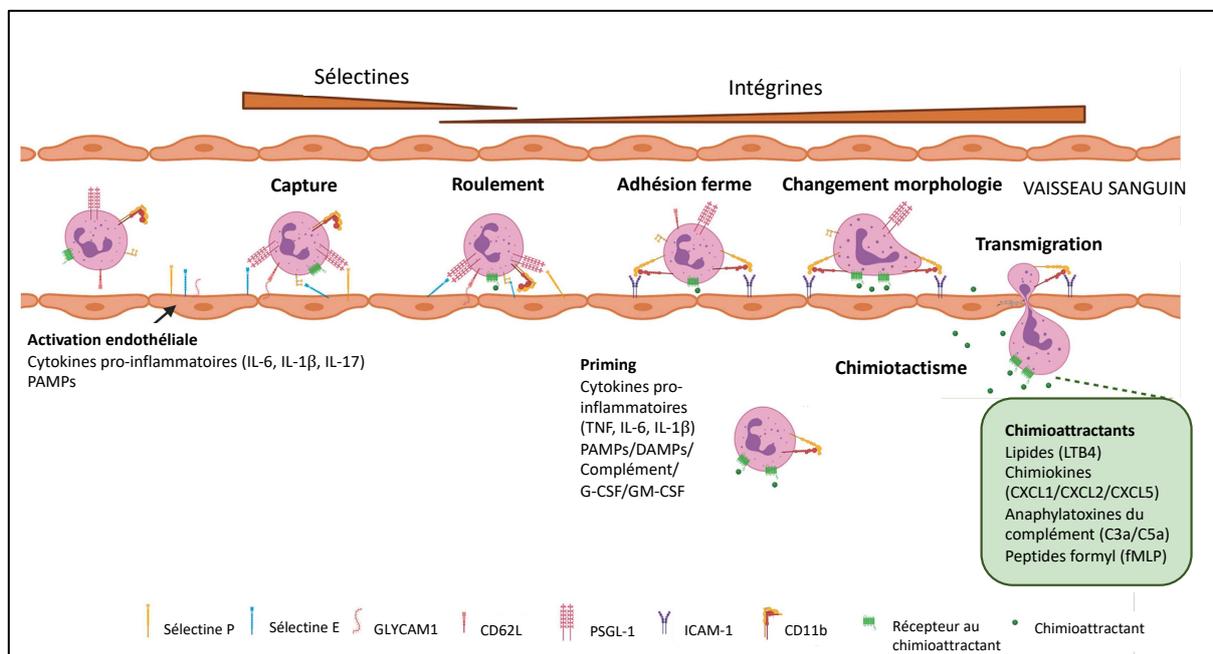
Un autre pool de neutrophiles se distingue des neutrophiles circulants : le pool des neutrophiles « marginés ». Cette réserve de neutrophiles correspond aux neutrophiles collés aux parois des cellules endothéliales qui longent les tissus. Ils sont principalement localisés au niveau de la MO, de la rate, du foie et des poumons (Granton et al. 2018). Au niveau des poumons, la margination des neutrophiles proviendrait de leur accumulation dans les vaisseaux qui les entourent. En effet, les vaisseaux ont un diamètre inférieur au niveau du système respiratoire et sont plus petits que la taille des neutrophiles, ce qui les empêcherait de circuler librement (Maas, Soehnlein, et Viola 2018). Une autre hypothèse soulève une possible sécrétion de CXCL12 par les cellules endothéliales à l'origine de l'augmentation de l'expression du CXCR4 à la surface de ces neutrophiles. Dans ce sens, l'inhibition médicamenteuse du CXCR4 chez la souris a induit la mobilisation des neutrophiles marginés vers la circulation sans avoir mobilisé les neutrophiles de la MO confortant le rôle du récepteur dans le maintien de neutrophiles marginés (Devi et al. 2013). Lors de contextes infectieux et/ou inflammatoires, ce pool de neutrophiles peut être ainsi rapidement mobilisé au sein du tissu endommagé, ce qui représente un avantage considérable de l'organisme face au danger qu'il rencontre.

## C. Migration tissulaire et activation des neutrophiles en contexte infectieux

### 1. Migration des neutrophiles au sein des tissus infectés

Grâce à leur production permanente dans la MO ainsi qu'à leur capacité migratoire, les neutrophiles sont facilement mobilisés vers les tissus enflammés. Les chimiokines CXCL1, CXCL2 et CXCL5, les molécules du complément C3a et C5a et les peptides bactériens tels que le fMLP poussent les neutrophiles à quitter la circulation sanguine en les attirant vers le tissu endommagé. Pour cela, les cytokines inflammatoires telles que le TNF, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-17 ou encore des produits microbiens comme le LPS stimulent les cellules endothéliales dont l'activation conduit à des changements conformationnels et l'expression de molécules d'adhérence pour faciliter le passage des neutrophiles (**Figure 11**). En réponse à ces stimuli, les cellules endothéliales expriment rapidement les sélectines P et E, qui vont interagir avec les neutrophiles circulants via leur ligand, les sélectines PGSL-1 (*P-selectin ligand 1*) et CD62L. Cette liaison permet la capture des neutrophiles et leur roulement le long de la paroi

endothéliale. Le contact avec l'endothélium déclenche ainsi l'exocytose des vésicules sécrétoires et donc l'expression membranaire des protéines d'adhésion CD11b et LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) par les neutrophiles. Ces protéines peuvent ainsi se lier aux glycoprotéines transmembranaires des cellules endothéliales ICAM-1 et VCAM-1, entraînant leur adhérence ferme sur la paroi endothéliale. Cette interaction est nécessaire afin de préparer les neutrophiles à la migration à travers l'endothélium. A cette fin, une cascade de signalisation intracellulaire induit des changements morphologiques des neutrophiles facilitant leur passage à travers les jonctions de l'endothélium (Borregaard 2010; Kolaczowska et Kubes 2013) (**Figure 11**).



**Figure 11. Étapes de migration des neutrophiles à travers l'endothélium des tissus infectieux.**

Au cours d'une infection, les cellules endothéliales sont activées en réponse au stimuli inflammatoires tels que les cytokines et les PAMPs, conduisant à l'expression des sélectines P et E. Les étapes de capture et de roulement des neutrophiles sont initiées suite à la liaison entre ces sélectines et les ligands PSGL-1 et CD62L présents à la surface des neutrophiles. Le contact avec l'endothélium active les intégrines des neutrophiles dont CD11b qui vont se lier au récepteur endothélial ICAM-1. Cette interaction conduit alors à l'adhérence ferme du neutrophile sur la paroi endothéliale, qui lui permet l'activation de voies de signalisation intracellulaires à l'origine d'une modulation morphologique pour lui faciliter la migration à travers l'endothélium. Une fois dans les tissus enflammés, les neutrophiles suivent un gradient de concentration médiés par les chimioattractants libérés puis sont fonctionnellement activés ou amorcés pour contribuer à l'élimination du pathogène. *Priming* : pré-activation/amorçage. Adapté de (Malengier-Devlies et al. 2021)

Une fois dans les tissus infectés, les neutrophiles sont guidés par les chimioattractants en direction des microorganismes pathogènes qu'ils pourront reconnaître grâce à la variété de récepteurs qu'ils possèdent comme les PRR, les FPR1 et FPR2 et les récepteurs du complément

(pour revue Thomas et Schroder 2013). Néanmoins, certaines molécules stimulent les neutrophiles dans un état dit amorcé ou pré-activé, un état qui nécessite une seconde activation pour une réactivité fonctionnelle accrue des neutrophiles face au danger (pour revue : Miralda, Uriarte, et McLeish 2017) (**Figure 11**). Dans ce contexte, des changements d'expression de marqueurs de surface tels que la CD62L et le CD11b débutent. Ainsi, en plus d'être importants dans la migration trans-endothéliale des neutrophiles, la diminution et l'augmentation de leur expression respective représentent de bons marqueurs d'activation en cytométrie.

## 2. Réponses des neutrophiles activés

Ainsi, les neutrophiles présentent quatre fonctions majeures : la phagocytose, la production de dérivés toxiques, la dégranulation et plus récemment décrite, la NETose.

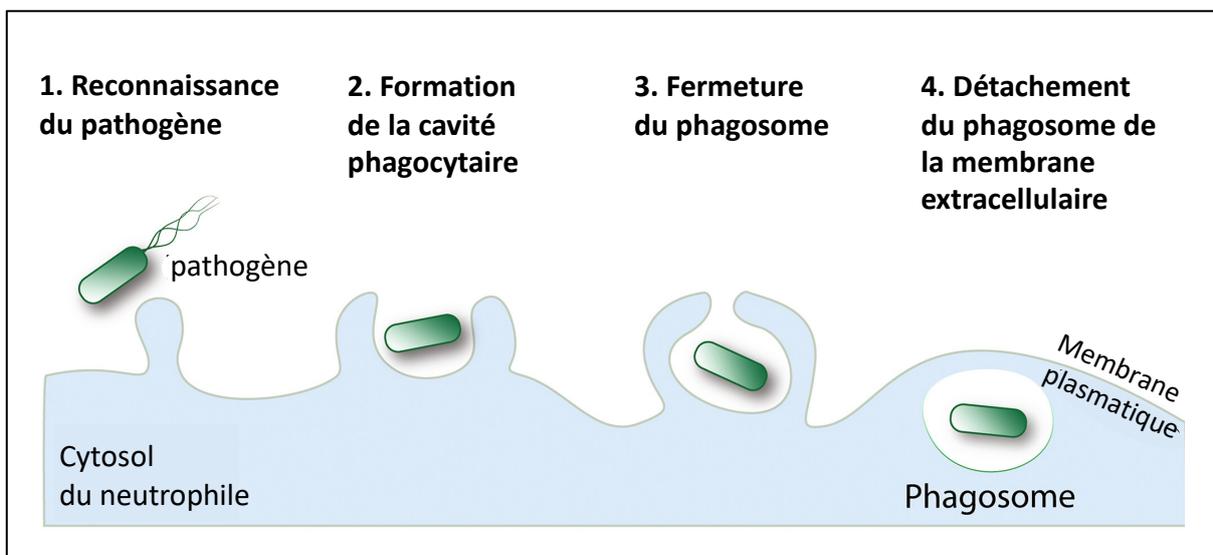
### (a) La phagocytose

La phagocytose représente le principal mécanisme employé par les neutrophiles pour éliminer les agents pathogènes ainsi que les débris cellulaires indésirables. Les neutrophiles peuvent ingérer aussi bien les agents pathogènes marqués par des opsonines que ceux qui ne le sont pas, grâce à la diversité de récepteurs qu'ils expriment (Futosi, Fodor, et Mócsai 2013). Parmi les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes, le récepteur CR3 se révèle être le plus efficace pour détecter les fragments du complément, notamment les fragments C3b/iC3b, qui recouvrent les pathogènes, et engendrer le processus de phagocytose. En plus du récepteur Fc $\gamma$ RIIIb (CD16), les neutrophiles expriment de manière constitutive d'autres récepteurs capables de reconnaître les fragments Fc des anticorps IgG tels que le Fc $\gamma$ RIIIa (CD32) et le Fc $\gamma$ RIV ainsi que le récepteur Fc $\gamma$ RI (CD64) dont l'expression nécessite une stimulation par le G-CSF (Repp et al. 1991; Witko-Sarsat et al. 2000).

Le processus de phagocytose implique une restructuration du cytosquelette sous l'effet de cascades de signalisation enzymatiques (Naish et al. 2023). L'activation des récepteurs phagocytaires entraîne la phosphorylation de leurs motifs ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) par les tyrosines kinases de la famille Src. Les ITAMs phosphorylés agissent comme points d'ancrage pour les domaines SH2 des tyrosines kinases Syk, qui à leur tour activent la phosphatidyl-inositol-triphosphate kinase ainsi que les protéines des GTPases Rho. L'intervention des GTPases conduit à la polymérisation de l'actine, provoquant,

conjointement, avec des mouvements de myosine, un réarrangement du cytosquelette et donc des mouvements membranaires. Plus précisément, des filaments ou pseudopodes se forment à travers la contraction de l'actine polymérisée et de la myosine aboutissant à la formation d'une cavité phagocytaire pour englober le pathogène (**Figure 12**).

Une fois le phagosome formé dans le cytosol et fusionné avec les granules, deux mécanismes cytotoxiques distincts peuvent être enclenchés. Le premier implique une réaction oxydative via l'assemblage simultané du complexe NADPH oxydase (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) à la membrane de la vacuole qui conduit à la production de ROS. Le deuxième mécanisme, de nature non-oxydative, repose sur la libération du contenu des granules directement dans le phagosome. Ces deux processus contribuent ainsi à l'élimination définitive du pathogène. Il est important de noter que ces deux processus bactéricides peuvent être également enclenchés à la surface membranaire du neutrophile pour éliminer les pathogènes extracellulaires.



**Figure 12. Étapes de maturation du phagosome du neutrophile.**

(1) Les neutrophiles reconnaissent les pathogènes, opsonisés ou non, via leurs récepteurs. (2) Cette reconnaissance initie une cascade de signalisation activant la polymérisation de l'actine nécessaire à la formation de pseudopodes. Sous le mouvement d'actine-myosine, la cavité phagocytaire se forme, englobant le pathogène. (3) La dépolymérisation de l'actine conduit à la fermeture du phagosome. A ce stade, les membranes des granules du neutrophile s'assemblent à la membrane du phagosome. (4) Le phagosome peut alors se détacher de la membrane plasmique du neutrophile et se trouver au sein du cytosol où les mécanismes oxydatifs et non-oxydatifs activés vont contribuer à l'élimination du pathogène.

## (b) Production de dérivés toxiques

La diversité de protéines préexistantes au sein des granules confère aux neutrophiles une capacité d'action rapide face au danger. Entre autres, les neutrophiles sont capables de générer une explosion oxydative, un processus résultant de la production rapide de composés toxiques tels que les ROS et les RNS, notamment avec la participation du complexe NADPH oxydase, des enzymes MPO et NOS (*Nitric oxide synthase*) (Teng et al. 2017).

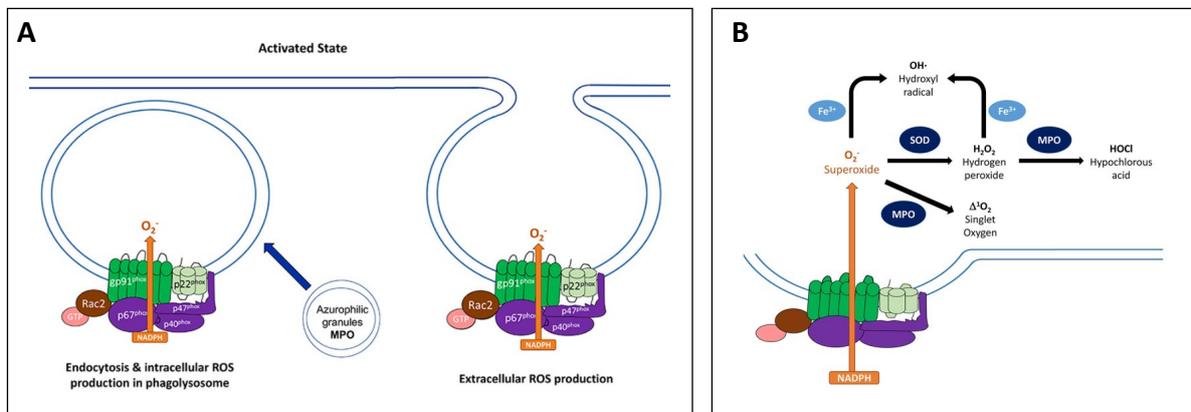
- La production de ROS

Les ROS sont un groupe de molécules relativement nocives pour les agents pathogènes. Diverses entités cellulaires sont capables de générer des ROS, y compris les cellules épithéliales et les macrophages ainsi que les CSH et les cellules endothéliales. Toutefois, les neutrophiles demeurent les cellules qui en produisent le plus (Begum et al. 2022).

La production de ROS provient majoritairement de l'activation du complexe NADPH oxydase en dormance, résultant de l'assemblage de glycoprotéines membranaires et cytosoliques (El-Benna et al. 2016) (**Figure 13A**). Plus précisément, des protéines telles que p67phox (NCF2), p40-phox (NCF4) et p47phox (NCF1) mais également Rac1 et Rac2 présentes dans le cytosol, s'associent au complexe membranaire dimérique préformé, le cytochrome  $b_{558}$ , préférentiellement fourni par les granules spécifiques. La formation du complexe entraîne le transfert d'électrons à partir du NADPH activé dans le cytosol à des molécules d'oxygène au sein du phagosome, générant d'importantes quantités d'anions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). L' $O_2^{\cdot-}$  agit comme le principal précurseur des ROS existants dont le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'acide hypochloreux (HOCl), qui est le substrat de la MPO délivrée par les granules primaires au sein du phagosome (**Figure 13B**). Ces molécules sont capables de dégrader les lipides, les protéines et les acides nucléiques des pathogènes, ce qui aboutit à leur destruction (El-Benna et al. 2016; Nguyen, Green, et Meccas 2017).

Il est important de noter que l'implication du complexe NADPH oxydase dans la défense immunitaire est cruciale, comme cela a été démontré chez les patients atteints de maladie granulomateuse chronique. En effet, ces patients présentent une vulnérabilité accrue aux infections bactériennes et fongiques (Dinauer, Leksstrom-Himes, et Dale 2000). Cette pathologie est caractérisée par diverses mutations génétiques affectant la formation de ce complexe comme la mutation du gène *NCF1* codant pour p47phox et qui représente 25% des

cas ou bien celle touchant le gène qui code pour la protéine gp91phox, *CYBB*, dont la mutation liée à l'X représente la cause la plus sévère (Dinauer 2016).



**Figure 13. Formation du complexe NADPH oxidase.**

(A) Une fois les neutrophiles activés, les protéines cytosoliques et membranaires s'assemblent pour former et activer le complexe NADPH oxidase, au sein du phagosome (panel de gauche) ou sur la membrane extracellulaire (panel de droite). L'activation du complexe entraîne le transfert transmembranaire d'électrons pour former l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . (B) L' $O_2^{\cdot-}$  représente le précurseur d'une réaction en chaîne pour la formation d'autres composés toxiques, notamment en  $OH^{\cdot}$  sous la réaction d'ions ferriques  $Fe^{3+}$ . L'enzyme « superoxyde dismutase » (SOD) réduit l' $O_2^{\cdot-}$  en un dérivé toxique, le  $H_2O_2$ , qui peut être ensuite réduit en molécule d'eau  $H_2O$  pour limiter les dommages (non montré). La MPO, délivrée par les granules azurophiles, convertit l' $O_2^{\cdot-}$  en dérivés toxiques tels que l'oxygène singulet mais aussi l' $H_2O_2$  en HOCl, qui représente le dérivé oxygéné le plus toxique. Adapté de (Nguyen, Green, et Meccas 2017).

- La production de RNS

Les neutrophiles sont également capables de produire du monoxyde d'azote (NO), un dérivé nitré, en réponse à des stimuli inflammatoires tels que le TNF, l'IL-1 et l'IFN- $\gamma$  ou la reconnaissance directe d'un agent bactérien (Saini et Singh 2019). Le NO est une molécule gazeuse, réactive et de courte durée de vie, qui joue un rôle crucial dans la régulation de divers processus physiologiques et immunitaires. Dans le contexte des neutrophiles, la production de NO peut être réalisée grâce à l'enzyme oxyde nitrique synthase, exclusivement sous sa forme inductible (iNOS – *inducible Nitric oxide synthase* ou nommée aussi NOS2). L'activation de l'iNOS conduit à la déamination de la L-arginine en NO et en citrulline.

Le NO et l' $O_2^{\cdot-}$  agissent de concert pour former les RNS, tels que les peroxy-nitrites ( $ONOO^{\cdot-}$ ), qui sont dotées d'un pouvoir antimicrobien relativement puissant. A la différence des ROS, les dérivés nitrés sont produits au sein des granules azurophiles des neutrophiles (Saini et Singh 2019). Ces molécules sont très réactives et nocives pour les agents pathogènes, elles ciblent aussi bien les composés lipidiques, protéiques et nucléaires provoquant la dégradation de la

perméabilité de la membrane des pathogènes et par conséquent leur mort (Winterbourn, Kettle, et Hampton 2016).

Le NO produit par les neutrophiles peut avoir plusieurs effets bénéfiques dans la réponse immunitaire. Il peut agir comme un agent antimicrobien en perturbant les fonctions cellulaires essentielles des agents pathogènes, y compris les bactéries et les parasites intracellulaires. De plus, le NO peut moduler la réponse inflammatoire en régulant la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et la migration des cellules immunitaires vers le site d'infection (Saini et Singh 2019).

Cependant, il est important de noter que la production excessive de NO ou de RNS peut également avoir des effets néfastes, contribuant à des dommages cellulaires et tissulaires. Dans certaines conditions pathologiques, une production excessive de NO peut être associée à une inflammation chronique, à des lésions tissulaires et à des maladies auto-immunes.

### (c) La dégranulation

Comme la libération de ROS, le neutrophile est également capable de libérer son contenu dans le compartiment extracellulaire afin d'éliminer les pathogènes non phagocytés. Dans ce contexte, la membrane des vésicules sécrétoires et des granules tertiaires préférentiellement fusionne avec la membrane plasmique du neutrophile tandis que les granules azurophiles et les granules spécifiques sont plus sollicités pour la formation du phagosome (Eichelberger et Goldman 2020). Ainsi, grâce à leurs fonctions décrites précédemment, les protéines libérées contribuent à l'élimination des microorganismes.

### (d) La NETose

La NETose (*Neutrophil Extracellular Traps formation*) est un mécanisme de défense spécifique des neutrophiles (Brinkmann et al. 2004). Ces cellules libèrent des structures tridimensionnelles appelées NET dans le but de piéger les microorganismes extracellulaires. L'activation des neutrophiles par des composés physiologiques tels que le fMLP, le LPS, la pneumolysine de *S. pneumoniae* ou des stimuli non physiologiques tel que le PMA (*phorbol-myristate acetate*) provoquent la libération de structures fibreuses (Brinkmann et al. 2004; Fuchs et al. 2007). Ces structures résultent de la dégradation nucléaire des neutrophiles, relâchant un réseau de fibres constitué d'ADN décondensé et enroulé autour d'histones. Les NETs contiennent également des protéines des granules telles que la MPO, l'élastase du neutrophile et la cathepsin G, qui éliminent alors les microorganismes piégés (Brinkmann et al. 2004).

Bien que des expérimentations sur la compréhension de la NETose aient grandement émergé depuis une dizaine d'années, les mécanismes sous-jacents de la production de NET ne sont pas encore totalement identifiés (pour revue : Boeltz et al. 2019). Certains décrivent un processus de mort active ou suicidaire des neutrophiles. Dans ce contexte, des chercheurs ont montré la coopération entre l'élastase du neutrophile et la MPO dans la décondensation de la chromatine après la production de ROS (Papayannopoulos et al. 2010) tandis que d'autres ont suggéré l'implication de la PDA4 (*peptidylarginine deiminase-4*), qui convertit l'arginine en citrulline, ce qui engendre un dépôt important de charges positives sur les histones et donc une décondensation de la chromatine (Leshner et al. 2012). Une autre variante de NETose dite « vitale », où les neutrophiles conservaient leur intégrité cellulaire, impliquait la libération d'ADN mitochondrial, et non d'ADN nucléaire (Yousefi et al. 2009). Ce processus dépendait de la production de ROS, via la chaîne respiratoire mitochondriale, et qui suggérait donc un autre processus impliqué dans la production de ROS chez les neutrophiles.

Bien que la NETose soit bénéfique pour combattre les infections, elle peut également avoir des conséquences néfastes si elle est excessive. Des niveaux élevés de NETs sont associés à des maladies auto-immunes et inflammatoires, car les NETs peuvent endommager les tissus hôtes (Boeltz et al. 2019). Par conséquent, il est crucial de maintenir un équilibre dans la fonctionnalité des neutrophiles afin de préserver l'intégrité des cellules et des tissus.

En outre, durant l'inflammation, les neutrophiles présentent une prolongation de leur survie, ce qui peut être favorable pour la résolution de l'inflammation. Cependant, leur persistance excessive dans les tissus peut engendrer des effets néfastes liés aux molécules libérées. Ainsi, les neutrophiles peuvent être éliminés soit par la formation de NETs, soit par l'apoptose ou le processus de nécrose, avant d'être totalement digérés par efferocytose via les macrophages (Dąbrowska et al. 2019).

## D. Importance du neutrophile au cours de l'infection pulmonaire à *S. pneumoniae*

L'accumulation abondante de neutrophiles dans les tissus enflammés est une caractéristique des infections bactériennes, en particulier celles provoquées par *S. pneumoniae* (Doerschuk et al. 1994). A l'inverse, une diminution de leur nombre, lors de neutropénies, augmente considérablement le risque de développer une pneumonie au pneumocoque (Roston et al. 2001). De nombreuses études ont convergé pour souligner l'importance cruciale des neutrophiles dans

la protection contre le pneumocoque. Dans des modèles murins, la déplétion des neutrophiles, en utilisant des anticorps anti-Ly6G avant l'infection, a entraîné une incapacité à éliminer les bactéries, se traduisant par une augmentation des colonies bactériennes dans les poumons et le sang (Garvy et Harmsen 1996). Le blocage de leur mobilisation à l'aide d'un antagoniste du récepteur CXCR2 a également compromis la survie des animaux infectés avec *S. pneumoniae* (Herbold et al. 2010).

L'élucidation des mécanismes bactéricides des neutrophiles impliqués dans la lutte contre *S. pneumoniae* s'est avérée néanmoins complexe. En effet, la présence de facteurs de virulence du pneumocoque perturbe les mécanismes de défense bactéricides des neutrophiles (Brooks et Mias 2018). Les études ont souvent montré l'inefficacité des mécanismes de phagocytose et de ROS contre certaines souches de pneumocoques en raison de la virulence de la capsule et des composés microbiens comme la pneumolysine. En revanche, la production de ROS via la NADPH oxydase serait essentielle au recrutement, à l'activation et à une apoptose retardée des neutrophiles au cours de l'infection (Marriott et al. 2008). Ce constat a été récemment remis en question par une étude récente suggérant que l'efficacité des ROS sur l'éradication du pneumocoque proviendrait d'un mécanisme dépendant de la mitochondrie et non du complexe NADPH oxydase (Herring et al. 2022). Finalement, les mécanismes de NETose, ainsi que la dégranulation, semblent être les mécanismes les plus efficaces pour éradiquer la bactérie (pour revue : Domon et Terao 2021). L'incapacité des neutrophiles à libérer leur contenu était associée à l'aggravation de la pneumonie (Herbold et al. 2010). De plus, une étude a révélé l'importance *in vitro* des sérine protéases telles que l'élastase, la cathepsine G et la protéinase 3 dans la neutralisation des facteurs de virulence du pneumocoque (Standish et Weiser 2009). Des travaux chez la souris ont confirmé l'effet protecteur des neutrophiles au cours de l'infection à *S. pneumoniae* via l'activité de ces protéases. En effet, des souris déficientes pour la cathepsin G et l'élastase avaient une charge bactérienne pulmonaire plus élevée que les animaux sauvages (Hahn et al. 2011).

Cependant, un recrutement excessif de neutrophiles, associé à une régulation non contrôlée de leurs mécanismes bactéricides, peut s'avérer néfaste et contribuer à la progression de la pneumonie (Domon et Terao 2021). En effet, des cas de pneumonie étaient liés à une infiltration neutrophilique importante à l'origine d'une détérioration de la pathologie et d'une survie altérée. C'est pourquoi une régulation appropriée, notamment via leur élimination par les macrophages et la libération de médiateurs anti-inflammatoires sont des mécanismes essentiels dans le contrôle de la pneumonie à *S. pneumoniae*.



# **Objectifs**

A l'heure actuelle, la prévention vaccinale et les traitements antibiotiques ne suffisent pas à contenir les infections à *S. pneumoniae*. En conséquence, ce pathogène est répertorié par l'OMS comme faisant partie des bactéries pour lesquelles de nouvelles alternatives antibiotiques sont urgentes (« WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed » s. d.). Dans ce contexte, la recherche se tourne vers la coopération entre les antibiotiques et le système immunitaire de l'organisme, une piste prometteuse explorée dans de nombreuses études (Anuforum, Wallace, et Piddock 2015).

En ce qui concerne les infections pulmonaires à *S. pneumoniae*, (i) les mécanismes d'action des  $\beta$ -lactamines et (ii) la réponse immunitaire innée ont été largement étudiés et documentés de manière indépendante. Cependant, à la vue de la littérature récente, il est tout à fait envisageable que ces deux mécanismes interagissent, notamment suite à la libération de composés bactériens par les pneumocoques tués par ces antibiotiques, ceux-ci pouvant déclencher la réponse innée chez l'hôte. Cette hypothèse suggère que les  $\beta$ -lactamines ont besoin du système immunitaire pour être efficace.

Dans ce contexte, notre étude s'est intéressée à l'impact potentiel d'un traitement par AMX, la  $\beta$ -lactamine couramment utilisée en première intention, sur les acteurs de l'immunité innée. Nous avons utilisé un modèle murin de pneumonie à *S. pneumoniae* chez des souris préalablement exposées au virus de la grippe et traitées efficacement avec de l'AMX. Dans ce contexte, nous avons étudié (i) la réponse inflammatoire, (ii) le recrutement des neutrophiles, étant donné leur importance au cours de l'infection à *S. pneumoniae* et (iii) leur développement dans la MO.

Les résultats obtenus font l'objet d'une publication en révision favorable dans *Journal of Leukocyte Biology* et qui est présentée sous sa forme originale en Annexe II.

Titre de l'article: **Amoxicillin treatment of pneumococcal pneumonia impacts bone marrow neutrophil maturation and function.**

Mondemé M., Zeroual Y., Soulard D., Hennart B., Beury D., Saliou J.M., Carnoy C., Sirard J.C. and Faveeuw C.



# **Matériels et Méthodes**



## A. Culture bactérienne de *S. pneumoniae*

La souche de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 2 (D39V) utilisée a été obtenue auprès de J.W. Veening Laboratory (University of Lausanne, Switzerland) (Slager, Aprianto, et Veening 2018). Des colonies fraîches cultivées sur gélose au sang de mouton 5% (Biomerieux) sont mises en culture en milieu liquide Todd Hewitt Yeast Broth (THYB) et incubées à 37°C sous CO<sub>2</sub> jusqu'à obtenir une DO<sub>600nm</sub> entre 0.7-0.9 unités. Les cultures sont conservées à -80°C dans du milieu THYB contenant 12% de glycérol (vol./vol.) pendant 3 mois (*working stock*). Pour les infections intranasales, un tube de *working stock* est décongelé, lavé deux fois avec du PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) puis dilué à la concentration attendue.

## B. Modèle murin d'infection et de traitement antibiotique

### Autorisation et normes de sécurité

Pour les élevages et les expérimentations, des souris mâles et femelles C57BL/6J âgées entre 7 à 10 semaines ont été fournies par le laboratoire Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Les souris CX3CR1<sup>gfp/+</sup> ont été obtenues après le croisement de souris CX3CR1<sup>gfp/gfp</sup> homozygotes (Jackson laboratory, USA) et de souris C57BL/6J. Les souris ont été maintenues dans des cages ventilées au sein de l'animalerie confinée de niveau de sécurité biologique 2 de l'Institut Pasteur de Lille. L'élevage et les expérimentations animales ont été réalisés selon protocoles établis (E59-350 009, Institut Pasteur de Lille ; Protocol APAFIS 16966-20180531141769v3).

### Modèle d'infection

Pour les infections, les souris ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale (i.p.) de 1.25 mg de ketamine et 0.25 mg de xylazine diluées dans 250 µl de PBS. Dans un premier temps, les souris ont été infectées par voie intra-nasale (i.n.) avec 70 PFU (*plaque-forming units*) de virus influenza A (IAV) H3N2 Scotland/20/74 dans 30 µl de PBS afin de les sensibiliser pour l'infection bactérienne. Sept jours plus tard, les souris ont été infectées avec 5x10<sup>4</sup> CFU (*Colony-forming Unit*) de *S. pneumoniae* dans 30 µl de PBS (i.n.).

## Traitement antibiotique

Le stock d'amoxicilline trihydratée (Sigma-Aldrich) est préparé dans de l'eau déionisée (1,75 mg/mL) puis conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Douze heures après l'infection à *S. pneumoniae*, une partie des souris ont reçu 150 µg d'AMX (Merck, Lyon, France) dans 200 µl d'eau par voie intragastrique (i.g.) (groupe IAV/Sp/AMX) et l'autre partie n'a pas été traitée (IAV/Sp). En parallèle, des souris seulement infectées par le virus de la grippe ont également reçu par voie orale l'AMX (groupe IAV/AMX).

## Dénombrement des bactéries et survie des animaux

Pour évaluer la charge bactérienne dans le poumon et la rate, les souris ont été sacrifiées à différents temps après injection intra-péritonéale (i.p.) de 11,4 mg de pentobarbital de sodium dans 200 µL de PBS. Les tissus ont été prélevés dans du PBS stérile puis broyés dans 1 mL de PBS à l'aide d'un UltraTurrax homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany). La charge bactérienne a également été évaluée dans la MO des animaux, 12h après traitement AMX. Pour cela, le fémur des animaux a été prélevé et les cellules de MO ont été préparées selon le protocole précédemment décrit (Heib et al. 2021) puis homogénéisées. Des dilutions sériées à partir des homogénats tissulaires et cellulaires ont été réalisées puis étalées sur gélose au sang. Les bactéries viables ont été comptabilisées après incubation des géloses à 37°C + 5% CO<sub>2</sub> pendant 24 h. La survie et la perte de poids des souris ont été contrôlées tous les jours après les infections.

## Modèle *in vivo* d'inflammation

Chez les souris surinfectées et traitées ou non par AMX, du LPS (Ultrapure, *Escherichia coli* O111:B4) a été administré par injection intrapéritonéale à la dose de 5 µg par souris dans 200 µL de PBS 12 h après l'AMX. Les fémurs, les poumons et le liquide péritonéal ont été prélevés cinq heures plus tard et des préparations cellulaires ont été préparées pour une analyse par cytométrie en flux.

## C. Quantification de l'AMX par LC-MS/MS (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem)

Les souris C57Bl/6J ont été infectées i.n. par IAV puis par Sp 7 jours plus tard. Ensuite, les souris ont reçu une dose unique de 150 µg d'AMX 12 h après l'infection par Sp. Le sang a été rapidement prélevé à 0,167-0,5-1-3-6-8 et 12h après le traitement. Les sérums ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. Des échantillons de calibrage (CAL) et de contrôle de qualité (QC) ont été préparés avec une solution aqueuse d'AMX à un sérum groupé de souris, ce qui a donné une gamme de concentrations de 0,05-10 µg/mL.

Une procédure analytique basée sur la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en tandem, utilisant l'ionisation par électrospray (LC-ESI/MS/MS), a été développée par l'unité de toxicologie du Centre Hospitalier Universitaire de Lille. Le sérum (50 µl) a été analysé après ajout de 200 µL de méthanol contenant du méthyl-clonazépam (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à 1,25 mg/L, utilisé comme étalon interne. Les échantillons ont été mélangés et centrifugés (14000 g, 4°C, 10 min) et le surnageant (20 µL) a été mélangé au tampon de formiate d'ammonium (180 µL). 10 µL de ce mélange ont été injectés sur un système UPLC-MS-MS (Acquity TQ-XS Detector, Waters, Milford, MA) équipé d'une colonne HSS C18 (1,8µm ; 2,1x150mm ; 40°C ; Waters). Une méthode d'élution en gradient a été choisie avec un débit de 0,4 mL/min et un temps d'exécution analytique total de 6,5 min. Le formiate d'ammonium 5mM (phase mobile A) et l'acétonitrile (phase mobile B), tous deux additionnés de 0,1% (V/V) d'acide formique, ont été utilisés pour l'élution. Les ions de chaque composé analysé ont été détectés en mode ion positif en utilisant la surveillance des réactions multiples. Le logiciel Chromalinks (Waters) a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données.

## D. Analyses transcriptionnelles par RT-qPCR

### Extraction et rétro-transcription de l'ARN

L'ARN de poumons broyés et de neutrophiles triés de MO ont été conservés dans du tampon de lyse RA1 (Macherey-Nagel) permettant de bloquer la dégradation des ARN par les RNases (Macherey-Nagel) et additionné de 2% de TCEP (Tris(2- carboxyethyl)phosphine), un agent réducteur. L'extraction de l'ARN a été réalisée selon le protocole du kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel, Duren, Allemagne). Les ARN totaux sont élués dans 30 µL d'eau *RNA-free* pour une évaluation qualitative et quantitative par spectrophotométrie à 260nm et 280nm au moyen du système Nanovue (GE Healthcare). Une transcription inverse est ensuite réalisée sur

1 µg d'ARN en utilisant le kit cDNA Archive (Applied Biosystems) et contenant des amorces aléatoires (Random Priming) et des dNTPs (dinucléotides tri- phosphates).

### PCR en temps réel et analyse

L'expression des gènes est ensuite analysée par PCR quantitative en temps réel sur les ADN complémentaires (ADNc) obtenus, en plaques de 384 puits et en utilisant des amorces spécifiques de gènes d'intérêt (**Tableau 1**) et la technologie SYBR green (Applied Biosystems). L'amplification est réalisée et suivie en temps réel par mesure de la fluorescence émise au moyen d'un QuantStudio™ 12K Flex Real- Time PCR System (Applied Biosystems). Pour chaque couple d'amorces, un contrôle de la spécificité de l'amplification a été réalisé en remplaçant l'ADNc par de l'eau. L'intensité de fluorescence détectée à chaque cycle d'amplification est proportionnelle à la concentration de transcrits des gènes cibles et est déterminée par la valeur du cycle seuil (Ct) en phase exponentielle. Cette valeur a été normalisée à deux gènes de référence ( $\Delta Ct = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{référence}}$ ), l'actine  $\beta$  (*Actb*) et la bêta-2-microglobuline (*B2m*) dont l'expression reste constante au cours du temps. L'expression relative d'ARN dans l'échantillon est obtenue selon la formule suivante :  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct \text{ échantillon}} - 2^{-\Delta Ct \text{ contrôle}}$ . Les gènes avec des valeurs de Ct supérieures à 35 cycles ont été considérées comme indétectables.

<b>Gène cible</b>	<b>Amorce sens (F)</b>	<b>Amorce anti-sens (R)</b>
<i>B2m</i>	TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC	GGGTGGCGTGAGTATACTTGAA
<i>Actb</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
<i>Il1β</i>	AATCTATACCTGTCCTGTGTA	TGGGTATTGCTTGGGATCCA
<i>Tnf</i>	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT
<i>S100a9</i>	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT	TGTCATTTATGAGGGCTTCATTT

<i>Cxcl2</i>	CCCTCAACGGAAGAACCAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC
<i>Csf3</i>	CCTGGAGCAAGTGAGGAAGA	CAGCTTGTAGGTGGCACACA
<i>Lcn2</i>	CCATCTATGAGCTACAAGAGAACAAT	TCTGATCCAGTAGCGACAGC
<i>S100a8</i>	ATCCTTTGTCAGCTCCGTCTT	TCTCCAGTTCAGACGGCATT
<i>Mmp8</i>	AACGGGAAGACATACTTCTTCATAA	GGGTCCATGGATCTTCTTTG

**Tableau 1. Liste des amorces utilisées pour les analyses transcriptionnelles par RT-qPCR**

## E. Analyses des protéines par dosages ELISA

La production d'IL-6 et de G-CSF a été quantifiée dans le sérum des souris par *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Pour ce faire, des kits de dosage commerciaux incluant les anticorps de capture/détection ainsi que le protocole d'utilisation ont été utilisés (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Une solution contenant les anticorps de capture a été absorbée toute une nuit à 4°C sur des plaques Maxisorp de 96 puits ThermoScientific®. Dans 8 puits par plaque, une série de dilutions de 2 en 2 d'une solution contenant l'antigène cible de concentration connue a été effectuée afin d'établir une gamme étalon. Entre chaque étape, 3 à 7 lavages ont été réalisés en PBS-Tween® 20 à 0,05%. Les sérums dilués dans un milieu contenant du PBS/10% de SVF ont été incubés 2h à température ambiante à l'obscurité dans les puits contenant l'anticorps de capture. Des témoins négatifs ou blancs contenant uniquement le milieu PBS/10%SVF ont également été déposés sur chaque plaque pour obtenir le bruit de fond du test. La détection est effectuée à l'aide d'un anticorps biotinylé dirigé spécifiquement contre la cytokine étudiée, sur lequel est fixé la streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*). L'addition d'un substrat spécifique de la HRP (Tétraméthylbenzidine ou TMB (BD Biosciences)) a permis de révéler de façon colorimétrique la réaction enzymatique. Après environ 15 minutes d'incubation dans l'obscurité, la révélation a été stoppée par ajout de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La lecture de l'absorbance (DO) a été effectuée sur un lecteur de plaque Multiskan Fc (ThermoScientific®) à 450 nm. Les imperfections telles que les contaminations du plastique ou les impuretés dans les puits ont été éliminées par une lecture à 570nm. Les résultats ont été déterminés à partir de la gamme étalon par régression linéaire ( $R^2 > 0,95$ ) à l'aide du logiciel

Skanit Software 3.1 (ThermoScientific®). Les résultats ont été analysés après correction de la DO selon la formule :

$$DO_{\text{analytique}} = (DO_{450\text{nm}} - DO_{570\text{nm}})_{\text{échantillon}} - (DO_{450\text{nm}} - DO_{570\text{nm}})_{\text{blanc}}$$

## F. Analyses par cytométrie en flux

### Préparations cellulaires

#### (a) Cellules de sang

Après injection intra-péritonéale d'une dose létale de pentobarbital de sodium, le sang des souris a été prélevé par ponction intra-orbitale puis collecté dans un tube eppendorf contenant de l'héparine. Ensuite, 150 µl de sang hépariné ont été transférés dans un tube de 15 ml. Les globules rouges ont été lysés après ajout d'un tampon de lyse (Pharmlyse, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) pendant 5 minutes. Après centrifugation, les cellules ont été reprises dans du PBS contenant 2% de SVF (Sérum de veau fœtal), des antibiotiques (Pénicilline (100 UE/mL) - Streptomycine (100 µg/ml)) (Peni-Strepto) et de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) (0,01%).

#### (b) Cellules de poumons

Les poumons ont été perfusés avec du PBS puis récupérés dans du milieu RPMI 1640/Peni-Strepto2%SVF. Ils ont été ensuite finement hâchés à l'aide de ciseaux dans une boîte de pétri puis incubés à 37°C pendant 20 minutes dans un milieu de digestion contenant 1 mg/ml de collagénase VIII (Sigma-Aldrich) et 1 µg/ml de DNase de type I (Sigma-Aldrich). Les poumons digérés ont été dissociés à l'aide d'une seringue et une aiguille (20G), filtrés sur un carré de nylon de 90 µm et lavés avec du milieu RPMI/Péni-Strepto/2%SVF (tube de 15 mL). Les suspensions cellulaires ont ensuite été centrifugées 10 minutes à 1400 rpm. Après élimination du surnageant, les globules rouges ont été lysés (Pharmlyse) pendant 3 minutes. Les cellules ont été ensuite lavées avec du milieu. Après centrifugation, les culots ont été repris dans 10ml de Percoll 20% puis les tubes ont été centrifugés 12 minutes à 2000 rpm sans frein. Après élimination du Percoll, les culots ont été lavés puis filtrés avec du PBS/Peni-Strepto/2%SVF/0,01%NaN<sub>3</sub>. Les cellules ont été ensuite comptées sur cellule de Neubauer avec du bleu trypan ; 3 à 5x10<sup>6</sup> cellules ont servi pour le marquage d'anticorps avant l'analyse par la cytométrie en flux.

### (c) Cellules de MO

Après sacrifice des animaux, les fémurs et tibias ont été prélevés puis collectés dans du milieu PBS/2%SVF/Peni-Strepto/0,01%NaN<sub>3</sub>. Les cellules de MO ont été isolées par la méthode de centrifugation décrite précédemment (Heib et al. 2021). Après centrifugation, les globules rouges ont été lysés pendant 3 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées avec du milieu puis filtrées avec du PBS/SVF/Peni-Strepto/NaN<sub>3</sub>. Après comptage dans du bleu trypan, 3 à 5x10<sup>6</sup> cellules ont été utilisées pour le marquage d'anticorps.

### (d) Cellules du péritoine

Les cellules de péritoine ont été obtenues après injection de 5 ml de PBS froid dans la cavité péritonéale. Après des massages de la cavité abdominale, les suspensions cellulaires ont été collectées par aspiration à l'aide d'une seringue puis centrifugées pendant 10 minutes à 1400 rpm. Les cellules ont finalement été resuspendues dans du PBS/2%SVF/PeniStrepto/0,01%NaN<sub>3</sub> avant le marquage.

### Réactifs et anticorps utilisés pour la cytométrie en flux

Les anticorps monoclonaux (Acs) murins dirigés contre CD3 (biotin-conjugated), NK1.1 (biotin-conjugated), Ter119 (biotin-conjugated), CD45R/B220 (biotin-conjugated), CD117 (Brilliant Violet (BV) 711-conjugated), Scal (APC-conjugated), CD34 (PE-conjugated), CD16/CD32 (PE/Cy7-conjugated), Ly6G (BV711- or APC-conjugated), CD11b (BV785-conjugated), Ly6C or Gr1 (Percp/Cy5.5-conjugated), Siglec-F (PE/CF594 or APC-conjugated), CD45 (BV510, PE, APC, APC-Cy7 or Alexa Fluor 700-conjugated), CD115 (BV421-conjugated), CXCR2 (BV510 or PE-conjugated), CXCR4 (APC-conjugated), CD101 (PE-conjugated), CD62L (PE-conjugated), Ki-67 (APC-conjugated) and BV605-conjugated streptavidin ont été fournies par Biolegend (Paris, France), BD Biosciences (Le Pont de Claix, France) ou eBioscience (Thermo Fisher Scientific)(Tableau 2). Le linéage (Lin) inclut CD3, NK1.1, Ter119, CD11b, CD45R/B220, Ly6G. L'iodide de propidium provient de Biolegend.

Antibody (Fluorochrome(s))	Clone	Supplier
Anti-mouse CD3 (biotin)	145-2C11	BioLegend

Anti-mouse NK1.1 (biotin)	PK136	BioLegend
Anti-mouse Ter119 (biotin)	TER-119	BioLegend
Anti-mouse CD45R/B220 (biotin)	RA3-6B2	BioLegend
Anti-mouse CD117 (BV711)	2B8	Biolegend
Anti-mouse Sca1/Ly-6A/E (APC)	D7	Biolegend
Anti-mouse CD34 (PE)	RAM34	BD Biosciences
Anti-mouse CD16/CD32 (PE-Cy7)	2.4G2	BD Biosciences
Anti-mouse Ly6G (BV711 or APC)	1A8	BioLegend
Anti-mouse CD11b (BV785)	M1/70	BioLegend
Anti-mouse Gr1 (Percp-Cy5.5)	RB6-8C5	BioLegend
Anti-mouse Ly6C (Percp-Cy5.5)	HK1.4	BioLegend
Anti-mouse Siglec F (PE-CF594)	E50-2440	BD Biosciences
Anti-mouse Siglec F (APC)	S17007I	BioLegend
Anti-mouse CD45 (BV510, PE, APC, APC-Cy7 or AF700)	30-F11	Biolegend
Anti-mouse CD115 (BV421)	T38-320	Biolegend
Anti-mouse CXCR2 (BV510)	V48-2310	BD Biosciences
Anti-mouse CXCR2 (PE)	SA044G4	BioLegend
Anti-mouse CXCR4 (APC)	2B11	BD Biosciences
Anti-mouse CD101 (PE)	Moushi101	eBioscience
Anti-mouse CD62L (PE)	MEL-14	eBioscience
Anti-mouse Ki-67 (APC)	11-F6	BioLegend

**Tableau 2. Liste des anticorps monoclonaux utilisés pour la cytométrie en flux.**

## Marquage d'anticorps monoclonaux extracellulaire et intracellulaire

Les marquages ont été réalisés dans des plaques de 96 puits à fond rond. Les suspensions cellulaires ont été resuspendues avec 50 µl de milieu d'anticorps puis incubées à l'obscurité et dans la glace pendant 20 min. Pour le marquage intra-nucléaire de Ki67, les cellules ont été fixées puis perméabilisées selon les recommandations du kit Foxp3 Fixation/Permeabilization kit (Invitrogen) après le marquage extracellulaire. Elles ont ensuite été incubées avec l'anticorps anti-Ki67 à l'obscurité et pendant 20 min à température ambiante.

## Analyse et acquisition des données

L'acquisition et l'analyse des échantillons ont été effectuées à l'aide d'un cytomètre en flux de type LSR Fortessa (BD Biosciences). Les réglages de compensation ont été effectués avec des billes sur lesquelles sont fixés les anticorps cités ci-dessus. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Flow Jo V10 (Tree Star, USA). Après avoir défini une région sur le FSC (*Forward Scatter*) et SSC (*Side Scatter*), l'analyse phénotypique des cellules myéloïdes a été réalisée au sein des cellules CD45<sup>+</sup> (marqueur leucocytaire) selon la stratégie de *gating* suivante : *GMPs*: Lin<sup>-</sup>ckit<sup>+</sup>sca1<sup>-/+</sup>CD34<sup>+</sup>CD16/CD32<sup>high</sup>CX3CR1<sup>-</sup>Ly6C<sup>-</sup>CD115<sup>-</sup>; *GPs*: Lin<sup>-</sup>ckit<sup>+</sup>sca1<sup>-/+</sup>CD34<sup>+</sup>CD16/CD32<sup>high</sup>CX3CR1<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>CD115<sup>-</sup> et *neutrophiles totaux*: Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup> (Siglec-F<sup>-</sup> pour le poumon) composés dans la MO de neutrophiles immatures (CXCR2<sup>low</sup>CD101<sup>-</sup>) et matures (CXCR2<sup>high</sup>CD101<sup>+</sup>). Dans la majorité des expériences, les cellules mortes ont été exclues grâce à l'iodide de propidium ajouté quelques minutes avant l'analyse.

Les neutrophiles matures de MO (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup>CXCR2<sup>high</sup>) ont été triés à l'aide du FACSaria III cell sorter (BD Biosciences) et le taux de pureté a été évalué comme supérieur à 98% par FACS.

## G. Identification intravasculaire des neutrophiles pulmonaires

Les souris ont reçu une infection intra-orbitale de 5 µg d'anticorps APC-labelled rat anti-CD45. L'anticorps a pu circuler pendant 5 minutes afin de marquer tous les leucocytes dans l'espace vasculaire (Barletta et al. 2012). Après perfusion, les poumons ont été prélevés et les suspensions cellulaires ont été préparées comme décrit précédemment. Ensuite, elles ont été marquées avec un mix d'anticorps pour la détection des neutrophiles dont l'anticorps BV510-

labelled anti-CD45 pour identifier tous les leucocytes. Les neutrophiles marginés ont été identifiés comme population doublement positive pour CD45-APC et CD45-BV510.

## H. Tests fonctionnels des neutrophiles de MO

### Évaluation de la production de ROS

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) a été évaluée à l'aide du kit CellROX Deep Red Reagent (Invitrogen) par cytométrie en flux. Brièvement, les cellules de MO ( $5 \times 10^5$ /ml) ont été resuspendues dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2% de SVF puis incubées ou non avec du tert-butyl hydroperoxide (TBHP, 400  $\mu$ M) à 37°C pendant 15 min. Ensuite, le réactif CellROX (500 nM) a été ajouté et les cellules ont été incubées à 37°C pendant 30 min. Après lavages, les cellules ont été marquées avec un mix d'anticorps approprié pour l'identification des neutrophiles matures. Quelques minutes avant l'acquisition, le réactif SYTOX blue a été ajouté afin d'exclure les cellules mortes. Comme contrôles négatifs, les cellules de MO ont été incubées avec du N-acetyl-cysteine (NAC, 1 mM) pendant 30 min à 37°C avant le traitement avec TBHP. L'analyse de la médiane d'intensité de fluorescence (MFI) du réactif CellROX a fourni une évaluation semi-quantitative de la production d'ERO.

### Évaluation de la phagocytose

Pour évaluer la capacité phagocytaire, les cellules de MO ( $1 \times 10^6$ /ml) ont été déposées dans une plaque de 96 puits puis resuspendues avec des bioparticules pHrodo™ Red (killed *E. Coli*) (Invitrogen) pendant 1 h à 37°C 5%CO<sub>2</sub>. Comme contrôles négatifs, des cellules de MO ont été incubées avec les bioparticules à 4°C. Après lavages, les cellules ont été marquées avec le mix d'anticorps approprié pour l'identification de neutrophiles matures. Le pourcentage et la MFI des neutrophiles matures de MO positifs pour *E.coli*-pHrodo ont été quantifiés par cytométrie en flux.

## I. Analyse RNA-sequencing (RNA-seq)

L'ARN total de neutrophiles matures triés ( $5 \times 10^6$ ) de MO de souris infectées et (ou non) traitées a été extrait pour une analyse transcriptomique par la méthode RNA-seq. La qualité de l'ARN a été évaluée par spectrophotométrie (Nanodrop) et le contrôle RIN à l'aide de TapeStation

4200 (Agilent Technologies). Les bibliothèques de données ont été préparées selon les recommandations du kit QIAseq stranded mRNA library (Qiagen). Toutes les bibliothèques ont été contrôlées avec TapeStation 4200 et quantifiées par qPCR (KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms, KapaBiosystems). Les données ont été normalisées et poolées de façon équimolaire, avant d'effectuer le séquençage à l'aide du séquenceur NovaSeq (Illumina)(2x150bp). Les données RNA-seq ont été générées sous le format FASTQ puis alignées au génome de la souris (GRCm39) à l'aide du logiciel d'alignement STAR (STAR-2.7.10a). Les « reads » alignés ont été ensuite annotés à l'aide du logiciel GENCODE M30 gtf. Une analyse différentielle de l'expression des gènes annotés a été réalisée en utilisant le logiciel DESeq2 (R version 4.2.1). Les gènes associés à un facteur de risque (FDR) inférieur à 0.5 ont été considérés comme gènes différentiellement exprimés (DEGs) puis utilisés pour générer un volcano plot. Une analyse sur-représentative a été réalisée à partir de l'ensemble des DEGs pour mettre en évidence les Gene Ontology (GO) (GO Biological Process 2021 et GO Cellular Component) les plus significativement enrichis à l'aide de la méthode Enrichr (Chien et al. 2013).

## J. Analyse protéomique par spectrométrie de masse

Les neutrophiles matures de la MO ( $5 \times 10^5$ ) ont été collectés pour l'analyse protéomique. Les cellules triées ont été lavées deux fois dans du PBS à 200 g pendant 3 minutes. Les culots ont été remis en suspension dans 20  $\mu$ l de tampon de chargement Trupage contenant du dithiothréitol (DTT) (Sigma-Aldrich). Les échantillons ont été conservés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à leur utilisation. La LC-MS/MS a été réalisée à l'aide du système UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pour l'élution des peptides. Les peptides ont été identifiés à l'aide du logiciel Proteome Discoverer (v.1.4) (ThermoFisher Scientific). Les spectres de masse ont été recherchés dans la base de données UniProtKB (taxonomie 10090, avril 2022, 88037 entrées) limitée à *Mus musculus* à l'aide du moteur de recherche Mascot (version 2.4.0, Matrix Science, London, UK). La tolérance de masse a été fixée à 0,02 Da pour les ions précurseurs et à 10 ppm pour les ions fragments. Une mauvaise cassure trypsine a été prise en compte ainsi que des modifications chimiques de la cystéine (carbamidométhylation et propionamidation), de la méthionine (oxydation) et de l'acétylation de l'extrémité N-terminale de la protéine. Les résultats de l'identification ont été validés à l'aide du logiciel Proline. Les spectres de peptides supérieurs à 9 résidus et les scores d'ions  $> 10$  ont été retenus. Seuls les peptides ayant un taux de fausse découverte  $< 1\%$  ont été pris en compte pour l'analyse (en

utilisant le score Mascot Modified Mudpit). Le nombre de spectres a été quantifié avec Proline 2.0. Les données protéomiques de la spectrométrie de masse ont été déposées auprès du ProteomeXchange Consortium via le dépôt partenaire PRIDE (Perez-Riverol et al. 2021) avec l'identifiant de jeu de données PXD042496 et 10.6019/PXD042496.

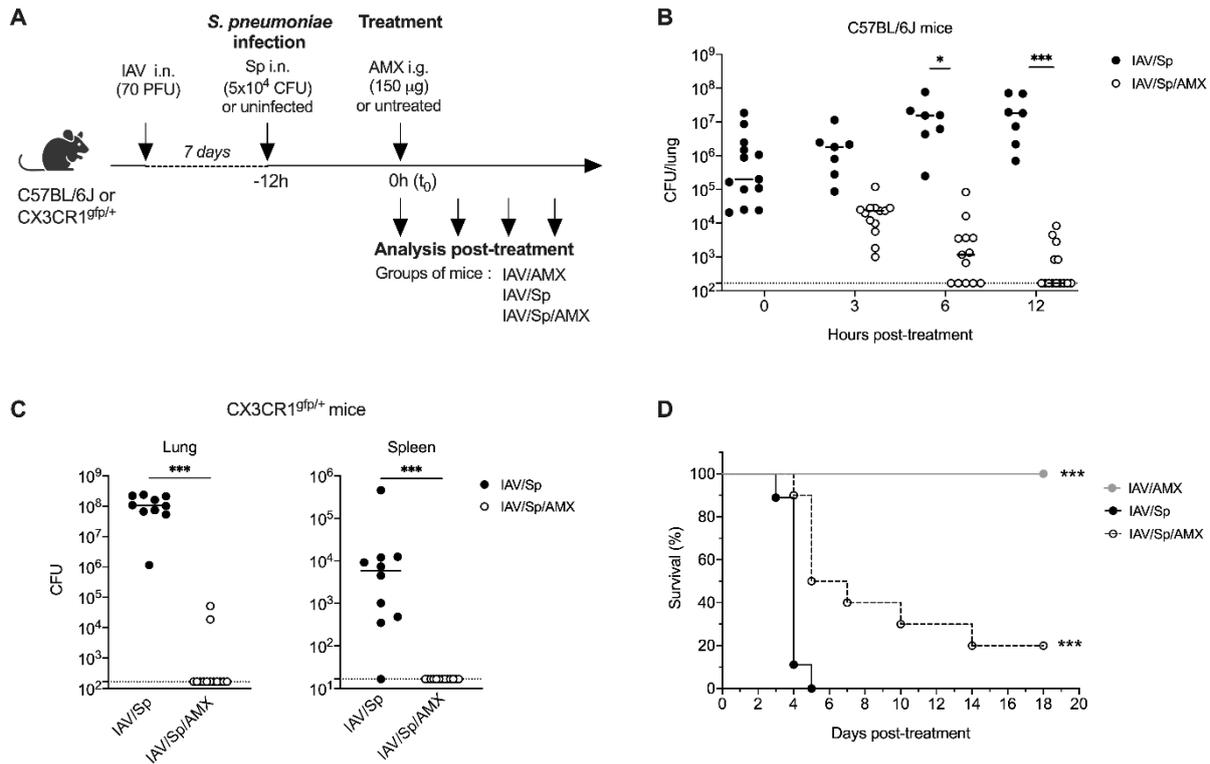
## K. Tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software®). Le T-test non apparié ou le test One-way ANOVA suivi du test de correction Bonferroni ont été utilisés lorsque deux groupes ou plus ont été analysés, respectivement. Lorsque les données ne suivaient pas une distribution de type gaussienne, la statistique significative a été évaluée à l'aide des tests non paramétriques Mann-Whitney pour les échantillons binaires ou Kruskal-Wallis pour les expériences à plus de deux groupes. Le test Two-way ANOVA a été utilisé lorsque deux paramètres ou plus ont été étudiés. Les données sur la survie des souris ont été comparées à l'aide de la méthode Kaplan-Meier et du log-rank test. Une différence significative entre les différents paramètres étudiés est représentée pour un  $p < 0.05$  par « \* », pour un  $p < 0.01$  par « \*\* », pour un  $p < 0.001$  par « \*\*\* » et pour un  $p < 0.0001$  par « \*\*\*\* ».

# **Résultats**

## A. L'administration d'une dose unique d'AMX protège contre la surinfection par *S. pneumoniae*

Afin de tester l'efficacité d'une dose intragastrique unique d'AMX, nous avons mis en place un modèle murin de surinfection pneumococcique chez des souris C57BL/6 et CX3CR1<sup>gfp/+</sup>, couramment utilisées en cytométrie en flux pour identifier les sous-populations de cellules de la lignée myéloïde. Les animaux ont été infectés avec une dose sub létale d'IAV, suivie 7 jours plus tard de *S. pneumoniae* à la dose de  $5 \times 10^4$  CFU (**Figure 14A**). Chez les souris non traitées, la charge bactérienne a augmenté progressivement avec le temps et a atteint  $1,8 \times 10^7$  CFU dans les poumons 24 heures après l'infection pneumococcique (**Figures 14B et 14C**). Un nombre élevé de bactéries a également été détecté dans la rate 24 heures après l'inoculation de *S. pneumoniae*, ce qui suggère que les bactéries disséminent des poumons vers le sang (**Figure 14C**). Dans le groupe traité à l'antibiotique, les animaux ont reçu une seule dose intragastrique d'AMX (150 µg par souris, 7,5 mg/kg) 12 h après l'infection bactérienne. Ce point temporel a été défini comme le t0 pour toutes les analyses (**Figure 14A**). Avec ce schéma thérapeutique, la concentration sérique d'AMX a atteint un pic de 2,88 µg/ml 30 min après l'administration, avant de chuter rapidement et de devenir indétectable 8 h après son administration (**Figure S1**). Le traitement par AMX a progressivement diminué les charges bactériennes dans les poumons et la rate, et les bactéries ont été éliminées presque complètement 12 h après le début du traitement (**Figures 14B et 14C**). Le traitement par AMX a été associé à un taux de survie significativement plus élevé par rapport aux souris infectées non traitées (**Figure 14D**). Dans l'ensemble, ces données indiquent que (i) les deux souches de souris ont développé des surinfections pneumococques similaires après une infection par IAV et (ii) la dose de traitement AMX sélectionnée a été efficace en termes de réduction de la charge bactérienne et d'amélioration de la survie.



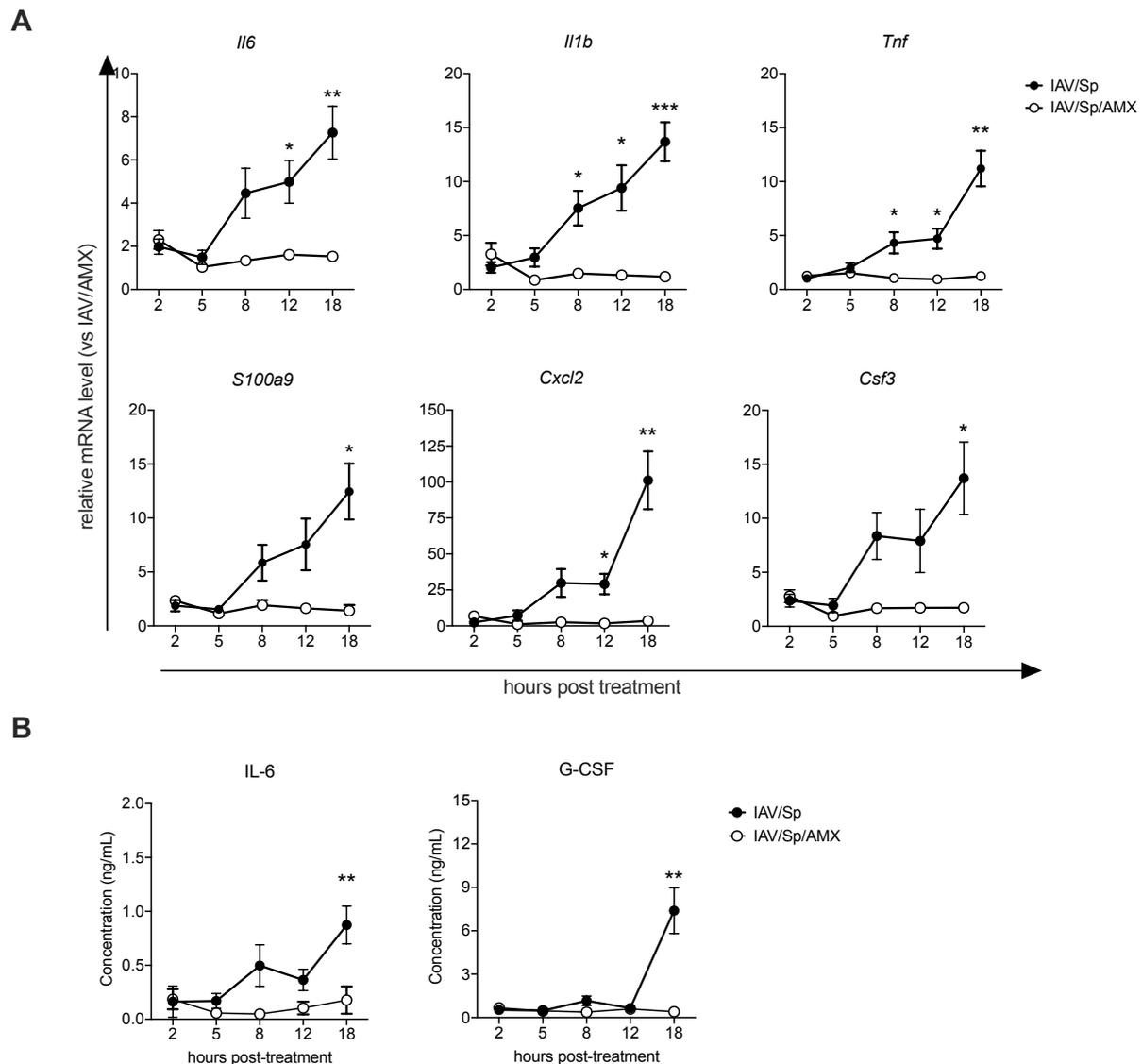
**Figure 14. Une dose unique d'AMX protège contre la surinfection par *S. pneumoniae*.**

(A) Des souris C57BL/6J ou CX3CR1<sup>gfp/+</sup> ont été infectées par voie intranasale (i.n.) avec le virus de la grippe A (IAV) et sept jours plus tard avec 5x10<sup>4</sup> Colony Forming Units (CFU) de *S. pneumoniae* (Sp). Les souris ont été traitées par voie intragastrique (i.g.) avec de l'amoxicilline (AMX) 12 h après l'infection avec Sp (définie par le terme t<sub>0</sub>) (IAV/Sp/AMX) ou n'ont pas été traitées (IAV/Sp). Comme groupe témoin, des souris uniquement infectées avec IAV ont également été traitées par AMX (IAV/AMX). Les poumons (B, C) et la rate (C) ont été prélevés à différents moments après le traitement (B) ou 12 heures après le traitement (C), broyés et déposés en dilutions sériées sur des géloses au sang pour mesurer la charge bactérienne. Le nombre de CFU est évalué dans les tissus pour chaque souris. La ligne continue représente la valeur médiane et la ligne en pointillé représente le seuil de détection. Les données représentent les résultats regroupés de deux expériences indépendantes, chaque symbole représentant une souris individuelle (n = 6-14). (B) \* p < 0,05 et \*\*\* p < 0,001 (test two-way ANOVA). (C) \*\*\* p < 0,001 (Mann-Whitney). (D) Le taux de survie des souris C57BL/6J infectées par IAV uniquement ou IAV/Sp traitées ou non par AMX a été contrôlé quotidiennement pendant 18 jours. Les données ont été comparées par un test de log-rank (\*\*\*, p < 0,001).

## B. L'administration d'AMX réduit la réponse inflammatoire pendant l'infection par *S. pneumoniae*

Nous avons ensuite évalué l'effet du traitement par AMX sur la production de divers facteurs liés à l'immunité innée, notamment les cytokines inflammatoires IL-6, IL-1β et TNF, la chimiokine CXCL2, le facteur de croissance G-CSF et le peptide antimicrobien S100A9. À cette fin, les poumons et les sérums d'animaux surinfectés traités (ou non) par AMX ont été prélevés à différents moments après le traitement. Les niveaux d'ARNm dans les poumons et les concentrations de protéines de cytokines/facteurs de croissance dans le sang ont été quantifiés et normalisés par rapport à ceux mesurés chez les animaux infectés uniquement avec

IAV et traités à l'AMX. Nous avons constaté qu'en l'absence de traitement par AMX, la transcription des gènes *Il6*, *Il1b*, *Tnf*, *S100a9*, *Cxcl2* et *Csf3* augmentait au fil du temps après l'infection par *S. pneumoniae* (**Figure 15A**). Les concentrations sériques d'IL-6 et de G-CSF étaient également plus élevées au bout de 18 heures (**Figure 15B**).



**Figure 15. Le traitement à l'AMX des animaux infectés réduit la réponse inflammatoire.**

Des souris C57BL/6J ont été infectées par Sp sept jours après l'infection par IAV, puis traitées par AMX 12 heures après l'infection par Sp (IAV/Sp/AMX) ou non (IAV/Sp). À titre de contrôle, les souris uniquement infectées par IAV ont été traitées par AMX (IAV/AMX). Les poumons et le sang ont été prélevés à différents moments après le traitement. (A) L'expression relative de gènes sélectionnés dans les poumons a été évaluée par RT-qPCR. Pour chaque gène, le niveau d'ARNm est normalisé par rapport aux gènes de référence *Actb* et *B2m*, puis par rapport au groupe de référence IAV/AMX. (B) Les concentrations d'IL-6 et de G-CSF dans le sérum ont été mesurées par ELISA. Les données représentent les résultats regroupés de deux expériences indépendantes ( $n = 10$ ) et sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (\*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$  et \*\*\*,  $p < 0,001$  ; test two-way ANOVA).

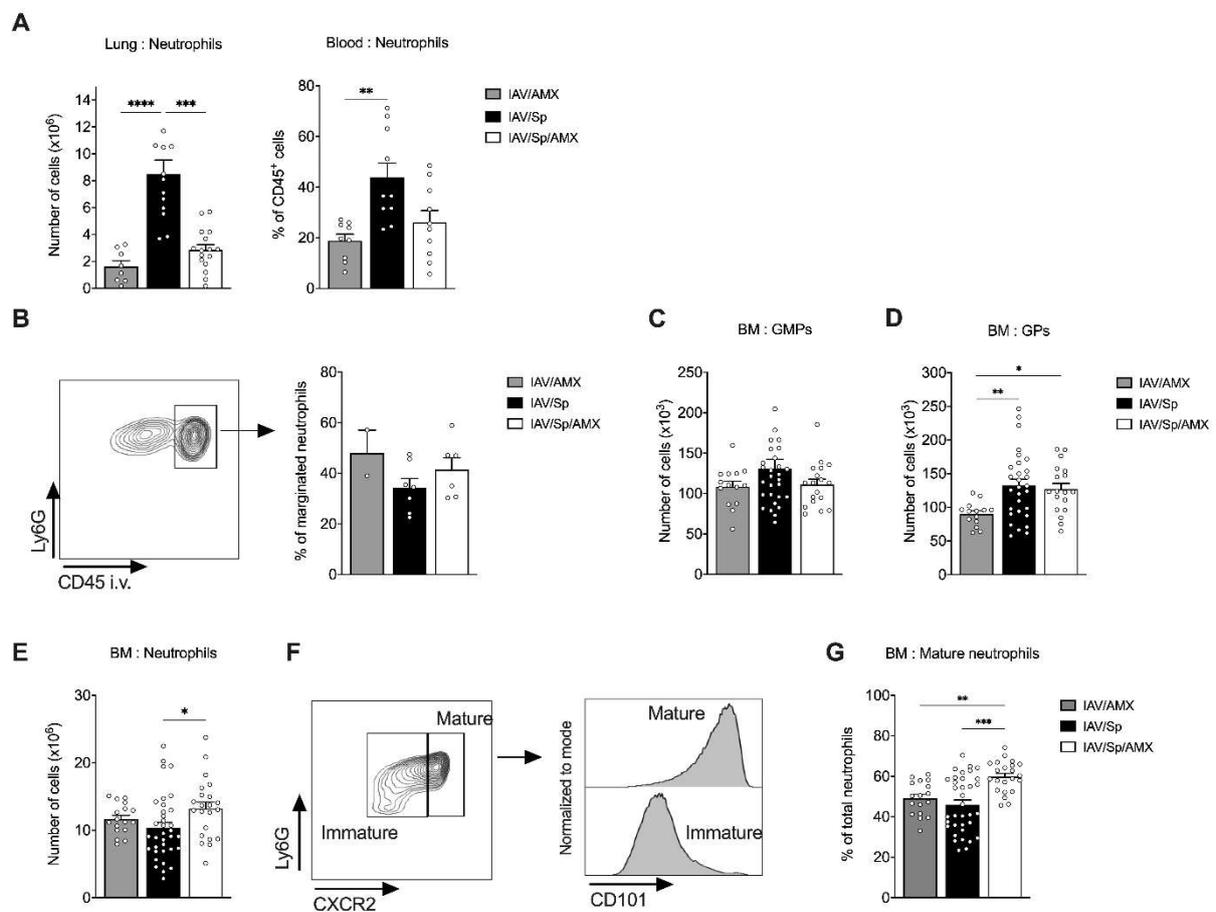
À  $t_0$  (12 heures après l'infection), les souris IAV/Sp et les souris uniquement IAV, ne présentaient pas de différence significative en ce qui concerne les niveaux d'ARNm des composants du système immunitaire inné ou le niveau sérique d'IL-6 (**Figures S2A et S2B**). La concentration sérique de G-CSF était légèrement plus élevée chez les animaux IAV/Sp que chez les animaux IAV seuls (**Figure S2B**). Le traitement par AMX des animaux surinfectés (c'est-à-dire IAV/Sp/AMX) a abrogé l'expression des transcrits des gènes inflammatoires et la production systémique d'IL-6 et de G-CSF à tous les moments après le traitement (**Figures 15A et 15B**). En plus d'éliminer de manière efficace les bactéries, ces résultats montrent que l'AMX a également empêché le déclenchement des réponses inflammatoires locales et systémiques liées à l'infection à *S. pneumoniae*.

### C. Le traitement à AMX favorise la maturation des neutrophiles de la MO

La lutte de l'hôte contre la pneumonie à *S. pneumoniae* dépend du recrutement rapide de neutrophiles dans les poumons - un processus régulé (au moins en partie) par des molécules inflammatoires comme IL-1 $\beta$ , TNF, CXCL1/2 et S100A9 (Palmer et Kimmey 2022 ; De Filippo et al. 2014 ; Jones et al. 2005 ; Paudel et al. 2019). Afin d'établir si l'inhibition de l'inflammation locale et systémique associée à l'AMX affecte la mobilisation des neutrophiles, nous avons donc déterminé le nombre de neutrophiles pulmonaires et sanguins chez les animaux traités à l'AMX. A  $t_0$  (12h après l'infection), le nombre de neutrophiles dans les poumons (mais pas dans le sang) était légèrement plus élevé chez les animaux surinfectés que chez les animaux infectés uniquement avec IAV (**Figure S2C**). Douze heures plus tard, des augmentations significatives du nombre de neutrophiles dans les poumons et dans le sang ont été observées chez les animaux IAV/Sp (**Figure 16A**). Le traitement par AMX a totalement supprimé le recrutement des neutrophiles dans les poumons, mais pas dans le sang, par rapport aux animaux non traités (**Figure 16A**). Nous avons constaté que moins de la moitié des neutrophiles pulmonaires étaient localisés dans le système vasculaire après l'infection par *S. pneumoniae* et que le traitement par AMX n'influait pas leur localisation (**Figure 16B**).

La mobilisation aiguë des neutrophiles dans les tissus infectés nécessite la production rapide de ces cellules dans la MO. Nous avons donc étudié les effets potentiels d'une infection pneumococcique secondaire et du traitement par AMX sur la génération de *novo* de neutrophiles dans la MO. Il est important de noter qu'aucune colonie bactérienne n'a été

détectée dans la moelle osseuse des animaux surinfectés et traités ou non à l'AMX (**Figure S3A**). En utilisant la stratégie de marquage décrite dans la **Figure S3B**, nous avons quantifié le nombre de progéniteurs de neutrophiles (c'est-à-dire les GMP et les GP), de neutrophiles immatures et de neutrophiles matures dans la MO d'animaux surinfectés non traités et traités à l'AMX (**Figures 16C, 16D et S2D**). Avant l'administration d'AMX ( $t_0$ ), les groupes IAV/Sp et IAV étaient similaires en termes de nombres de GMP, GP, nombre total de neutrophiles et de neutrophiles matures (**Figure S2D**).



**Figure 16. Le traitement à l'AMX des animaux infectés favorise la maturation des neutrophiles de la MO.** Des souris CX3CR1<sup>gfp/+</sup> ont été infectées par Sp sept jours après l'infection par IAV et traitées par AMX 12 heures après l'infection par Sp (IAV/Sp/AMX) ou non (IAV/Sp). Comme contrôle, les souris uniquement infectées par IAV ont été traitées par AMX (IAV/AMX). (A) Le nombre absolu de neutrophiles pulmonaires et la fréquence des neutrophiles sanguins ont été évalués par cytométrie de flux 12 heures après le traitement. (B) Un diagramme de points FACS représentatif du marquage CD45 in vivo des neutrophiles pulmonaires est présenté dans le panneau de gauche. Les moyennes  $\pm$  SEM du pourcentage de neutrophiles pulmonaires CD45<sup>+</sup> (pool marginé) sont indiquées (n=6-7). Le nombre absolu de GMP (C) et de GP (D) de la BM a été quantifié par cytométrie de flux. (E) Nombre absolu de neutrophiles de la BM. (F) Stratégie de sélection des neutrophiles matures dans la BM en fonction de l'expression de Ly6G, CXCR2 et CD101 et (G) fréquence des neutrophiles matures de la BM par rapport au nombre total de neutrophiles. Les moyennes  $\pm$  SEM des réplicats biologiques d'au moins trois expériences indépendantes sont représentées (n = 9-14) (\*, p < 0,05, \*\*, p < 0,01, \*\*\*, p < 0,001 et \*\*\*\*, p < 0,0001 ; test de Kruskal-Wallis).

Le nombre absolu de GMP n'a pas varié de manière significative après l'infection bactérienne et le traitement par AMX (**Figure 16C**). En revanche, le nombre de GP a augmenté significativement lors de l'infection par *S. pneumoniae* (**Figure 16D**). Il est intéressant de noter que le traitement par AMX n'a pas modifié le nombre de GP par rapport aux animaux surinfectés non traités et qu'il est resté élevé par rapport aux animaux infectés uniquement avec IAV. Alors que le nombre total de neutrophiles n'a pas changé de manière significative lors de l'infection par *S. pneumoniae*, le traitement par AMX a été associé à une augmentation de cette variable (**Figure 16E**). Il convient de noter que, comme indiqué dans la littérature, la proportion de neutrophiles en prolifération était beaucoup plus faible que la proportion de progéniteurs de neutrophiles (**Figure S3C**) (Nies et al. 2018 ; Evrard et al. 2018). En outre, le traitement par AMX n'a pas influencé la proportion de GMP, GP et neutrophiles en prolifération identifiés à l'aide du marqueur intranucléaire Ki-67.

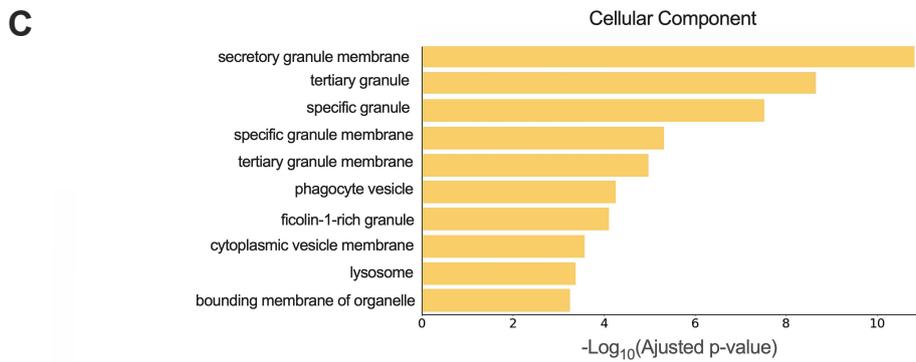
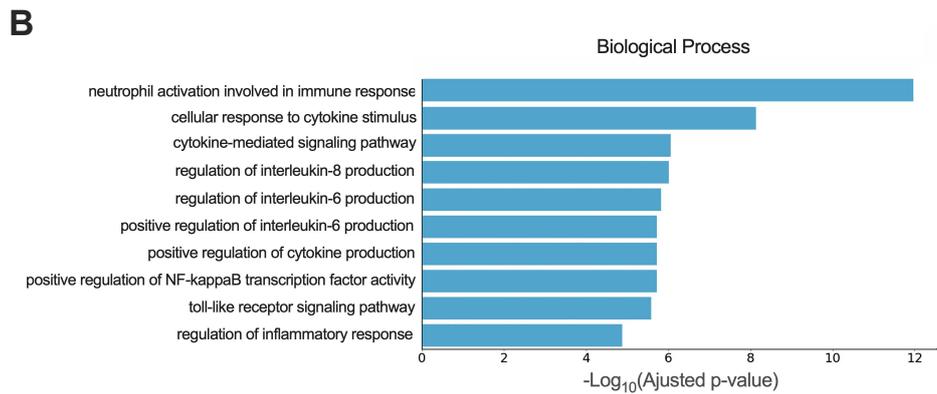
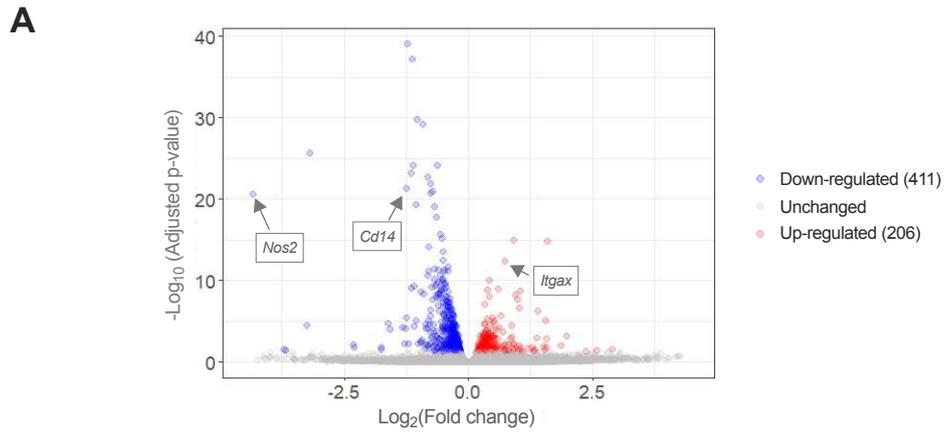
Les neutrophiles matures ont ensuite été identifiés sur les différences d'expression de CXCR2 et de CD101, ce dernier marqueur s'étant récemment révélé spécifique de cette population cellulaire (**Figure 16F**) (Evrard et al. 2018). Il est intéressant de noter que le traitement par AMX a augmenté de manière significative la proportion de neutrophiles matures dans la MO, par rapport aux animaux surinfectés non traités ou aux animaux infectés avec IAV (**Figure 16G**). Dans l'ensemble, ces données indiquent que le traitement par AMX d'une infection pneumococcique secondaire influence la maturation des neutrophiles dans la MO.

#### D. Les neutrophiles matures de la MO ont des profils transcriptionnels et protéomiques spécifiques au cours du traitement de la surinfection par AMX.

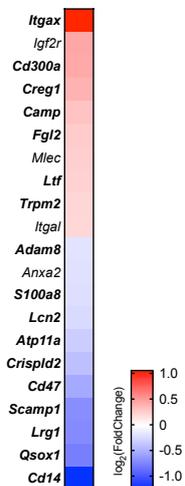
Pour mieux comprendre la biologie des neutrophiles matures de la MO, nous avons effectué une analyse RNA-seq des cellules exprimant Ly6G et CXCR2 provenant d'animaux surinfectés traités (ou non) par AMX pendant 12 heures (**Figure 17**). Au total, 617 gènes exprimés de manière différentielle (DEG) ont été identifiés dans les neutrophiles de la MO des animaux traités par AMX : 206 étaient régulés à la hausse et 411 à la baisse, par rapport aux neutrophiles de la MO des animaux non traités (**Figure 17A**).

Pour mieux comprendre la relation entre les DEG et la fonction des neutrophiles matures, nous avons utilisé la méthode Enrichr pour effectuer une analyse d'enrichissement de l'ontologie des gènes (GO). L'analyse des processus biologiques a révélé que le traitement par AMX

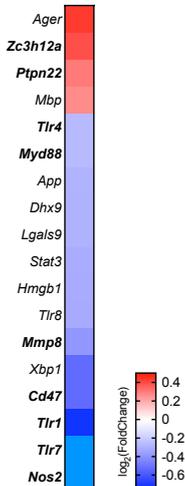
enrichissait de manière significative les gènes liés à l'activation et à la dégranulation des neutrophiles ainsi que les gènes impliqués dans la production/régulation des cytokines (par ex. *Il6*) (**Figure 17B**). Les DEG relatifs aux composants cellulaires liés aux granules et aux vésicules phagocytaires ou sécrétoires ont également été enrichis de manière significative (**Figure 17C**). Plus précisément, le traitement par AMX a été associé à une baisse de l'expression des gènes associés à la reconnaissance des pathogènes (*Tlr4*, *Tlr7*, *Myd88* et *Cd14*), au transport des vésicules (*Scamp1* et *Atp11a*), à l'inflammation (*Mmp8*, *Sl00a8*, *Adam8*, *Lrg1* et *Lcn2*), au stress oxydatif (*Nos2* et *Qsox1*) et à la régulation immunitaire (*Cd47* et *Crispld2*) (**Figures 17D-17F** et **S4A**). Certains des gènes régulés à la baisse ont été sélectionnés pour être confirmés par RT-qPCR (**Figure S4B**). En ce qui concerne les composants cellulaires, le traitement par AMX a été associé à une diminution de l'expression de *Clec4e* (codant pour une lectine de type C phagocytaire) et des gènes *Rab23*, *Rab20* et *Rab31* liés au RAS (connus pour leur rôle crucial dans la maturation des phagosomes) (**Figure 17F**). Il est intéressant de noter que l'un des gènes régulés à la hausse (*Itgax*, codant pour la protéine CD11c de la chaîne de l'intégrine X) a récemment été identifié comme étant essentiel pour la régulation de la maturation des neutrophiles dans la MO (**Figures 17A et 17D**) (Hou et al. 2022). Le traitement par AMX a été associé à une plus grande expression des gènes liés à l'immunité innée (*Unc93b1*, *Camp*, *Ltf* et *Mpeg1*), à l'endocytose/phagocytose (*Creg1*, *Tcirg1* et *Hvcn1*) et à la régulation de l'inflammation (*Cd300a*, *Fgl2*, *Trpm2*, *Zc3h12a* et *Ptpn22*) (**Figures 17D-17F**). De plus, une analyse protéomique semi-quantitative des neutrophiles matures de la MO a identifié un certain nombre de protéines modulées par le traitement AMX (**Figure S4C**). Certaines des protéines régulées à la baisse étaient liées au remodelage du cytosquelette (protéine WAS, RHOA et VAV) ou à l'activité des neutrophiles (NCF4 (une sous-unité de la NADPH oxydase cruciale pour la production de ROS), galectine-9 et Rab31) ; Rab31 a également été identifiée dans l'analyse RNA-seq (**Figure 17F**). En revanche, certaines des protéines régulées à la hausse par le traitement AMX étaient liées au système du complément et à la cascade de la coagulation. Nos résultats montrent qu'au cours d'une surinfection, l'AMX régule principalement à la baisse les gènes liés à l'activation, mais aussi à la hausse les gènes associés à la phagocytose/endocytose et à la régulation au sein des neutrophiles matures de la MO.



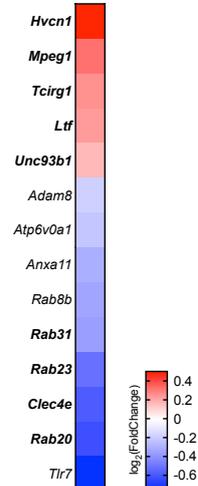
**D** Neutrophil activation involved in immune response



**E** Regulation of IL-6 production



**F** Phagocyte vesicle

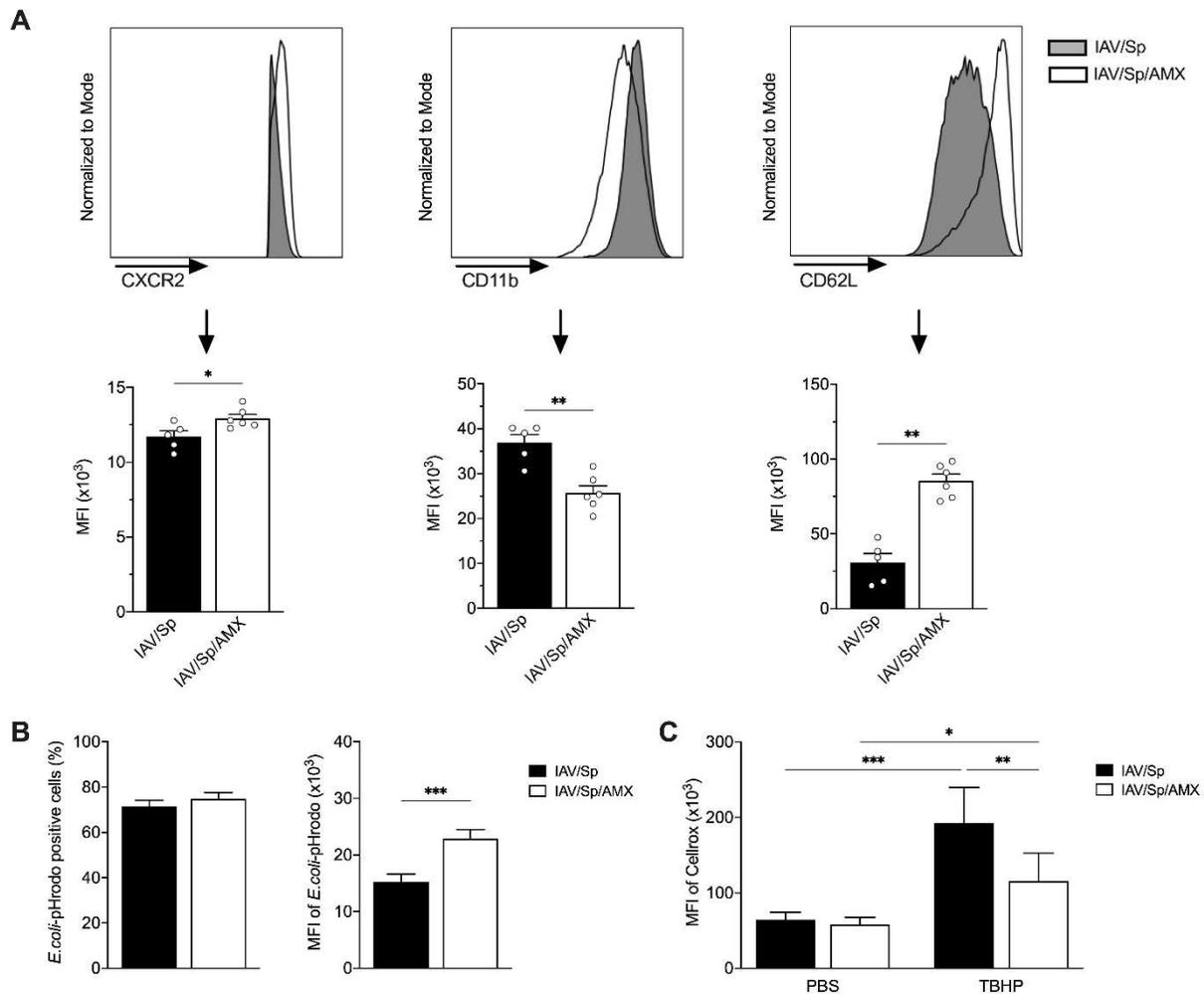


**Figure 17. Le traitement à l'AMX modifie le profil transcriptionnel des neutrophiles matures de la MO.**

Des souris CX3CR1<sup>sp/+</sup> ont été infectées par Sp sept jours après l'infection par IAV et traitées avec AMX 12 heures après l'infection par Sp (IAV/Sp/AMX) ou non (IAV/Sp). Les souris ont été sacrifiées 12 heures après le traitement. Les neutrophiles matures de la MO ont été triés sur la base de l'expression de Ly6G et de CXCR2 et l'ARN a été purifié pour une analyse RNA-seq. (A) Volcano plot montrant  $-\log_{10}$  (valeur p ajustée) et  $\log_2$  (Fold change) pour les gènes différentiellement exprimés (DEG) chez les animaux traités à l'AMX par rapport aux souris non traitées. Chaque point représente un gène. Les points bleus (downregulated) et rouges (upregulated) sont les gènes avec un  $\log_2$  significatif (fold change) et une p-value ajustée  $< 0,05$ . (B-C) Analyse d'enrichissement de l'ontologie des gènes (GO) sur les DEG identifiés à l'aide d'Enrichr. Les 10 termes GO les plus significativement enrichis des gènes cibles dans les processus biologiques (B) et les composants cellulaires (C) sont présentés. (D-F) Heat-map montrant l'expression ( $\log_2$  (FoldChange)) des DEG les plus enrichis associés au processus biologique "activation des neutrophiles impliqués dans la réponse immunitaire" (D), tous les DEG liés au processus biologique "régulation de la production d'IL-6" (E) et les composants cellulaires "vésicule phagocytaire" (F). Les données représentent des triplicats biologiques, chaque réplicat étant un pool de trois souris par groupe.

## E. Le traitement à l'AMX impacte l'activation et les fonctions des neutrophiles matures de la MO.

Nous avons ensuite cherché à établir si le traitement par AMX des animaux surinfectés influençait ou non l'activation et les fonctions effectrices des neutrophiles matures de la MO. À cette fin, nous avons utilisé des approches de cytométrie en flux pour mesurer l'expression des marqueurs associés à l'activation cellulaire, à la phagocytose et à la production de ROS dans les neutrophiles matures parmi un échantillon de cellules totales de MO récoltées chez des animaux surinfectés traités (ou non) par AMX (**Figure 18**). Le traitement par AMX a renforcé l'expression de CXCR2 et de CD62L à la surface des neutrophiles matures de la MO, tandis que l'expression de CD11b était plus faible que chez les animaux non traités, ce qui indique un phénotype moins activé/amorcé (**Figure 18A**). En utilisant des bioparticules pHrodo conjuguées à *E.coli*, nous avons montré que le traitement par AMX ne modifiait pas la proportion de neutrophiles matures de la MO capables de phagocyter les particules *in vitro*, mais qu'il augmentait significativement l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de pHrodo au sein de ces neutrophiles (**Figures 18B et S5A**). Ce résultat suggère que les neutrophiles matures de la MO des animaux traités par AMX ont une capacité de phagocytose plus élevée. Il convient de noter que le blocage de la phagocytose en incubant les neutrophiles avec des particules d'*E. coli* à 4°C, a diminué le pourcentage de cellules pHrodo positives et la MFI de pHrodo dans des proportions pratiquement identiques dans les deux groupes (**Figure S18A**). Ces résultats suggèrent que les neutrophiles matures provenant d'animaux traités à l'AMX ont une capacité de phagocytose plus élevée.



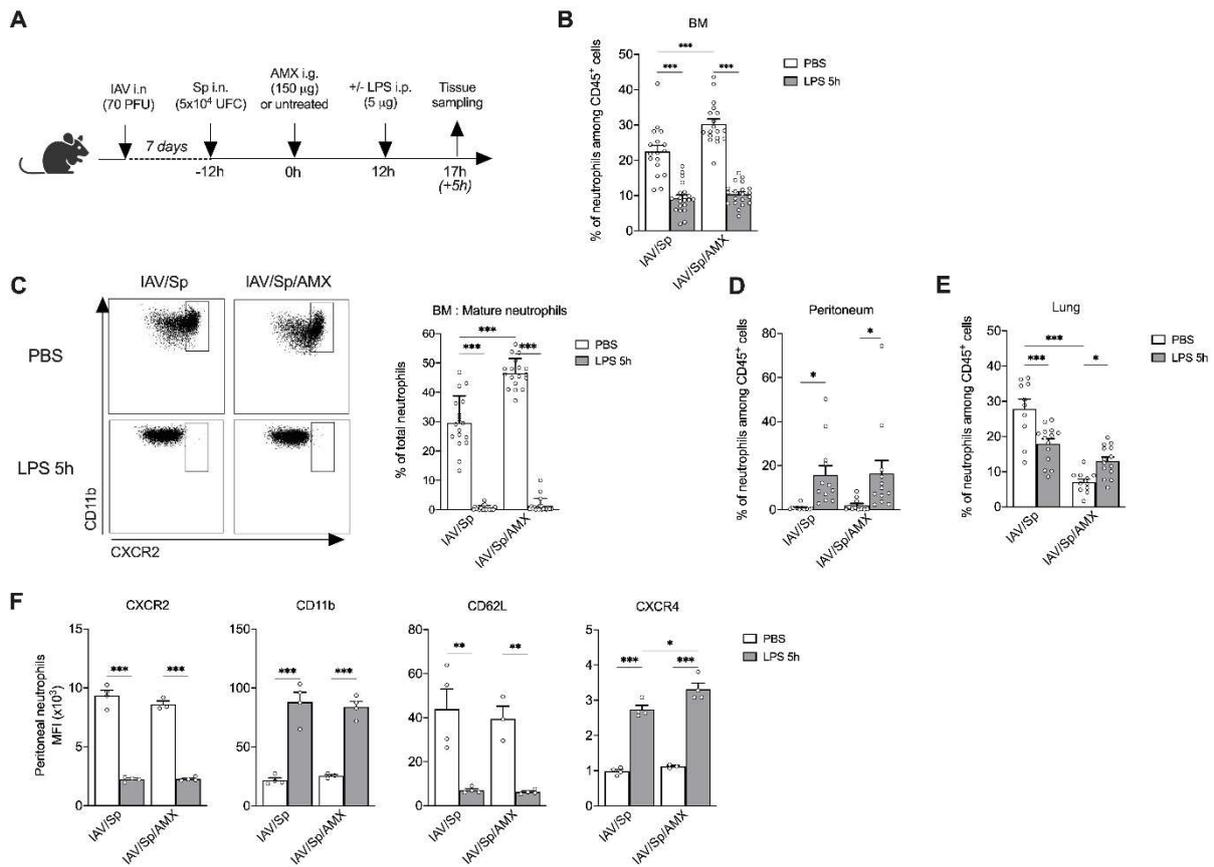
**Figure 18. Le traitement à l'AMX impacte l'activation et les fonctions des neutrophiles matures de la MO.** Des souris CX3CR1<sup>gfp/+</sup> ont été infectées par Sp sept jours après l'infection par IAV et traitées avec AMX 12 heures après l'infection par Sp (IAV/Sp/AMX) ou non (IAV/Sp). Les souris ont été sacrifiées 12 heures après le traitement par AMX. (A) La MFI de l'expression de CXCR2, CD11b et CD62L à la surface des neutrophiles matures de la MO a été analysé par cytométrie de flux. Des histogrammes représentatifs (*panels supérieures*) et les moyennes ± SEM d'une expérience représentative de trois sont montrés (*panels inférieures*) (n = 6). (B) Les cellules totales de la MO ont été incubées avec les bioparticules *E. coli*-pHrodo et le pourcentage de neutrophiles matures de la MO positifs pour *E. coli*-pHrodo (*panel de gauche*) ainsi que la MFI de *E. coli*-pHrodo (*panel de droite*) ont été quantifiés par cytométrie en flux. Les données représentent les résultats regroupés de trois expériences indépendantes (n=13) (\*\*\*, p < 0,001 ; Mann-Whitney). (C) Les cellules totales de la MO ont été traitées avec du TBHP (ou du PBS) puis incubées avec le réactif CellROX Deep Red. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM de la MFI de CellROX d'une expérience représentative de deux (n = 5-6) (\*, p < 0,05, \*\*, p < 0,01, \*\*\*, p < 0,001 ; Two-way ANOVA).

Par ailleurs, les niveaux basaux de production de ROS étaient similaires dans les neutrophiles matures de la MO des souris surinfectées traitées avec AMX et celles non traitées (**Figure 18C**). En revanche, les neutrophiles matures de la MO provenant d'animaux traités par AMX qui avaient été activés *ex vivo* avec de l'hydroperoxyde de tert-butyle (TBHP) ont libéré moins de ROS que les animaux non traités (**Figures 18C et S18B**). Dans l'ensemble, nos données ont

confirmé que le traitement par AMX avait un impact significatif sur le phénotype et la fonction des neutrophiles matures de la MO.

## F. Les neutrophiles matures de la MO conditionnés par le traitement AMX sont rapidement mobilisés en réponse à une inflammation systémique.

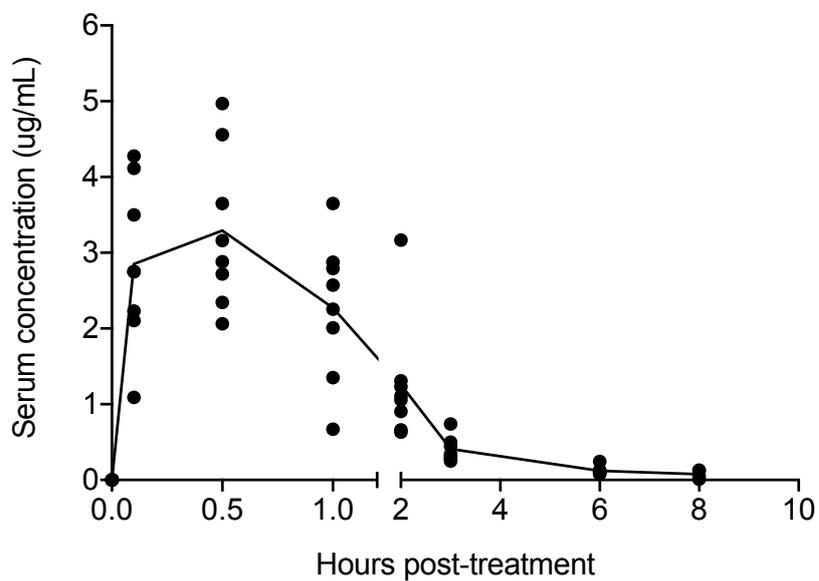
Le traitement par AMX ayant modifié le programme transcriptionnel et les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des neutrophiles matures de la MO, nous avons ensuite cherché à savoir si l'antibiotique influençait ou non la mobilisation des neutrophiles au cours d'une inflammation aiguë. À cette fin, du LPS a été administré par voie intrapéritonéale à des animaux surinfectés traités (ou non) par AMX (**Figure 19A**). Une chute rapide de la proportion de neutrophiles totaux de la MO et la disparition complète des neutrophiles matures ont été observées dans les deux groupes 5 heures après la stimulation par le LPS - suggérant la sortie des neutrophiles de la MO (**Figures 19B et 19C**). Dans les deux groupes de souris, la chute du nombre de neutrophiles dans la MO a été associée à une accumulation rapide de neutrophiles dans le péritoine (**Figure 19D**). Il a été rapporté précédemment que l'administration intrapéritonéale de LPS chez des animaux naïfs favorise l'accumulation rapide de neutrophiles dans les poumons (Andonegui et al. 2003; Ye et al. 2020). Il est intéressant de noter que l'administration de LPS a été associée à un pourcentage plus élevé de neutrophiles pulmonaires chez les animaux traités par AMX et à un pourcentage significativement plus faible chez les animaux non traités (**Figure 19E**). Ainsi, les neutrophiles de la MO conditionnés par AMX ont été rapidement mobilisés vers les tissus périphériques en réponse à l'administration systémique de LPS. Une analyse phénotypique des neutrophiles ayant migré dans le péritoine après l'administration de LPS a montré que le LPS favorisait l'activation des neutrophiles à la fois chez les animaux surinfectés traités par AMX et chez les animaux non traités, comme le montrent les niveaux élevés de CD11b en surface et les niveaux d'expression plus faibles de CD62L et de CXCR2 (**Figure 19F**) (Reber et al. 2017). Dans les deux groupes de souris, le LPS a également renforcé l'expression de CXCR4, un marqueur des neutrophiles âgés (De Filippo et Rankin 2018; Uhl et al. 2016). Il est important de noter que l'expression de CXCR4 en surface était plus élevée sur les neutrophiles des animaux traités à l'AMX. Nos résultats suggèrent que le traitement par AMX influence le vieillissement des neutrophiles dans un contexte d'inflammation systémique.



**Figure 19. Le traitement à l'AMX favorise le recrutement des neutrophiles dans les tissus après l'administration de LPS *in vivo*.**

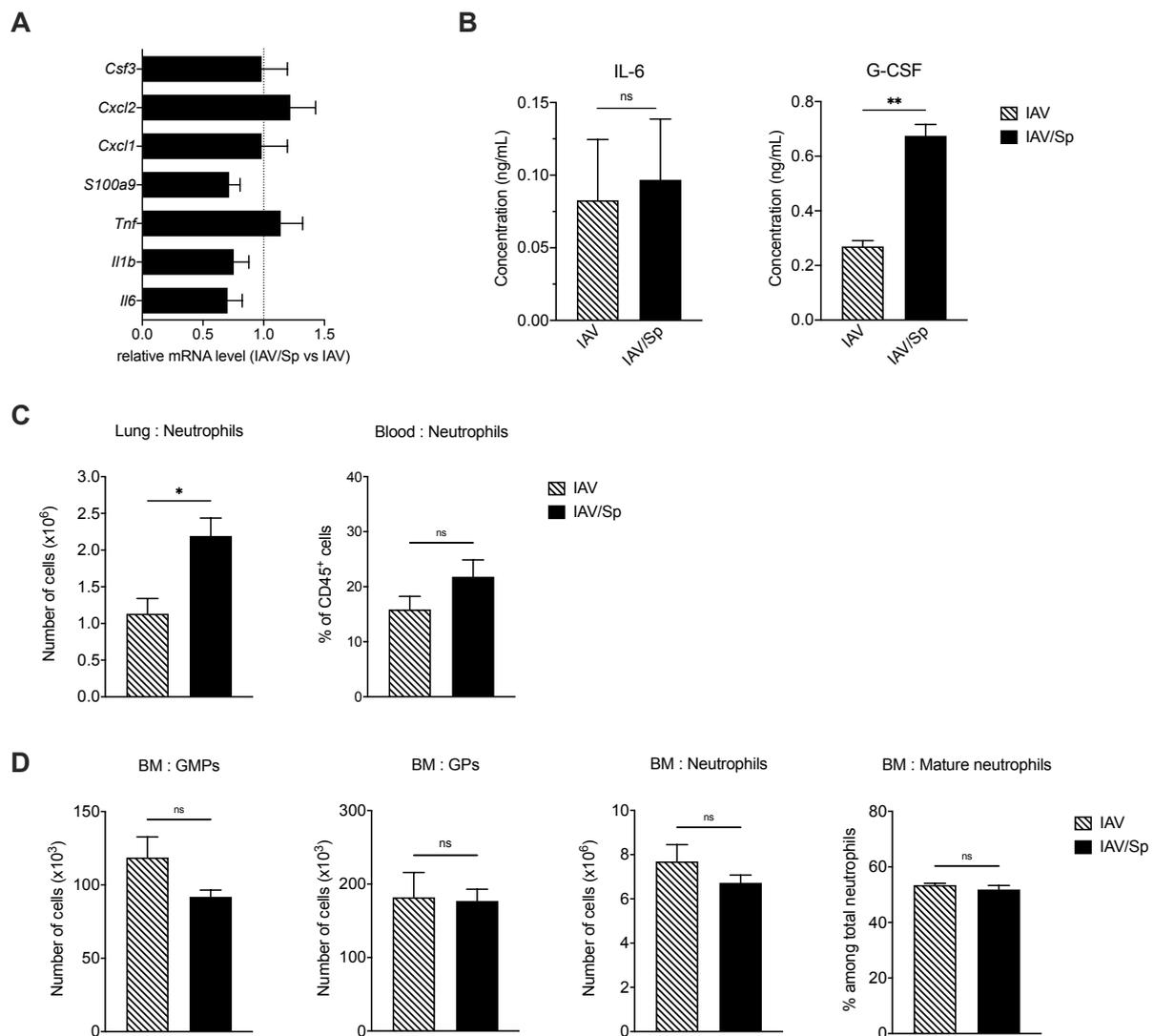
(A) Des souris CX3CR1<sup>tgfp/+</sup> ont été infectées par Sp sept jours après l'infection par IAV et traitées par AMX 12 heures après l'infection à Sp (IAV/Sp/AMX) ou non (IAV/Sp). Ensuite, une partie des souris de chaque groupe a reçu par voie intrapéritonéale (ou non) avec 5 µg de LPS. Les souris ont été sacrifiées 5 h plus tard. (B) Le pourcentage de neutrophiles totaux parmi la population CD45<sup>+</sup> a été quantifié par cytométrie en flux. (C) Les neutrophiles matures de la MO (CXCR2<sup>high</sup>) ont été quantifiés parmi les neutrophiles totaux de la MO. Les neutrophiles ont été quantifiés dans le péritoine (D) et le poumon (E). (F) Le phénotype des neutrophiles dans le péritoine a été évalué par cytométrie en flux. Les moyennes ± SEM des réplicats biologiques d'au moins trois expériences indépendantes sont représentées (n=11-20). \* p < 0,05 et \*\*\* p < 0,001 (ANOVA à deux voies).

## Figures supplémentaires



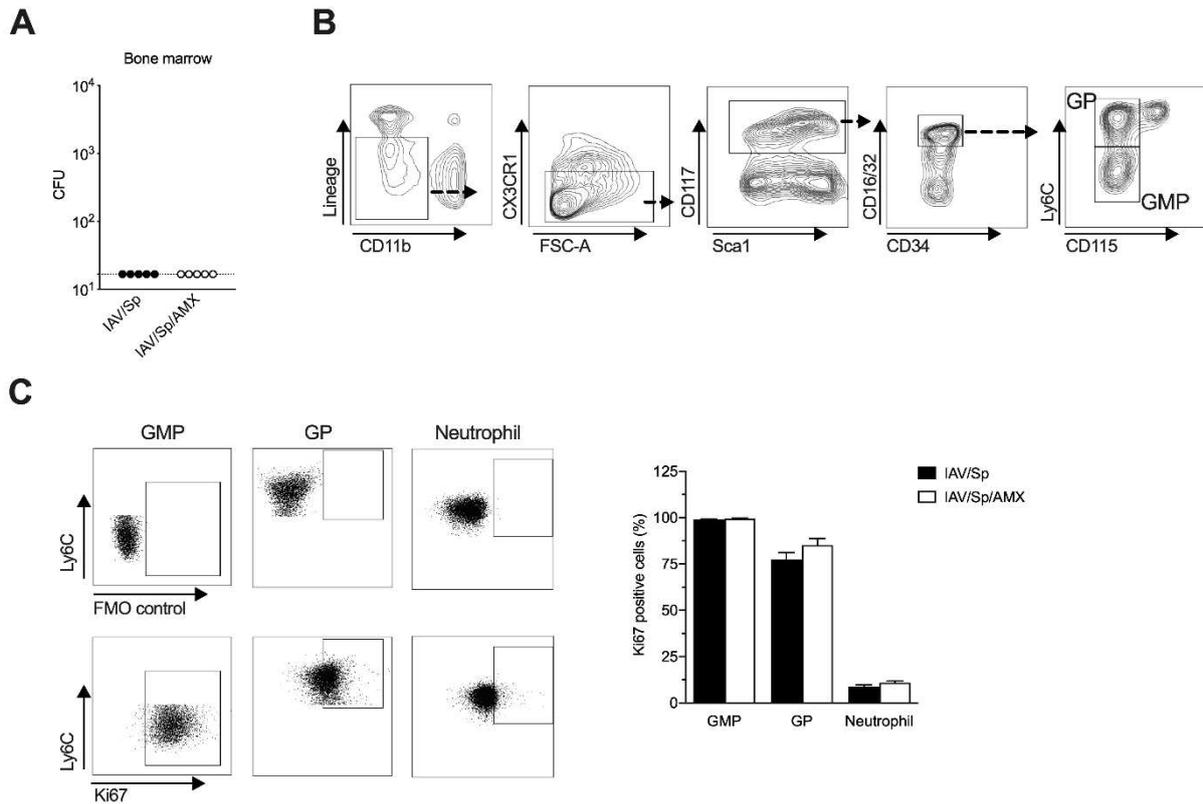
**Figure S1. Détermination des concentrations d'AMX dans le sérum des animaux surinfectés.**

Des souris C57Bl/6J ont été infectées i.n. par l'IAV suivi de Sp 7 jours plus tard. Ensuite, les souris ont reçu une dose unique de 150  $\mu$ g d'AMX 12 h après l'infection par Sp. Le sang a été prélevé à différents moments après le traitement et la concentration d'AMX dans les sérums a été déterminée par LC-MS/MS. Chaque symbole représente la concentration d'AMX pour un animal individuel et la ligne représente la concentration médiane (n=4-8).



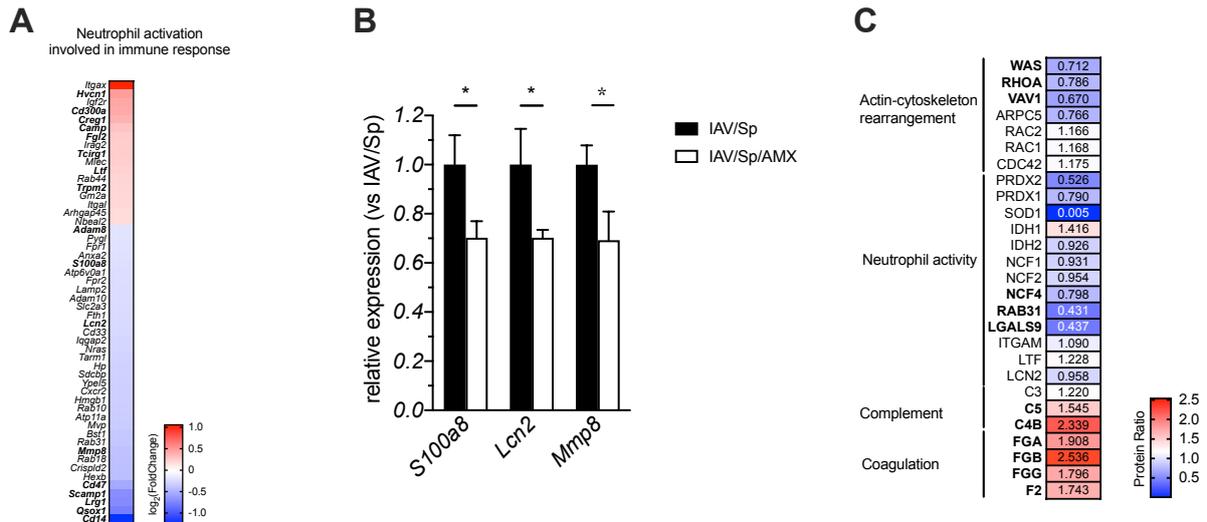
**Figure S2. La surinfection par *S. pneumoniae* impacte modérément les réponses pulmonaires et médullaires 12 h après l'infection.**

(A, B) Des souris C57BL/6J ou (C, D) CX3CR1<sup>gfp/+</sup> ont été infectées i.n. par l'IAV. Sept jours plus tard, les animaux ont été infectés i.n. par Sp (IAV/Sp) ou non (IAV). (A-C) Les poumons, le sang et (D) la MO ont été prélevés 12 h après l'infection par Sp, le moment correspondant à t0. (A) L'expression relative de chaque gène a été normalisée par rapport aux gènes de référence Actb et B2m, puis par rapport au groupe de référence IAV (fixé à la valeur de 1). (B) Les concentrations d'IL-6 et de G-CSF ont été déterminées dans les sérums par ELISA. Les moyennes  $\pm$  SEM des répliquats biologiques sont représentées (n=5-8). \*\* p < 0,01 (Mann-Whitney). (C) Les nombres absolus de neutrophiles pulmonaires (panel de gauche) et la fréquence des neutrophiles sanguins (panel de droite) sont représentés. (D) Les nombres absolus des progéniteurs et de neutrophiles totaux ainsi que la fréquence des neutrophiles matures sont représentés. Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de deux expériences indépendantes (n=4-10). (\* p < 0,05 ; ns: non significatif; Mann-Whitney).



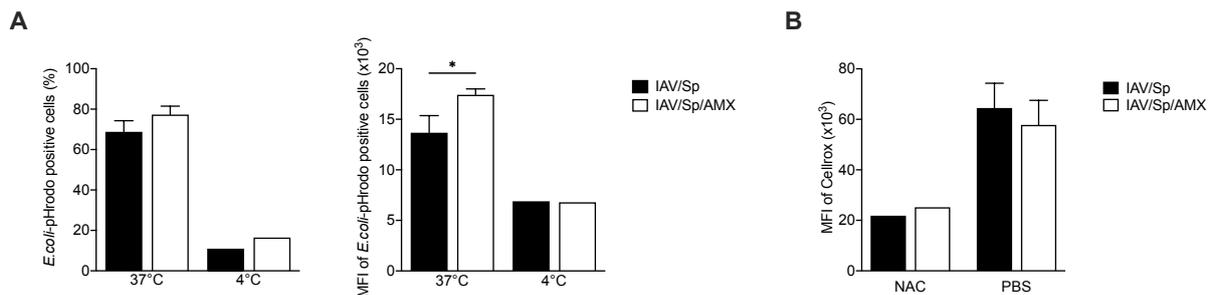
**Figure S3. Stratégie de *gating* par cytométrie en flux.**

(A) Les souris CX3CR1<sup>gfp/+</sup> ont été infectées par Sp sept jours après l'infection par IAV puis traitées (IAV/Sp/AMX) ou non (IAV/Sp) par AMX 12 h après. Les cellules de MO ont été préparées (12h après traitement) puis déposées en dilutions sériées sur des géloses au sang pour comptabiliser les colonies bactériennes. Le nombre de CFU par fémur pour chaque souris est représenté (n=5). (B) Stratégie de *gating* pour les progéniteurs granulocytaires GMP et GP dans la MO. (C) Stratégie de *gating* pour identifier les cellules prolifératives parmi les GMP, les GP et les neutrophiles dans la MO en fonction de l'expression de Ki67 ou non (contrôle FMO) (pannels de gauche). Les pourcentages de cellules prolifératives sont indiqués (pannels de droite). Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM d'une expérience (n = 3-4).



**Figure S4. Analyse transcriptomique et protéomique des neutrophiles de MO traités par AMX par rapport aux neutrophiles non traités.**

Les souris CX3CR1<sup>egfp/+</sup> ont été infectées par Sp sept jours après l'infection par IAV puis traitées (IAV/Sp/AMX) ou non (IAV/Sp) par AMX 12 h après. Les souris ont été sacrifiées 12 heures après le traitement. Les neutrophiles matures de la MO ont été triés sur la base de l'expression de CXCR2, et l'ARN (A, B) et les protéines (C) ont été purifiés pour une analyse RNA-seq et protéomique ultérieure. (A) Heat-map montrant l'expression de tous les DEG associés au processus biologique "activation des neutrophiles impliqués dans la réponse immunitaire". (B) L'expression relative des gènes sélectionnés dans les neutrophiles matures de la MO d'animaux surinfectés, traités ou non par AMX, a été déterminée par RT-qPCR. Le niveau d'ARNm de chaque gène est normalisé par rapport aux gènes de référence Actb et B2m, puis par rapport au groupe IAV/Sp (défini par la valeur de 1). \*p < 0,05 (Unpaired t-test). (C) Analyse protéomique semi-quantitative. Heat-map représentant les protéines sélectionnées exprimées de façon différentielle en fonction du ratio de protéines détectés dans les deux groupes dont l'échelle est figurée.



**Figure S5. Inhibition de la phagocytose à 4°C et niveau basal de production des ROS par les neutrophiles matures de la MO.**

Les souris CX3CR1<sup>egfp/+</sup> ont été infectées par Sp sept jours après l'infection par IAV puis traitées (IAV/Sp/AMX) ou non (IAV/Sp) par AMX 12 h après. Les souris ont été sacrifiées 12 heures après le traitement. (A) La totalité des cellules de MO a été incubée avec les bioparticules *E. coli* pHrodo Red à 37°C ou 4°C et le pourcentage de neutrophiles matures de MO positifs pour *E. coli* pHrodo (pannel de gauche) ainsi que la MFI de *E. coli* pHrodo (pannel de droite) ont été quantifiés par cytométrie de flux. (B) Les cellules totales de MO ont été incubées avec de la N-acétyl-cystéine (NAC) ou non et la production de ROS a été évaluée par cytométrie en flux à l'aide du réactif Celltox Deep Red. (A, B) Les données sont représentatives de deux expériences (n=2-5). \* p < 0,05 (Two-way ANOVA).



# **Discussion**

*S. pneumoniae* fait partie de l'une des bactéries les plus largement retrouvées dans les fluides biologiques des patients hospitalisés pour une PAC et le nombre de décès reste encore élevé malgré l'existence des vaccins et des traitements antibiotiques (Wahl et al. 2018 ; Brooks et Mias 2018 ; « Maladie pneumococcique | CDC » 2022). L'exploration des mécanismes d'action peu connus sur l'immunité des  $\beta$ -lactamines pourrait ouvrir la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques. Malgré l'utilisation répandue de modèles de pneumonie à *S. pneumoniae* pour évaluer l'efficacité des antibiotiques, la pharmacocinétique et la pathogenèse de l'infection, les données disponibles dans la littérature concernant la caractérisation des effecteurs immunitaires cellulaires et moléculaires pendant un traitement antibiotique demeurent très limitées (Borsa, Di Pasquale, et Restrepo 2019). Notre étude est la première à caractériser un impact *in vivo* d'un traitement à base de  $\beta$ -lactamine sur le développement des neutrophiles au cours d'une infection bactérienne. Nos résultats mettent en évidence qu'un traitement efficace à l'AMX n'impacte pas la granulopoïèse d'urgence induite par l'infection pulmonaire à *S. pneumoniae* mais conduit à une augmentation du nombre de neutrophiles matures dans la MO. En réponse au traitement, nous montrons que ces neutrophiles matures se distinguent des neutrophiles d'animaux non traités par un phénotype moins activé et des fonctions antimicrobiennes spécifiques. En revanche, nos résultats révèlent que ces neutrophiles matures conditionnés par le traitement AMX conservent la capacité d'être mobilisés au cours d'une réponse inflammatoire aiguë et se caractérisent par un phénotype âgé. Ces résultats renforcent notre hypothèse selon laquelle le système immunitaire participe à l'efficacité du traitement à l'AMX, conséquence de son action directe sur la bactérie.

### **Mise en place d'un traitement efficace dans un modèle d'étude murin de pneumonie**

Notre premier objectif a été la mise en place d'un modèle d'infection à *S. pneumoniae* chez la souris qui se rapproche des conditions réelles. La différence de virulence est l'un des paramètres qui permet de différencier la multitude de sérotypes de *S. pneumoniae* dont le degré conditionne la pathogénicité de l'infection (Fuji, Pichichero, et Kaur 2021). Dans cette étude, la souche utilisée dérive d'une souche collectée chez des patients atteints de PAC mais qui s'est avérée peu virulente chez la souris (données du laboratoire non montrées). Nous savons que l'infection IAV favorise la colonisation et la propagation de *S. pneumoniae* dans les voies inférieures respiratoires (McCullers 2014). Dans notre étude, une pré-infection des animaux avec IAV conduit à une colonisation bactérienne pulmonaire et systémique importante et homogène chez tous les animaux. De plus, notre modèle de sensibilisation virale n'altère pas les défenses

immunitaires dirigées contre le pneumocoque comme ont pu le relater d'autres expérimentations de la littérature (pour revue, Sender, Hentrich, et Henriques-Normark 2021). En utilisant un modèle de surinfection post-grippale, nous reproduisons les phénomènes inflammatoires et immunitaires innés impliqués au cours de l'infection à *S. pneumoniae* comme (i) une réponse moléculaire inflammatoire, (ii) un recrutement pulmonaire accru de neutrophiles et (iii) une augmentation des progéniteurs granulocytaires, signe d'un déclenchement de granulopoïèse d'urgence. De plus, étant donné que *S. pneumoniae* est l'agent bactérien le plus fréquemment observé lors des surinfections grippales, notre modèle de pneumonie post-grippale est particulièrement pertinent car il reproduit fidèlement la situation clinique (Morris, Cleary, et Clarke 2017).

Ce modèle d'infection pneumococcique secondaire nous a permis d'étudier l'effet d'un traitement à base d'une  $\beta$ -lactamine, l'AMX, qui représente la molécule utilisée en première intention contre les infections à *S. pneumoniae* (Postma et al. 2015). L'efficacité de ces antibiotiques dépend du temps et requiert des concentrations adéquates, c'est-à-dire au-dessus de la CMI, pendant une durée optimale (W. A. Craig 1998). Bien qu'une seule dose d'AMX ait retardé significativement la gravité de l'infection et la survie des animaux, ceci suggère que la période d'exposition de l'antibiotique pourrait ne pas être suffisante pour complètement guérir les animaux. L'observation à des temps plus tardifs de la charge bactérienne dans les poumons et la rate des animaux surinfectés et traités avec une dose d'AMX pourraient nous informer sur une éventuelle recrudescence de la bactérie qui serait la cause de la mortalité des animaux. De plus, les analyses PK de l'AMX montrent une demi-vie relativement courte de l'AMX dans le sang, corroborant les résultats de travaux précédemment rapportés et soutenant la nécessité d'une administration répétée pour obtenir un effet thérapeutique chez les animaux surinfectés (Andes et Craig 1998; Franck et al. 2019). Des expérimentations parallèles ont mis en évidence une amélioration significative de la survie des animaux surinfectés après traitement répété d'AMX. En effet, nous avons observé un taux de survie atteignant 80% après quatre doses d'AMX administrées toutes les 12h confirmant l'effet protecteur de l'antibiotique.

Des perturbations de la composition et de la fonction du microbiote intestinal au cours des thérapies associant des antibiotiques à large spectre ont été décrites (Tan et al. 2021). Le tractus gastro-intestinal recouvre le plus grand réservoir de microbes, qui peuvent interagir avec les cellules immunitaires de l'hôte à la surface des muqueuses. Une perturbation du microbiote intestinal peut ainsi influencer la protection des organes immunitaires distants (Gauguet et al. 2015 ; Sencio et al. 2020). Il est important de noter que les effets précédemment relatés des  $\beta$ -

lactamines sur la composition du microbiote intestinal résultent généralement de l'exposition prolongée aux  $\beta$ -lactamines (Tan et al. 2021). Afin de vérifier que l'administration d'une dose d'AMX n'affecte pas les paramètres immunitaires que nous examinons, nous avons mené des études transcriptionnelles et de cytométrie en flux sur des animaux sensibilisés à l'IAV et ayant reçu ou non une dose d'AMX. En comparaison aux animaux seulement IAV, le traitement AMX n'a pas eu d'impact sur l'expression des gènes liés à l'inflammation (*Tnf*, *Il6*, *Il1 $\beta$* ) et des facteurs impliqués dans l'attraction et la production de neutrophiles (*S100a9*, *Cxcl2*, *Csf3*) dans les tissus pulmonaires des souris. De plus, aucune variation significative dans le nombre de neutrophiles dans les différents compartiments étudiés (MO, poumons et sang) et dans celui des précurseurs des granulocytes (GMP et GP) n'a été observée. Ces résultats suggèrent fortement que même si une dose d'AMX pouvait potentiellement influencer le microbiote intestinal, cela n'affecte pas les paramètres étudiés dans notre étude. Pour confirmer ou infirmer cet impact sur le microbiote intestinal, une étude comparative de sa composition à partir d'analyses métagénomiques des fécès de souris IAV ayant reçu de l'AMX par rapport à des souris uniquement infectées par l'IAV pourrait être réalisée (Sencio et al. 2020).

L'effet thérapeutique d'une dose d'AMX 12h après son administration a été associé à une réduction relative des réponses inflammatoires pulmonaires et systémiques suggérant fortement l'implication de l'effet direct de l'antibiotique sur la bactérie. Cependant, notre étude révèle que la majorité des colonies bactériennes a été éliminée dans le tissu pulmonaire et totalement dans le compartiment systémique, à un temps où l'antibiotique a totalement été éliminé de l'organisme des animaux. Ces résultats peuvent également suggérer l'intervention de facteurs externes dans l'activité de l'antibiotique. Compte tenu des effets des  $\beta$ -lactamines récemment décrits dans la littérature (pour revue, Mondemé et al. 2023), nous pourrions supposer que la libération de PAMPs par les pneumocoques lysés *in vivo* par l'AMX ait pu déclencher les mécanismes de défense de première ligne comme les cellules structurales épithéliales et/ou des macrophages alvéolaires. Une analyse par RT-qPCR de l'expression de molécules de l'inflammation aiguë (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6) dans les tissus pulmonaires à des temps plus tôt soit entre 0 et 2h après traitement, serait intéressante. Une expression plus élevée chez les animaux infectés et traités à l'AMX par rapport aux animaux non traités confirmerait notre hypothèse.

De plus en plus de données suggèrent une interaction entre le système immunitaire et les antibiotiques, contribuant à leur efficacité (Anuforum, Wallace, et Piddock 2015 ; Wolf, Liu, et Underhill 2017). Dans ce sens, nous nous sommes intéressés aux neutrophiles qui représentent la cible idéale étant donné leur rôle crucial au cours de l'infection à *S. pneumoniae*. De manière intéressante, nous montrons que le traitement avec une dose d'AMX au cours de la pneumonie à *S. pneumoniae* affecte leur développement, leurs fonctions mais également leur migration.

### **Impact du traitement AMX sur le développement des neutrophiles**

Face à la mobilisation accrue de neutrophiles au cours des infections, les progéniteurs granulocytaires sont capables d'accélérer leur capacité de prolifération et de différenciation pour répondre à la demande sous le phénomène de granulopoïèse d'urgence (Manz et Boettcher 2014). En réponse à l'infection à *S. pneumoniae*, nous montrons une augmentation du nombre de GP avec un niveau de prolifération élevé (Ki67<sup>+</sup>). Ce résultat est conforme à ce qui a déjà été précédemment rapporté au cours de l'infection à *S. pneumoniae* chez la souris dans le but de restaurer le réservoir de neutrophiles (Paudel et al. 2019). En cause, les médiateurs inflammatoires détectés dans la circulation tels que les cytokines (IL-1 $\beta$  et IL-6) et les bactéries, en plus du G-CSF, chez les animaux surinfectés sont susceptibles de participer au déclenchement du processus de granulopoïèse d'urgence (Mitroulis et al. 2018). D'une manière surprenante, nos résultats révèlent que la granulopoïèse d'urgence induite par l'infection à *S. pneumoniae* n'est pas altérée suite au traitement à l'AMX. En effet, le nombre élevé de progéniteurs granulocytaires en prolifération reste stable, même si la réponse inflammatoire en périphérie est inhibée et que l'AMX est totalement éliminée de l'organisme des animaux. De plus, aucune colonie de *S. pneumoniae* n'a été détectée dans la MO des animaux, qu'ils aient été traités ou non avec l'AMX. Cet effet sur la granulopoïèse suppose un mécanisme indirect de l'antibiotique. Des expériences *ex vivo* ont montré que l'incubation des progéniteurs myéloïdes avec seulement des agonistes des récepteurs TLR2 et TLR4 et donc sans facteurs de croissance, stimulaient leur capacité de différenciation. Cette activation était dépendante de Myd88 (Nagai et al. 2006). Nous pouvons supposer qu'en réponse au traitement AMX, les PAMPs relargués par les bactéries lysées *in vivo* aient pu atteindre la circulation sanguine et stimuler les capacités prolifératives des progéniteurs granulocytaires dans la MO. D'une part, une analyse dans le sérum des souris des composés bactériens par spectrométrie de masse pourrait confirmer notre hypothèse. D'autre part, une évaluation de l'expression

transmembranaire des TLR sur les progéniteurs granulocytaires par cytométrie en flux pourrait également nous éclairer sur les mécanismes impliqués dans la stimulation de la granulopoïèse en réponse au traitement. Des expérimentations avec des souris déficientes pour Myd88 pourraient être intéressantes afin d'appréhender l'implication de la protéine de transduction dans le mécanisme indirect de l'AMX. Par ailleurs, un effet du G-CSF, dont l'augmentation a été observée chez les animaux avant d'être traités, n'est pas à exclure, étant donné son implication dans la stimulation de la granulopoïèse. Un dosage du G-CSF dans le surnageant de lysats cellulaires de MO pourrait le confirmer.

Plus important encore, nous montrons que ce nombre augmenté de GP suite au traitement s'accompagne d'un nombre de neutrophiles matures de la MO plus élevé que les animaux non traités. Ceci suggère que l'AMX réduit la mobilisation des neutrophiles matures de la MO vers les poumons, malgré une expression augmentée du CXCR2, récepteur impliqué dans la migration des neutrophiles (Martin et al. 2003). L'hypothèse d'une implication plus importante de la voie de signalisation médiée par CXCR4 :CXCL12 dans la rétention de ces neutrophiles n'est pas exclue (Eash et al. 2010). Bien qu'elle ne soit pas significative, l'analyse transcriptomique a révélé une augmentation de *Cxcr4* chez les neutrophiles matures de souris surinfectées et traitées à l'AMX par rapport aux animaux non traités. Une augmentation de l'expression du CXCR4 évaluée par cytométrie en flux par les neutrophiles de souris traitées par rapport aux souris non traitées pourrait nous confirmer cette hypothèse.

### **Impact du traitement sur les fonctions des neutrophiles matures de MO**

Au terme de leur maturation dans la MO, les neutrophiles matures possèdent le matériel transcriptionnel nécessaire pour leurs mécanismes bactéricides (Boxio et al. 2004) tels que : la phagocytose et la production de peptides antimicrobiens, de ROS et de RNS. De plus, une importante plasticité phénotypique et fonctionnelle des neutrophiles a largement été décrite dans la littérature, conséquences d'une expression transcriptionnelle modulée, que ce soit en condition homéostasique ou pathologique (Ng, Ostuni, et Hidalgo 2019; Xie et al. 2020). Nous nous sommes alors demandé si le traitement AMX au cours de la pneumonie à *S. pneumoniae* pouvait impacter la fonction de ces cellules.

De manière intéressante, nous montrons que le traitement à l'AMX d'animaux surinfectés à *S. pneumoniae* impacte le profil transcriptomique et phénotypique des neutrophiles matures de la MO. Notre analyse phénotypique nous suggère une maturation des neutrophiles plus importante

liée à une augmentation du CXCR2 mais une activation/un amorçage diminué au regard de l'expression de CD11b et CD62L des neutrophiles matures de la MO chez les animaux surinfectés traités à l'AMX par rapport à ceux non traités. Cet état amorcé ou activé est nécessaire pour fournir les mécanismes fonctionnels en réponse à l'infection (Miralda, Uriarte, et McLeish 2017). Ces résultats sont en accord avec la faible capacité de ces cellules à produire des ROS lors de la stimulation par rapport aux neutrophiles matures d'animaux non traités. La diminution de l'expression des gènes liés à la reconnaissance des pathogènes (*Tlr7*, *Tlr4*, *Cd14* et *Myd88*), aux réponses inflammatoires (*Mmp8*, *S100a8* et *Lcn2*) et à la production de dérivés toxiques RNS et ROS (*Nos2* et *Qsox1*) ainsi que le faible niveau protéique observé de la sous-unité de la NADPH oxidase (NCF4) et de la superoxyde dismutase SOD1, importante dans la réduction d' $O_2^-$ , soutiennent notre conclusion. Par ailleurs, les données transcriptomiques ont révélé des expressions diminuées au sein des neutrophiles matures de souris traitées, bien que non significatives, en lien avec le métabolisme des neutrophiles telle que la glycolyse, l'une des sources principales d'énergie consommées au cours de l'activation du neutrophile (Jeon et al. 2020) ou la signalisation HIF-1, qui permet la régulation de l'homéostasie en oxygène et favorise la survie des neutrophiles (Walmsley et al. 2005). Bien qu'une confirmation soit nécessaire, ces analyses renforcent l'idée d'une activation fonctionnelle diminuée du traitement AMX.

Cependant, nous avons été surpris d'observer une augmentation de la capacité des neutrophiles matures de la MO conditionnés par AMX à phagocyter les particules bactériennes. Ce résultat est en accord avec l'augmentation de gènes liés à la voie phagocytaire (*Creg1*, *Tc1rg* et *Hvcn1*) et des protéines du système du complément et de la coagulation (Berends et al. 2014). D'une part, cela suggère une plus grande expression des récepteurs et molécules liés à la phagocytose sur les neutrophiles matures de MO conditionnés par AMX. D'autre part, la régulation à la baisse des gènes et des protéines liés au remodelage du cytosquelette, au transport des vésicules et à la maturation des phagosomes suggère l'altération du transport des granules cytoplasmiques et de la fusion avec les phagosomes, une condition préalable à l'activité de destruction des neutrophiles (Nordenfelt et Tapper 2011). Cette divergence apparente pourrait être due à un taux plus faible de digestion du contenu phagosomal dans les neutrophiles matures traités par AMX, ce qui augmenterait le nombre de bactéries dans les phagosomes. Le fait que les cellules soient moins amorcées/activées conforte cette hypothèse. Cependant, il reste à déterminer si le traitement par AMX affecte les étapes initiales de phagocytose et/ou de la maturation des phagosomes dans les neutrophiles matures de la MO.

Une autre hypothèse repose sur les limitations du test pHrodo, qui évalue plus précisément l'acidification du phagosome. Or, des données démontrent clairement que le pH des neutrophiles lors de la phagocytose est neutre (Nordenfelt et Tapper 2011), ce qui suggère que le phénomène observé est plutôt une internalisation de la bactérie. Par ailleurs, des essais de couplage entre une souche de *S. pneumoniae* avec une particule pHrodo ont été testés au sein du laboratoire. Or, une diminution de la fluorescence a été observée, un phénomène déjà relaté dans la littérature, avec l'utilisation de ces particules (Nordenfelt et Tapper 2011). L'utilisation de particules de zymosan a été rapportée comme moins problématique et plus pertinente dans l'étude de la phagocytose, cette piste pourra être explorée.

Pour une étude plus approfondie de la phagocytose, deux méthodes ont été mises à l'essai et sont en cours d'exploration :

- (i) Nous avons tenté d'observer en temps réel la localisation des particules pHrodo au sein des neutrophiles de MO des souris infectées et (ou non) traitées par une approche de microscopie confocale (Spinning disk). Différents ratio (cellules : particules) ont été testés afin de quantifier de manière optimale le nombre de particules contenues dans les neutrophiles et donc leur capacité phagocytaire exprimée par l'index de phagocytose.
- (ii) Des tests fonctionnels de phagocytose *in vitro* avec *E. coli* ont été investigués avec des cellules de MO de souris infectées et ou non traitées à l'AMX. Des mises au point sont en cours d'investigation pour définir les paramètres d'incubation (MOI, temps de contact entre cellules et bactéries) optimaux.

Grâce à ces différentes approches, nous espérons avoir des informations supplémentaires qui nous permettront de conclure sur la différence de capacité phagocytaire des neutrophiles matures de MO de souris traitées par rapport aux souris non traitées.

D'autres processus fonctionnels pourraient être étudiés tels que la NETose et la dégranulation, qui se sont d'autant plus avérés essentiels contre le pneumocoque (Domon et Terao 2021). Bien que des mises au point seront nécessaires, la NETose pourra être évaluée par microscopie confocale des neutrophiles stimulés *in vitro* avec le réactif PMA. Par cette approche, nous pourrions visualiser les histones et les protéines localisées dans les filaments de chromatine décondensée à l'aide d'anticorps (anti-H3 et anti-MPO, à titre d'exemples) ou quantifier ces protéines dans les surnageants. Une évaluation de la NETose par cytométrie en flux décrite récemment n'est pas à exclure (McGill, Lu, et Benayoun 2021). Par ailleurs, un temps de stimulation plus faible des neutrophiles avec le PMA (de l'ordre de 30 min) permet d'évaluer

la dégranulation. Dans ce contexte, les sérines protéases (élastase, cathepsin G et protéinase 3) dans les surnageants pourront être quantifiées par électrophorèse sur gel (Standish et Weiser 2009).

De manière intéressante, les analyses protéomiques, bien que semi-quantitatives, montrent une augmentation des protéines liées à la coagulation telles que les protéines du fibrinogène (FGA, FGB, FGG) et celle du facteur de coagulation FII (F2) par les neutrophiles matures de souris surinfectées et traitées à l'AMX. La coagulation est un mécanisme important dans la réparation des tissus au cours d'un contexte inflammatoire (Antoniak 2018) et pourrait suggérer un effet bénéfique des neutrophiles en cas d'inflammation. Par ailleurs, un effet protecteur du fibrinogène empêchant une NETose excessive et délétère des neutrophiles a été démontrée (Locke et al. 2020). Pris un ensemble, nous pourrions supposer que le traitement à l'AMX au cours de l'infection à *S. pneumoniae* conditionne les neutrophiles à adopter un comportement fonctionnel favorable, sans effets néfastes.

Par ailleurs, il convient de noter que les neutrophiles sont des cellules très fragiles et qui contiennent peu d'ARN. De nombreuses souris ont été nécessaires pour avoir une quantité d'ARN suffisante lors de nos expérimentations de tri de neutrophiles pour les analyses transcriptomiques. Des analyses plus sensibles et moins contraignantes comme l'analyse *Single cell*-RNAseq auprès de chercheurs spécialistes du neutrophile seraient plus intéressantes et nous permettraient une exploration plus approfondie de l'hétérogénéité fonctionnelle des neutrophiles en réponse au traitement AMX au cours de la pneumonie à *S. pneumoniae*. Notre laboratoire a récemment débuté une collaboration avec l'équipe de recherche de F. Ginhoux, dont l'expertise a contribué à la caractérisation de sous-populations de neutrophiles comme détaillé dans l'élégante étude d'Evrard et al. mentionnée dans ce manuscrit (Evrard et al. 2018).

### **Impact du traitement sur la mobilisation des neutrophiles de MO**

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'impact du traitement AMX de la pneumonie à *S. pneumoniae* sur les capacités migratoires des neutrophiles matures de la MO.

En réponse à l'administration systémique de LPS, les neutrophiles matures des animaux traités par AMX ont quitté la MO et ont migré vers le péritoine et les poumons. Ce résultat est en accord avec la mobilisation rapide des neutrophiles dans les tissus périphériques lors de l'administration de LPS précédemment rapportée chez des animaux naïfs (Andonegui et al. 2003; Ye et al. 2020). En revanche, les neutrophiles matures des animaux non traités ont

seulement migré vers le péritoine. Nous avons investigué des dosages sériques par ELISA des cytokines inflammatoires IL-6 et IL-1 $\beta$  qui montrent une augmentation significative de la réponse inflammatoire chez les animaux ayant reçu du LPS, et ceci indépendamment du traitement AMX. Nous pourrions supposer que cette production accrue de cytokines inflammatoires en réponse au LPS ait également atteint les poumons. Pour confirmer cela, une analyse de l'expression de gènes inflammatoires (*Il6*, *Il1 $\beta$* , *Tnf*), de chimiokines importantes pour le recrutement de neutrophiles (*Cxcl1*, *Cxcl2* ; *Cxcl5*) et du récepteur TLR4 (*Tlr4*) par RT-qPCR dans le poumon a débuté. Si une réponse inflammatoire élevée est observée dans les poumons en réponse au LPS, nous pouvons supposer que le faible nombre de neutrophiles dans les poumons de souris non traitées est dû à une apoptose augmentée. Une évaluation par cytométrie en flux à l'aide du réactif Annexin V nous permettrait d'identifier les neutrophiles en apoptose. Ce réactif se fixe sur les motifs phosphatidylsérine exposés dans le milieu extracellulaire lorsque les cellules entrent en apoptose.

Une hypothèse supplémentaire repose sur le phénomène de migration inverse des neutrophiles, des poumons vers le péritoine, décrite au cours de l'activation par le LPS (Q. Xu et al. 2022). Bien que les mécanismes impliqués dans ce processus soient encore incertains, des différences phénotypiques entre les neutrophiles après migration inverse et les neutrophiles résidents des poumons étaient notables, avec en particulier l'expression élevée de la protéine d'adhésion ICAM-1, normalement peu exprimée par les neutrophiles classiques (Woodfin et al. 2011). Une expression élevée de *Icam-1* dans les poumons de souris atteintes de sepsis avait été rapportée comme témoin de la présence de neutrophiles migrants inverses (Zhao et al. 2014). Dans notre contexte, l'évaluation de l'expression de ICAM-1 par cytométrie en flux pourrait nous aider à déterminer si le poumon fonctionne comme un réservoir de neutrophiles activés chez les animaux surinfectés par rapport aux animaux traités, c'est-à-dire un réservoir qui peut être mobilisé vers des tissus périphériques à la demande.

De manière intéressante, l'administration de LPS a également induit une augmentation significative du nombre de neutrophiles présentant un phénotype âgé, caractérisé par une expression élevée du CD11b et du CXCR4 dans le péritoine des souris. Les neutrophiles matures ont rapidement migré vers la zone enflammée du péritoine, ce qui renforce les constatations antérieures suggérant que ces neutrophiles sont les premiers à se déplacer vers les tissus enflammés en réaction au LPS (Uhl et al. 2016). De manière intéressante, les neutrophiles des animaux traités à l'AMX présente une expression augmentée du CXCR4, suggérant un phénotype plus âgé par rapport aux neutrophiles d'animaux non traités. Par ailleurs, une

hypersegmentation nucléaire typique des neutrophiles âgés a été rapportée (Casanova-Acebes et al. 2013). Nous pourrions supposer à un nombre plus élevé de neutrophiles hypersegmentés dans le groupe AMX par rapport au groupe non traité. Pour répondre à cette question, nous avons débuté des expériences d'imagerie sur cytospin de cellules péritonéales totales de souris traitées au LPS. Les lames ont été colorées par automate au May-Grunwald Giemsa, ce qui nous a permis d'obtenir de belles images au microscope. A l'heure actuelle, nous essayons de quantifier ces images de manière automatisée. De plus, des expériences d'immunocytochimie pourront nous aider à déterminer si l'augmentation de l'expression de CXCR4 est liée à un accroissement du nombre de neutrophiles présentant une hypersegmentation nucléaire chez les animaux traités par rapport aux animaux non traités.

Notre étude s'arrête à l'analyse du phénotype des neutrophiles péritonéaux. Pourtant, il a été démontré que les neutrophiles âgés en réaction au LPS ont des fonctions effectrices plus importantes, en termes de phagocytose et de NETose, tandis que la production de ROS n'est pas impactée (Uhl et al. 2016; Zhang et al. 2015). Ainsi, nos résultats peuvent également laisser penser que le vieillissement des neutrophiles de souris traitées à l'AMX s'accompagne d'un accroissement de l'efficacité des neutrophiles matures. Pour cela, des tests de phagocytose et de NETose avec les cellules de péritoine pourront être conduits.

### **Impact du traitement sur les fonctions des neutrophiles de poumons ?**

Au-delà des effets sur la fonction des cellules de MO, nous nous sommes demandé si le traitement AMX pouvait également impacter la fonction des neutrophiles du poumon. De manière intéressante, des analyses *in silico* ont démontré que les neutrophiles pulmonaires de souris infectées avec *S. pneumoniae* augmentaient entre autres l'expression de leurs PRR, cytokines et médiateurs inflammatoires (Gomez et al. 2017). Dans notre contexte, nous pourrions supposer que (i) la libération de PAMP par les bactéries lysées *in vivo* après AMX ait pu induire des changements transcriptionnels et fonctionnels au sein des neutrophiles pulmonaires ou (ii) l'impact sur le développement des neutrophiles influence la fonction des neutrophiles périphériques.

Pour cela, nous avons investigué des expérimentations évaluant la production de ROS et la phagocytose par cytométrie en flux sur des cellules de poumon et de lavages broncho-alvéolaires issues de souris surinfectées et ou non traitées. Bien qu'en adaptant les conditions expérimentales des kit Deep Red CellROX et *E.coli*-pHrodo utilisées pour l'étude fonctionnelle

des cellules de MO, nous avons constaté une mortalité importante des neutrophiles pulmonaires. L'étude fonctionnelle des neutrophiles murins représente un défi en raison de plusieurs facteurs, notamment :

1. La fragilité des neutrophiles d'origine murine par rapport à leurs homologues humains.
2. L'état pré-activé des neutrophiles pulmonaires en raison des mécanismes qui les stimulent lors de la migration à travers les parois endothéliales (Kolaczowska et Kubes 2013; Maas, Soehnlein, et Viola 2018).
3. Les multiples étapes impliquées dans la préparation des neutrophiles, qui elles-mêmes peuvent activer les processus d'apoptose de ces cellules.

La mise en place d'une méthode de préparation cellulaire moins invasive telle que la sélection par un gradient de densité ou par méthode de sélection positive pourraient limiter cette mortalité.

### **Effet protecteur des neutrophiles ?**

Alors que des études ont mis en évidence des corrélations entre les pathologies inflammatoires induite par les antibiotiques *in vivo* et le degré de libération de produits inflammatoires bactériens au cours d'essais *in vitro*, il est surprenant de constater que l'on sait peu de choses sur les mécanismes immunologiques, qui seraient les plus pertinents dans un contexte de besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques (pour revue, Mondemé et al. 2023).

Ces travaux fournissent de véritables preuves sur l'existence d'un effet immunomodulateur indirect de l'AMX au cours d'un traitement contre l'infection à *S. pneumoniae*. Le neutrophile représente une cible idéale en raison de sa plasticité fonctionnelle et phénotypique. Par ailleurs, si on considère qu'une activation trop importante des neutrophiles peut être délétère, l'activation moindre des neutrophiles de MO de souris traitées par rapport aux souris non traitées nous encourage sur l'existence d'un conditionnement bénéfique du traitement sur ces cellules. Il serait intéressant d'observer l'impact d'une seconde infection avec une souche de *S. pneumoniae* chez les animaux qui ont survécu après une dose d'AMX. Nous pourrions supposer que les neutrophiles matures de la MO aient les armes nécessaires pour répondre à une seconde infection et que la survie des animaux soit améliorée. Il serait également intéressant d'explorer la fonction et le phénotype des neutrophiles après quatre doses d'AMX chez les animaux infectés.

De manière intéressante, des modifications épigénétiques à partir des stades CMP et GMP étaient à l'origine de modifications fonctionnelles au sein des neutrophiles matures (Kalafati et al. 2023). Bien que des études épigénétiques soient nécessaires, nous pourrions supposer que l'effet indirect de l'AMX sur la fonction des neutrophiles proviendrait d'une modulation transcriptionnelle en amont, au niveau des précurseurs. Une analyse sc-RNAseq serait intéressante dans ce contexte afin d'approfondir les effets du traitement sur la granulopoïèse.

Dans un contexte où la découverte de nouvelles stratégies aux antibiotiques devient de plus en plus urgente, une analyse plus approfondie des différences fonctionnelles, transcriptionnelles et phénotypiques permettront de définir les mécanismes impliqués dans l'effet immunomodulateur du traitement à l'AMX. A l'heure actuelle, l'association antibiotique et molécule innée fait ses preuves. Au sein du laboratoire, la stimulation de l'immunité innée en utilisant un agoniste au TLR5, améliore l'efficacité des antibiotiques sur les bactéries sensibles mais également sur les bactéries résistantes (Matarazzo et al. 2019). De manière intéressante, l'équipe de Sakoulas *et al.* a démontré que des concentrations sub-thérapeutiques d'une pénicilline rendaient plus sensibles une souche de *Staphylococcus aureus* à l'activité microbicide de la cathélicidine, normalement résistante (Sakoulas et al. 2014). *In vivo*, les neutrophiles, sources importantes de cathélicidine, ont détruit de manière efficace les bactéries sensibilisées par l'antibiotique démontrant une coopération entre l'antibiotique et le système immunitaire. Bien que les mécanismes restent à élucider, notre étude pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies combinant (i) l'effet direct de l'AMX sur la bactérie et (ii) son effet immunomodulateur sur les neutrophiles, observé dans le contexte de l'infection à *S. pneumoniae*.

# Conclusion

Parmi les stratégies alternatives au « tout antibiotique », la modulation du système immunitaire est une piste pertinente. Il est maintenant bien accepté que les antibiotiques interagissent avec le système immunitaire pour lutter contre les infections bactériennes. Grâce à cette étude, l'exploration des mécanismes impliqués dans l'effet du traitement à l'amoxicilline sur les neutrophiles pourra être poursuivie. Dans un contexte de mésusage des antibiotiques et d'apparition de résistance, cette étude permet de revisiter pour la première fois le mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines *in vivo* au cours de l'infection à *S. pneumoniae* et notamment d'identifier l'impact sur les mécanismes anti-infectieux de l'hôte. A terme, ces travaux devraient permettre de mieux comprendre la relation entre *S. pneumoniae*, l'amoxicilline et les neutrophiles afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

# **Bibliographie**

- Aceil, Javid, et Fikri Y. Avci. 2022. « Pneumococcal Surface Proteins as Virulence Factors, Immunogens, and Conserved Vaccine Targets ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (mai): 832254.
- Adegbola, Richard A., Rodrigo DeAntonio, Philip C. Hill, Anna Roca, Effua Usuf, Bernard Hoet, et Brian M. Greenwood. 2014. « Carriage of Streptococcus Pneumoniae and Other Respiratory Bacterial Pathogens in Low and Lower-Middle Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *PloS One* 9 (8): e103293.
- AFFSAPS. 2010. « Antibiothérapie par voie générale dans les infections respiratoires basses de l'adulte ». Société de Pneumologie de Langue Française. 1 juillet 2010.
- A-Gonzalez, Noelia, Steven J. Bensinger, Cynthia Hong, Susana Beceiro, Michelle N. Bradley, Noam Zelcer, Jose Deniz, et al. 2009. « Apoptotic Cells Promote Their Own Clearance and Immune Tolerance through Activation of the Nuclear Receptor LXR ». *Immunity* 31 (2): 245-58.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, et I. L. Weissman. 2000. « A Clonogenic Common Myeloid Progenitor That Gives Rise to All Myeloid Lineages ». *Nature* 404 (6774): 193-97.
- Albiger, Barbara, Sofia Dahlberg, Andreas Sandgren, Florian Wartha, Katharina Beiter, Hiroaki Katsuragi, Shizuo Akira, Staffan Normark, et Birgitta Henriques-Normark. 2007. « Toll-like Receptor 9 Acts at an Early Stage in Host Defence against Pneumococcal Infection ». *Cellular Microbiology* 9 (3): 633-44.
- Albiger, Barbara, Andreas Sandgren, Hiroaki Katsuragi, Ulf Meyer-Hoffert, Katharina Beiter, Florian Wartha, Mathias Hornef, Staffan Normark, et Birgitta Henriques Normark. 2005. « Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Signalling Controls Bacterial Growth during Colonization and Systemic Pneumococcal Disease in Mice ». *Cellular Microbiology* 7 (11): 1603-15.
- Aliberti, S., M. Mantero, M. Mirsaeidi, et F. Blasi. 2014. « The role of vaccination in preventing pneumococcal disease in adults ». *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 (0 5): 52-58.
- Almeida, Sónia T, Ana Cristina Paulo, Filipe Froes, Hermínia de Lencastre, et Raquel Sá-Leão. 2021. « Dynamics of Pneumococcal Carriage in Adults: A New Look at an Old Paradigm ». *The Journal of Infectious Diseases* 223 (9): 1590-1600.
- Andes, D., et W. A. Craig. 1998. « In Vivo Activities of Amoxicillin and Amoxicillin-Clavulanate against Streptococcus pneumoniae: Application to Breakpoint Determinations ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (9): 2375-79.
- Andonegui, Graciela, Claudine S. Bonder, Francis Green, Sarah C. Mullaly, Lori Zbytnuik, Eko Raharjo, et Paul Kubes. 2003. « Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs ». *Journal of Clinical Investigation* 111 (7): 1011-20.
- Antoniak, Silvio. 2018. « The Coagulation System in Host Defense ». *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 2 (3): 549-57.

- Anuforum, Olachi, Graham R. Wallace, et Laura V. Piddock. 2015. « The Immune Response and Antibacterial Therapy ». *Medical Microbiology and Immunology* 204 (2): 151-59.
- Arora, Shweta, Shaniya Ahmad, Rasha Irshad, Yamini Goyal, Sahar Rafat, Neha Siddiqui, Kapil Dev, et al. 2019. « TLRs in pulmonary diseases ». *Life Sciences* 233 (septembre): 116671.
- Azoulay, Elie, Lene Russell, Andry Van de Louw, Victoria Metaxa, Philippe Bauer, Pedro Pova, José Garnacho Montero, et al. 2020. « Diagnosis of Severe Respiratory Infections in Immunocompromised Patients ». *Intensive Care Medicine* 46 (2): 298-314.
- Bals, R., et P. S. Hiemstra. 2004. « Innate Immunity in the Lung: How Epithelial Cells Fight against Respiratory Pathogens ». *European Respiratory Journal* 23 (2): 327-33.
- Bals, Robert. 2000. « Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection ». *Respiratory Research* 1 (3): 141-50.
- Barletta, Kathryn E., R. Elaine Cagnina, Kori L. Wallace, Susan I. Ramos, Borna Mehrad, et Joel Linden. 2012. « Leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury ». *Journal of Immunological Methods* 375 (1-2): 100-110.
- Barman, Pijus K, et Helen S Goodridge. 2022. « Microbial Sensing by Hematopoietic Stem and Progenitor Cells ». *Stem Cells* 40 (1): 14-21.
- Begum, Rizwana, Shilpa Thota, Abubakar Abdulkadir, Gagandeep Kaur, Prathyusha Bagam, et Sanjay Batra. 2022. « NADPH Oxidase Family Proteins: Signaling Dynamics to Disease Management ». *Cellular & Molecular Immunology* 19 (6): 660-86.
- Berends, Evelien T. M., Annemarie Kuipers, Marietta M. Ravesloot, Rolf T. Urbanus, et Suzan H. M. Rooijackers. 2014. « Bacteria under Stress by Complement and Coagulation ». *FEMS Microbiology Reviews* 38 (6): 1146-71.
- Bergenfelz, Caroline, et Anders P Hakansson. 2017. « Streptococcus pneumoniae Otitis Media Pathogenesis and How It Informs Our Understanding of Vaccine Strategies ». *Current Otorhinolaryngology Reports* 5 (2): 115-24.
- Berger, Sarah, Cengiz Goekeri, Shishir K. Gupta, Julio Vera, Kristina Dietert, Ulrike Behrendt, Jasmin Lienau, et al. 2018. « Delay in Antibiotic Therapy Results in Fatal Disease Outcome in Murine Pneumococcal Pneumonia ». *Critical Care (London, England)* 22 (1): 287.
- Bergeron, Yves, Nathalie Ouellet, Anne-Marie Deslauriers, Marie Simard, Martin Olivier, et Michel G. Bergeron. 1998. « Cytokine Kinetics and Other Host Factors in Response to Pneumococcal Pulmonary Infection in Mice ». *Infection and Immunity* 66 (3): 912-22.
- Bjerregaard, Malene Digmann, Jesper Jurlander, Pia Klausen, Niels Borregaard, et Jack Bernard Cowland. 2003. « The in Vivo Profile of Transcription Factors during Neutrophil Differentiation in Human Bone Marrow ». *Blood* 101 (11): 4322-32.

- Boeltz, Sebastian, Poorya Amini, Hans-Joachim Anders, Felipe Andrade, Rostyslav Bilyy, Simon Chatfield, Iwona Cichon, et al. 2019. « To NET or Not to NET: Current Opinions and State of the Science Regarding the Formation of Neutrophil Extracellular Traps ». *Cell Death & Differentiation* 26 (3): 395-408.
- Bogaert, D, R de Groot, et PWM Hermans. 2004. « Streptococcus Pneumoniae Colonisation: The Key to Pneumococcal Disease ». *The Lancet Infectious Diseases* 4 (3): 144-54.
- Bonten, Marc J. M., Susanne M. Huijts, Marieke Bolkenbaas, Chris Webber, Scott Patterson, Samantha Gault, Cornelis H. van Werkhoven, et al. 2015. « Polysaccharide Conjugate Vaccine against Pneumococcal Pneumonia in Adults ». *The New England Journal of Medicine* 372 (12): 1114-25.
- Borregaard, Niels. 2010. « Neutrophils, from Marrow to Microbes ». *Immunity* 33 (5): 657-70.
- Borregaard, Niels, Ole E. Sørensen, et Kim Theilgaard-Mönch. 2007. « Neutrophil Granules: A Library of Innate Immunity Proteins ». *Trends in Immunology* 28 (8): 340-45.
- Borsa, Noemi, Marta Di Pasquale, et Marcos I. Restrepo. 2019. « Animal Models of Pneumococcal pneumonia ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (17): 4220.
- Bou Ghanem, Elsa N., Stacie Clark, Sara E. Roggensack, Sally R. McIver, Pilar Alcaide, Philip G. Haydon, et John M. Leong. 2015. « Extracellular Adenosine Protects against Streptococcus Pneumoniae Lung Infection by Regulating Pulmonary Neutrophil Recruitment ». *PLoS Pathogens* 11 (8): e1005126.
- Boxio, Rachel, Carine Bossenmeyer-Pourié, Natacha Steinckwich, Christian Dournon, et Oliver Nüße. 2004. « Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils ». *Journal of Leukocyte Biology* 75 (4): 604-11.
- Brinkmann, Volker, Ulrike Reichard, Christian Goosmann, Beatrix Fauler, Yvonne Uhlemann, David S. Weiss, Yvette Weinrauch, et Arturo Zychlinsky. 2004. « Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria ». *Science* 303 (5663): 1532-35.
- Brooks, Lavidia R. K., et George I. Mias. 2018. « Streptococcus Pneumoniae's Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention ». *Frontiers in Immunology* 9: 1366.
- Brown, Jeremy S., Tracy Hussell, Sarah M. Gilliland, David W. Holden, James C. Paton, Michael R. Ehrenstein, Mark J. Walport, et Marina Botto. 2002. « The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to Streptococcus pneumoniae infection in mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (26): 16969-74.
- Brueggemann, Angela B., David T. Griffiths, Emma Meats, Timothy Peto, Derrick W. Crook, et Brian G. Spratt. 2003. « Clonal Relationships between Invasive and Carriage Streptococcus Pneumoniae and Serotype- and Clone-Specific Differences in Invasive Disease Potential ». *The Journal of Infectious Diseases* 187 (9): 1424-32.
- Bush, Karen, et Patricia A. Bradford. 2016. «  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (8).

- Calbo, Esther, et Javier Garau. 2010. « Of Mice and Men: Innate Immunity in Pneumococcal Pneumonia ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 35 (2): 107-13.
- Canvin, J. R., A. P. Marvin, M. Sivakumaran, J. C. Paton, G. J. Boulnois, P. W. Andrew, et T. J. Mitchell. 1995. « The Role of Pneumolysin and Autolysin in the Pathology of Pneumonia and Septicemia in Mice Infected with a Type 2 Pneumococcus ». *The Journal of Infectious Diseases* 172 (1): 119-23.
- Casanova-Acebes, María, Christophe Pitaval, Linnea A. Weiss, César Nombela-Arrieta, Raphaël Chèvre, Noelia A-González, Yuya Kunisaki, et al. 2013. « Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance ». *Cell* 153 (5): 1025-35.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2009. « Bacterial Coinfections in Lung Tissue Specimens from Fatal Cases of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009 ». *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 58 (38): 1071-74.
- Chen, Edward Y., Christopher M. Tan, Yan Kou, Qiaonan Duan, Zichen Wang, Gabriela Vaz Meirelles, Neil R. Clark, et Avi Ma'ayan. 2013. « Enrichr : interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool ». *BMC Bioinformatics* 14 (1): 128.
- Chien, Yu-Wen, Keith P. Klugman, et David M. Morens. 2009. « Bacterial Pathogens and Death during the 1918 Influenza Pandemic ». *The New England Journal of Medicine* 361 (26): 2582-83.
- Chung, Won-Suk, Laura E. Clarke, Gordon X. Wang, Benjamin K. Stafford, Alexander Sher, Chandrani Chakraborty, Julia Joung, et al. 2013. « Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways ». *Nature* 504 (7480): 394-400.
- Cillóniz, Catia, Carolina Garcia-Vidal, Adrian Ceccato, et Antoni Torres. 2018. « Antimicrobial Resistance Among *Streptococcus pneumoniae* ». *Antimicrobial Resistance in the 21st Century*, mars, 13-38.
- Cowland, Jack B., et Niels Borregaard. 2016. « Granulopoiesis and Granules of Human Neutrophils ». *Immunological Reviews* 273 (1): 11-28.
- Craig, Ann, John Mai, Shanshan Cai, et Samithamby Jeyaseelan. 2009. « Neutrophil Recruitment to the Lungs during Bacterial Pneumonia ». *Infection and Immunity* 77 (2): 568-75.
- Craig, W. A. 1998. « Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 26 (1): 1-10; quiz 11-12.
- Craig, William A. 1996. « Antimicrobial Resistance Issues of the Future ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 25 (4): 213-17.
- Dalia, Ankur B., Alistair J. Standish, et Jeffrey N. Weiser. 2010. « Three Surface Exoglycosidases from *Streptococcus pneumoniae*, NanA, BgaA, and StrH, Promote Resistance to Opsonophagocytic Killing by Human Neutrophils ». *Infection and Immunity* 78 (5): 2108-16.

- Dancey, J T, K A Deubelbeiss, L A Harker, et C A Finch. 1976. « Neutrophil kinetics in man. » *Journal of Clinical Investigation* 58 (3): 705-15.
- Daniel, Priya, Chamira Rodrigo, Tricia M. Mckeever, Mark Woodhead, Sally Welham, Wei Shen Lim, et British Thoracic Society. 2016. « Time to First Antibiotic and Mortality in Adults Hospitalised with Community-Acquired Pneumonia: A Matched-Propensity Analysis ». *Thorax* 71 (6): 568-70.
- Davis, Kimberly M., Shigeki Nakamura, et Jeffrey N. Weiser. 2011. « Nod2 Sensing of Lysozyme-Digested Peptidoglycan Promotes Macrophage Recruitment and Clearance of *S. Pneumoniae* Colonization in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (9): 3666-76.
- Davis, Kimberly M., et Jeffrey N. Weiser. 2011. « Modifications to the Peptidoglycan Backbone Help Bacteria To Establish Infection ». *Infection and Immunity* 79 (2): 562-70.
- Day, Ryan B., et Daniel C. Link. 2012. « Regulation of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 69 (9): 1415-23.
- De Filippo, Katia, Daniel R. Neill, Meg Mathies, Mathieu Bangert, Eileen McNeill, Aras Kadioglu, et Nancy Hogg. 2014. « A New Protective Role for S100A9 in Regulation of Neutrophil Recruitment during Invasive Pneumococcal Pneumonia ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (8): 3600-3608.
- De Filippo, Katia, et Sara M. Rankin. 2018. « CXCR4, the Master Regulator of Neutrophil Trafficking in Homeostasis and Disease ». *European Journal of Clinical Investigation* 48 Suppl 2 (Suppl Suppl 2): e12949.
- Dehoux, M S, A Boutten, J Ostinelli, N Seta, M C Dombret, B Crestani, M Deschenes, J L Trouillet, et M Aubier. 1994. « Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. » *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 150 (3): 710-16.
- Delobel, Pauline, Benjamin Ginter, Eliane Rubio, Karl Balabanian, et Gwendal Lazennec. 2022. « CXCR2 intrinsically drives the maturation and function of neutrophils in mice ». *Frontiers in Immunology* 13.
- Devi, Sapna, Yilin Wang, Weng Keong Chew, Ronald Lima, Noelia A-González, Citra N.Z. Mattar, Shu Zhen Chong, et al. 2013. « Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (11): 2321-36.
- Dinauer, Mary C. 2016. « Primary immune deficiencies with defects in neutrophil function ». *Hematology* 2016 (1): 43-50.
- Dinauer, Mary C., Julie A. Lekstrom-Himes, et David C. Dale. 2000. « Inherited Neutrophil Disorders: Molecular Basis and New Therapies ». *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 303-18.

- Dockrell, David H., Helen M. Marriott, Lynne R. Prince, Victoria C. Ridger, Paul G. Ince, Paul G. Hellewell, et Moira K. B. Whyte. 2003. « Alveolar Macrophage Apoptosis Contributes to Pneumococcal Clearance in a Resolving Model of Pulmonary Infection ». *The Journal of Immunology* 171 (10): 5380-88.
- Doerschuk, C. M., J. Markos, H. O. Coxson, D. English, et J. C. Hogg. 1994. « Quantitation of Neutrophil Migration in Acute Bacterial Pneumonia in Rabbits ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 77 (6): 2593-99.
- Dolk, F. Christiaan K., Koen B. Pouwels, David R. M. Smith, Julie V. Robotham, et Timo Smieszek. 2018. « Antibiotics in Primary Care in England: Which Antibiotics Are Prescribed and for Which Conditions? » *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73 (suppl\_2): ii2-10.
- Domon, Hisanori, et Yutaka Terao. 2021. « The Role of Neutrophils and Neutrophil Elastase in Pneumococcal Pneumonia ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11: 615959.
- Du, Yang, Zhiqiang Hu, Yien Luo, Helen Y. Wang, Xiao Yu, et Rong-Fu Wang. 2023. « Function and Regulation of CGAS-STING Signaling in Infectious Diseases ». *Frontiers in Immunology* 14: 1130423.
- Dudek, M., F. Puttur, C. Arnold-Schrauf, A.A. Köhl, B. Holzmann, B. Henriques-Normark, L. Berod, et T. Sparwasser. 2016. « Lung Epithelium and Myeloid Cells Cooperate to Clear Acute Pneumococcal Infection ». *Mucosal Immunology* 9 (5): 1288-1302.
- Eash, Kyle J., Adam M. Greenbaum, Priya K. Gopalan, et Daniel C. Link. 2010. « CXCR2 and CXCR4 Antagonistically Regulate Neutrophil Trafficking from Murine Bone Marrow ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (7): 2423-31.
- Eisele, Nicholas A., et Deborah M. Anderson. 2011. « Host Defense and the Airway Epithelium: Frontline Responses That Protect against Bacterial Invasion and Pneumonia ». *Journal of Pathogens* 2011: 249802.
- El-Benna, Jamel, Margarita Hurtado-Nedelec, Viviana Marzaioli, Jean-Claude Marie, Marie-Anne Gougerot-Pocidalo, et Pham My-Chan Dang. 2016. « Priming of the Neutrophil Respiratory Burst: Role in Host Defense and Inflammation ». *Immunological Reviews* 273 (1): 180-93.
- Ellis, Gregory T., Sophia Davidson, Stefania Crotta, Nora Branzk, Venizelos Papayannopoulos, et Andreas Wack. 2015. « TRAIL+ Monocytes and Monocyte-Related Cells Cause Lung Damage and Thereby Increase Susceptibility to Influenza-Streptococcus Pneumoniae Coinfection ». *EMBO Reports* 16 (9): 1203-18.
- EMA. 2021. « Apexxnar ». Text. European Medicines Agency. 14 décembre 2021.
- Evrard, Maximilien, Immanuel W. H. Kwok, Shu Zhen Chong, Karen W. W. Teng, Etienne Becht, Jinmiao Chen, Je Lin Sieow, et al. 2018. « Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions ». *Immunity* 48 (2): 364-379.e8.

- Fang, Rendong, Kohsuke Tsuchiya, Ikuo Kawamura, Yanna Shen, Hideki Hara, Shunsuke Sakai, Takeshi Yamamoto, et al. 2011. « Critical Roles of ASC Inflammasomes in Caspase-1 Activation and Host Innate Resistance to Streptococcus Pneumoniae Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (9): 4890-99.
- Feng, Siwei, Tingting Chen, Guihua Lei, Fengqing Hou, Jiali Jiang, Qingyuan Huang, Yuanyi Peng, Chao Ye, Dong-Liang Hu, et Rendong Fang. 2019. « Absent in melanoma 2 inflammasome is required for host defence against Streptococcus pneumoniae infection ». *Innate Immunity* 25 (7): 412-19.
- Fletcher, Ashley A., et Christopher M. Evans. 2014. « Regulation of Microbial Populations and Immune Functions by Muc5b ». *Annals of the American Thoracic Society* 11 (Suppl 1): S80.
- Ford, A. M., C. A. Bennett, L. E. Healy, M. Towatari, M. F. Greaves, et T. Enver. 1996. « Regulation of the Myeloperoxidase Enhancer Binding Proteins Pu1, C-EBP Alpha, -Beta, and -Delta during Granulocyte-Lineage Specification ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20): 10838-43.
- Franck, Sebastian, Tania Fuhrmann-Selter, Jan F. Joseph, Robin Michelet, Fiordiligie Casilag, Jean-Claude Sirard, Sebastian G. Wicha, et Charlotte Kloft. 2019. « A rapid, simple and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to determine amoxicillin concentrations in biological matrix of little volume ». *Talanta* 201 (août): 253-58.
- Fuchs, Tobias A., Ulrike Abed, Christian Goosmann, Robert Hurwitz, Ilka Schulze, Volker Wahn, Yvette Weinrauch, Volker Brinkmann, et Arturo Zychlinsky. 2007. « Novel Cell Death Program Leads to Neutrophil Extracellular Traps ». *The Journal of Cell Biology* 176 (2): 231-41.
- Fuji, Naoko, Michael E. Pichichero, et Ravinder Kaur. 2021. « Comparison of Specific In-Vitro Virulence Gene Expression and Innate Host Response in Locally Invasive vs Colonizer Strains of Streptococcus Pneumoniae ». *Medical Microbiology and Immunology* 210 (2-3): 111-20.
- Furze, Rebecca C, et Sara M Rankin. 2008. « Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow ». *Immunology* 125 (3): 281-88.
- Futosi, Krisztina, Szabina Fodor, et Attila Mócsai. 2013. « Neutrophil Cell Surface Receptors and Their Intracellular Signal Transduction Pathways ». *International Immunopharmacology* 17 (3): 638-50.
- Gaffen, Sarah L. 2009. « Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily ». *Nature reviews. Immunology* 9 (8): 556.
- Ganaie, Feroze, Jamil S. Saad, Lesley McGee, Andries J. van Tonder, Stephen D. Bentley, Stephanie W. Lo, Rebecca A. Gladstone, et al. 2020. « A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, Is the 100th Serotype and Has a Large Cps Fragment from an Oral Streptococcus ». *MBio* 11 (3): e00937-20.

- Ganz, T, J A Metcalf, J I Gallin, L A Boxer, et R I Lehrer. 1988. « Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and “specific” granule deficiency. » *Journal of Clinical Investigation* 82 (2): 552-56.
- Garvy, B. A., et A. G. Harmsen. 1996. « The Importance of Neutrophils in Resistance to Pneumococcal Pneumonia in Adult and Neonatal Mice ». *Inflammation* 20 (5): 499-512.
- Gauguet, Stefanie, Samantha D’Ortona, Kathryn Ahnger-Pier, Biyan Duan, Neeraj K. Surana, Roger Lu, Colette Cywes-Bentley, et al. 2015. « Intestinal Microbiota of Mice Influences Resistance to Staphylococcus Aureus Pneumonia ». *Infection and Immunity* 83 (10): 4003-14.
- Geno, K. Aaron, Gwendolyn L. Gilbert, Joon Young Song, Ian C. Skovsted, Keith P. Klugman, Christopher Jones, Helle B. Konradsen, et Moon H. Nahm. 2015. « Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future ». *Clinical Microbiology Reviews* 28 (3): 871-99.
- Ghoneim, Hazem E., Paul G. Thomas, et Jonathan A. McCullers. 2013. « Depletion of Alveolar Macrophages during Influenza Infection Facilitates Bacterial Superinfections ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (3): 1250-59.
- Gil, Eliza, Mahdad Noursadeghi, et Jeremy S. Brown. 2022. « Streptococcus pneumoniae interactions with the complement system ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (juillet): 929483.
- Gombart, Adrian F., Scott H. Kwok, Karen L. Anderson, Yuji Yamaguchi, Bruce E. Torbett, et H. Phillip Koeffler. 2003. « Regulation of Neutrophil and Eosinophil Secondary Granule Gene Expression by Transcription Factors C/EBP Epsilon and PU.1 ». *Blood* 101 (8): 3265-73.
- Gomez, John C., Hong Dang, Matthew Kanke, Robert S. Hagan, Jason R. Mock, Samir N. P. Kelada, Praveen Sethupathy, et Claire M. Doerschuk. 2017. « Predicted Effects of Observed Changes in the MRNA and MicroRNA Transcriptome of Lung Neutrophils during S. Pneumoniae Pneumonia in Mice ». *Scientific Reports* 7 (1): 11258.
- Granton, Elise, Jung Hwan Kim, John Podstawka, et Bryan G. Yipp. 2018. « The Lung Microvasculature Is a Functional Immune Niche ». *Trends in Immunology* 39 (11): 890-99.
- Grief, Samuel N., et Julie K. Loza. 2018. « Guidelines for the Evaluation and Treatment of Pneumonia ». *Primary Care* 45 (3): 485-503.
- Griese, M., M. Steinecker, S. Schumacher, A. Braun, P. Lohse, et S. Heinrich. 2008. « Children with Absent Surfactant Protein D in Bronchoalveolar Lavage Have More Frequently Pneumonia ». *Pediatric Allergy and Immunology* 19 (7): 639-47.
- Grieshaber-Bouyer, Ricardo, Felix A. Radtke, Pierre Cunin, Giuseppina Stifano, Anaïs Levescot, Brinda Vijaykumar, Nathan Nelson-Maney, Rachel B. Blaustein, Paul A. Monach, et Peter A. Nigrovic. 2021. « The neutrotime transcriptional signature defines a single continuum of neutrophils across biological compartments ». *Nature Communications* 12 (mai): 2856.
- Guilliams, Martin, Alexander Mildner, et Simon Yona. 2018. « Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes ». *Immunity* 49 (4): 595-613.

- Guillot, Loïc, Nadia Nathan, Olivier Tabary, Guillaume Thouvenin, Philippe Le Rouzic, Harriet Corvol, Serge Amselem, et Annick Clement. 2013. « Alveolar Epithelial Cells: Master Regulators of Lung Homeostasis ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (11): 2568-73.
- Gupta, P., S. Awasthi, U. Gupta, N. Verma, T. Rastogi, A. K. Pandey, H. Naziat, H. Rahman, M. Islam, et S. Saha. 2022. « Nasopharyngeal Carriage of Streptococcus Pneumoniae Serotypes Among Healthy Children in Northern India ». *Current Microbiology* 80 (1): 41.
- Hahn, Ines, Anna Klaus, Ann-Kathrin Janze, Kathrin Steinwede, Nadine Ding, Jennifer Bohling, Christina Brumshagen, et al. 2011. « Cathepsin G and Neutrophil Elastase Play Critical and Nonredundant Roles in Lung-Protective Immunity against Streptococcus pneumoniae in Mice ». *Infection and Immunity* 79 (12): 4893-4901.
- Hamaguchi, Shigeto, M. Ammar Zafar, Michael Cammer, et Jeffrey N. Weiser. 2018. « Capsule Prolongs Survival of Streptococcus Pneumoniae during Starvation ». *Infection and Immunity* 86 (3): e00802-17.
- Heib, Tobias, Carina Gross, Martha-Lena Müller, David Stegner, et Irina Pleines. 2021. « Isolation of Murine Bone Marrow by Centrifugation or Flushing for the Analysis of Hematopoietic Cells - a Comparative Study ». *Platelets* 32 (5): 601-7.
- Herbold, Wiebke, Regina Maus, Ines Hahn, Nadine Ding, Mrigank Srivastava, John W. Christman, Matthias Mack, et al. 2010. « Importance of CXC Chemokine Receptor 2 in Alveolar Neutrophil and Exudate Macrophage Recruitment in Response to Pneumococcal Lung Infection ». *Infection and Immunity* 78 (6): 2620-30.
- Hergott, Christopher B., Aoife M. Roche, Nikhil A. Naidu, Clementina Mesaros, Ian A. Blair, et Jeffrey N. Weiser. 2015. « Bacterial Exploitation of Phosphorylcholine Mimicry Suppresses Inflammation to Promote Airway Infection ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (10): 3878-90.
- Herring, Sydney E., Sovathiro Mao, Manmeet Bhalla, Essi Y. I. Tchalla, Jill M. Kramer, et Elsa N. Bou Ghanem. 2022. « Mitochondrial ROS production by neutrophils is required for host antimicrobial function against Streptococcus pneumoniae and is controlled by A2B adenosine receptor signaling ». *PLOS Pathogens* 18 (11): e1010700.
- Heß, Nathalie, Franziska Waldow, Thomas P. Kohler, Manfred Rohde, Bernd Kreikemeyer, Alejandro Gómez-Mejía, Torsten Hain, et al. 2017. « Lipoteichoic Acid Deficiency Permits Normal Growth but Impairs Virulence of Streptococcus Pneumoniae ». *Nature Communications* 8 (1): 2093.
- Hidalgo, Andrés, Edwin R. Chilvers, Charlotte Summers, et Leo Koenderman. 2019. « The Neutrophil Life Cycle ». *Trends in Immunology* 40 (7): 584-97.
- Holzheimer, R. G. 2001. « Antibiotic Induced Endotoxin Release and Clinical Sepsis: A Review ». *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)* 13 Spec No 1 (1): 159-72.
- Hou L, Voit RA, Shibamura-Fujiogi M, Koutsogiannaki S, Li Y, Chen Y, et al. CD11c regulates neutrophil maturation. *Blood Adv.* 2022.

- Hyams, Catherine, Emilie Camberlein, Jonathan M. Cohen, Katie Bax, et Jeremy S. Brown. 2010. « The Streptococcus pneumoniae Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms ». *Infection and Immunity* 78 (2): 704-15.
- Ikuta, Kevin S., Lucien R. Swetschinski, Gisela Robles Aguilar, Fablina Sharara, Tomislav Mestrovic, Authia P. Gray, Nicole Davis Weaver, et al. 2022. « Global Mortality Associated with 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 ». *The Lancet* 400 (10369): 2221-48.
- J, Li, Glover Dt, Szalai Aj, Hollingshead Sk, et Briles De. 2007. « PspA and PspC Minimize Immune Adherence and Transfer of Pneumococci from Erythrocytes to Macrophages through Their Effects on Complement Activation ». *Infection and Immunity* 75 (12).
- Jackson, J. J., et H. Kropp. 1992. « Beta-Lactam Antibiotic-Induced Release of Free Endotoxin: In Vitro Comparison of Penicillin-Binding Protein (PBP) 2-Specific Imipenem and PBP 3-Specific Ceftazidime ». *The Journal of Infectious Diseases* 165 (6): 1033-41.
- Jeon, Jae-Han, Chang-Won Hong, Eun Young Kim, et Jae Man Lee. 2020. « Current Understanding on the Metabolism of Neutrophils ». *Immune Network* 20 (6): e46.
- Jeong, Dong-Gu, Jin-Hee Seo, Seung-Ho Heo, Yang-Kyu Choi, et Eui-Suk Jeong. 2015. « Tumor Necrosis Factor-Alpha Deficiency Impairs Host Defense against Streptococcus Pneumoniae ». *Laboratory Animal Research* 31 (2): 78-85.
- Jones, Matthew R., Benjamin T. Simms, Michal M. Lupa, Mariya S. Kogan, et Joseph P. Mizgerd. 2005. « Lung NF-KappaB Activation and Neutrophil Recruitment Require IL-1 and TNF Receptor Signaling during Pneumococcal Pneumonia ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (11): 7530-35.
- Jönsson, Göran, Lennart Truedsson, Gunnar Sturfelt, Vivi-Anne Oxelius, Jean Henrik Braconier, et Anders G. Sjöholm. 2005. « Hereditary C2 Deficiency in Sweden: Frequent Occurrence of Invasive Infection, Atherosclerosis, and Rheumatic Disease ». *Medicine* 84 (1): 23.
- Joseph, Carol, Yu Togawa, et Nahoko Shindo. 2013. « Bacterial and viral infections associated with influenza ». *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7 (Suppl 2): 105-13.
- Jounblat, R., H. Clark, P. Eggleton, S. Hawgood, P. W. Andrew, et A. Kadioglu. 2005. « The Role of Surfactant Protein D in the Colonisation of the Respiratory Tract and Onset of Bacteraemia during Pneumococcal Pneumonia ». *Respiratory Research* 6 (1): 126.
- Kadioglu, Aras, Katia De Filippo, Mathieu Bangert, Vitor E. Fernandes, Luke Richards, Kristian Jones, Peter W. Andrew, et Nancy Hogg. 2011. « The Integrins Mac-1 and Alpha4beta1 Perform Crucial Roles in Neutrophil and T Cell Recruitment to Lungs during Streptococcus Pneumoniae Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (10): 5907-15.
- Kadioglu, Aras, Neill A. Gingles, Kate Grattan, Alison Kerr, Tim J. Mitchell, et Peter W. Andrew. 2000. « Host Cellular Immune Response to Pneumococcal Lung Infection in Mice ». *Infection and Immunity* 68 (2): 492-501.

- Kadioglu, Aras, Jeffrey N. Weiser, James C. Paton, et Peter W. Andrew. 2008. « The Role of Streptococcus Pneumoniae Virulence Factors in Host Respiratory Colonization and Disease ». *Nature Reviews Microbiology* 6 (4): 288-301.
- Kafka, Daniel, Eduard Ling, Galia Feldman, Daniel Benharroch, Elena Voronov, Noga Givon-Lavi, Yoichiro Iwakura, Ron Dagan, Ron N. Apte, et Yaffa Mizrahi-Nebenzahl. 2008. « Contribution of IL-1 to Resistance to Streptococcus Pneumoniae Infection ». *International Immunology* 20 (9): 1139-46.
- Kalafati, Lydia, Aikaterini Hatzioannou, George Hajishengallis, et Triantafyllos Chavakis. 2023. « The Role of Neutrophils in Trained Immunity ». *Immunological Reviews* 314 (1): 142-57.
- Kang, Young-Sun, Jae Y. Kim, Sandra A. Bruening, Maggi Pack, Anna Charalambous, Alla Pritsker, Thomas M. Moran, Jutta M. Loeffler, Ralph M. Steinman, et Chae Gyu Park. 2004. « The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of Streptococcus pneumoniae in the marginal zone of mouse spleen ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (1): 215-20.
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2011. « Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity ». *Immunity* 34 (5): 637-50.
- Kerr, Alison R., Gavin K. Paterson, Jackie McCluskey, Francesco Iannelli, Marco R. Oggioni, Gianni Pozzi, et Tim J. Mitchell. 2006. « The Contribution of PspC to Pneumococcal Virulence Varies between Strains and Is Accomplished by Both Complement Evasion and Complement-Independent Mechanisms ». *Infection and Immunity* 74 (9): 5319-24.
- Kim, Hyun Kyung, Maria De La Luz Sierra, Cassin Kimmel Williams, A. Virginia Gulino, et Giovanna Tosato. 2006. « G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells ». *Blood* 108 (3): 812-20.
- Kim, Lindsay, Lesley McGee, Sara Tomczyk, et Bernard Beall. 2016. « Biological and Epidemiological Features of Antibiotic-Resistant Streptococcus pneumoniae in Pre- and Post-Conjugate Vaccine Eras: a United States Perspective ». *Clinical Microbiology Reviews* 29 (3): 525-52.
- Knapp, Sylvia, Jaklien C. Leemans, Sandrine Florquin, Judith Branger, Nico A. Maris, Jennie Pater, Nico van Rooijen, et Tom van der Poll. 2003. « Alveolar Macrophages Have a Protective Antiinflammatory Role during Murine Pneumococcal Pneumonia ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167 (2): 171-79.
- Kolaczowska, Elzbieta, et Paul Kubes. 2013. « Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (3): 159-75.
- Koppe, Uwe, Katrin Högner, Jan-Moritz Doehn, Holger C. Müller, Martin Witzenth, Birgitt Gutbier, Stefan Bauer, et al. 2012. « Streptococcus Pneumoniae Stimulates a STING- and IFN Regulatory Factor 3-Dependent Type I IFN Production in Macrophages, Which Regulates RANTES Production in Macrophages, Cocultured Alveolar Epithelial Cells, and Mouse Lungs ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (2): 811-17.

- Koppe, Uwe, Norbert Suttorp, et Bastian Opitz. 2012. « Recognition of Streptococcus Pneumoniae by the Innate Immune System ». *Cellular Microbiology* 14 (4): 460-66.
- Korkmaz, Filiz T., et Katrina E. Traber. 2023. « Innate immune responses in pneumonia ». *Pneumonia* 15 (1): 4.
- Kowalska-Krochmal, Beata, et Ruth Dudek-Wicher. 2021. « The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance ». *Pathogens* 10 (2): 165.
- Kraus, Richard Felix, et Michael Andreas Gruber. 2021. « Neutrophils—From Bone Marrow to First-Line Defense of the Innate Immune System ». *Frontiers in Immunology* 12.
- Kumar, Sushil, Harshad Ingle, Durbaka Vijaya Raghava Prasad, et Himanshu Kumar. 2013. « Recognition of Bacterial Infection by Innate Immune Sensors ». *Critical Reviews in Microbiology* 39 (3): 229-46.
- Kuronuma, Koji, Hitomi Sano, Kazunori Kato, Kazumi Kudo, Naoki Hyakushima, Shin-ichi Yokota, Hiroki Takahashi, et al. 2004. « Pulmonary Surfactant Protein A Augments the Phagocytosis of Streptococcus Pneumoniae by Alveolar Macrophages through a Casein Kinase 2-Dependent Increase of Cell Surface Localization of Scavenger Receptor A\* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (20): 21421-30.
- Lacy, Paige. 2006. « Mechanisms of Degranulation in Neutrophils ». *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 2 (3): 98-108.
- Langevelde, P. van, J. T. van Dissel, E. Ravensbergen, B. J. Appelmelk, I. A. Schrijver, et P. H. Groeneveld. 1998. « Antibiotic-Induced Release of Lipoteichoic Acid and Peptidoglycan from Staphylococcus Aureus: Quantitative Measurements and Biological Reactivities ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (12): 3073-78.
- Lawrence, Shelley M., Ross Corriden, et Victor Nizet. 2018. « The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 82 (1): e00057-17.
- Lee, Han Sol, et Woo Joo Kim. 2022. « The Role of Matrix Metalloproteinase in Inflammation with a Focus on Infectious Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (18): 10546.
- Lemon, Jamie K., et Jeffrey N. Weiser. 2015. « Degradation Products of the Extracellular Pathogen Streptococcus pneumoniae Access the Cytosol via Its Pore-Forming Toxin ». *mBio* 6 (1): e02110-14.
- Leshner, Marc, Shu Wang, Carrie Lewis, Han Zheng, Xiangyun Chen, Lorraine Santy, et Yanming Wang. 2012. « PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures ». *Frontiers in Immunology* 3.
- Li, Danyang, et Minghua Wu. 2021. « Pattern Recognition Receptors in Health and Diseases ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 (1): 1-24.

- Lieshout, Miriam H.P. van, Alex F. de Vos, Mark C. Dessing, Alexander P.N.A. de Porto, Onno J. de Boer, Regina de Beer, Sanne Terpstra, Sandrine Florquin, Cornelis van't Veer, et Tom van der Poll. 2018. « ASC and NLRP3 Impair Host Defense during Lethal Pneumonia Caused by Serotype 3 Streptococcus Pneumoniae in Mice ». *European Journal of Immunology* 48 (1): 66-79.
- Lin, Michelle, Patricia Jackson, Angus M. Tester, Eugenia Diaconu, Christopher M. Overall, J. Edwin Blalock, et Eric Pearlman. 2008. « Matrix Metalloproteinase-8 Facilitates Neutrophil Migration through the Corneal Stromal Matrix by Collagen Degradation and Production of the Chemotactic Peptide Pro-Gly-Pro ». *The American Journal of Pathology* 173 (1): 144-53.
- Locke, Matthew, Robert J. Francis, Evgenia Tsaousi, et Colin Longstaff. 2020. « Fibrinogen protects neutrophils from the cytotoxic effects of histones and delays neutrophil extracellular trap formation induced by ionomycin ». *Scientific Reports* 10 (juillet): 11694.
- Ma, Qing, Dan Jones, et Timothy A. Springer. 1999. « The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for the Retention of B Lineage and Granulocytic Precursors within the Bone Marrow Microenvironment ». *Immunity* 10 (4): 463-71.
- Maas, Sanne L., Oliver Soehnlein, et Joana R. Viola. 2018. « Organ-Specific Mechanisms of Transendothelial Neutrophil Migration in the Lung, Liver, Kidney, and Aorta ». *Frontiers in Immunology* 9.
- MacIntyre, Chandini Raina, Abrar Ahmad Chughtai, Michelle Barnes, Iman Ridda, Holly Seale, Renin Toms, et Anita Heywood. 2018. « The Role of Pneumonia and Secondary Bacterial Infection in Fatal and Serious Outcomes of Pandemic Influenza a(H1N1)Pdm09 ». *BMC Infectious Diseases* 18 (1): 637.
- MacMicking, J., Q. W. Xie, et C. Nathan. 1997. « Nitric Oxide and Macrophage Function ». *Annual Review of Immunology* 15: 323-50.
- « Maladie pneumococcique | CDC ». 2022. 1 novembre 2022.
- Malengier-Devlies, Bert, Mieke Metzemaekers, Carine Wouters, Paul Proost, et Patrick Matthys. 2021. « Neutrophil Homeostasis and Emergency Granulopoiesis: The Example of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis ». *Frontiers in Immunology* 12.
- Mall, Marcus A. 2008. « Role of Cilia, Mucus, and Airway Surface Liquid in Mucociliary Dysfunction: Lessons from Mouse Models ». *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* 21 (1): 13-24.
- Malley, Richard, Philipp Henneke, Sarah C. Morse, Michael J. Cieslewicz, Marc Lipsitch, Claudette M. Thompson, Evelyn Kurt-Jones, James C. Paton, Michael R. Wessels, et Douglas T. Golenbock. 2003. « Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (4): 1966-71.
- Manz, Markus G., et Steffen Boettcher. 2014. « Emergency Granulopoiesis ». *Nature Reviews. Immunology* 14 (5): 302-14.

- Marriott, Helen M., Colin D. Bingle, Robert C. Read, Karen E. Braley, Guido Kroemer, Paul G. Hellewell, Ruth W. Craig, Moira K.B. Whyte, et David H. Dockrell. 2005. « Dynamic changes in Mcl-1 expression regulate macrophage viability or commitment to apoptosis during bacterial clearance ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (2): 359-68.
- Marriott, Helen M., Laura E. Jackson, Thomas S. Wilkinson, A. John Simpson, Tim J. Mitchell, David J. Buttle, Simon S. Cross, et al. 2008. « Reactive Oxygen Species Regulate Neutrophil Recruitment and Survival in Pneumococcal Pneumonia ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 (8): 887-95.
- Martin, Coralie, Peter C. E. Burdon, Gary Bridger, Jose Carlos Gutierrez-Ramos, Timothy J. Williams, et Sara M. Rankin. 2003. « Chemokines Acting via CXCR2 and CXCR4 Control the Release of Neutrophils from the Bone Marrow and Their Return Following Senescence ». *Immunity* 19 (4): 583-93.
- Martner, Anna, Claes Dahlgren, James C. Paton, et Agnes E. Wold. 2008. « Pneumolysin Released during *Streptococcus pneumoniae* Autolysis Is a Potent Activator of Intracellular Oxygen Radical Production in Neutrophils ». *Infection and Immunity* 76 (9): 4079-87.
- Masomian, Malihe, Zuleeza Ahmad, Lai Ti Gew, et Chit Laa Poh. 2020. « Development of Next Generation *Streptococcus pneumoniae* Vaccines Conferring Broad Protection ». *Vaccines* 8 (1): 132.
- Matarazzo, Laura, Fiordiligie Casilag, Rémi Porte, Frederic Wallet, Delphine Cayet, Christelle Faveeuw, Christophe Carnoy, et Jean-Claude Sirard. 2019. « Therapeutic Synergy Between Antibiotics and Pulmonary Toll-Like Receptor 5 Stimulation in Antibiotic-Sensitive or -Resistant Pneumonia ». *Frontiers in Immunology* 10: 723.
- Mattie, Herman, Kristin Stuert, Roland Nau, et Jaap T. van Dissel. 2005. « Pharmacodynamics of Antibiotics with Respect to Bacterial Killing of and Release of Lipoteichoic Acid by *Streptococcus pneumoniae* ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (1): 154-59.
- McAllister, David A, Li Liu, Ting Shi, Yue Chu, Craig Reed, John Burrows, Davies Adeyoye, et al. 2018. « Global, regional, and national estimates of pneumonia morbidity and mortality in children younger than 5 years between 2000 and 2015: a systematic analysis ». *The Lancet. Global Health* 7 (1): e47-57.
- McCullers, Jonathan A. 2014. « The Co-Pathogenesis of Influenza Viruses with Bacteria in the Lung ». *Nature Reviews. Microbiology* 12 (4): 252-62.
- McNeela, Edel A., Aine Burke, Daniel R. Neill, Cathy Baxter, Vitor E. Fernandes, Daniela Ferreira, Sarah Smeaton, et al. 2010. « Pneumolysin Activates the NLRP3 Inflammasome and Promotes Proinflammatory Cytokines Independently of TLR4 ». *PLoS Pathogens* 6 (11): e1001191.
- Medzhitov, Ruslan. 2007. « Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response ». *Nature* 449 (7164): 819-26.
- McGill, Cassandra J., Ryan J. Lu, et Bérénice A. Benayoun. 2021. « Protocol for Analysis of Mouse Neutrophil NETosis by Flow Cytometry ». *STAR Protocols* 2 (4): 100948.

- Miralda, Irina, Silvia M. Uriarte, et Kenneth R. McLeish. 2017. « Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (mai): 217.
- Misharin, Alexander V., Luisa Morales-Nebreda, Gökhan M. Mutlu, G. R. Scott Budinger, et Harris Perlman. 2013. « Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Dendritic Cell Subsets in the Mouse Lung ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 49 (4): 503-10.
- Mitroulis, Ioannis, Lydia Kalafati, George Hajishengallis, et Triantafyllos Chavakis. 2018. « Myelopoiesis in the Context of Innate Immunity ». *Journal of Innate Immunity* 10 (5-6): 365-72.
- Mondemé, Mélanie, Christophe Carnoy, Jean-Claude Sirard, et Christelle Faveeuw. 2023. « Treatment of Bacterial Infections with  $\beta$ -Lactams: Cooperation with Innate Immunity ». *Infection and Immunity* 91 (2): e00503-22.
- Moore, Lisa J., Alison C. Pridmore, Steven K. Dower, et Robert C. Read. 2003. « Penicillin Enhances the Toll-like Receptor 2-Mediated Proinflammatory Activity of Streptococcus Pneumoniae ». *The Journal of Infectious Diseases* 188 (7): 1040-48.
- Morona, Judy K., Renato Morona, et James C. Paton. 2006. « Attachment of Capsular Polysaccharide to the Cell Wall of Streptococcus Pneumoniae Type 2 Is Required for Invasive Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (22): 8505-10.
- Morris, Denise E., David W. Cleary, et Stuart C. Clarke. 2017. « Secondary Bacterial Infections Associated with Influenza Pandemics ». *Frontiers in Microbiology* 8: 1041.
- Nagai, Yoshinori, Karla P. Garrett, Shoichiro Ohta, Uleng Bahrin, Taku Kouro, Shizuo Akira, Kiyoshi Takatsu, et Paul W. Kincade. 2006. « Toll-Like Receptors on Hematopoietic Progenitor Cells Stimulate Innate Immune System Replenishment ». *Immunity* 24 (6): 801-12.
- Naish, Emily, Alexander JT Wood, Andrew P Stewart, Matthew Routledge, Andrew Conway Morris, Edwin R Chilvers, et Katharine M Lodge. 2023. « The Formation and Function of the Neutrophil Phagosome ». *Immunological Reviews* 314 (1): 158-80.
- Nandakumar, Satish K., Jacob C. Ulirsch, et Vijay G. Sankaran. 2016. « Advances in Understanding Erythropoiesis: Evolving Perspectives ». *British Journal of Haematology* 173 (2): 206-18.
- Nasioudis, Dimitrios, et Steven S. Witkin. 2015. « Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Innate Immune Responses to Bacterial Infections ». *Medical Microbiology and Immunology* 204 (4): 471-79.
- Nelson, Aaron L., Aoife M. Roche, Jane M. Gould, Kannie Chim, Adam J. Ratner, et Jeffrey N. Weiser. 2007. « Capsule Enhances Pneumococcal Colonization by Limiting Mucus-Mediated Clearance ». *Infection and Immunity* 75 (1): 83-90.
- Neshani, Alireza, Hosna Zare, Mohammad Reza Akbari Eidgahi, Reza Kamali Kakhki, Hadi Safdari, Azad Khaledi, et Kiarash Ghazvini. 2019. « LL-37: Review of Antimicrobial Profile against Sensitive and Antibiotic-Resistant Human Bacterial Pathogens ». *Gene Reports* 17 (décembre): 100519.

- Ng, Lai Guan, Renato Ostuni, et Andrés Hidalgo. 2019. « Heterogeneity of Neutrophils ». *Nature Reviews Immunology* 19 (4): 255-65.
- Nguyen, Giang T., Erin R. Green, et Joan Mecsas. 2017. « Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 373.
- Nies KPH, Kraaijvanger R, Lindelauf KHK, Drent R, Rutten RMJ, Ramaekers FCS, et al. Determination of the proliferative fractions in differentiating hematopoietic cell lineages of normal bone marrow. *Cytometry A*. 2018;93(11):1097-105.
- Nishimoto, Andrew T., Jason W. Rosch, et Elaine I. Tuomanen. 2020. « Pneumolysin: Pathogenesis and Therapeutic Target ». *Frontiers in Microbiology* 11 (juillet): 1543.
- Nordenfelt, Pontus, et Hans Tapper. 2011. « Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils ». *Journal of Leukocyte Biology* 90 (2): 271-84.
- O'Brien, Katherine L., et Ron Dagan. 2003. « The Potential Indirect Effect of Conjugate Pneumococcal Vaccines ». *Vaccine* 21 (17-18): 1815-25.
- Opitz, Bastian, Anja Püschel, Bernd Schmeck, Andreas C. Hocke, Simone Rosseau, Sven Hammerschmidt, Ralf R. Schumann, Norbert Suttorp, et Stefan Hippenstiel. 2004. « Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Proteins Are Innate Immune Receptors for Internalized Streptococcus Pneumoniae\* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (35): 36426-32.
- Palmer, Catherine S., et Jacqueline M. Kimmey. 2022. « Neutrophil Recruitment in Pneumococcal Pneumonia ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (mai): 894644.
- Papayannopoulos, Venizelos, Kathleen D. Metzler, Abdul Hakkim, et Arturo Zychlinsky. 2010. « Neutrophil Elastase and Myeloperoxidase Regulate the Formation of Neutrophil Extracellular Traps ». *The Journal of Cell Biology* 191 (3): 677-91.
- Pateron, Dominique, Maurice Raphaël, et Albert Trinh-Duc. 2019. « Pneumopathies infectieuses communautaires ». *Mega-Guide Pratique des Urgences*, 112-22.
- Paudel, Sagar, Pankaj Baral, Laxman Ghimire, Scott Bergeron, Liliang Jin, Joseph A. DeCorte, John T. Le, Shanshan Cai, et Samithamby Jeyaseelan. 2019. « CXCL1 regulates neutrophil homeostasis in pneumonia-derived sepsis caused by Streptococcus pneumoniae serotype 3 ». *Blood* 133 (12): 1335-45.
- Peñaloza, Hernán F., Pamela A. Nieto, Natalia Muñoz-Durango, Francisco J. Salazar-Echegarai, Javiera Torres, María J. Parga, Manuel Alvarez-Lobos, Claudia A. Riedel, Alexis M. Kalergis, et Susan M. Bueno. 2015. « Interleukin-10 Plays a Key Role in the Modulation of Neutrophils Recruitment and Lung Inflammation during Infection by Streptococcus Pneumoniae ». *Immunology* 146 (1): 100-112.
- Pérez-Dorado, I., S. Galan-Bartual, et J. A. Hermoso. 2012. « Pneumococcal Surface Proteins: When the Whole Is Greater than the Sum of Its Parts ». *Molecular Oral Microbiology* 27 (4): 221-45.

- Periselneris, Jimstan, Ricardo J. José, et Jeremy Brown. 2015. « Targeting Inflammatory Responses to Streptococcus Pneumoniae ». *New Horizons in Translational Medicine* 2 (6): 167-74.
- Pham, Christine T. N. 2006. « Neutrophil Serine Proteases: Specific Regulators of Inflammation ». *Nature Reviews Immunology* 6 (7): 541-50.
- Pinho, Sandra, et Paul S. Frenette. 2019. « Haematopoietic Stem Cell Activity and Interactions with the Niche ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 20 (5): 303.
- Poll, T van der, C V Keogh, W A Buurman, et S F Lowry. 1997. « Passive immunization against tumor necrosis factor-alpha impairs host defense during pneumococcal pneumonia in mice. » *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155 (2): 603-8.
- Poll, Tom van der, Christopher V. Keogh, Xavier Guirao, Wim A. Buurman, Manfred Kopf, et Stephen F. Lowry. 1997. « Interleukin-6 Gene-Deficient Mice Show Impaired Defense against Pneumococcal Pneumonia ». *The Journal of Infectious Diseases* 176 (2): 439-44.
- Postma, Douwe F., Cornelis H. van Werkhoven, Leontine J. R. van Elden, Steven F. T. Thijsen, Andy I. M. Hoepelman, Jan A. J. W. Kluytmans, Wim G. Boersma, et al. 2015. « Antibiotic Treatment Strategies for Community-Acquired Pneumonia in Adults ». *The New England Journal of Medicine* 372 (14): 1312-23.
- Quin, Lisa R., Chinwendu Onwubiko, Quincy C. Moore, Megumi Fujioka Mills, Larry S. McDaniel, et Stephanie Carmicle. 2007. « Factor H Binding to PspC of Streptococcus Pneumoniae Increases Adherence to Human Cell Lines in Vitro and Enhances Invasion of Mouse Lungs in Vivo ». *Infection and Immunity* 75 (8): 4082-87.
- Quinton, Lee J., Allan J. Walkey, et Joseph P. Mizgerd. 2018. « Integrative Physiology of Pneumonia ». *Physiological Reviews* 98 (3): 1417-64.
- Rabes, Anne, Stephanie Zimmermann, Katrin Reppe, Roland Lang, Peter H. Seeberger, Norbert Suttorp, Martin Witzernath, Bernd Lepenies, et Bastian Opitz. 2015. « The C-Type Lectin Receptor Mincle Binds to Streptococcus pneumoniae but Plays a Limited Role in the Anti-Pneumococcal Innate Immune Response ». *PLoS ONE* 10 (2): e0117022.
- Rajagopal, Mithila, et Suzanne Walker. 2017. « Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 404: 1-44.
- Raquil, Marie-Astrid, Nadia Anceriz, Pascal Rouleau, et Philippe A. Tessier. 2008. « Blockade of Antimicrobial Proteins S100A8 and S100A9 Inhibits Phagocyte Migration to the Alveoli in Streptococcal Pneumonia1 ». *The Journal of Immunology* 180 (5): 3366-74.
- Reber, Laurent L., Caitlin M. Gillis, Philipp Starkl, Friederike Jönsson, Riccardo Sibilano, Thomas Marichal, Nicolas Gaudenzio, et al. 2017. « Neutrophil Myeloperoxidase Diminishes the Toxic Effects and Mortality Induced by Lipopolysaccharide ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (5): 1249-58.

- Repp, R., Th. Valerius, A. Sandler, M. Gramatzki, H. Iro, J. R. Kalden, et E. Platzer. 1991. « Neutrophils Express the High Affinity Receptor for IgG (FcγRI, CD64) After In Vivo Application of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor ». *Blood* 78 (4): 885-89.
- Richards, Michael K., Fulu Liu, Hiromi Iwasaki, Koichi Akashi, et Daniel C. Link. 2003. « Pivotal Role of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in the Development of Progenitors in the Common Myeloid Pathway ». *Blood* 102 (10): 3562-68.
- Robb, C. T., K. H. Regan, D. A. Dorward, et A. G. Rossi. 2016. « Key Mechanisms Governing Resolution of Lung Inflammation ». *Seminars in Immunopathology* 38 (4): 425-48.
- Roberts, Andrew W. 2005. « G-CSF: A Key Regulator of Neutrophil Production, but That's Not All! ». *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 23 (1): 33-41.
- Roche, A. M., A. L. Richard, J. T. Rahkola, E. N. Janoff, et J. N. Weiser. 2015. « Antibody Blocks Acquisition of Bacterial Colonization through Agglutination ». *Mucosal Immunology* 8 (1): 176-85.
- Rolston, Kenneth V. I. 2001. « The Spectrum of Pulmonary Infections in Cancer Patients ». *Current Opinion in Oncology* 13 (4): 218.
- Ruiz-Moreno, Juan Sebastian, Lutz Hamann, Lei Jin, Leif E. Sander, Monika Puzianowska-Kuznicka, John Cambier, Martin Witzenrath, Ralf R. Schumann, Norbert Suttorp, et Bastian Opitz. 2018. « The CGAS/STING Pathway Detects Streptococcus Pneumoniae but Appears Dispensable for Antipneumococcal Defense in Mice and Humans ». *Infection and Immunity* 86 (3): e00849-17.
- Ryckman, Carle, Karen Vandal, Pascal Rouleau, Mariève Talbot, et Philippe A. Tessier. 2003. « Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (6): 3233-42.
- Saini, Rashmi, et Sarika Singh. 2019. « Inducible Nitric Oxide Synthase: An Asset to Neutrophils ». *Journal of Leukocyte Biology* 105 (1): 49-61.
- Sakoulas, George, Cheryl Y. Okumura, Wdee Thienphrapa, Joshua Olson, Poochit Nonejuie, Quang Dam, Abhay Dhand, et al. 2014. « Nafcillin Enhances Innate Immune-Mediated Killing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus ». *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 92 (2): 139-49.
- Sánchez-Tarjuelo, Rodrigo, Isabel Cortegano, Juliana Manosalva, Mercedes Rodríguez, Carolina Ruíz, Mario Alía, María Carmen Prado, et al. 2020. « The TLR4-MyD88 Signaling Axis Regulates Lung Monocyte Differentiation Pathways in Response to Streptococcus pneumoniae ». *Frontiers in Immunology* 11 (septembre): 2120.
- Sarkar, Paramita, Venkateswarlu Yarlagadda, Chandradhish Ghosh, et Jayanta Haldar. 2017. « A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics †The authors declare no competing interests. ». *MedChemComm* 8 (3): 516-33.

- Scharf, Stefanie, Janine Zahlten, Kolja Szymanski, Stefan Hippenstiel, Norbert Suttorp, et Philippe Dje N'Guessan. 2012. « Streptococcus pneumoniae induces human  $\beta$ -defensin-2 and -3 in human lung epithelium ». *Experimental Lung Research* 38 (2): 100-110.
- Schroll, Andrea, Kathrin Eller, Clemens Feistritzer, Manfred Nairz, Thomas Sonnweber, Patrizia A. Moser, Alexander R. Rosenkranz, Igor Theurl, et Guenter Weiss. 2012. « Lipocalin-2 Ameliorates Granulocyte Functionality ». *European Journal of Immunology* 42 (12): 3346-57.
- Semerad, Craig L., Fulu Liu, Alyssa D. Gregory, Katherine Stumpf, et Daniel C. Link. 2002. « G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood ». *Immunity* 17 (4): 413-23.
- Sencio, Valentin, Adeline Barthelemy, Luciana P. Tavares, Marina G. Machado, Daphnée Soulard, Céline Cuinat, Celso Martins Queiroz-Junior, et al. 2020. « Gut Dysbiosis during Influenza Contributes to Pulmonary Pneumococcal Superinfection through Altered Short-Chain Fatty Acid Production ». *Cell Reports* 30 (9): 2934-2947.e6.
- Sender, Vicky, Karina Hentrich, et Birgitta Henriques-Normark. 2021. « Virus-Induced Changes of the Respiratory Tract Environment Promote Secondary Infections With Streptococcus pneumoniae ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (mars): 643326.
- Sharma, Bhesh Raj, Rajendra Karki, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2019. « Role of AIM2 Inflammasome in Inflammatory Diseases, Cancer and Infection ». *European Journal of Immunology* 49 (11): 1998-2011.
- Silva Lagos, Luis, Thy Viet Luu, Bart De Haan, Marijke Faas, et Paul De Vos. 2022. « TLR2 and TLR4 Activity in Monocytes and Macrophages after Exposure to Amoxicillin, Ciprofloxacin, Doxycycline and Erythromycin ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 77 (11): 2972-83.
- Simell, Birgit, Maija Korkeila, Heikki Pursiainen, Terhi M. Kilpi, et Helena Käyhty. 2001. « Pneumococcal Carriage and Otitis Media Induce Salivary Antibodies to Pneumococcal Surface Adhesin A, Pneumolysin, and Pneumococcal Surface Protein A in Children ». *The Journal of Infectious Diseases* 183 (6): 887-96.
- Sjöholm, A. G., G. Jönsson, J. H. Braconier, G. Sturfelt, et L. Truedsson. 2006. « Complement Deficiency and Disease: An Update ». *Molecular Immunology* 43 (1-2): 78-85.
- Slager, Jelle, Rieza Aprianto, et Jan-Willem Veening. 2018. « Deep Genome Annotation of the Opportunistic Human Pathogen Streptococcus Pneumoniae D39 ». *Nucleic Acids Research* 46 (19): 9971-89.
- Spreer, Annette, Holger Kerstan, Tobias Böttcher, Joachim Gerber, Alexander Siemer, Gregor Zysk, Timothy J. Mitchell, Helmut Eiffert, et Roland Nau. 2003. « Reduced Release of Pneumolysin by Streptococcus Pneumoniae in Vitro and in Vivo after Treatment with Nonbacteriolytic Antibiotics in Comparison to Ceftriaxone ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (8): 2649-54.

- Standish, Alistair J., et Jeffrey N. Weiser. 2009. « Human Neutrophils Kill *Streptococcus Pneumoniae* via Serine Proteases ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (4): 2602-9.
- Stark, Matthew A., Yuqing Huo, Tracy L. Burcin, Margaret A. Morris, Timothy S. Olson, et Klaus Ley. 2005. « Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17 ». *Immunity* 22 (3): 285-94.
- « Stratégie de vaccination contre les infections à pneumocoque - Place du vaccin pneumococcique polysidique conjugué (20-valent, adsorbé) chez l'adulte ». s. d. Haute Autorité de Santé.
- Stuertz, K., H. Schmidt, H. Eiffert, P. Schwartz, M. Mäder, et R. Nau. 1998. « Differential Release of Lipoteichoic and Teichoic Acids from *Streptococcus Pneumoniae* as a Result of Exposure to Beta-Lactam Antibiotics, Rifamycins, Trovafloxacin, and Quinupristin-Dalfopristin ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (2): 277-81.
- Summers, Charlotte, Sara M. Rankin, Alison M. Condliffe, Nanak Singh, A. Michael Peters, et Edwin R. Chilvers. 2010. « Neutrophil Kinetics in Health and Disease ». *Trends in Immunology* 31 (8): 318-24.
- Syed, Shahan, Larisa Viazmina, Riccardo Mager, Seppo Meri, et Karita Haapasalo. 2020. « Streptococci and the Complement System: Interplay during Infection, Inflammation and Autoimmunity ». *FEBS Letters* 594 (16): 2570-85.
- Takashima, K, K Tateda, T Matsumoto, Y Iizawa, M Nakao, et K Yamaguchi. 1997. « Role of tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of pneumococcal pneumonia in mice. ». *Infection and Immunity* 65 (1): 257-60.
- Tan, Chew Teng, Xiaoli Xu, Yuan Qiao, et Yue Wang. 2021. « A Peptidoglycan Storm Caused by  $\beta$ -Lactam Antibiotic's Action on Host Microbiota Drives *Candida Albicans* Infection ». *Nature Communications* 12 (1): 2560.
- Teng, Tie-Shan, Ai-ling Ji, Xin-Ying Ji, et Yan-Zhang Li. 2017. « Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered ». *Journal of Immunology Research* 2017: 9671604.
- Thomas, Christina J., et Kate Schroder. 2013. « Pattern Recognition Receptor Function in Neutrophils ». *Trends in Immunology* 34 (7): 317-28.
- Tomlinson, Gillian, Suneeta Chimalapati, Tracey Pollard, Thabo Lapp, Jonathan Cohen, Emilie Camberlein, Sian Stafford, et al. 2014. « TLR-Mediated Inflammatory Responses to *Streptococcus Pneumoniae* Are Highly Dependent on Surface Expression of Bacterial Lipoproteins ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193 (7): 3736-45.
- Troeger, Christopher, Mohammad Forouzanfar, Puja C. Rao, Ibrahim Khalil, Alexandria Brown, Scott Swartz, Nancy Fullman, et al. 2017. « Estimates of the Global, Regional, and National Morbidity, Mortality, and Aetiologies of Lower Respiratory Tract Infections in 195 Countries: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 ». *The Lancet Infectious Diseases* 17 (11): 1133-61.

- Tvedskov, Ellen Signe Filtenborg, Nichlas Hovmand, Thomas Benfield, et Michaela Tinggaard. 2022. « Pneumococcal Carriage among Children in Low and Lower-Middle-Income Countries: A Systematic Review ». *International Journal of Infectious Diseases* 115 (février): 1-7.
- Uhl, Bernd, Yannick Vadlau, Gabriele Zuchtriegel, Katharina Nekolla, Kariem Sharaf, Florian Gaertner, Steffen Massberg, Fritz Krombach, et Christoph A. Reichel. 2016. « Aged Neutrophils Contribute to the First Line of Defense in the Acute Inflammatory Response ». *Blood* 128 (19): 2327-37.
- Wahl, Brian, Katherine L. O'Brien, Adena Greenbaum, Anwesha Majumder, Li Liu, Yue Chu, Ivana Lukšić, et al. 2018. « Burden of Streptococcus Pneumoniae and Haemophilus Influenzae Type b Disease in Children in the Era of Conjugate Vaccines: Global, Regional, and National Estimates for 2000-15 ». *The Lancet. Global Health* 6 (7): e744-57.
- Walmsley, Sarah R., Cristin Print, Neda Farahi, Carole Peyssonnaud, Randall S. Johnson, Thorsten Cramer, Anastasia Sobolewski, et al. 2005. « Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 $\alpha$ -dependent NF- $\kappa$ B activity ». *The Journal of Experimental Medicine* 201 (1): 105-15.
- Weiser, Jeffrey N., Daniela M. Ferreira, et James C. Paton. 2018. « Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion ». *Nature reviews. Microbiology* 16 (6): 355-67.
- Welte, Karl. 2014. « G-CSF: Filgrastim, Lenograstim and Biosimilars ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 14 (7): 983-93.
- Whitsett, Jeffrey A, et Theresa Alenghat. 2014. « Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity ». *Nature immunology* 16 (1): 27-35.
- « WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed ». s. d. Consulté le 16 avril 2020.
- Winterbourn, Christine C., Anthony J. Kettle, et Mark B. Hampton. 2016. « Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function ». *Annual Review of Biochemistry* 85 (1): 765-92.
- Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, et L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. « Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80 (5): 617-53.
- Wolf, Andrea J., George Y. Liu, et David M. Underhill. 2017. « Inflammatory Properties of Antibiotic-Treated Bacteria ». *Journal of Leukocyte Biology* 101 (1): 127-34.
- Woo, Yeon Duk, Dongjin Jeong, et Doo Hyun Chung. 2021. « Development and Functions of Alveolar Macrophages ». *Molecules and Cells* 44 (5): 292-330.
- Woodfin, Abigail, Mathieu-Benoit Voisin, Martina Beyrau, Bartomeu Colom, Dorothée Caille, Frantzeska-Maria Diapouli, Gerard B Nash, et al. 2011. « Junctional adhesion molecule-C (JAM-C) regulates polarized neutrophil transendothelial cell migration in vivo ». *Nature immunology* 12 (8): 761-69.

- Xie, Xuemei, Qiang Shi, Peng Wu, Xiaoyu Zhang, Hiroto Kambara, Jiayu Su, Hongbo Yu, et al. 2020. « Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection ». *Nature immunology* 21 (9): 1119-33.
- Xu, Hongmei, Libin Wang, Jian Huang, Yanqing Zhang, Feng Ma, Jianmin Wang, Wenchun Xu, Xuemei Zhang, Yibing Yin, et Kaifeng Wu. 2015. « Pneumococcal Wall Teichoic Acid Is Required for the Pathogenesis of Streptococcus Pneumoniae in Murine Models ». *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 53 (2): 147-54.
- Xu, Qichao, Wenqi Zhao, Mingyang Yan, et Hongxia Mei. 2022. « Neutrophil reverse migration ». *Journal of Inflammation* 19 (1): 22.
- Xu, Zheng, Xue-Feng Hou, Chun-Mei Feng, Ling Zheng, De-Xiang Xu, Hui Zhao, et Lin Fu. 2023. « The association between serum complement C3a and severity in patients with community-acquired pneumonia ». *Frontiers in Immunology* 14 (janvier): 1034233.
- Yamamoto, Kazuko, Ayele-Nati N. Ahyi, Zachary A. Pepper-Cunningham, Joseph D. Ferrari, Andrew A. Wilson, Matthew R. Jones, Lee J. Quinton, et Joseph P. Mizgerd. 2014. « Roles of Lung Epithelium in Neutrophil Recruitment during Pneumococcal Pneumonia ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 50 (2): 253-62.
- Yáñez, Alberto, Madelena Y. Ng, Nargess Hassanzadeh-Kiabi, et Helen S. Goodridge. 2015. « IRF8 Acts in Lineage-Committed Rather than Oligopotent Progenitors to Control Neutrophil vs Monocyte Production ». *Blood* 125 (9): 1452-59.
- Ye, Yang, Hua-Wei Zhang, Hong-Xia Mei, Hao-Ran Xu, Shu-Yang Xiang, Qian Yang, Sheng-Xing Zheng, Fang Gao Smith, Sheng-Wei Jin, et Qian Wang. 2020. « PDX Regulates Inflammatory Cell Infiltration via Resident Macrophage in LPS-Induced Lung Injury ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24 (18): 10604-14.
- Yousefi, S., C. Mihalache, E. Kozłowski, I. Schmid, et H. U. Simon. 2009. « Viable Neutrophils Release Mitochondrial DNA to Form Neutrophil Extracellular Traps ». *Cell Death and Differentiation* 16 (11): 1438-44.
- Zafar, M. Ammar, Yang Wang, Shigeto Hamaguchi, et Jeffrey N. Weiser. 2017. « Host-to-Host Transmission of Streptococcus Pneumoniae Is Driven by Its Inflammatory Toxin, Pneumolysin ». *Cell Host & Microbe* 21 (1): 73-83.
- Zhang, D. E., P. Zhang, N. D. Wang, C. J. Hetherington, G. J. Darlington, et D. G. Tenen. 1997. « Absence of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Signaling and Neutrophil Development in CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha-Deficient Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (2): 569-74.
- Zhang, Dachuan, Grace Chen, Deepa Manwani, Arthur Mortha, Chunliang Xu, Jeremiah J. Faith, Robert D. Burk, et al. 2015. « Neutrophil Ageing Is Regulated by the Microbiome ». *Nature* 525 (7570): 528-32.

Zhao, Yan-jun, Wen-jing Yi, Xiao-jian Wan, Jun Wang, Tian-zhu Tao, Jin-bao Li, Jia-feng Wang, et Xiao-ming Deng. 2014. « Blockade of ICAM-1 Improves the Outcome of Polymicrobial Sepsis via Modulating Neutrophil Migration and Reversing Immunosuppression ». *Mediators of Inflammation* 2014 (mai): e195290.

# **Annexes**

# Annexe I : Revue de la littérature

Publiée dans *Infection and Immunity* (janvier 2023)

Disponible en *Open Access*



MINIREVIEW



## Treatment of Bacterial Infections with $\beta$ -Lactams: Cooperation with Innate Immunity

Mélanie Mondemé,<sup>a</sup> Christophe Carnoy,<sup>a</sup>  Jean-Claude Sirard,<sup>a</sup>  Christelle Faveeuw<sup>a</sup>

<sup>a</sup>University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR 9017-CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

**ABSTRACT**  $\beta$ -Lactams are the most widely prescribed antibiotics used for the control and treatment of bacterial infections. The direct effect of  $\beta$ -lactams on bacteria is well studied worldwide. In the context of infections and as a consequence of their direct activity against the pathogen,  $\beta$ -lactams also regulate antibacterial immune responses. This knowledge has led to the theorem that the effectiveness of  $\beta$ -lactam treatment results from the synergy between the drug and the immune response. Key players in this immune response, with an essential role in the clearance of live and dead bacteria, are the myeloid cells. In this review, we summarize the data that shed light on how  $\beta$ -lactams interact with myeloid cells during bacterial infection treatment.

**KEYWORDS**  $\beta$ -lactams, bacterial infections, pathogen-associated molecular patterns, neutrophils, monocytes, proinflammatory responses, phagocytosis

The discovery of antibiotics to treat bacterial infectious diseases was a remarkable achievement in the 20th century. Unfortunately, though, the overuse and misuse of antibiotics have promoted the accelerated emergence of antimicrobial resistance that, in combination with the drying out of antibiotic discovery pipelines, has led to the postantibiotic era (1, 2). Antibiotics are drugs that stop or interfere with essential physiological processes, resulting in growth inhibition or death of bacteria. It has been proposed that antibiotic therapeutic effectiveness is also dependent on host immunity, as antibiotics are often not as effective in immunocompromised individuals (3, 4). A better understanding of the complex relationship between antibiotics and host immunity during the treatment of infection will help optimize the use of antibiotics.

The  $\beta$ -lactams, including penicillins, cephalosporins, monobactams, and carbapenems, constitute a major family of antibiotics. Compared to other classes of antibiotics,  $\beta$ -lactam drugs are safe and well tolerated (5). The  $\beta$ -lactams share a structure, i.e., a  $\beta$ -lactam ring.  $\beta$ -lactams inhibit peptidoglycan (PG) cross-linking by inactivating penicillin-binding proteins (PBPs), composed of synthases and hydrolases. By modifying the synthase-hydrolase balance,  $\beta$ -lactams disrupt cell wall integrity and lead to bacterial lysis and death (6). In turn, bacterial products, including pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), are released and modulate antimicrobial immunity through sensing by pattern recognition receptors (PRRs) expressed by sentinel cells (4).

A  $\beta$ -lactam is considered highly effective when the concentration is above the minimal inhibition concentration (MIC) where it kills bacteria, leading ultimately to activation of innate immunity. When the bacteria are exposed to antibiotic concentrations below the MIC (sub-MIC), it can induce changes in bacterial gene expression, protein synthesis, metabolism, and growth properties that also influence immune responses. The goal of the present review is to provide an overview of the impact of  $\beta$ -lactams on innate immunity during the treatment of bacterial infections.

**Editor** Anthony R. Richardson, University of Pittsburgh

**Copyright** © 2023 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Christelle Faveeuw, christelle.faveeuw@inserm.fr.

The authors declare no conflict of interest.

**Published** 25 January 2023

## **Annexe II : Version originale de l'article de thèse**

### **Amoxicillin treatment of pneumococcal pneumonia impacts bone marrow neutrophil maturation and function.**

Mondemé M.<sup>1</sup>, Zeroual Y.<sup>1</sup>, Soulard D.<sup>1</sup>, Hennart B.<sup>2</sup>, Beury D.<sup>3</sup>, Saliou J.M.<sup>3</sup>, Carnoy C.<sup>1</sup>, Sirard J.C.<sup>1</sup> and Faveeuw C.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59019 Lille, France

<sup>2</sup> Toxicology and Genopathy Unit, CHU Lille, F-59000 Lille, France

<sup>3</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 - UAR 2014 - PLBS - Plateformes Lilloises de Biologie & Santé, F-59000 Lille, France

\* Corresponding author: [christelle.faveeuw@inserm.fr](mailto:christelle.faveeuw@inserm.fr)

Running Title: Amoxicillin treatment and bone marrow neutrophils

En cours de soumission dans *Journal of Leukocyte Biology*

## Abstract

Pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* is a leading cause of death worldwide. A growing body of evidence indicates that the successful treatment of bacterial infections results from synergy between antibiotic-mediated direct antibacterial activity and the host's immune defenses. However, the mechanisms underlying the protective immune responses induced by amoxicillin, a  $\beta$ -lactam antibiotic used as the first-line treatment of *S. pneumoniae* infections, have not been characterized. A better understanding of amoxicillin's effects on host-pathogen interactions might facilitate the development of other treatment options. Given the crucial role of neutrophils in the control of *S. pneumoniae* infections, we decided to investigate amoxicillin's impact on neutrophil development in a mouse model of pneumococcal superinfection. A single therapeutic dose of amoxicillin almost completely eradicated the bacteria that prevented local and systemic inflammatory responses. Interestingly, in this context, amoxicillin treatment did not impair the emergency granulopoiesis triggered in the bone marrow by *S. pneumoniae*. Importantly, treatment of pneumonia with amoxicillin was associated with a greater mature neutrophil count in the bone marrow; these neutrophils had specific transcriptomic and proteomic profiles. Furthermore, amoxicillin-conditioned, mature neutrophils in the bone marrow had a less activated phenotype and might be rapidly mobilized in peripheral tissues in response to systemic inflammation. Thus, by revealing a novel effect of amoxicillin on the development and functions of bone marrow neutrophils during *S. pneumoniae* pneumonia, our findings provide new insights into the impact of amoxicillin treatment on host immune responses.

## Introduction

Respiratory infections constitute a leading cause of morbidity and mortality worldwide [1]. *Streptococcus pneumoniae* is a major cause of community-acquired pneumonia and may also damage the lung barrier, leading to further dissemination of the bacteria into the bloodstream and thus bacteremia and meningitis [2]. Importantly, *S. pneumoniae* is the most common bacteria associated with superinfections in patients infected with influenza A virus (IAV) [3, 4]. Although vaccines and antibiotics have proven extremely useful in respectively the prevention and treatment of pneumococcal pneumonia, *S. pneumoniae* has been listed by the World Health Organization as a "priority pathogen" that requires the development of novel therapeutic strategies [5].

The activity of antibiotics relies primarily on the direct killing or growth inhibition of bacteria. However, the literature data indicate that host immunity contributes to the effectiveness of antibiotics [6-8]. Thus, antibiotics are often less effective in immunocompromised patients. Furthermore, macrolides and fluoroquinolones show anti-inflammatory effects *in vivo* in addition to their direct antimicrobial action [7-10]. The first-line antibiotic used to treat *S. pneumoniae* pneumonia is the  $\beta$ -lactam amoxicillin (AMX) [11]. Penicillins like AMX exert their bactericidal activity by targeting penicillin-binding proteins and thus by interfering with bacterial peptidoglycan synthesis and cell wall integrity. The current general hypothesis is that  $\beta$ -lactams' action can directly regulate innate immune responses against bacteria. Upon treatment with a  $\beta$ -lactam, dying and dead bacteria release various compounds, including pathogen-associated molecular patterns that might modulate local and/or systemic antimicrobial immunity [12]. However, mechanistic evidence of  $\beta$ -lactam-induced protective immune responses in the host is currently lacking.

The innate immune response to a *S. pneumoniae* lung infection is critical for pathogen clearance and disease control [13]. The recognition of *S. pneumoniae* by epithelial and myeloid cells expressing pattern recognition receptors (e.g. such as Toll-like receptors (TLRs)) results in the production of inflammatory mediators, the recruitment of immune cells, and changes in adaptive immunity. In this context, neutrophils have a significant role in the control of a *S. pneumoniae* infection via their ability to rapidly engulf bacteria in phagosomes [14, 15]. The phagosomes then mature further upon fusion with preformed granules. Together with reactive oxygen species (ROS) generated by NADPH oxidase, the granule contents (proteases, defensins, and antimicrobial peptides) directly interfere with the pathogen's survival in the phagosomal vacuole [16].

Acute microbial infections induce a host phenomenon known as emergency granulopoiesis, which maintains the supply of neutrophils to the infected tissue [17]. Neutrophils are derived from progenitor cells in the bone marrow (BM). Studies in the mouse have provided a description of the successive steps leading to the generation of mature neutrophils [18, 19]. The granulocyte/monocyte progenitors (GMPs) develop into granulocyte progenitors (GPs), which in turn further differentiate locally into immature and then mature neutrophils. Mature neutrophils subsequently leave the BM,

enter the bloodstream and circulate as quiescent cells at homeostasis. Upon infection, circulating neutrophils migrate to the infected tissue, where they encounter bacteria and become fully activated. Emergency granulopoiesis is a complex and tightly regulated process involving interleukins, chemokines, transcription factors, and differentiation factors (primarily granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) [20].

Given the major role of neutrophils in *S. pneumoniae* clearance, we looked at whether AMX treatment alters neutrophil development and function during pneumonia. We established a murine model of IAV-*S. pneumoniae* superinfection and found that AMX treatment was associated with a greater number of mature neutrophils in the BM. These neutrophils had a distinct transcriptomic profile and distinct functional responses.

## Materials and methods

### Bacterial strains and cultures

Serotype 2 *S. pneumoniae* (D39V strain) was obtained from J.W. Veening Laboratory (University of Lausanne, Switzerland) [21]. Fresh colonies grown on blood agar plates were incubated in Todd Hewitt Yeast Broth (THYB) (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 37°C until the OD<sub>600nm</sub> reached 0.7-0.9 units. Cultures were stored at -80°C in THYB medium containing 12% glycerol (vol./vol.) for up to 3 months. For intranasal infection, working stocks were thawed, washed twice in phosphate buffer saline (PBS) (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) and diluted to adjust the concentration.

### Mouse model of infection and AMX treatment

Seven-to-ten-week-old male wild-type (WT) C57BL/6J were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). CX3CR1<sup>gfp/gfp</sup> homozygous mice (Jackson laboratory, USA) were crossed with C57BL/6J mice to generate heterozygous CX3CR1<sup>gfp/+</sup> progeny. CX3CR1<sup>gfp/+</sup> were used for an optimal characterization by flow cytometry of myeloid cells populations, including BM progenitors. Mice were maintained in ventilated cages, in a biosafety level 2 facility in the Animal Resource Center at the Institut Pasteur de Lille. Housing and experiments were carried out according to institutional regulations and ethical guidelines (E59-350 009, Institut Pasteur de Lille; Protocol APAFIS 16966-20180531141769v3). A primary infection with the murine-adapted H3N2 Influenza virus strain A (IAV) Scotland/20/74 was performed to sensitize the mice to *S. pneumoniae* infection. Briefly, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 1.25 mg of ketamine and 0.25 mg of xylazine in 250 µl of PBS and then intranasally (i.n.) infected with 30 µl of PBS containing 70 plaque-forming units (pfu) of IAV. Seven days later, mice were infected (or not) i.n. with 5x10<sup>4</sup> CFU (Colony Forming Units) of *S. pneumoniae* in 30 µl of PBS. Twelve hours post-infection, mice were intragastrically treated with 150 µg of AMX

(Merck, Lyon, France) in 200 µl water or left untreated. To evaluate bacterial counts in lung and spleen, mice were sacrificed at selected times using intraperitoneal injection of 11,4 mg of sodium pentobarbital in 200µl of PBS. Tissues were collected in sterile PBS and homogenized with an UltraTurrax homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany). Viable bacteria were determined by plating serial dilutions onto blood agar plates and incubating them at 37°C for 24 h. Survival and body weight were monitored daily after infections.

### ***In vivo* model of inflammation**

Ultrapure LPS from *Escherichia coli* 0111: B4 strain (5 µg/mouse, Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France) was administered by the intraperitoneal route (200 µl) 12 h post-AMX treatment. Five hours later, femurs, blood, lungs and peritoneal fluid were collected and cell suspensions were prepared for flow cytometry analysis.

### **Real-time PCR assays**

Total RNA from lungs or bone marrow (BM) neutrophils were extracted with the Nucleospin RNA Plus kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) and reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The cDNA was amplified using SYBR green-based real-time PCR on a QuantStudio 12K PCR system (Applied Biosystems). The primers used were designed using NCBI and are listed in **Table 1**. *Bm2* and *Actb* were used as housekeeping genes. The relative mRNA level was determined (i) by normalizing the cycle thresholds (Ct) for the gene of interest to the housekeeping genes (*Bm2* and *Actb*) ( $= 2^{-\Delta Ct}$ ) and (ii) the  $2^{-\Delta Ct}$  values of group of interest were compared with the  $2^{-\Delta Ct}$  values of control group ( $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Genes with Ct values greater than 35 cycles were considered non-detectable.

<b>Target gene</b>	<b>Forward primer (F)</b>	<b>Reverse primer (R)</b>
<i>B2m</i>	TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC	GGGTGGCGTGAGTATACTTGAA
<i>Actb</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
<i>Il1b</i>	AATCTATACCTGTCCTGTGTA	TGGGTATTGCTTGGGATCCA
<i>Tnf</i>	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT
<i>S100a9</i>	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT	TGTCATTTATGAGGGCTTCATTT
<i>Cxcl2</i>	CCCTCAACGGAAGAACCAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC
<i>Csf3</i>	CCTGGAGCAAGTGAGGAAGA	CAGCTTGTAGGTGGCACACA
<i>Lcn2</i>	CCATCTATGAGCTACAAGAGAACAAT	TCTGATCCAGTAGCGACAGC
<i>S100a8</i>	ATCCTTTGTGAGCTCCGTCTT	TCTCCAGTTCAGACGGCATT
<i>Mmp8</i>	AACGGGAAGACATACTTCTTCATAA	GGGTCCATGGATCTTCTTTG

**Table 1.** Sequences of the primers used for qPCR assays

### **Cytokine and growth factor quantification**

Levels of IL-6 and G-CSF were quantified in sera using standardized sandwich enzyme-linked ELISA kits (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) according to the manufacturer's recommendations.

### **Cell preparations**

White blood cells were prepared from whole-blood samples obtained by retro-orbital puncture. Briefly, blood was collected in 1.5 ml tube containing heparin and 150  $\mu$ l of sample was next processed. Red blood cells were removed using a lysis buffer (Pharmlyse, BD Bioscience). Lungs were perfused with PBS, excised and finely minced, followed by enzymatic digestion for 20 min at 37°C in PBS containing 1 mg/ml type VIII collagenase (Sigma-Aldrich) and 1  $\mu$ g/ml DNase type I (Sigma-Aldrich). After red blood cell lysis, lung cell homogenates were suspended in a 20% Percoll and centrifuged at 2000 rpm without brake at room temperature for 12 min. Cell pellets were washed with PBS supplemented with 2% FCS, penicillin (10 units/ml) and streptomycin (100ug/ml) (Peni/Strepto) and then filtrated. Bone marrow (BM) cells were isolated using a centrifugation-based method as previously described [22]. Then, red blood cells were lysed and cell suspensions were washed and filtered. Peritoneal cells were obtained by injecting 5 ml of ice-cold sterile PBS into the peritoneal cavity. After abdominal massage, the cell suspension was collected and centrifuged for 10 min at 1400 rpm. The cell suspensions were finally resuspended in PBS/2% FCS/Peni/Strepto/0.01% NaN<sub>3</sub> before antibody labelling. The total number of cells was determined by trypan blue exclusion with a Corning Cell Counter (Life Sciences, Tewksbury, MA).

### **Reagents and antibodies for flow cytometry analysis**

Monoclonal antibodies (Abs) against mouse CD3 (biotin-conjugated), NK1.1 (biotin-conjugated), Ter119 (biotin-conjugated), CD45R/B220 (biotin-conjugated), CD117 (Brilliant Violet (BV) 711-conjugated), Sca1 (APC-conjugated), CD34 (PE-conjugated), CD16/CD32 (PE-Cy7-conjugated), Ly6G (BV711- or APC-conjugated), CD11b (BV785-conjugated), Ly6C or Gr1 (Percp/Cy5.5-conjugated), Siglec-F (PE/CF594 or APC-conjugated), CD45 (BV510, PE, APC, APC-Cy7 or Alexa Fluor 700-conjugated), CD115 (BV421-conjugated), CXCR2 (BV510 or PE-conjugated), CXCR4 (APC-conjugated), CD101 (PE-conjugated), CD62L (PE-conjugated), Ki-67 (APC-conjugated) and BV605-conjugated streptavidin were purchased from Biolegend (Paris, France) or BD Biosciences (Le Pont de Claix, France) or eBioscience (ThermoFisher Scientific) (**Table 2**). Lineage markers (Lin) include CD3, NK1.1, Ter119, CD11b, CD45R/B220, Ly6G. Propidium iodide was purchased from Biolegend.

<b>Antibody (Fluorochrome(s))</b>	<b>Clone</b>	<b>Supplier</b>
Anti-mouse CD3 (biotin)	145-2C11	BioLegend
Anti-mouse NK1.1 (biotin)	PK136	BioLegend
Anti-mouse Ter119 (biotin)	TER-119	BioLegend
Anti-mouse CD45R/B220 (biotin)	RA3-6B2	BioLegend
Anti-mouse CD117 (BV711)	2B8	Biolegend
Anti-mouse Sca1/Ly-6A/E (APC)	D7	Biolegend
Anti-mouse CD34 (PE)	RAM34	BD Biosciences
Anti-mouse CD16/CD32 (PE-Cy7)	2.4G2	BD Biosciences
Anti-mouse Ly6G (BV711 or APC)	1A8	BioLegend
Anti-mouse CD11b (BV785)	M1/70	BioLegend
Anti-mouse Gr1 (Percp-Cy5.5)	RB6-8C5	BioLegend
Anti-mouse Ly6C (Percp-Cy5.5)	HK1.4	BioLegend
Anti-mouse Siglec F (PE-CF594)	E50-2440	BD Biosciences
Anti-mouse Siglec F (APC)	S17007I	BioLegend
Anti-mouse CD45 (BV510, PE, APC, APC-Cy7 or AF700)	30-F11	Biolegend
Anti-mouse CD115 (BV421)	T38-320	Biolegend
Anti-mouse CXCR2 (BV510)	V48-2310	BD Biosciences
Anti-mouse CXCR2 (PE)	SA044G4	BioLegend
Anti-mouse CXCR4 (APC)	2B11	BD Biosciences
Anti-mouse CD101 (PE)	Moushi101	eBioscience

Anti-mouse CD62L (PE)	MEL-14	eBioscience
Anti-mouse Ki-67 (APC)	11-F6	BioLegend

**Table 2. List of monoclonal antibodies used for flow cytometry**

### Flow cytometry and cell sorting

Briefly, 3 to  $5 \times 10^6$  cells were plated in 96-well plates, resuspended in 50  $\mu$ l of the appropriate combination of Abs and incubated on ice for 20 min. For Ki-67 labeling, after extracellular staining, cells were fixed and permeabilized using the Foxp3 Fixation/Permeabilization kit (Invitrogen) and incubated for 20 min at room temperature with anti-Ki67 mAb. After the last wash, cell populations (CD45<sup>+</sup> cells) were analyzed with a BD LSR Fortessa (BD Biosciences) and the FlowJo software (Treestar, OR, USA). Cell subsets were identified as follows: *GMPs*: Lin<sup>-</sup>ckit<sup>+</sup>sca1<sup>-</sup>/+CD34<sup>+</sup>CD16/CD32<sup>high</sup>Ly6C<sup>-</sup>CD115<sup>-</sup>CX3CR1<sup>-</sup>; *GPs*: Lin<sup>-</sup>ckit<sup>+</sup>sca1<sup>-</sup>/+CD34<sup>+</sup>CD16/CD32<sup>high</sup>Ly6C<sup>+</sup>CD115<sup>-</sup>CX3CR1<sup>-</sup> and *Total neutrophils*: Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup> (Siglec-F<sup>-</sup> for the lung) composed in the BM of immature (CXCR2<sup>low</sup>CD101<sup>-</sup>) and mature (CXCR2<sup>high</sup>CD101<sup>+</sup>) neutrophils. In some experiments, dead cells were excluded by propidium iodide staining. Bone marrow mature neutrophils (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup>CXCR2<sup>high</sup>) were sorted using a FACS Aria III cell sorter (BD Biosciences) and this protocol yielded > 98% cell purity as evaluated by FACS.

### Intravascular labelling of lung neutrophils.

Mice were injected with 5  $\mu$ g of APC-labelled rat anti-CD45 mAb via the retro-orbital venous plexus. mAb was allowed to circulate for 5 min in order to label all leukocytes in the vascular space including circulating and marginated leukocytes [23]. After perfusion, lungs were removed and leukocytes were prepared as previously described. Cell suspensions were then labeled with appropriate mAbs for neutrophil detection and BV510-labeled anti-CD45 mAb to stain all leukocytes. Marginated neutrophils were defined as double positive for CD45-APC and CD45-BV510.

### Phagocytosis and ROS production

Production of Reactive Oxygen Species (ROS) was assessed using the CellROX Deep Red Reagent (Invitrogen) and flow cytometry. Briefly, BM cells ( $5 \times 10^5$ /ml) were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 2% FCS and incubated or not with tert-butyl hydroperoxide (TBHP, 400  $\mu$ M) at 37°C for 15 min. Then, CellROX (500 nM) was added and cells incubated at 37°C for 30 min. After washes, cells were labelled with appropriate Abs to identify mature neutrophils. SYTOX blue reagent was added to exclude dead cells. As negative control, BM cells were incubated with N-acetylcysteine (NAC, 1 mM) for 30 min at 37°C before treatment with TBHP. Analysis of the median fluorescence intensity (MFI) provides a semiquantitative assessment of ROS production. To assess phagocytosis capacity, BM cells ( $2 \times 10^5$ /ml) were plated in 96-well plates and resuspended with the pHrodo<sup>TM</sup> Red bioparticles (killed *E. Coli*)

(Invitrogen) for 1 h at 37°C 5%CO<sub>2</sub>. As a control, some BM cells were incubated with bioparticles at 4°C. After washes, BM cells were labeled with appropriate Abs for mature neutrophil identification. The percentages of mature BM neutrophils positive for *E. coli*-pHrodo as well as the MFI were quantified by flow cytometry.

### **RNAseq analysis**

Total RNA from 5x10<sup>6</sup> mature neutrophils was extracted and RNA quality was evaluated by spectrophotometry (Nanodrop) and RIN with the TapeStation 4200 (Agilent Technologies). Libraries were prepared with the QIAseq stranded mRNA library kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. All libraries were controlled by TapeStation 4200 and quantified by qPCR (KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms, KapaBiosystems). Libraries were normalized and pooled in an equimolar way, before sequencing on a NovaSeq sequencer (Illumina) in 2x150 bp. RNA-Seq data in the form of FASTQ files were subsequently mapped to the mouse genome build (GRCm39) using the STAR (STAR-2.7.10a) alignment software. The mapped reads were then annotated using GENCODE M30 gtf file. Raw counts were used to perform a differential expressed gene (DEG) analysis using DESeq2 (R version 4.2.1). Genes with a FDR < 0.05 were considered as differentially regulated and used to generate volcano plots. Overrepresentation analysis through Gene ontology (GO) enrichment (GO Biological Process 2021 and GO Cellular Component 2021) of DEGs was performed using Enrichr [24].

### **Statistical analysis**

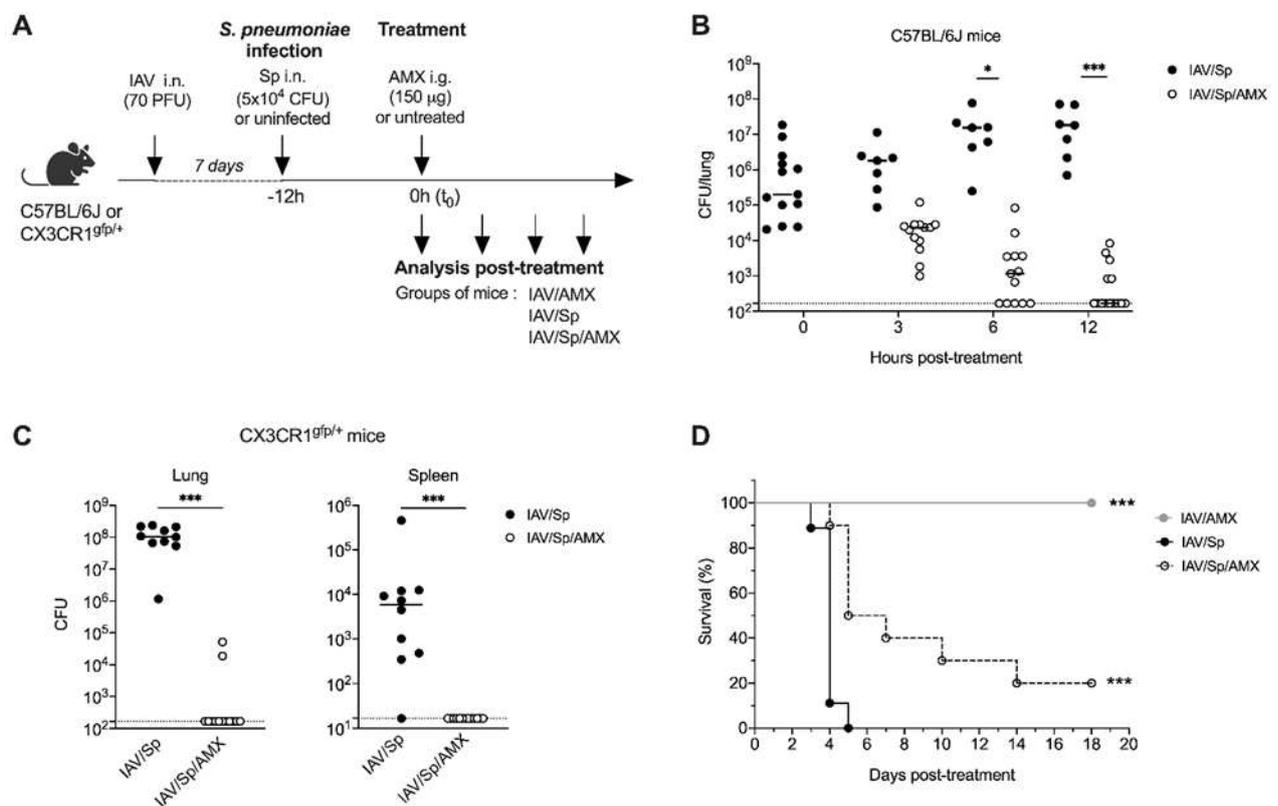
All statistical analysis were performed using GraphPad Prism software. Unpaired T-test or one-way ANOVA followed by Bonferroni's post T-test were used for statistical analysis when two groups or multiple groups were analyzed, respectively. When data did not follow a Gaussian distribution, the statistical significance was evaluated using non-parametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis (followed by a Dunns post-test). We used two-way ANOVA when multiple parameters were studied. The survival of mice was analyzed using the Kaplan-Meier method and a log-rank test. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001; \*\*\*\*, p < 0.0001.

## **Results**

### **Administration of a single dose of AMX protects against *S. pneumoniae* superinfection**

In order to test the efficacy of a single, intragastric dose of AMX, we set up a murine model of pneumococcal superinfection in C57BL/6 and CX3CR1<sup>gfp/+</sup> mice, commonly used in flow cytometry to track myeloid lineage cell subpopulations. Animals were infected with a sublethal dose of IAV, followed 7 days later by 5x10<sup>4</sup> CFU of *S. pneumoniae* (**Fig 1A**). In untreated mice, the bacterial load increased gradually over time and reached 1.8x10<sup>7</sup> CFU per lung 24 h after the pneumococcal infection (**Fig 1B** and **1C**). High numbers of bacteria were also detected in the spleen 24 h after

inoculation with *S. pneumoniae*, suggesting that bacteria disseminate from the lungs into the blood (**Fig 1C**). In the antibiotic-treated group, animals were administered with a single, intragastric dose of AMX (150  $\mu\text{g}$  per mouse, 7.5 mg/kg) 12 h after the bacterial infection. This time point was defined as the  $t_0$  for all analyses (**Fig 1A**). With this regimen, the serum AMX concentration peaked at 2.88  $\mu\text{g}/\text{ml}$  30 min after administration, fell rapidly, and became undetectable at 8 h (**S1 Fig**). Treatment with AMX gradually decreased the bacterial loads in the lung and spleen, and the bacteria were cleared almost completely 12 h after the start of treatment (**Fig 1B and 1C**). Treatment with AMX was associated with a significant higher survival rate, relative to infected, untreated mice (**Fig 1D**). Taken as a whole, these data indicate that (i) both strains of mice developed similar pneumococcal superinfections after IAV infection and (ii) the selected AMX dose of treatment was effective in terms of reducing the bacterial load and promoting survival.

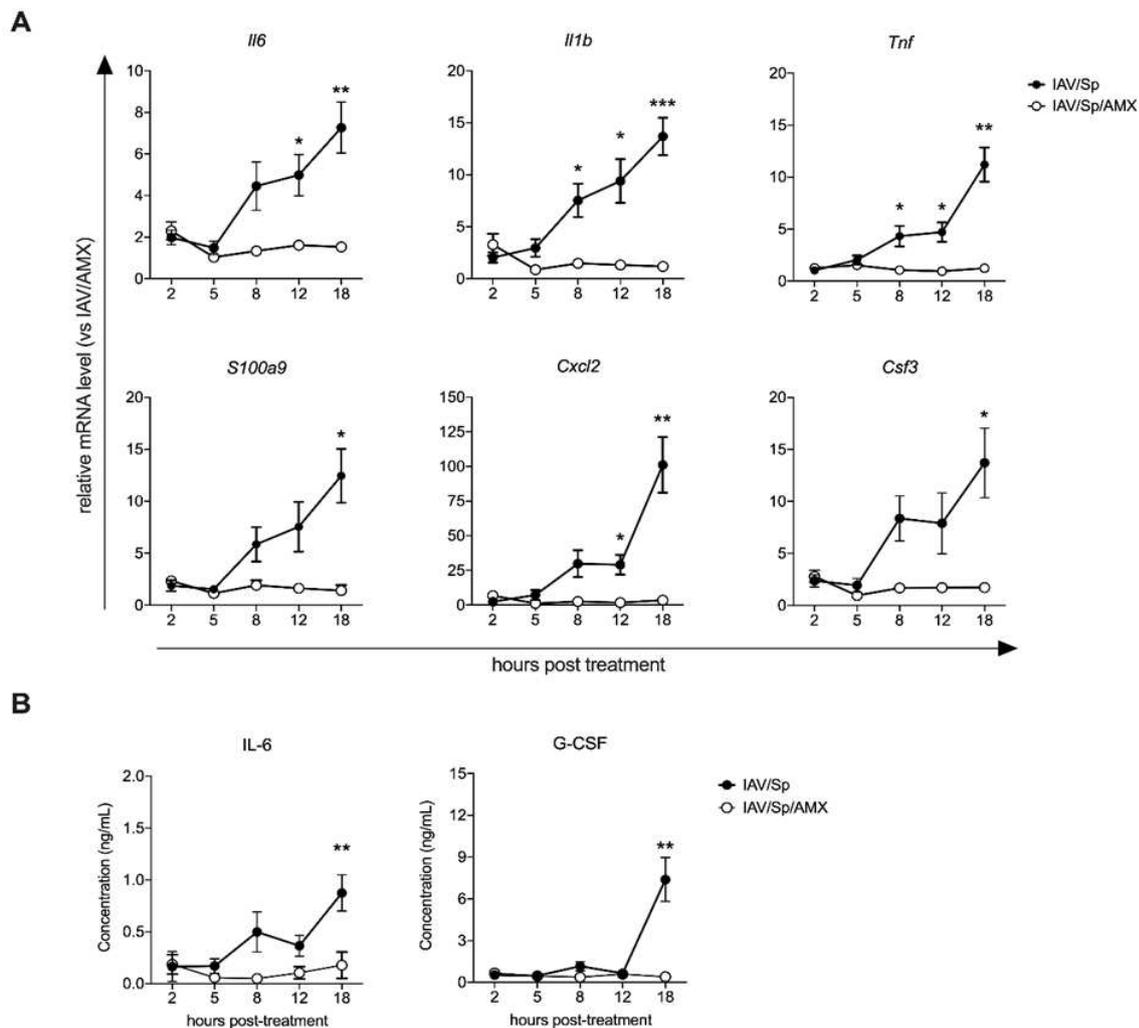


**Figure 1. A single dose of amoxicillin protects against *S. pneumoniae* superinfection.** (A) C57BL/6J or CX3CR1<sup>9fp/+</sup> mice were infected intranasally (i.n.) with influenza A virus (IAV) and seven days later with  $5 \times 10^4$  colony-forming unit (CFU) of *S. pneumoniae* (Sp). Mice were treated intragastrically (i.g.) with amoxicillin (AMX) 12 h after Sp infection (defined as the  $t_0$ ) (IAV/Sp/AMX) or left untreated (IAV/Sp). As a control group, mice only infected with IAV were also treated with AMX (IAV/AMX). Lungs (B, C) and spleen (C) were collected at different times post-treatment in C57BL/6 mice (B) or at 12 h post-treatment in CX3CR1<sup>9fp/+</sup> mice (C), homogenized, and plated in serial dilutions onto blood agar plates to measure the bacterial load. Counts for individual mouse are shown as CFU per tissue. The solid line represents the median value and the dashed line represents the detection threshold. Data depict pooled results from two independent experiments, with each symbol representing an individual mouse ( $n = 6-14$ ). (B) \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$  (two-way ANOVA test). (C) \*\*\*  $p < 0.001$  (Mann-Whitney). (D) The survival rate of C57BL/6J mice infected with IAV only or IAV/Sp treated or not with AMX was monitored daily for 18 days. Data were compared in a log-rank test (\*\*\*,  $p < 0.001$ ).

### **Administration of AMX reduces the inflammatory response during *S. pneumoniae* infection**

We next evaluated the effect of AMX treatment on the production of various innate-immunity-related factors, including the inflammatory cytokines IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF, the chemokine CXCL2, the growth factor G-CSF and the antimicrobial peptide S100A9. To this end, lungs and sera of superinfected animals treated (or not) with AMX were collected at various post-treatment time points. Levels of mRNA in the lungs and levels of cytokine/growth factor proteins in the blood were quantified and normalized against those measured in animals infected with IAV only and treated with AMX. We found that in the absence of AMX treatment, transcription of the *Il6*, *Il1b*, *Tnf*, *S100a9*, *Cxcl2*, and *Csf3* genes increased over time after infection with *S. pneumoniae* (**Fig 2A**). The serum concentrations of IL-6 and G-CSF were also higher at the 18 h timepoint (**Fig 2B**). At  $t_0$  (12h post-infection), IAV/Sp and IAV-only mice did not differ significantly with regard to mRNA levels of innate immune system components or the serum IL-6 level (**S2A** and **S2B Fig**). The serum G-CSF concentration was slightly higher in IAV/Sp animals than in IAV-only animals (**S2B Fig**). AMX treatment of infected animals (*i.e.* IAV/Sp/AMX) abrogated the expression of inflammatory gene transcripts and systemic IL-6 and G-CSF production at all post-treatment timepoints (**Fig 2A** and **2B**); this finding shows that AMX treatment efficiently killed *S. pneumoniae* and prevented the secondary bacterial infection from triggering local and systemic inflammatory responses.

**Figure 2**



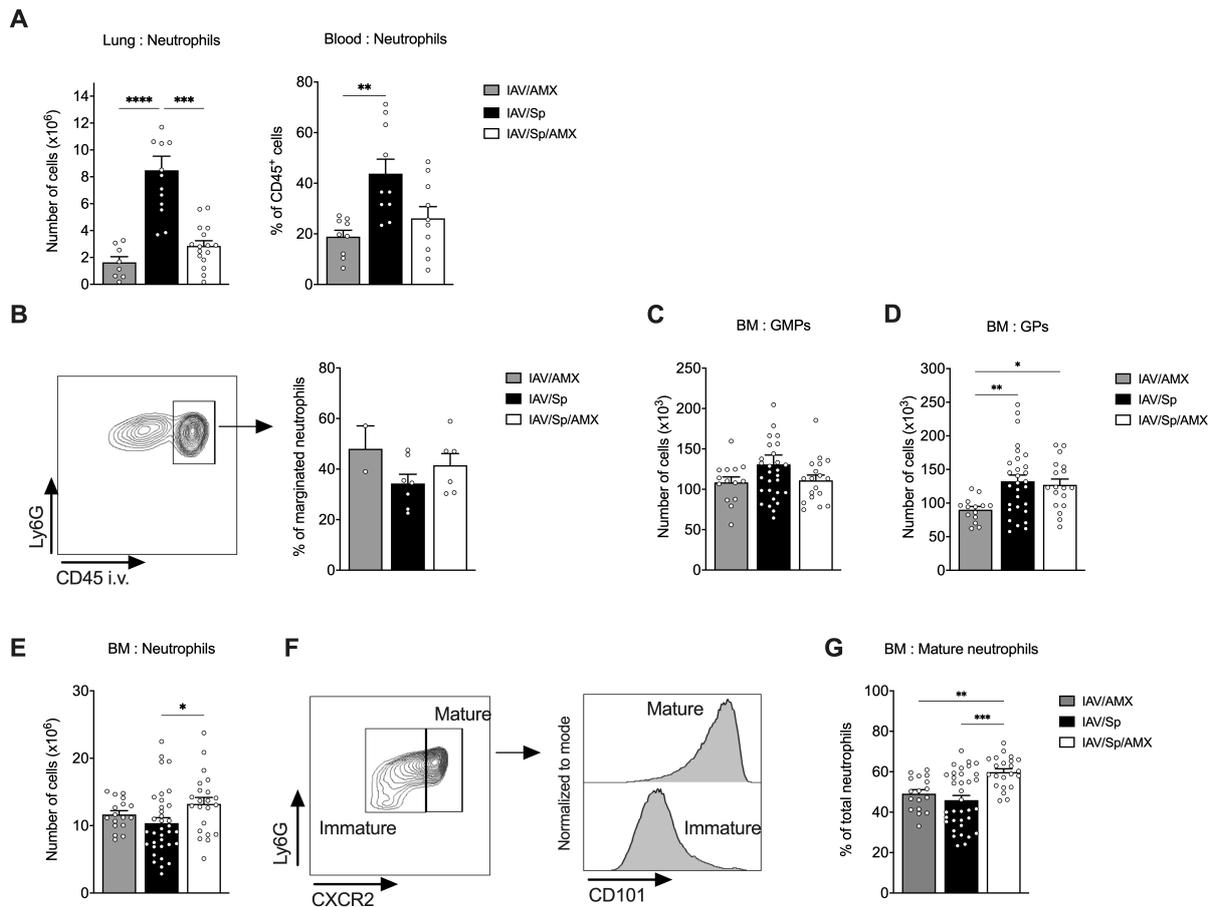
**Figure 2. Amoxicillin treatment of infected animals reduces the inflammatory response.** C57BL/6J mice were infected with Sp seven days post-IAV infection and treated with AMX 12 h after Sp infection (IAV/Sp/AMX) or left untreated (IAV/Sp). Lungs and blood were collected at different time points post-treatment. **(A)** Relative expression of selected genes in the lungs was assessed by RT-qPCR. For each gene, mRNA level is normalized to the reference genes *Actb* and *B2m*, and then to the control group IAV/AMX. **(B)** IL-6 and G-CSF concentrations in the sera were measured by ELISA. Data represent pooled results from two independent experiments ( $n = 10$ ) and are expressed as mean  $\pm$  SEM (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ ; Two-way ANOVA test).

### Amoxicillin treatment promotes the maturation of BM neutrophils

The host's control of *S. pneumoniae* pneumonia depends on the rapid recruitment of neutrophils to the lungs – a process that is regulated (at least in part) by inflammatory molecules like IL-1 $\beta$ , TNF, CXCL1/2, and S100A9 [14, 25-27]. In order to establish whether AMX-associated inhibition of local and systemic inflammation affects neutrophil mobilization, we therefore determined the numbers of lung and blood neutrophils in animals treated with AMX. At  $t_0$  (12h post-infection), the neutrophil count in the lungs (but not in the blood) was slightly higher in superinfected animals than in animals infected with IAV only (**S2C Fig**). Twelve hours later, significant increases in lung and blood neutrophil counts were observed in IAV/Sp animals (**Fig 3A**). Treatment with AMX fully abolished neutrophil recruitment to the lungs and moderately reduced

neutrophil recruitment in the blood, compared with untreated animals (**Fig 3A**). We found that fewer than half of the lung neutrophils were located in the vasculature after *S. pneumoniae* infection and that AMX treatment did not influence their localization (**Fig 3B**).

Acute mobilization of neutrophils in infected tissues requires the rapid production of these cells in the BM. We therefore investigated the potential effects of secondary pneumococcal infection and AMX treatment on the *de novo* generation of BM neutrophils. Of note, *S. pneumoniae* was not detected in BM cells of superinfected animals treated or not with AMX (**S3A Fig**). Using the gating strategy depicted in **S3B Fig**, we quantified the numbers of neutrophil progenitors (*i.e.* GMPs and GPs), immature neutrophils and mature neutrophils in the BM of untreated and AMX-treated superinfected animals (**Fig 3C** and **3D** and **S2D Fig**). Before the administration of AMX ( $t_0$ ), the IAV/Sp and IAV groups were similar in terms of GMP, GP, total neutrophil and mature neutrophil counts (**S2D Fig**). The absolute GMP count did not significantly change upon bacterial infection and AMX treatment (**Fig 3C**). In contrast, the GP count significantly increased upon infection with *S. pneumoniae* (**Fig 3D**). Interestingly, AMX treatment did not modify the GP count relative to untreated superinfected animals and remained high relative to animals infected with IAV only. Whereas the total neutrophil count did not change significantly upon infection with *S. pneumoniae*, AMX treatment was associated with an increase in this variable (**Fig 3E**). It is noteworthy that as reported elsewhere, the proportion of proliferating neutrophils was much lower than the proportion of neutrophil progenitors (**S3C Fig**) [18, 28]. Furthermore, AMX treatment did not influence the proportion of Ki-67<sup>+</sup> proliferating GMPs, GPs and neutrophils. Mature neutrophils were then identified based on the expression of CXCR2 and CD101; the latter marker was recently found to be specific for this cell population (**Fig 3F**) [18]. Interestingly, treatment with AMX significantly enhanced the proportion of mature neutrophils in BM, relative to untreated superinfected animals or IAV-infected animals (**Fig 3G**). Taken as a whole, these data indicate that the AMX treatment of secondary pneumococcal infection influences the maturation of neutrophils in the BM.



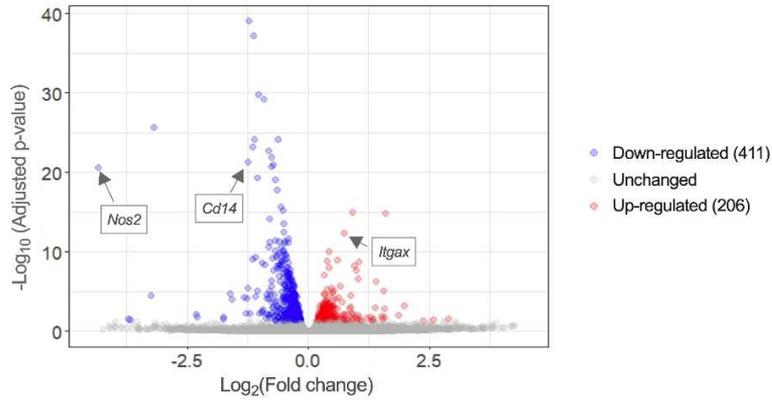
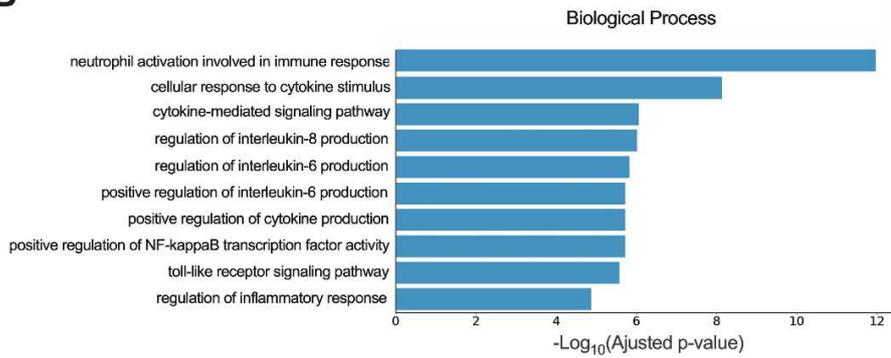
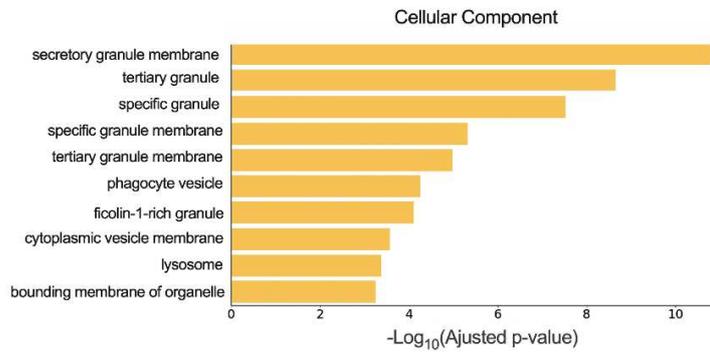
**Figure 3. Amoxicillin treatment of infected animals promotes BM neutrophil maturation.** CX3CR1<sup>gfp/+</sup> mice were infected with Sp seven days post-IAV infection and treated with AMX 12 h after Sp infection (IAV/Sp/AMX) or left untreated (IAV/Sp). As a control, mice only infected with IAV were treated with AMX (IAV/AMX). **(A)** Absolute number of lung neutrophils and frequency of blood neutrophils were assessed by flow cytometry 12 h post-treatment. Means  $\pm$  SEM of three experiments are shown (n=9-16). **(B)** A representative FACS dot plot of CD45 *in vivo* labeling of lung neutrophils is shown in the *left panel*. Means  $\pm$  SEM of the percentage of CD45<sup>+</sup> lung neutrophils (marginated pool) are shown (n=6-7). Absolute number of BM GMPs **(C)** and GPs **(D)** were quantified by flow cytometry. **(E)** Absolute number of BM neutrophils. **(F)** Gating strategy for mature neutrophils in the BM according to Ly6G, CXCR2 and CD101 expression and **(G)** frequency of mature BM neutrophils among total neutrophils. Means  $\pm$  SEM of biological replicates from at least three independent experiments are represented (n = 14-35) (\*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01, \*\*\*, p < 0.001 and \*\*\*\*, p < 0.0001; Kruskal-Wallis test).

### Mature BM neutrophils display specific transcriptional and proteomic profiles during the AMX treatment of superinfection

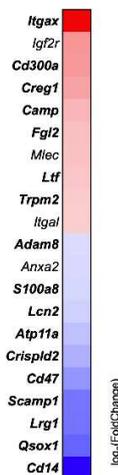
To gain further insights into the biology of mature BM neutrophils, we conducted RNA-seq analysis of Ly6G- and CXCR2-expressing cells from superinfected animals treated (or not) with AMX for 12 hours (**Fig 4**). A total of 617 differential expressed genes (DEGs) were identified in BM neutrophils from AMX-treated animals: 206 were upregulated and 411 were downregulated, relative to BM neutrophils from untreated animals (**Fig 4A**). To further elucidate the relation between DEGs and function, we used Enrichr to perform a Gene Ontology (GO) enrichment analysis. Analysis of the biological processes revealed that AMX treatment significantly enriched genes related

to neutrophil activation and degranulation and the production/regulation of cytokines (e.g. *Il6*) (**Fig 4B** and **S1 Table**). DEGs were also significantly enriched in cellular components related to granules and phagocytic or secretory vesicles (**Fig 4C** and **S2 Table**). AMX treatment was associated with lower expression of genes associated with pathogen recognition (*Tlr4*, *Tlr7*, *Myd88*, and *Cd14*), vesicle transport (*Scamp1* and *Atp11a*), inflammation (*Mmp8*, *S100a8*, *Adam8*, *Lrg1*, and *Lcn2*), oxidative stress (*Nos2* and *Qsox1*), and immune regulation (*Cd47* and *Crispld2*) (**Fig 4D-4F** and **S4A Fig**). Some of the downregulated genes were further selected for confirmation by RT-qPCR (**S4B Fig**). With regard to cellular components, AMX treatment was associated with downregulation of *Clec4e* (coding for a phagocytic C-type lectin) and the RAS-related *Rab* genes *Rab23*, *Rab20*, and *Rab31* (known to be crucial for phagosome maturation) (**Fig 4F**).

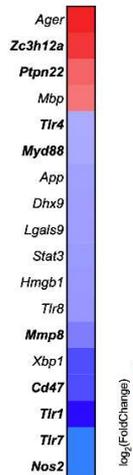
Interestingly, one of the upregulated genes (*Itgax*, encoding the integrin X chain protein CD11c) was recently identified as being essential for the regulation of neutrophil maturation in the BM (**Fig 4A** and **4D**) [29]. AMX treatment was associated with greater expression of genes related to innate immunity (*Unc93b1*, *Camp*, *Ltf*, and *Mpeg1*), endocytosis/phagocytosis (*Creg1*, *Tcirg1*, and *Hvcn1*) and the regulation of inflammation (*Cd300a*, *Fgl2*, *Trpm2*, *Zc3h12a*, and *Ptpn22*) (**Fig 4D-4F**). A semiquantitative proteomics analysis of mature BM neutrophils identified a number of proteins modulated by AMX treatment (**S4C Fig**). Some of the downregulated proteins were related to cytoskeleton remodeling (WAS protein, RHOA, and VAV) or neutrophil activity (NCF4 (an NADPH oxidase subunit crucial for ROS production), galectin-9, and Rab31); Rab31 was also identified in the RNA-seq analysis. Some of the proteins upregulated by AMX treatment were linked with the complement system and the coagulation cascade. Our results show that during a superinfection, AMX mainly downregulates activation-related genes but also upregulates phagocytosis/endocytosis- and regulation-associated genes in mature BM neutrophils.

**A****B****C****D**

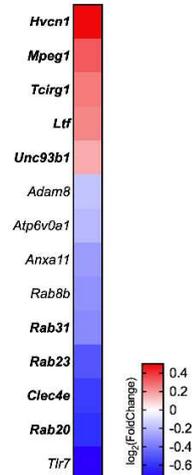
Neutrophil activation  
involved in immune response

**E**

Regulation of  
IL-6 production

**F**

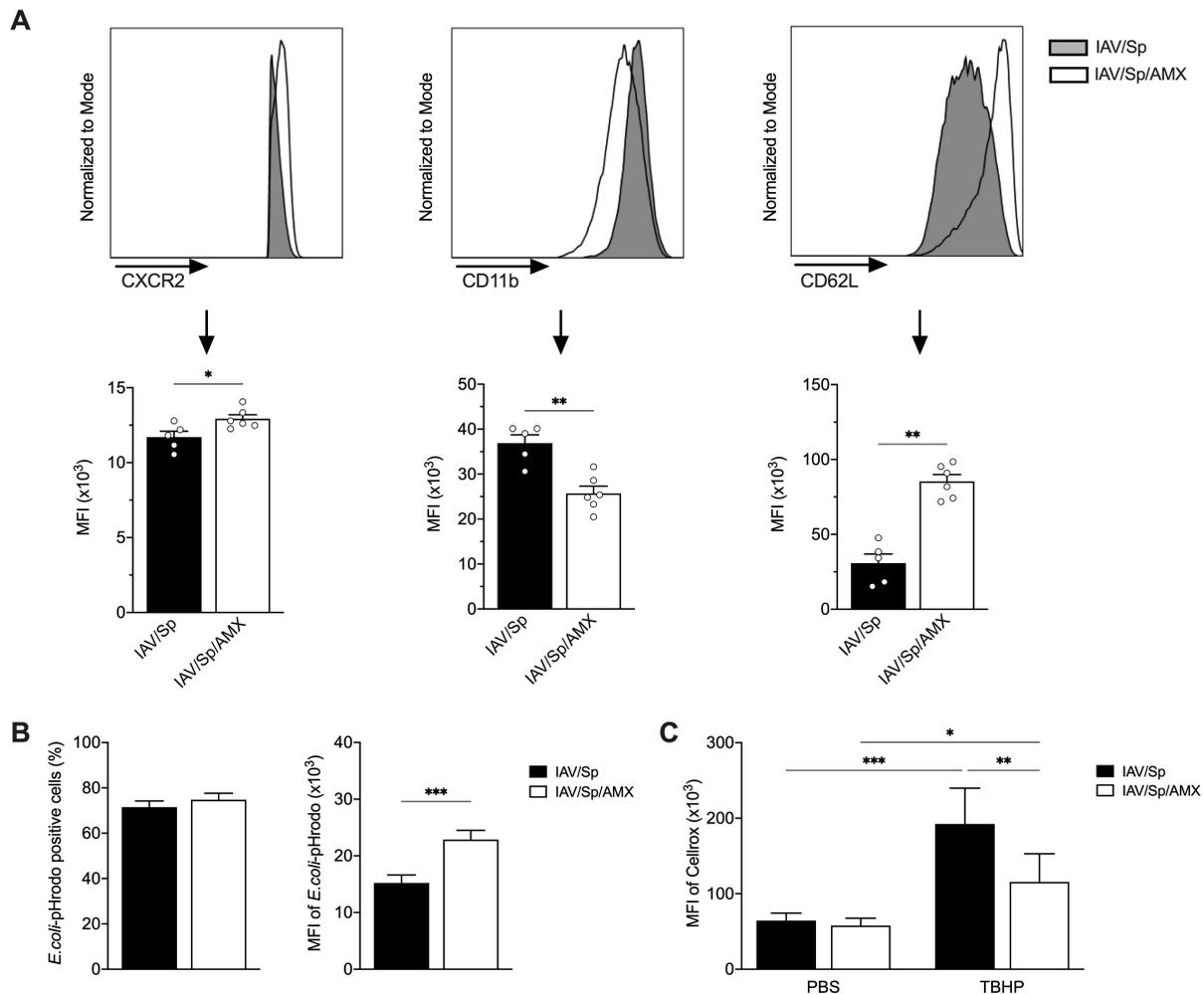
Phagocyte  
vesicle



**Figure 4. Amoxicillin treatment alters the transcriptional profile of mature BM neutrophils.** CX3CR1<sup>gfp/+</sup> mice were infected with Sp seven days post-IAV infection and treated with AMX 12 h after Sp infection (IAV/Sp/AMX) or left untreated (IAV/Sp). Mice were sacrificed 12 h post-treatment. Mature BM neutrophils were sorted on the basis of Ly6G and CXCR2 expression and RNA was purified for subsequent RNA-seq analysis. **(A)** Volcano plot showing  $-\log_{10}$  (adjusted p-value) and  $\log_2$  (fold change) for differentially expressed genes (DEGs) in AMX treated animals compared to untreated mice. Each data point represents a gene. Blue (downregulated) and red (upregulated) points are the genes with a significant  $\log_2$  (fold change) and an adjusted p-value < 0,05. **(B-C)** Enrichment analysis of Gene Ontology (GO) on identified DEGs using Enrichr. The top 10 significantly enriched GO terms of the target genes in the biological processes **(B)** and cellular components **(C)** are shown. **(D-F)** Heat maps showing row-scaled expression ( $\text{Log}_2$  (fold change)) of the highest DEGs associated with the biological process "neutrophil activation involved in the immune response" **(D)**, all DEG related to the biological process "regulation of IL-6 production" **(E)** and the cellular components "phagocytic vesicle" **(F)**. Data represent biological triplicates, each replicate being a pool of three mice per group.

### **Amoxicillin treatment impacts the activation and functions of mature BM neutrophils.**

We next sought to establish whether or not AMX treatment of superinfected animals influenced the activation and effector functions of mature BM neutrophils. To this end, we used flow cytometry to measure the expression of markers associated with cell activation, phagocytosis and ROS production in mature neutrophils among a sample of total BM cells harvested from superinfected animals treated (or not) with AMX (**Fig 5**). Treatment with AMX enhanced the expression of CXCR2 and CD62L on mature BM neutrophils, whereas CD11b expression was lower than in untreated animals; this indicated a less activated/primed phenotype (**Fig 5A**). Using *E. coli* bioparticles conjugated to pHrodo, we showed that AMX treatment did not change the proportion of mature BM neutrophils capable of phagocytosing particles *in vitro* but did significantly enhance the mean fluorescence intensity (MFI) of pHrodo in mature BM neutrophils from AMX-treated animals (**Fig 5B** and **S5A Fig**). This finding suggests that mature BM neutrophils from AMX-treated animals have a higher phagocytosis capacity. It is noteworthy that incubation of neutrophils with *E. coli* particles at 4°C, when the phagocytosis is blocked, drastically decreased the percentage of pHrodo positive cells and the MFI of pHrodo to the same extent in the two groups (**S5A Fig**). This finding suggests that mature BM neutrophils from AMX-treated animals have a higher phagocytosis capacity. Basal levels of ROS production were similar in mature BM neutrophils from superinfected mice treated with AMX and those not treated with AMX (**Fig 5C**). In contrast, mature BM neutrophils from AMX-treated animals that had been activated *ex vivo* with tert-butyl hydroperoxide released less ROS than untreated animals did (**Fig 5C** and **S5B Fig**). Overall, our data confirmed that AMX treatment significantly impacted the phenotype and function of mature BM neutrophils.

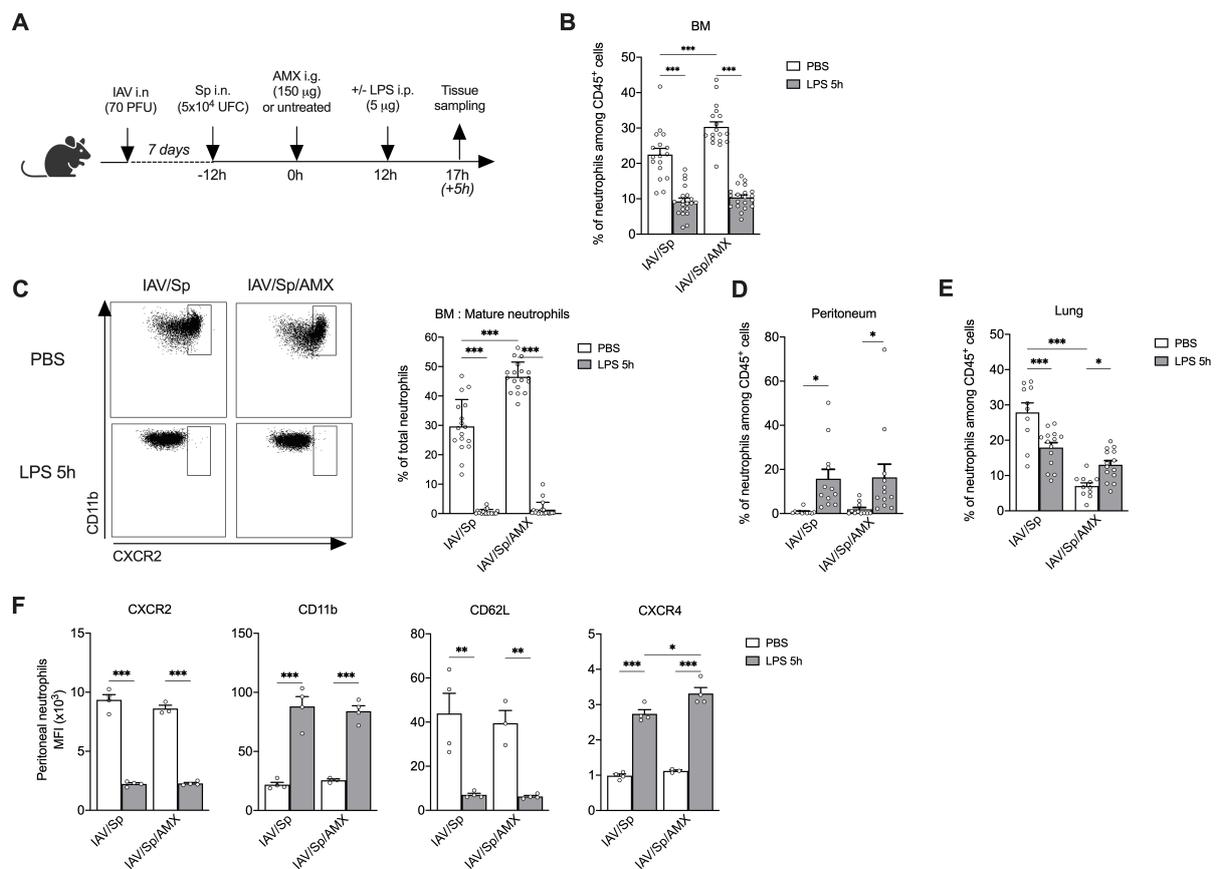


**Figure 5. Amoxicillin treatment impacts the activation state and functions of mature BM neutrophils.** CX3CR1<sup>9fp/+</sup> mice were infected with Sp seven days post-IAV infection and treated with AMX 12 h after Sp infection (IAV/Sp/AMX) or left untreated (IAV/Sp). Mice were sacrificed 12 h post-AMX treatment. **(A)** The MFI of CXCR2, CD11b and CD62L expression on mature BM neutrophils were analyzed by flow cytometry. Representative histograms (*top panel*) and means  $\pm$  SEM of one experiment representative of 3 are shown (*lower panel*) ( $n = 5-6$ ). **(B)** Total BM cells were incubated with pHrodo *E. coli* bioparticles and the percentage of mature BM neutrophils positive for *E. coli* pHrodo (*left panel*) as well as the MFI of *E. coli* pHrodo (*right panel*) were quantified by flow cytometry. Data represent pooled results from three independent experiments ( $n=13$ ) (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; Mann-Whitney). **(C)** Total BM cells were treated with TBHP (or PBS) and then incubated with CellROX Deep Red Reagent. Results are expressed as means  $\pm$  SEM of CellROX MFI of one experiment representative of two ( $n = 5-6$ ) (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ; Two-way ANOVA).

### Mature BM neutrophils conditioned by AMX treatment are rapidly mobilized in response to systemic inflammation

Since AMX treatment modified the mature BM neutrophils' transcriptional program and phenotypic and functional characteristics, we next looked at whether or not the antibiotic influenced neutrophil mobilization during acute inflammation. To this end, lipopolysaccharide (LPS) was administered intraperitoneally into superinfected animals treated (or not) with AMX (**Fig 6A**). A rapid drop in the proportion of total BM

neutrophils and the complete disappearance of mature neutrophils was observed in both groups 5 h after LPS stimulation – suggesting the egress of neutrophils from the BM (Fig 6B and 6C). In both groups of mice, the fall in the BM neutrophil count was associated with the rapid accumulation of neutrophils in the peritoneum (Fig 6D). It has been reported previously that the intraperitoneal administration of LPS in naive animals promotes the rapid accumulation of neutrophils in the lungs [30, 31]. Interestingly, LPS challenge was associated with a higher percentage of lung neutrophils in AMX-treated animals and a significantly lower percentage in untreated animals (Fig 6E). Thus, AMX-conditioned BM neutrophils were rapidly mobilized to peripheral tissues in response to the systemic administration of LPS. A phenotypic analysis of neutrophils that had migrated into the peritoneum after the LPS challenge indicated that LPS promoted the activation of neutrophils in both AMX-treated and untreated superinfected animals, as demonstrated by elevated surface levels of CD11b and lower levels of CD62L and CXCR2 expression (Fig 6F) [32]. In both groups of mice, LPS also enhanced the expression of CXCR4, a marker of aged neutrophils [33, 34]. Importantly, surface CXCR4 expression was higher on neutrophils from AMX-treated animals. Our results suggest that AMX treatment influences neutrophil aging in a context of systemic inflammation.



**Figure 6. Amoxicillin treatment promotes neutrophil recruitment in tissues following administration of LPS *in vivo*.** (A) CX3CR1<sup>9fb/+</sup> mice were infected with Sp seven days post-IAV infection and treated with AMX 12 h after *S. pneumoniae* infection (IAV/Sp/AMX) or left untreated (IAV/Sp). Then, in each group, animals were injected intraperitoneally (or not) with 5 µg LPS. Mice were sacrificed 5 h later. (B) The percentage of total BM neutrophils among CD45<sup>+</sup> population was quantified by flow cytometry. (C) Mature BM neutrophils (CXCR2<sup>high</sup>) were quantified among total neutrophils in the BM. Neutrophils were quantified in the peritoneum (D) and the lung (E) Means ± SEM of biological replicates from three independent experiments are represented (n=11-20). (F) The phenotype of neutrophils in the peritoneum was evaluated by flow cytometry. Means ± SEM of biological replicates of one experiment representative of three are shown (n=4) (\*p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001; Two-way ANOVA).

## Discussion

Characterization of the complex relationship between β-lactams and host immunity during the treatment of infection might help to improve. Given the neutrophils' dominant role in clearing *S. pneumoniae* infection, we looked at whether or not AMX treatment of pneumococcal pneumonia *in vivo* influenced neutrophil development and function. Our study is the first to have shown that AMX treatment of pneumonia influenced emergency granulopoiesis in the BM and led to the generation of mature neutrophils with distinct antimicrobial functions. Importantly, these AMX-conditioned mature neutrophils were mobilized rapidly in response to systemic inflammation.

Previous research had shown that neutrophil depletion or delayed neutrophil recruitment during *S. pneumoniae* pneumonia was associated with higher bacterial loads and a higher mortality rate – highlighting the neutrophils' critical role in the elimination of bacteria [14]. By using a murine model of pneumococcal post-influenza superinfection, we showed that (i) neutrophils accumulated in the lungs and blood, and (ii) *S. pneumoniae* triggered significant innate defense mechanisms in the highly inflammatory context of viral infection [35, 36]. The pool of neutrophils in the BM did not change in superinfected animals. However, a concomitant enhancement of emergency granulopoiesis, characterized by a greater number of proliferating (Ki-67<sup>+</sup>) GPs, was observed. This finding is in line with the previously reported emergency granulopoiesis during *S. pneumoniae* infection, which restores the neutrophil reservoir in the BM [27].

We next hypothesized that curative AMX treatment of ongoing pneumonia affects neutrophils by modulating their development, migration, and/or functions. The reduced bacterial burden upon AMX treatment was associated with a lower pulmonary pro-inflammatory response and lung neutrophil count, a hallmark most likely due to the direct effect of AMX on *S. pneumoniae*. In contrast, AMX treatment did not affect emergency granulopoiesis in the BM: the GP count was the same as in untreated animals. More importantly, the number of mature BM neutrophils was higher upon AMX treatment. Our results suggest that AMX treatment does not interfere with emergency granulopoiesis caused by *S. pneumoniae* but does reduce the mobilization of mature neutrophils from the BM into the lungs. It is not clear how AMX treatment maintains emergency granulopoiesis. Since no *S. pneumoniae* could be detected in the BM of animals treated (or not) with AMX, an indirect mode of action for AMX could be

postulated. Indeed, these effects were visible when AMX was no longer detectable in the bloodstream ( $\geq 8$  h). Earlier *in vitro* and *in vivo* studies had shown that when exposed to  $\beta$ -lactams, *S. pneumoniae* can rapidly release the cell wall components teichoic and lipoteichoic acids and the virulence factor pneumolysin [37-39]. Further studies will be needed to establish whether AMX-exposed bacteria in the lungs of superinfected animals release bacterial compounds that might trigger BM hematopoietic cells and skew differentiation towards the myeloid lineage [40]. We cannot completely rule out a local effect of proinflammatory cytokines (e.g. IL-6 or IFN- $\gamma$ ) or differentiation factors (e.g. G-CSF) upon AMX treatment [41-43].

A large body of evidence shows that neutrophils are phenotypically heterogeneous and functionally versatile [44]. In response to infection, neutrophils switch from a resting state to a primed or activated state – an essential requirement for the cells' functions. Our analysis of the mature BM neutrophils' phenotype highlighted the presence of a less fully activated/primed population in AMX-treated animals. These results are in line with the weak ability of AMX-conditioned mature BM neutrophils to produce ROS upon stimulation. The downregulation of genes related to pathogen recognition (*Tlr4*, *Tlr7*, and *Myd88*), inflammatory responses (*Mmp8*, *S100a8*, and *Lcn2*) and ROS production (*Nos2* and *Qsox1*) and the low observed protein level of the NADPH oxidase subunit NCF4 [46], further support our conclusion. However, we were surprised to observe an increase in the ability of AMX-conditioned mature BM neutrophils to phagocytose bacterial particles. This finding was in line with the upregulation of genes related to the phagocytic/endocytic pathway (*Creg1*, *Tcirdg*, and *Hvcn1*) and proteins of the complement and coagulation systems [47]. On one hand, this is suggestive of greater expression of phagocytosis-related receptors/molecules on AMX-conditioned mature BM neutrophils. On the other hand, the downregulation of genes and proteins related to cytoskeleton remodeling, vesicle transport and phagosome maturation suggest the impairment of cytoplasmic granule transport and fusion with phagosomes – a prerequisite for neutrophil killing activity [45, 48] – in AMX-conditioned mature BM neutrophils. This apparent discrepancy might be due to a lower rate of phagosomal content digestion in AMX-treated mature BM neutrophils, which would increase the number of bacteria in the phagosomes. The cells' less primed/activated state is in line with this hypothesis. However, it remains to be determined whether AMX treatment affects the initial steps in phagocytosis and/or phagosome maturation in mature BM neutrophils.

AMX-treated mature BM neutrophils are also endowed with distinct migratory capabilities. In response to systemic administration of LPS, mature neutrophils from AMX-treated animals exited the BM and migrated towards the peritoneum and the lungs. This finding is in line with the rapid mobilization of neutrophils in peripheral tissues upon LPS administration previously reported in naive animals [30, 31]. Mature BM neutrophils from untreated animals only migrated towards the peritoneum. The low neutrophil count in the lungs might have been due to either local apoptosis of

neutrophils in superinfected animals or, as has been described previously, reverse migration from the lungs to the peritoneum upon LPS activation [49]. It remains to be established whether or not the lung functions as a reservoir of primed/activated neutrophils in superinfected animals, *i.e.* a reservoir that can be mobilized to distant tissues on demand. Endotoxemia also induced a significant elevation in the number of neutrophils with an aged phenotype, characterized by enhanced expression of CD11b and CXCR4, in the peritoneum of mice, regardless of treatment with AMX [33, 34]. Aged neutrophils are rapidly mobilized under inflammatory conditions and have stronger effector functions (*e.g.* phagocytosis and neutrophil extracellular trap formation) than young neutrophils [34, 50]. Importantly, the higher expression of CXCR4 on peritoneal neutrophils upon LPS treatment suggests that AMX enhances retention of these cells at the site of inflammation, which would render aged neutrophils more efficient *in situ*. After completing their functions, the CXCR4<sup>high</sup> neutrophils traffic back to the BM and are cleared; this physiological phenomenon is important for maintaining immunological homeostasis [51, 52].

To conclude, we showed the AMX treatment of a bacterial lung infection can rapidly influence *in vivo* neutrophil development and functions within the BM. We now intend to elucidate the mechanisms by which AMX reprograms neutrophil progenitors and/or mature neutrophils in the BM and determine how these changes are associated with a therapeutic effect during bacterial pneumonia. This knowledge should facilitate the development of novel antimicrobial drugs and new treatment strategies that harness the host-pathogen interface.

### **Acknowledgments and Funding**

We thank Drs. Anne Rogel and Laurye Van Maele for critical reading of the manuscript. We thank the BiImaging Center Lille (BICeL) and animal core facilities of the UMS 2014 - US 41 - PLBS, Lille, for access to equipment and technical assistance, respectively. We thank the platforms GO@L and PAGés-P3M for transcriptomic and proteomic analysis, respectively. MM was a fellow of the Innovation Pharmaceutique et Recherche program. CC was funded by Univ Lille. YZ, JCS and CF were funded by INSERM. BH was funded by Lille University Hospital. DS, JMS and DB were funded by the Institut Pasteur de Lille. The work is supported by the INSERM, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, the project FAIR that received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No 847786, and the project BIP from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE18-0030-02). We declare no competing interests.

### **Authorship**

Conceptualization, C.F., J.C.S. and C.C.; Investigation, M.M., D.S., C.F., B.H., D.B. and J.M.S.; Data curation: M.M., Y.Z. and J.M.S.; Formal analysis, M.M., Y.Z., B.H., C.F. and J.M.S.; Resources, J.C.S. and C.F.; Validation, M.M., C.F. and Y.Z.;

Supervision, C.F.; Writing- original draft: M.M. and C.F.; Writing – review & editing: M.M., C.F., J.C.S and C.C.

### **Conflict-of-Interest Disclosure**

The authors declare no conflict of interest

### **References**

- 1.Collaborators GBDLRI. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(11):1191-210.
- 2.Mandziuk J, Kuchar EP. Streptococcal Meningitis. *StatPearls. Treasure Island (FL)2022.*
- 3.Gadsby NJ, Musher DM. The Microbial Etiology of Community-Acquired Pneumonia in Adults: from Classical Bacteriology to Host Transcriptional Signatures. *Clin Microbiol Rev.* 2022;35(4):e0001522.
- 4.Morris DE, Cleary DW, Clarke SC. Secondary Bacterial Infections Associated with Influenza Pandemics. *Front Microbiol.* 2017;8:1041.
- 5.<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. 2017.
- 6.Berti A, Rose W, Nizet V, Sakoulas G. Antibiotics and Innate Immunity: A Cooperative Effort Toward the Successful Treatment of Infections. *Open Forum Infect Dis.* 2020;7(8):ofaa302.
- 7.Periti P, Mazzei T. Infections in immunocompromised patients. II. Established therapy and its limitations. *Clin Ther.* 1985;8(1):100-17.
- 8.Wolf AJ, Liu GY, Underhill DM. Inflammatory properties of antibiotic-treated bacteria. *Journal of leukocyte biology.* 2017;101(1):127-34.
- 9.Assar S, Nosratabadi R, Khorramdel Azad H, Masoumi J, Mohamadi M, Hassanshahi G. A Review of Immunomodulatory Effects of Fluoroquinolones. *Immunol Invest.* 2021;50(8):1007-26.
- 10.Kricker JA, Page CP, Gardarsson FR, Baldursson O, Gudjonsson T, Parnham MJ. Nonantimicrobial Actions of Macrolides: Overview and Perspectives for Future Development. *Pharmacol Rev.* 2021;73(4):233-62.
- 11.<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>. 2022.
- 12.Mondeme M, Carnoy C, Sirard JC, Faveeuw C. Treatment of Bacterial Infections with beta-Lactams: Cooperation with Innate Immunity. *Infect Immun.* 2023:e0050322.
- 13.Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol.* 2012;14(4):460-6.
- 14.Palmer CS, Kimmey JM. Neutrophil Recruitment in Pneumococcal Pneumonia. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:894644.
- 15.Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:197-223.

16. Naish E, Wood AJ, Stewart AP, Routledge M, Morris AC, Chilvers ER, et al. The formation and function of the neutrophil phagosome. *Immunol Rev.* 2022.
17. Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(5):302-14.
18. Evrard M, Kwok IWH, Chong SZ, Teng KWW, Becht E, Chen J, et al. Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity.* 2018;48(2):364-79 e8.
19. Yanez A, Coetzee SG, Olsson A, Muench DE, Berman BP, Hazelett DJ, et al. Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity.* 2017;47(5):890-902 e4.
20. Paudel S, Ghimire L, Jin L, Jeansonne D, Jeyaseelan S. Regulation of emergency granulopoiesis during infection. *Front Immunol.* 2022;13:961601.
21. Slager J, Aprianto R, Veening JW. Deep genome annotation of the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae* D39. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(19):9971-89.
22. Heib T, Gross C, Muller ML, Stegner D, Pleines I. Isolation of murine bone marrow by centrifugation or flushing for the analysis of hematopoietic cells - a comparative study. *Platelets.* 2021;32(5):601-7.
23. Barletta KE, Cagnina RE, Wallace KL, Ramos SI, Mehrad B, Linden J. Leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury. *J Immunol Methods.* 2012;375(1-2):100-10.
24. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics.* 2013;14:128.
25. De Filippo K, Neill DR, Mathies M, Bangert M, McNeill E, Kadioglu A, et al. A new protective role for S100A9 in regulation of neutrophil recruitment during invasive pneumococcal pneumonia. *FASEB J.* 2014;28(8):3600-8.
26. Jones MR, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP. Lung NF-kappaB activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2005;175(11):7530-5.
27. Paudel S, Baral P, Ghimire L, Bergeron S, Jin L, DeCorte JA, et al. CXCL1 regulates neutrophil homeostasis in pneumonia-derived sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3. *Blood.* 2019;133(12):1335-45.
28. Nies KPH, Kraaijvanger R, Lindelauf KHK, Drent R, Rutten RMJ, Ramaekers FCS, et al. Determination of the proliferative fractions in differentiating hematopoietic cell lineages of normal bone marrow. *Cytometry A.* 2018;93(11):1097-105.
29. Hou L, Voit RA, Shibamura-Fujiogi M, Koutsogiannaki S, Li Y, Chen Y, et al. CD11c regulates neutrophil maturation. *Blood Adv.* 2022.
30. Andonegui G, Bonder CS, Green F, Mullaly SC, Zbytniuk L, Raharjo E, et al. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest.* 2003;111(7):1011-20.

31. Ye Y, Zhang HW, Mei HX, Xu HR, Xiang SY, Yang Q, et al. PDX regulates inflammatory cell infiltration via resident macrophage in LPS-induced lung injury. *J Cell Mol Med*. 2020;24(18):10604-14.
32. Reber LL, Gillis CM, Starkl P, Jonsson F, Sibilano R, Marichal T, et al. Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2017;214(5):1249-58.
33. De Filippo K, Rankin SM. CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in homeostasis and disease. *Eur J Clin Invest*. 2018;48 Suppl 2(Suppl Suppl 2):e12949.
34. Uhl B, Vadlau Y, Zuchtriegel G, Nekolla K, Sharaf K, Gaertner F, et al. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood*. 2016;128(19):2327-37.
35. Ellis GT, Davidson S, Crotta S, Branzk N, Papayannopoulos V, Wack A. TRAIL+ monocytes and monocyte-related cells cause lung damage and thereby increase susceptibility to influenza-Streptococcus pneumoniae coinfection. *EMBO Rep*. 2015;16(9):1203-18.
36. Smith MW, Schmidt JE, Rehg JE, Orihuela CJ, McCullers JA. Induction of pro- and anti-inflammatory molecules in a mouse model of pneumococcal pneumonia after influenza. *Comp Med*. 2007;57(1):82-9.
37. Mattie H, Stuertz K, Nau R, van Dissel JT. Pharmacodynamics of antibiotics with respect to bacterial killing of and release of lipoteichoic acid by Streptococcus pneumoniae. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(1):154-9.
38. Spreer A, Kerstan H, Bottcher T, Gerber J, Siemer A, Zysk G, et al. Reduced release of pneumolysin by Streptococcus pneumoniae in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(8):2649-54.
39. Stuertz K, Schmidt H, Eiffert H, Schwartz P, Mader M, Nau R. Differential release of lipoteichoic and teichoic acids from Streptococcus pneumoniae as a result of exposure to beta-lactam antibiotics, rifamycins, trovafloxacin, and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(2):277-81.
40. Boettcher S, Manz MG. Sensing and translation of pathogen signals into demand-adapted myelopoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(1):5-10.
41. MacNamara KC, Jones M, Martin O, Winslow GM. Transient activation of hematopoietic stem and progenitor cells by IFN $\gamma$  during acute bacterial infection. *PLoS One*. 2011;6(12):e28669.
42. Schuettpeitz LG, Borgerding JN, Christopher MJ, Gopalan PK, Romine MP, Herman AC, et al. G-CSF regulates hematopoietic stem cell activity, in part, through activation of Toll-like receptor signaling. *Leukemia*. 2014;28(9):1851-60.
43. Tie R, Li H, Cai S, Liang Z, Shan W, Wang B, et al. Interleukin-6 signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Exp Mol Med*. 2019;51(10):1-12.
44. Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol*. 2019;40(7):565-83.
45. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. 2014;15(7):602-11.

46. Winter S, Hultqvist Hopkins M, Laulund F, Holmdahl R. A Reduction in Intracellular Reactive Oxygen Species Due to a Mutation in NCF4 Promotes Autoimmune Arthritis in Mice. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25(18):983-96.
47. Berends ET, Kuipers A, Ravesloot MM, Urbanus RT, Rooijackers SH. Bacteria under stress by complement and coagulation. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38(6):1146-71.
48. Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of leukocyte biology*. 2011;90(2):271-84.
49. Xu Q, Zhao W, Yan M, Mei H. Neutrophil reverse migration. *J Inflamm (Lond)*. 2022;19(1):22.
50. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*. 2015;525(7570):528-32.
51. Wang J, Hossain M, Thanabalasuriar A, Gunzer M, Meininger C, Kubes P. Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science*. 2017;358(6359):111-6.
52. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003;19(4):583-93.
53. Aruci E, Saliou JM, Ferveur JF, Briand L. Proteomic Characterization of *Drosophila melanogaster* Proboscis. *Biology (Basel)*. 2022;11(11).
54. Perez-Riverol Y, Bai J, Bandla C, Garcia-Seisdedos D, Hewapathirana S, Kamatchinathan S, et al. The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D543-D52.

## Supplemental methods

### AMX quantification with LC-MS/MS

C57Bl/6J mice were infected i.n. with IAV and inoculated with Sp 7 days later. Then, mice received a single dose of 150 µg of AMX 12 h post Sp infection. Blood was rapidly sampled at 0.167-0.5-1-3-6-8 and 12h post-treatment. Sera were then stored at -80°C until analysis. Calibrator (CAL) and quality control (QC) samples were prepared with aqueous AMX solution to a pooled serum of mice resulting in a concentration range of 0.05-10 µg/mL.

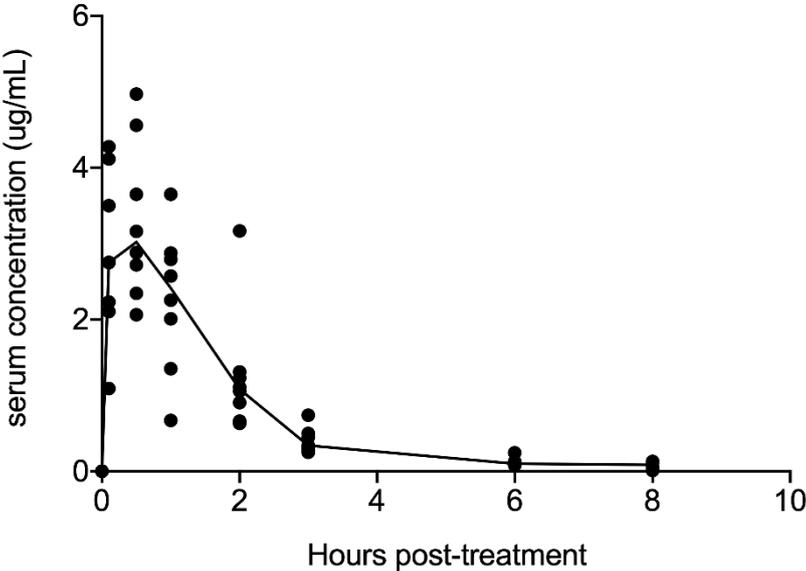
An analytical procedure based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, employing electrospray ionization (LC-ESI/MS/MS), has been developed by the toxicology unit of the Lille University Hospital Center. Serum (50 µl) was analyzed after the addition of 200 µL methanol containing methyl-clonazepam (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 1.25 mg/L, as an internal standard. The samples were mixed and centrifuged (14000 g, 4°C, 10 min) and the supernatant (20 µL) was mixed to ammonium formate buffer (180 µL). 10 µL of this mixture were injected onto an UPLC-MS-MS system (Acquity TQ-XS Detector, Waters, Milford, MA) equipped with a HSS C18 column (1,8µm; 2,1x150mm; 40°C; Waters). A gradient elution method was chosen with a flow rate of 0.4 mL/min and a total analytical runtime of 6.5 min. 5mM ammonium formate (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B) both supplemented with 0,1% (V/V) formic acid were used for elution. Ions of each analyzed compound were detected in a positive ion mode using multiple reaction monitoring. Chromalinks software (Waters) was used for data acquisition and processing.

### Mass Spectrometry Proteomic Analysis

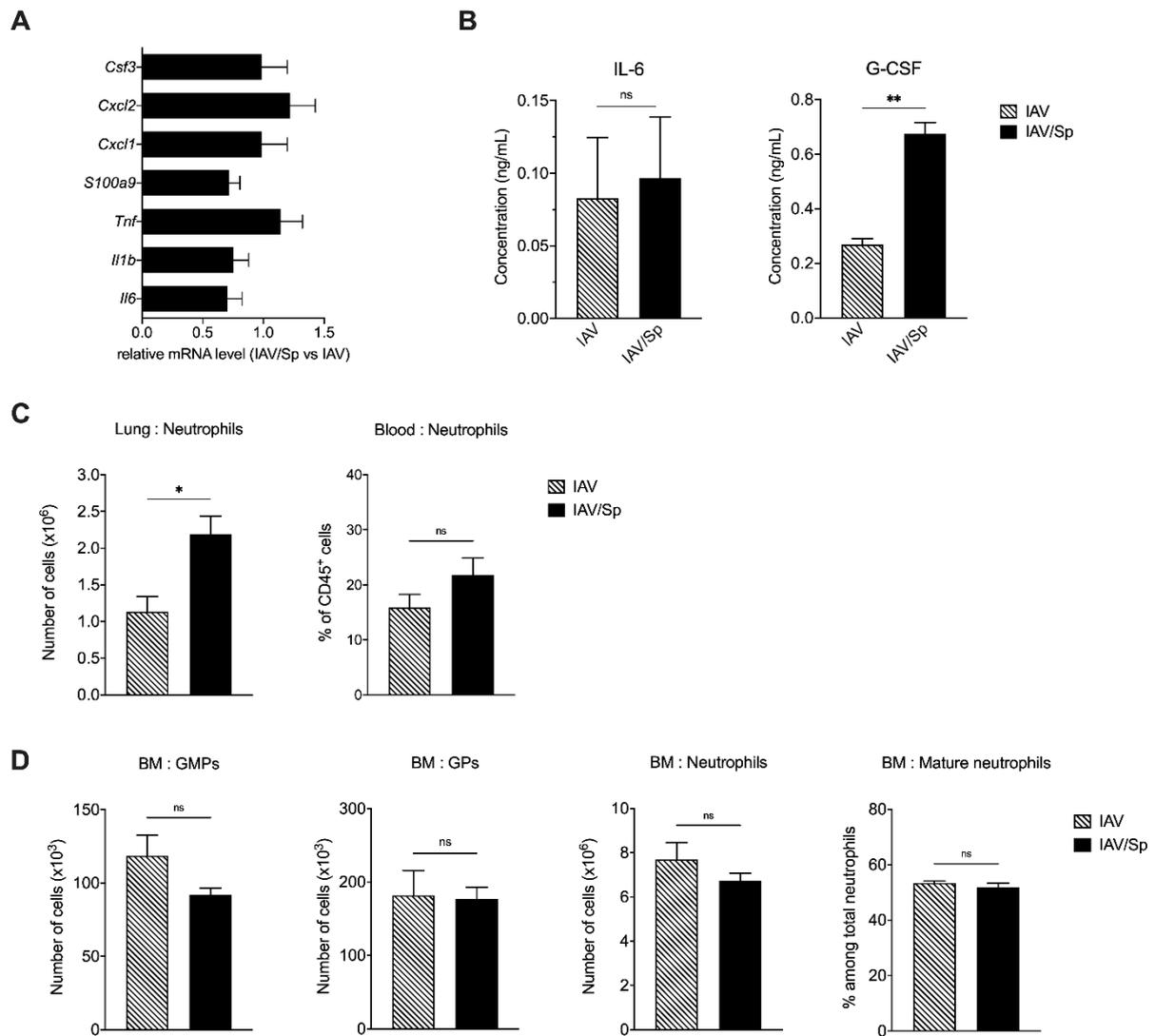
Mature BM neutrophils ( $5 \times 10^5$ ) were collected for the proteomic analysis. The sorted cells were washed twice in PBS at 200 g for 3 minutes. Pellets were resuspended in 20 µl of Trupage loading buffer containing dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich). Samples were stored at -20°C up until use. LC-MS/MS was performed using UltiMate 3000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for peptides elution as previously described [53]. Peptides were identified using Proteome Discoverer Software (v.1.4) (ThermoFisher Scientific). Mass spectra were searched against UniProtKB database (taxonomy 10090, April 2022, 88037 entries) restricted to *Mus musculus* using the Mascot search engine (version 2.4.0, Matrix Science, London, UK). Mass tolerance was set to 0.02 Da for precursor ions and 10 ppm for fragment ions. One tryptic miscleavage was considered as well as chemical modifications of cysteine (carbamidomethylation and propionamidation), methionine (oxidation) and protein N-terminal acetylation. The identification results were validated using Proline Software. Peptide spectrum greater than 9 residues and ion scores > 10 were retained. Only peptides with a false discovery rate < 1% were considered for analysis (using Mascot Modified Mudpit score). Spectra counts were quantified with Proline 2.0. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange

Consortium via the PRIDE [54] partner repository with the dataset identifier PXD042496 and 10.6019/PXD042496.

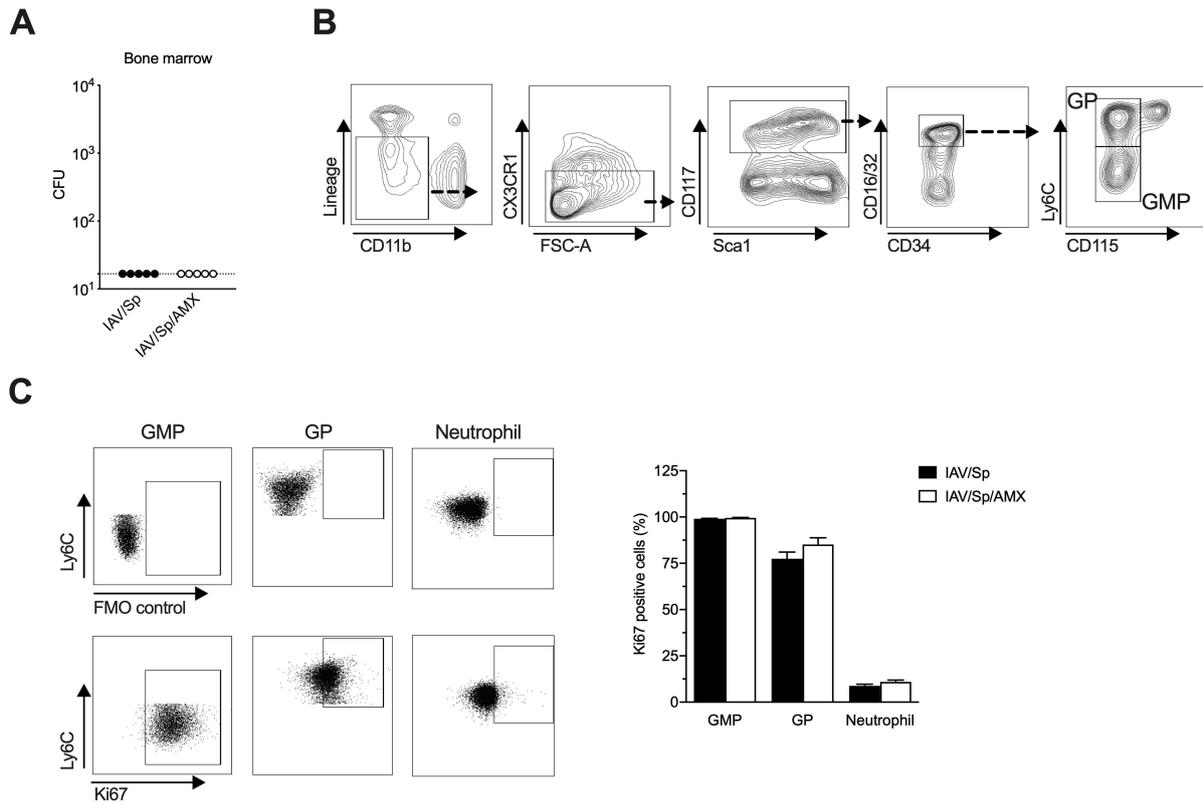
# Supplemental Figures



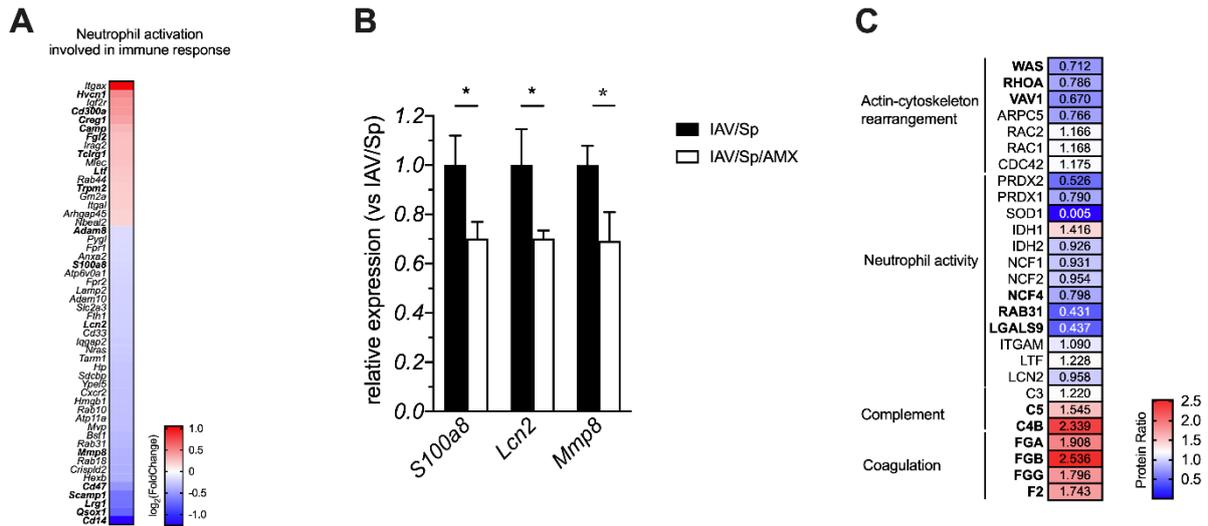
**Supplementary Figure 1. Determination of amoxicillin concentrations in the sera of superinfected animals.** C57Bl/6J mice were infected i.n. with IAV and inoculated with Sp 7 days later. Then, mice received a single dose of 150  $\mu$ g of AMX 12 h post Sp infection. Blood was rapidly sampled at different time points post-treatment and AMX concentration in the sera was determined by LC-MS/MS. Each symbol represents AMX concentration for an individual animal and the line represents the median concentration (n=4-8).



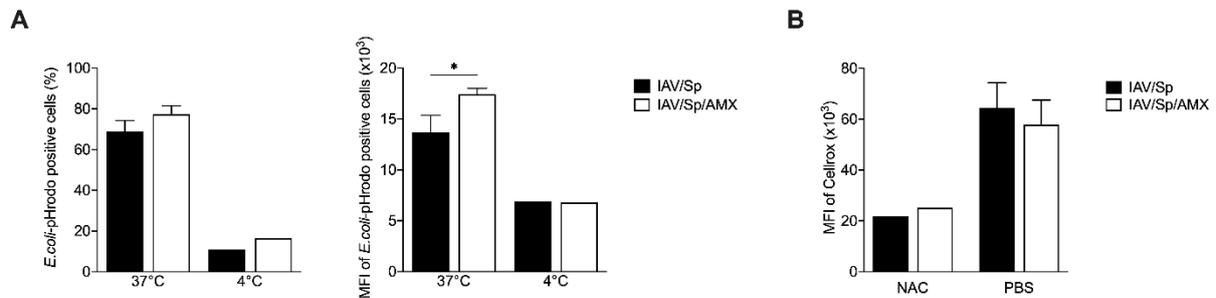
**Supplementary Figure 2. *S. pneumoniae* secondary infection moderately impacts the lung and BM responses 12 h post infection.** (A, B) C57BL/6J or (C, D) CX3CR1gfp/+ mice were infected i.n. with IAV. Seven days later, animals were infected i.n. with Sp (IAV/Sp) or left uninfected (IAV). (A-C) Lungs, blood and (D) BM were collected 12 h after Sp infection, the timing corresponding to t0. (A) The relative expression of each gene was normalized to the reference genes *Actb* and *B2m*, and then to the reference group IAV (set to the value of 1). (B) IL-6 and G-CSF concentrations were determined in the sera by ELISA. Means  $\pm$  SEM of biological replicates are represented (n=5-8). \*\*  $p < 0,01$  (Mann-Whitney). (C) Absolute numbers of lung neutrophils (left panel) and frequency of blood neutrophils (right panel) are represented. (D) Absolute numbers of BM progenitors and total neutrophils as well as the frequency of mature neutrophils are shown. Data represent the means  $\pm$  SEM of two independent experiments (n=4-10). (\*  $p < 0,05$ ; ns: not significant; Mann-Whitney).



**Supplementary Figure 3. Flow cytometry gating strategies** (A) CX3CR1<sup>gfp/+</sup> mice were infected with Sp seven days post-IAV infection and treated with AMX 12 h after Sp infection (IAV/Sp/AMX) or left untreated (IAV/Sp). BM cells were prepared 12 h post-treatment and plated in serial dilutions onto blood agar plates to measure bacterial load. Counts for individual mouse are shown as CFU per femur (n=5). (B) Gating strategy for granulocyte progenitors GMP and GP in the BM. (C) Gating strategy to identify the proliferative cells among GMP, GP and neutrophils in the BM according to Ki67 expression or not (FMO control) (left panels). The percentages of proliferative cells are shown (right panel). Results are expressed as means  $\pm$  SEM of one experiment (n = 3-4).



**Supplementary Figure 4. Transcriptomic and proteomic analysis of AMX-treated BM neutrophils compared to untreated one.** CX3CR1<sup>9fp/+</sup> mice were infected with Sp seven days post-IAV infection and treated with AMX 12 h after Sp infection (IAV/Sp/AMX) or left untreated (IAV/Sp). Mice were sacrificed 12h post-treatment. Mature BM neutrophils were sorted on the basis of CXCR2 expression and RNA (A, B) and proteins (C) were purified for subsequent RNA-seq and proteomic analysis. (A) Heat map showing row-scaled expression of all DEGs associated with the biological process "neutrophil activation involved in the immune response". (B) The relative expression of selected genes in mature BM neutrophils of superinfected animals treated or not with AMX, was determined by RT-qPCR. mRNA level for each gene is normalized to the reference genes *Actb* and *B2m* and then to the group IAV/Sp (defined by the value 1). \*p < 0,05 (Unpaired t-test). (C) Semi-quantitative proteomic analysis. Heat map representing selected differentially expressed proteins and the raw scaling (Protein Ratio) is shown.



**Supplementary Figure 5. Phagocytosis is inhibited at 4°C and basal level of ROS production by mature BM neutrophils.** CX3CR1<sup>9fp/+</sup> mice were infected with Sp seven days post-IAV infection and treated with AMX 12 h after Sp infection (IAV/Sp/AMX) or left untreated (IAV/Sp). (A) Total BM cells were incubated with pHrodo Red *E. coli* bioparticles at 37°C or 4°C and the percentage of mature BM neutrophils positive for *E. coli* pHrodo (left panel) as well as the MFI of *E. coli* pHrodo (right panel) were quantified by flow cytometry. (B) Total BM cells were incubated with N-Acetyl Cysteine (NAC) or not and ROS production was evaluated by flow cytometry using Cellroxx Deep Red Reagent. (A, B) Data are representative of two experiments (n=2-5). \* p < 0,05 (Two-way ANOVA)

Terms	p-adjusted value	DEGs
neutrophil activation involved in immune response (GO:0002283)	1.1097616308472693E-12	HEXB;HP;SLC2A3;PYGL;TCIRG1;HMGB1;ITGAL;RAB44;GM2A;FTH1;LAMP2;ITGAX;QSOX1;CAMP;CD33;ANXA2;CD300A;ADAM10;IRAG2;ATP11A;SCAMP1;MMP8;ARHGAP45;RAB31;CRISPLD2;ADAM8;CD47;S100A8;LTF;HVCN1;MVP;FGL2;FPR1;FPR2;IQGAP2;TRPM2;SDCBP;NRAS;CREG1;CXCR2;MLEC;CD14;ATP6V0A1;NBEAL2;IGF2R;RAB10;BST1;LRG1;TARM1;LCN2;RAB18;YPEL5
cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	7.779862095032441E-9	NFAT5;RIPOR2;CSF3R;IFITM2;SELPLG;DHX9;FPR1;F13A1;SLA;CXCR4;CSF2RB;IL1RAP;HIF1A;ZFP36L1;SOCS3;SBNO2;IRAK2;ZC3H12A;PIM1;ITGAX;HMOX1;RIPK1;LGALS9;JAK3;IL13RA1;MCL1;CCR1;XBP1;ANXA1;NOS2;IFNGR1;IL1R2;STAT3;ACOD1;PTPN12;GAB2;YWHAZ;HCK;AIM2;PDE12;LCN2;CD47;GAPDH;TLR4;BCL2L1
cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	8.10535993436178E-7	ARF1;RNASEL;CSF3R;IFITM2;TNFRSF13B;FPR1;SLA;F13A1;CSF2RB;IL1RAP;HIF1A;LMNB1;SOCS3;UGCG;IL18RAP;IRAK2;CXCR2;PIM1;ITGAX;HMOX1;MAP3K8;RIPK1;CD300LF;JAK3;IL13RA1;MCL1;CCR1;IL15RA;ANXA1;ANXA2;NOS2;IFNGR1;IL15;IL1R2;STAT3;GAB2;YWHAZ;NFKBIA;PSMA6;HCK;AIM2;TRAF5;LCN2;LTB;MAP3K14;MYD88;BCL2L1;BIRC3
regulation of interleukin-8 production (GO:0032677)	8.10535993436178E-7	RAB1A;ANXA1;NOS2;STAT3;PTPN22;HMGB1;TLR1;BCL3;TLR8;TLR7;RIPK1;LGALS9;CD14;TLR4;CD33;MYD88
regulation of interleukin-6 production (GO:0032675)	1.6129919641906346E-6	APP;XBP1;NOS2;DHX9;STAT3;PTPN22;HMGB1;MMP8;AGER;TLR1;ZC3H12A;TLR8;MBP;TLR7;LGALS9;CD47;TLR4;MYD88
positive regulation of interleukin-6 production (GO:0032755)	1.9466141117460113E-6	APP;XBP1;NOS2;DHX9;STAT3;HMGB1;MMP8;AGER;TLR1;TLR8;TLR7;MBP;LGALS9;TLR4;MYD88
positive regulation of cytokine production (GO:0001819)	1.9466141117460113E-6	APP;RAB1A;DHX9;PTPN22;HMGB1;HIF1A;AGER;FLOT1;PDE4B;HMOX1;NLRP3;MBP;RIPK1;LGALS9;CD14;XBP1;ANXA1;NOS2;IL15;PDE4D;STAT3;EIF2AK3;ARNT;MMP8;TLR1;SLC7A5;TLR8;TLR7;LTB;TLR4;GAPDH;MYD88
positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity (GO:0051092)	1.9466141117460113E-6	APP;DHX9;STAT3;IL1RAP;AGER;NFKBIA;PSMA6;IL18RAP;AIM2;IRAK2;TRAF5;FLOT1;NLRP3;FLOT2;ADAM8;RIPK1;LGALS9;TLR4;S100A8;MYD88;LTF
toll-like receptor signaling pathway (GO:0002224)	2.6079730462733165E-6	UNC93B1;UBE2D3;HMGB1;TLR1;CTSL;IRAK2;CTSK;TLR8;TLR7;RIPK1;LGALS9;CD14;TLR4;S100A8;MYD88;BIRC3
regulation of inflammatory response (GO:0050727)	1.1922714501693547E-5	APP;SEMA7A;ANXA1;DHX9;IL15;ACOD1;FPR2;MMP8;NFKBIA;BST1;HCK;PSMA6;SBNO2;NLRP3;TLR7;RIPK1;CD47;GGT1;TLR4;S100A8;MYD88;PPARD;BIRC3

**Supplementary Table 1.** List of differentially expressed genes in the top 10 of GO Biological Process enriched terms in BM mature neutrophils from AMX-treated infected animals compared to infected animals left untreated.

Terms	p-adjusted value	DEGs
secretory granule membrane (GO:0030667)	1.591085361946809E-11	HVCN1;FPR1;ITPR2;SLC2A3;FPR2;TCIRG1;SRI;IQGAP2;ITGAL;TRPM2;RAB44;NRAS;CXCR2;LAMP2;ITGAX;MLEC;ANXA7;CD14;CD33;ATP6V0A1;CD300A;ADAM10;IRAG2;NBEAL2;ATP11A;SCAMP1;IGF2R;SELP;RAB10;BST1;RAB31;TARM1;RAB18;ADAM8;CD47;PAM
tertiary granule (GO:0070820)	2.193131395782551E-9	HP;FPR1;SLC2A3;FPR2;TCIRG1;TRPM2;NRAS;FTH1;LAMP2;ITGAX;QSOX1;CAMP;CD33;ATP6V0A1;CD300A;ADAM10;NBEAL2;ATP11A;MMP8;LRG1;TARM1;ADAM8;CD47;YPEL5;LTF
specific granule (GO:0042581)	3.1666298883370194E-8	HVCN1;HP;ADAM10;ANXA11;SLC2A3;ATP11A;FPR2;SCAMP1;ITGAL;MMP8;RAB44;TRPM2;BST1;LRG1;TARM1;LCN2;MLEC;ADAM8;QSOX1CD47;CAMP;CD33;LTF
specific granule membrane (GO:0035579)	4.345679536862851E-6	HVCN1;ADAM10;SLC2A3;ATP11A;FPR2;ITGAL;SCAMP1;RAB44;TRPM2;BST1;TARM1;MLEC;ADAM8;CD47;CD33
tertiary granule membrane (GO:0070821)	1.0255053349126982E-5	CD300A;ADAM10;SLC2A3;NBEAL2;ATP11A;FPR2;TRPM2;NRAS;TARM1;ITGAX;ADAM8;CD47;CD33
phagocytic vesicle (GO:0045335)	5.6189935553874795E-5	UNC93B1;HVCN1;ANXA11;TCIRG1;MPEG1;RAB31;RAB20;RAB23;ADAM8;TLR7;CLEC4E;ATP6V0A1;RAB8B;LTF
ficolin-1-rich granule (GO:0101002)	7.807491794226607E-5	CD300A;MVP;FGL2;FPR1;NBEAL2;SLC2A3;FPR2;HMGB1;PYGL;TCIRG1;TRPM2;LRG1;CRISPLD2;FTH1;LAMP2;ITGAX;ADAM8;YPEL5;ATP6V0A1
cytoplasmic vesicle membrane (GO:0030659)	2.829837640087242E-4	RAB1A;HVCN1;FPR1;ITPR2;SLC2A3;TCIRG1;ANTXR2;IQGAP2;RHOBTB2;TRPM2;SNX1;IRAK2;RAB23;CXCR2;ITGAX;RIPK1;CD14;ATP6V0A1;IGF2R;FIG4;RAB10;RAB31;RAB18;TLR8;TLR7;PAM;TLR4;MYD88
lysosome (GO:0005764)	4.092278452327749E-4	ATP6V1A;IFITM2;UNC93B1;HEXB;HEXA;GNAI3;RNF19B;CXCR4;TCIRG1;LITAF;RPTOR;TRPM2;SNX1;GM2A;CTSL;CTSK;LAMP2;CXCR2;FLOT1;ATP6V0A1;SRGN;CD164;NAPSA;ATP6V1G1;ANXA2;AP3B1;ATP11A;GALC;HCK;TLR7;ATP13A2;GPLD1
bounding membrane of organelle (GO:0098588)	5.351165046585665E-4	RAB1A;ARF1;UNC93B1;HVCN1;GCNT1;FPR1;GNAI3;SLC2A1;XYLT1;ITPR2;SLC2A3;TCIRG1;IQGAP2;ANTXR2;RHOBTB2;UGCG;NRAS;SNX1;GLIPR2;IRAK2;MAN2A1;RAB23;CXCR2;ITGAX;NLRP3;QSOX1;RIPK1;CD14;ATP6V0A1;ST8SIA1;IGF2R;FIG4;RAB10;RAB31;DOP1B;MGAT4A;RAB18;TLR8;TLR7;COPG2;B4GALT6;PAM;TLR4;MYD88

**Supplementary Table 2.** List of differentially expressed genes in the top 10 of GO Cellular Component enriched terms in BM mature neutrophils from AMX-treated infected animals compared to infected animals left untreated.

## **Annexe III : Communications scientifiques**

### **Communications orales**

- Séminaire hebdomadaire – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille (avril 2023) –  
Sujet : Amoxicillin treatment of pneumococcal pneumonia impacts bone marrow neutrophil maturation and function
- Présentation vidéo pour la 21<sup>ème</sup> journée André Verbert (septembre 2021) – École Doctorale de Biologie Santé de Lille – Sujet : Analysis of myeloid cells during amoxicillin treatment of pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*.

### **Communications par poster**

- Séminaire « hors-site » du CIIL – Lille (juin 2023)
- Congrès international de la SFI et AFC – Nice (novembre 2022)

Sujet: Amoxicillin treatment of pulmonary infections caused by *Streptococcus pneumoniae* impacts granulopoiesis