



HAL
open science

Caractérisation des réponses immunitaires associées aux muqueuses pulmonaires et intestinales lors des infections à *Klebsiella pneumoniae*

Marjolaine Vareille-Delarbre

► To cite this version:

Marjolaine Vareille-Delarbre. Caractérisation des réponses immunitaires associées aux muqueuses pulmonaires et intestinales lors des infections à *Klebsiella pneumoniae*. Immunité adaptative. Université Clermont Auvergne, 2024. tel-04943351

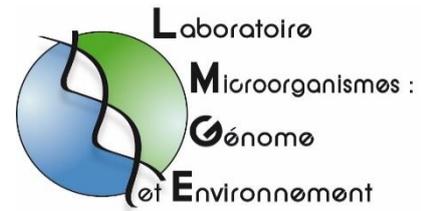
HAL Id: tel-04943351

<https://hal.science/tel-04943351v1>

Submitted on 12 Feb 2025

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.



HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Spécialité Immunologie-Microbiologie

Soutenue le 3 mai 2024
Par

Marjolaine VAREILLE-DELARBRE

Docteur de l'Université Clermont-Auvergne
Maître de conférences – Section CNU 87
UFR Pharmacie – Université Clermont-Auvergne

Caractérisation des réponses immunitaires associées aux muqueuses pulmonaires et intestinales lors des infections à *Klebsiella pneumoniae*

Composition du jury :

Rapporteurs :

Professeur des Universités Olivier DUSSURGET (Université Paris Cité, Institut Pasteur, Paris)

Directeur de Recherche Thomas HENRY (CIRI, Inserm U1111, CNRS UMR5308, UCBL, ENSL, Lyon)

Directeur de Recherche Nalini RAMARAO (INRAE, AgroParisTech, Institut Micalis, Jouy-en-Josas)

Examineur :

Docteur Paul ROUZAIRE (Service d'Histocompatibilité et Immunogénétique, CHU Gabriel Montpied, UMR1240 INSERM, Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand)

Garant :

Professeur des Universités Christiane FORESTIER (Université Clermont Auvergne, UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes : Génome Environnement)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, de me faire l'honneur de juger cette Habilitation à Diriger des Recherches et, ce faisant, enrichir mes réflexions grâce à vos regards critiques et aux discussions suscitées lors de la soutenance.

Je remercie vivement Mme le Professeur Christiane Forestier qui m'a accueilli il y a maintenant 4 ans et m'a permis de revenir dans le monde de la microbiologie. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour son aide précieuse et constante.

Nous n'avons jamais fini d'apprendre. Je voulais exprimer ma plus sincère reconnaissance aux différents chercheurs qui ont participé à ma formation et ont su guider mes pas au travers des années et des thématiques de recherche.

Je tiens ici à exprimer ma gratitude à l'ensemble de mes collègues pour le bonheur que j'ai à interagir avec eux chaque jour. Merci donc à Sylvie et Damien, mes collègues de bureau, pour tous ces échanges (scientifiques) qui m'aident à avancer. Merci à Laurence pour son aide précieuse au quotidien. Merci également à Valérie, Maëva, Nicolas, Philippe, Geneviève ainsi qu'aux autres membres de l'équipe, qui m'ont toujours soutenu depuis mon arrivée au LMGE. Merci aussi à Sophie sans qui les TP d'immuno ne seraient pas les mêmes. Merci à David (mon binôme de licence) de m'avoir donné l'opportunité de coordonner la licence Nutrition-Pharmacologie.

Enfin, je ne peux terminer sans un immense merci à tous les étudiants ayant travaillé à mes côtés sans qui tout cela n'aurait jamais existé. Un merci tout particulier à Julien que j'ai le plaisir d'encadrer en thèse.

Je réserve mes remerciements les plus chaleureux à mes parents et mon mari Vincent pour leur soutien indéfectible et la source de motivation qu'ils représentent.

Enfin, je veux remercier mes enfants Hugo, Emy et Léo pour leur amour. Vous êtes de loin ce qui peut m'arriver de plus beau dans ma vie !

TABLE DES MATIERES

Avant-propos

CHAPITRE 1 : Curriculum vitae.....	1
I. Etat civil.....	1
II. Diplômes et formations	1
III. Expériences professionnelles.....	2
IV. Productions scientifiques.....	3
IV.1 Publications internationales	
IV.2 Chapitres d’ouvrage et revues	
IV.3 Communications scientifiques	
IV.3.1 Communications orales	
IV.3.2 Communications affichées	
V. Collaborations scientifiques.....	9
V.1 Collaborations locales ou nationales	
V.2 Collaborations internationales	
V.3 Collaborations avec des partenaires privés	
VI. Demande de financements.....	10
V.1 Contrats publics	
V.2 Contrats privés	
VII. Prix scientifiques et distinctions	11
VIII. Responsabilités diverses.....	11
IX. Autres informations	12
CHAPITRE 2 : Activités d’enseignement et d’encadrement	13
I. Activités d’enseignement.....	13
I.1 Présentation synthétique de l’activité d’enseignement	
I.2 Responsabilités pédagogiques	
II. Activités d’encadrement.....	15
CHAPITRE 3 : Contexte de mes travaux de recherche	19
CHAPITRE 4 : Travaux de recherche en doctorat et post-doctorat (2005-2010)	25
I. La réponse mucoale intestinale lors des infections à E. coli enterohémorragiques (EHEC) (Travaux de doctorat)	25
II. La réponse mucoale pulmonaire lors des infections à rhinovirus chez les patients atteints de mucoviscidose (Travaux de post-doctorat).....	29
CHAPITRE 5 : Travaux de recherche au sein de l’UMR INRA 1019 (2010-2019).....	32
I. Les probiotiques comme immunomodulateurs de la réponse des muqueuses.....	32
II. Etude n°1 : Caractérisation des propriétés immunomodulatrices du Lcr35 sur la réponse de la muqueuse vaginale lors des infections à <i>Gardnerella vaginalis</i>	34
III. Etude n°2 : Caractérisation des propriétés immunomodulatrices d’une souche de <i>Lactobacillus plantarum</i> sur la réponse de la muqueuse pulmonaire lors des infections à <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39

CHAPITRE 6 : Travaux de recherche au sein de l'UMR CNRS 6023 (2020-aujourd'hui) :	
Travaux actuels et futurs	43
Partie 1 : Immunité pulmonaire et <i>K. pneumoniae</i>	45
Partie 2 : Immunité intestinale et <i>K. pneumoniae</i>	53
Partie 3 : L'axe « intestin-poumon » : impact des microbiotes intestinal et pulmonaire dans les infections à <i>K. pneumoniae</i>	55
Conclusion générale	57

AVANT-PROPOS

Ce manuscrit a pour but de retracer mes expériences de recherche de la thèse jusqu'aux projets de recherche développés depuis mon recrutement en tant que maître de conférences à l'Université Clermont Auvergne en 2010. J'ai effectué une grande partie de mon parcours académique à Clermont-Ferrand avec une incursion de deux ans à Montpellier pour réaliser un master et d'un an et demi en Suisse pour un stage post-doctoral.

Ce document résume quinze ans d'études sur la réponse immunitaire des muqueuses face aux microorganismes pathogènes. Ces différentes expériences m'ont conduit à explorer la réponse de différentes muqueuses, la muqueuse intestinale pendant mon doctorat puis la muqueuse pulmonaire pendant mon post-doctorat face à des bactéries et des virus.

Suite à mon recrutement en 2010, j'ai intégré l'Unité de Nutrition Humaine UMR1019 INRA-UCA ; mes sujets de recherche ont alors quelque peu dévié puisque j'ai étudié pendant plus de 5 ans le rôle du système immunitaire inné dans le cancer du sein et notamment les interactions entre cellules dendritiques et cellules cancéreuses mammaires. Mon intérêt pour l'immunité anti-infectieuse et les interactions entre le pathogène et son hôte m'a cependant conduit à développer pendant cette période une collaboration avec le Professeur Christiane Forestier du Laboratoire Microorganismes : Génome Environnement UMR CNRS 6023 pour étudier l'effet de bactéries probiotiques sur la réponse des muqueuses vaginales et pulmonaires infectées respectivement par les bactéries *Gardnerella vaginalis* et *Klebsiella pneumoniae*. Au-delà des retombées scientifiques, cette collaboration m'a permis de recentrer mes activités de recherche et d'effectuer un changement d'unité de recherche en 2020. Mes projets actuels et futurs sont détaillés dans la dernière partie de ce manuscrit.

Chapitre 1 - Curriculum vitae

I. Etat civil

Marjolaine VAREILLE-DELARBRE

41 ans – Mariée – 3 enfants

Maître de conférences en Immunologie

Section CNU : 87 « Sciences biologiques fondamentales et cliniques »

UFR de Pharmacie, Université Clermont Auvergne

Nommée le 1er avril 2010, titularisée le 1^{er} avril 2011

Coordonnées professionnelles

UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes : Génome Environnement (LMGE)

Equipe CMES "Communautés microbiennes : Ecotoxicologie- Santé"

UFR de Médecine et Pharmacie

28, place Henri Dunant 63000 Clermont-Ferrand

Coordonnées personnelles

5 rue du breuil

63910 Bouzel

II. Diplômes et formations

2013 : Certificat de sauveteur secouriste du travail

Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand.

2008 : Certificat d'expérimentation animale, Niveau I

Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand.

2005-2008 : Doctorat d'Université, Spécialité Microbiologie- Immunologie

Ecole doctorale Sciences de la vie et de la Santé, Clermont-Ferrand.

2005 : DEA de Biologie Santé

Université Montpellier II, Montpellier.

2002-2004 : Diplôme d'Ingénieur-Maitre Ingénierie de la santé

Université de Montpellier I, Montpellier.

2000-2002 : DUT Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques

Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand.

III. Expériences professionnelles

Depuis avril 2010 : Maître de Conférences des Universités, Immunologie, UFR de Pharmacie, Université Clermont Auvergne.

Enseignement : Pharmacie (DFGSP2, DFGSP3, DFASP1), Licence Sciences de la vie (L2, LAS2), Master 1 & 2 Biologie-Santé, Master 1 Ingénierie de la santé, Master 2 Microbiologie.

Recherche : 1) de 2010 à 2020 : UMR INRAE- UCA 1019 Unité de Nutrition Humaine / Equipe Micro-Environnement CellulaiRe, Immunomodulation et Nutrition

2) de 2020 à aujourd'hui : UMR CNRS-UCA 6023 Laboratoire Microorganismes : Génome Environnement / Equipe Communautés microbiennes : Ecotoxicologie - Santé

Janvier 2009 - Mars 2010 : Division of paediatric respiratory medicine, University Children's Hospital, Inselpital, Bern, Switzerland (Prof. Dr. med Nicolas Regamey)

Post-doctorat : Modulation of the mucosal innate immune response after viral infections in cystic fibrosis lung disease

Financement : Bourse européenne Marie Curie

Mobilité : Department of respiratory medicine (Directeur : Pr. S.L. Johnston), Imperial College London, St Mary's Campus, London (3 mois).

Octobre 2005 - décembre 2008 : Unité de Microbiologie, INRAE Theix, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand.

Doctorat : La réponse immunitaire mucoale intestinale lors des infections par les *Escherichia coli*. enterohémorragiques: Rôle et régulation du monoxyde d'azote. Directeur de thèse : Dr Alain P. Gobert

Financement : Bourse INRA-Région

Mobilité : Laboratoire de biologie moléculaire (Directeur Pr. Josée Harel), GREMIP, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada, (2 mois).

Fonctions universitaires : Vacataire d'enseignement, IUT Génie Biologique, Université Clermont Auvergne, TP Biologie cellulaire, 2^{ème} année, 64h/an (2005-2008).

Septembre 2004 - juin 2005 : Institut de Génétique moléculaire, UMR 5535 / IFR122 CNRS, Montpellier et Laboratoire de Microbiologie et Pathologie infectieuse, INSERM U-431, Montpellier.

Stage 1 de Master 2 : Contribution de la réponse immunitaire cellulaire TCD8 dans l'effet protecteur induit par une immunothérapie passive. Encadrement : Dr Laurent Gros

Stage 2 de Master 2 : Régulation du gène de la glutamine synthase chez *Brucella suis*. Encadrement : Dr Stephan Kohler

Janvier - juillet 2004 : Laboratoire de Microbiologie fondamentale, EA 2224, IBMIG, Poitiers.

Stage d'IUP : Transport et maturation des bactériocines de bactéries lactiques. Encadrement : Dr Jean-Marc Berjeaud

Avril - juin 2002 : Laboratoire de virologie, CHU Nord, Saint-Etienne.

Stage IUT : Etude cinétique de la réplication et de la persistance du Coxsackievirus B3 au niveau intestinal chez la souris.

IV. Productions scientifiques

IV.1 Publications internationales

(18 publications internationales dans des revues à comités de lecture)

- Kaura M, Miquel S, Olivier-Nakusi L, Thorala C, Vareille-Delarbre M, Fontainec T, Bekirianc C, d'Enfert C, Rogeta K, Forestier C. Elemental sulfur enhances the anti-fungal effect of *Lactocaseibacillus rhamnosus* Lcr35. *Microbes Infect.* 2023, 30:105286.
- Miquel S, Verlaguet J, Garcin S, Evrard B, Forestier C and Vareille-Delarbre M. *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® stimulates epithelial vaginal defenses upon *Gardnerella vaginalis* infection. *Infect Immun.* 2022;90(9):e0030922.
- Cholet J, Decombat C, Delort L, Vareille-Delarbre M, Gainche M, Berry A, Sénéjoux F, Ripoche I, Vermerie M, Fraisse D, Felgines C, Ranouille E, Berthon JY, Tourette A, Troin Y, Chalard P, Caldefie-Chezet F. Potential anti-inflammatory and chondroprotective effect of *Luzula sylvatica*. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 24, 127.
- Gainche M, Ripoche I, Senejoux F, Cholet J, Ogeron C, Decombat C, Danton O, Delort L, Vareille-Delarbre M, Berry A, Vermerie M, Fraisse D, Felgines C, Ranouille E, Berthon JY, Priam J, Saunier E, Tourette A, Troin Y, Caldefie-Chezet F, Chalard P. Anti-Inflammatory and Cytotoxic Potential of New Phenanthrenoids from *Luzula Sylvatica* *Molecules.* 2020 May 20;25(10):2372.
- Vareille-Delarbre M, Miquel S, Garcin S, Bertran T, Balestrino D, Evrard B, Forestier C Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* on Inflammatory Response Induced by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 2019 Oct 18;87(11):e00570-19.
- Cholet J, Vareille-Delarbre M^{*}, Decombat C^{*}, Gainche M, Berry A, Senejoux F, Ripoche I, DelortL, Vermerie M, Fraisse D, Felgines C, Ranouille E, Berthon JY, Priam J, Saunier E, Tourrette A, Troin Y, Thebaud G, Chalard P, Caldefie-Chezet F. In Vitro Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of an Extract from the Roots of *Bupleurum rotundifolium*. *Medicines (Basel).* 2019 Oct 11;6(4):101.
- Cholet J, Vareille-Delarbre M^{*}, Decombat C^{*}, Gainche M, Berry A, Ogeron C, Ripoche I, Delort L, Vermerie M, Fraisse D, Felgines C, Ranouille E, Berthon JY, Tourette A, Troin Y, Sénéjoux F, Chalard P, Caldefie-Chezet F. Comparison of the anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of two medicinal herbs: Meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and Harpagophytum (*Harpagophytum procumbens*). *IJPAES.* 2019, 9(3), 145-163.
- Lagrafeuille R, Miquel S, Balestrino D, Vareille-Delarbre M, Chain F, Langella P, Forestier C. Opposing effect of *Lactobacillus* on in vitro *Klebsiella pneumoniae* in biofilm and in an in vivo intestinal colonisation model. *Benef Microbes.* 2018 Jan 29;9(1):87-100.
- Branchu P, Matrat S, Vareille M, Garrivier A, Durand A, Crépin S, Harel J, Jubelin G, Gobert AP. NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide. *PLoS Pathog.* 2014 Jan;10(1):e1003874.
- Edwards MR, Regamey N, Vareille M, Kieninger E, Gupta A, Shoemark A, Saglani S, Sykes A, Macintyre J, Davies J, Bossley C, Bush A, Johnston SL. Impaired innate interferon induction in severe therapy resistant atopic asthmatic children. *Mucosal Immunol.* 2013 Jul;6(4):797-806.

- Kieninger E, Vareille M, Kopf BS, Blank F, Alves MP, Gisler FM, Latzin P, Casaulta C, Geiser T, Johnston SL, Edwards MR, Regamey N. Lack of an exaggerated inflammatory response upon virus infection in cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2012 Feb;39(2):297-304.
- De Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP and Martin C. Human Microbiota-Secreted Factors Inhibit Shiga-Toxin Synthesis by Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Infect. Immun.* 2009, 77(2):783-90.
- Vareille M, Rannou F, Théliier N, Glasser AL, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Heme oxygenase is a critical regulator of NO production in enterohemorrhagic Escherichia coli-infected human enterocytes. *J. Immunol.* 2008, 180(8):5720-6.
- Gobert AP, Coste A, Guzman CA, Vareille M, Hindré T, de Sablet T, Girardeau JP and Martin C. Modulation of chemokine gene expression by Shiga-toxin producing Escherichia coli belonging to various origin and serotypes. *Microbes Infect.* 2008, 10(2):159-65.
- De Sablet T, Bertin Y, Vareille M, Garrivier A, Girardeau JP, Gobert AP and Martin C. Differential expression of stx₂ alleles in Shiga toxin-producing Escherichia coli belonging to seropathotypes A and C. *Microbiol.* 2008, 154(Pt 1):176-86.
- Gobert AP, Vareille M, Glasser AL, Hindré T, de Sablet T and Martin C. Shiga-toxin produced by enterohemorrhagic Escherichia coli inhibits PI3K/NF-κB signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 2007, 178 (12): 8168-8174.
- Vareille M, de Sablet T, Hindré T, Martin C and Gobert AP. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007, 104 (24): 10199-10204.

IV.2 Chapitres d'ouvrage et revues

- « Immunité innée et inflammation », chapitre de l'ouvrage *Immunologie*, objectif internat pharmacie, AssHIB, Elsevier Masson, 2023. Rédacteur : Marjolaine Vareille-Delarbre. Relecteur : Sylvie Cholet-Martin.
- « Les cellules de l'immunité innée », chapitre de l'ouvrage *Immunologie*, objectif internat pharmacie, AssHIB, Elsevier Masson, 2023. Rédacteur : Marjolaine Vareille-Delarbre. Relecteur: Paul Rouzaire.
- Vareille M, Kieninger E, Johnston SL, Edwards MR and Regamey N. The airway epithelium: Soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2011 Jan;24(1):210-29.

IV.3 Communications scientifiques

IV.3.1 Communications orales

Communications internationales

- Lagrafeuille R, Miquel S, Chain F, Langella P, Vareille M et Forestier C. Anti-biofilm activity of *Lactobacillus*. Biofilms 7, Porto, Portugal, 2016.
- Vareille M, Kieninger E, Mühlemann K, Blank F, Edwards M, Johnston SL, Geiser T and Regamey N. Deficient innate antiviral response after rhinovirus infection in cystic fibrosis airway cells. Lung Science conference, 2010, Estoril, Portugal.
- Vareille M, Kieninger E, Mühlemann K, Blank F, Edwards M, Johnston SL, Geiser T and Regamey N. Deficient innate antiviral response after rhinovirus infection in cystic fibrosis airway cells. Swiss paediatric respiratory medicine research meeting 2009, Münchenwiller, Switzerland.
- Kieninger E, Vareille M, Aebi S, Mühlemann K, Geiser T and Regamey N. Inflammatory response to viral infection in airway epithelial cells from CF patients. Swiss paediatric respiratory medicine research meeting 2009, Münchenwiller, Switzerland.
- Vareille M, Kieninger E, Edwards M, Johnston SL, Geiser T and Regamey N. Impact of viral infection in the modulation of innate immune response in CF patients. Forum on Experimental Lung Research 2009, 5th édition, Geneva, Switzerland.
- Vareille M, Kieninger E, Edwards M, Geiser T and Regamey N. Regulation of innate immunity in cystic fibrosis lung disease. Cardiovascular conference, 2009, Bern, Switzerland.
- Kieninger E, Vareille M, Aebi S, Mühlemann K, Geiser T and Regamey N. Inflammatory response to viral infection in airway epithelial cells from CF patients. Conference on respiratory medicine, Kinderklinik, Inselpital, 2009, Bern, Switzerland.
- Vareille M, Airault C, Martin C and Gobert AP. Implication of nitric oxide in the pathophysiology of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infections. National Institute for Medical Research, 2008, London, United-Kingdom.
- De Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP and Martin C. The human microbiota inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Digestive Disease Week, 2008. San Diego, USA.
- Vareille M, Glasser AL, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Les interactions entre le monoxyde d'azote et les *E. coli* entérohémostatiques. GREMIP, 2007, Université de Montréal, Montréal, Canada.
- Vareille M, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin gene expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Fourth International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2006, Monterey, USA.

- Vareille M, de Sablet T, Durand A, Martin C and Gobert AP. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibit nitric oxide synthesis by activated human intestinal epithelial cells. Gut Microbiology, 2006, Aberdeen, Ecosse.

Communications nationales

- Verlaguet J, Carriere E, Balestrino D, Gueirard P and Vareille-Delarbre M. Videomicroscopy analysis of early interactions between neutrophils and pathogenic microorganisms. Microscopists's day, Clermont-Ferrand, 30 novembre 2023.

- Verlaguet J, Miquel S, Merciecca T, Charbonnel N, Forestier C, Vareille-Delarbre M. Rôle de l'entérobactine (entB) sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans des cellules épithéliales pulmonaires infectées par *Klebsiella pneumoniae*. 17e congrès Microbes de la SFM, Montpellier, 3-5 octobre 2022.

- Verlaguet J, Miquel S, Forestier C, Vareille-Delarbre M. Rôle de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules de l'immunité innée infectées par *Klebsiella pneumoniae*. JDD, Clermont-Ferrand, 6-7 juillet 2022.

- Cholet J, Vareille-Delarbre M, Decombat C, Delort L, Gainche M, Berry A, Bernard-Vermerie M, Caldefie-Chézet F. Etude et valorisation de plantes auvergnates médicinales et alimentaire. 22ème Journée de l'école doctorale. 23-24 mai 2019.

- Vareille M, Evrard B, Delort L, Vasson MP, Caldefie-Chézet F and Tridon A. Interaction cellules tumorales mammaires et cellules dendritiques : Rôle des glycosylations aberrantes. 1ère journée de cancérologie, 2011, Clermont-Ferrand.

- Vareille M, Airault C, Martin C and Gobert AP. Le monoxyde d'azote représenterait-il un nouveau moyen de lutte contre les infections aux *Escherichia coli* entérohémorragiques ? Journées de l'Ecole doctorale, 2008, Clermont-Ferrand, France.

- Vareille M, Rannou F, Théliier N, de Sablet T, Glasser AL, Martin C and Gobert AP. Régulation de l'expression de la iNOS par des bactéries pathogènes : Implication de l'hème oxygénase. Journée Scientifique du Club NO, 2007, Paris, France.

- Vareille M, de Sablet T, Harel J, Crépin S, Martin C, and Gobert AP. Inhibition de la production d'une toxine bactérienne par NO via NsrR. Journée Scientifique du Club NO, 2007, Paris, France.

- Vareille M, de Sablet T, Garrivier A, Martin C and Gobert AP. Modulation par les *Escherichia coli* entérohémorragiques de la production de monoxyde d'azote par les cellules épithéliales du colon humain. Congrès de la Société Française de Microbiologie, 2007, Nantes, France.

- Vareille M, Glasser AL, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Inhibition of nitric oxide production in human intestinal epithelial cells by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* results in increased Shiga-toxin synthesis. GREMI, 2007, Institut Pasteur, Paris, France.

- Vareille M, de Sablet T, Durand A, Martin C and Gobert AP. Le monoxyde d'azote : un nouvel inhibiteur de la production de Shiga-toxine par les *Escherichia coli* entérohémorragiques. Journée de L'Institut fédératif de Recherche Santé Auvergne, 2006, Clermont-Ferrand, France.

- Vareille M, de Sablet T, Durand A, Martin C and Gobert AP. Inhibition de la production de monoxyde d'azote des cellules épithéliales intestinales humaines par les *Escherichia coli* entérohémorragiques. IIIème Journée des microbiologistes, 2006, Clermont-Ferrand, France.

- Vareille M, de Sablet T, Durand A, Martin C and Gobert AP. Analyse des interactions entre le monoxyde d'azote et les *Escherichia coli* entérohémorragiques. Journée Scientifique du Club NO, 2006, Paris, France.

IV.3.2 Communications affichées

Communications internationales

- Cholet J, Vareille-Delarbre M, Decombat C, Gainche M, Berry A, Delort L, Vermerie M, Ogéron C, Senejoux F, Ripoche I, Fraisse D, Felgines C, Ranouille E, Berthon JY, Tourette A, Chalard P, Caldefie-Chezet F. The PlantinAuv project: enhance the value of a local botanical heritage, example of a plant extract with anti-inflammatory properties. Natural Products in drug discovery and human health. Lisbonne, 28-31 juillet 2019.

- Vareille M, Kieninger E, Mühlemann K, Blank F, Edwards M, Johnston SL, Geiser T and Regamey N. Deficient innate antiviral response after rhinovirus infection in cystic fibrosis airway cells. Day of clinical research 2009, Bern, Switzerland.

- Kieninger E, Vareille M, Aebi S, Mühlemann K, Geiser T and Regamey N. Inflammatory response to viral infection in airway epithelial cells from CF patients. Day of clinical research 2009, Bern, Switzerland.

- Kieninger E, Vareille M, Aebi S, Mühlemann K, Geiser T and Regamey N. Inflammatory response to viral infection in airway epithelial cells from CF patients. ERS 2009, Vienna, Austria.

- Vareille M, Martin C, Del'Homme C, Théliier N, Rannou F, Chaturvedi R, Wilson KT, and Gobert AP. Inadequate Inflammatory response of the colonic mucosa to enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. DDW 2009, Chicago, USA.

- Vareille M, Crepin S, Harel J, Martin C and Gobert AP. (2009). Nitric oxide inhibits Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* adherence to human epithelial cells. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* infections, Buenos Aires, Argentina.

- Vareille M, Del'Homme C, Théliier N, Rannou F, Chaturvedi R, Wilson KT, Martin C and Gobert AP. (2009). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Are they true pro-inflammatory pathogens? 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* infections, Buenos Aires, Argentina.

- De Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP and Martin C. The human microbiota inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Pathogenic *E. coli* network, 2008. Rome, Italie.

- Vareille M., Durand A, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. (2006). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Inhibit Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Human Intestinal Epithelial Cells. 6th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* infections, Melbourne, Australia.

- Vareille M., Durand A, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. (2006). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibit iNOS expression in activated human intestinal epithelial cells. Fourth International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Monterey, USA.

Communications nationales

- Verlaguet J, Ollivier-Nakusi L, Balestrino D, Forestier C, Vareille-Delarbre M. Interaction *Klebsiella pneumoniae* / polynucléaires neutrophiles : rôle de l'entérobactine (entB). 18e congrès Microbes de la SFM, Rennes, 4-6 octobre 2023.

- Verlaguet J, Ollivier-Nakusi L, Balestrino D, Forestier C, Vareille-Delarbre M. Interaction *Klebsiella pneumoniae* / polynucléaires neutrophiles : rôle de l'entérobactine (entB). Innasco-Frontinov Symposium, Lyon, 5-6 septembre 2023.

- Vareille-Delarbre M, Miquel S, Verlaguet S, Garcin S, Evrard B, Forestier C. *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 stimule les défenses vaginales épithéliales lors des infections par *Gardnerella vaginalis*. 17e congrès Microbes de la SFM, Montpellier, 3-5 octobre 2022.

- Miquel S, Vareille-Delarbre M, Garcin S, Nakusi L, Balestrino D, et Forestier C. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on inflammatory response induced by *Klebsiella pneumoniae*. 15e congrès de la SFM, Paris, 30-2 octobre 2019.

- Cholet J, Vareille-Delarbre M, Decombat C, Delort L, Gainche M, Berry A, Bernard-Vermerie M, Caldefie-Chézet F. Comparaison de l'activité immunomodulatrice de 3 plantes issues de la flore auvergnate à celle de plantes médicinales reconnues (harpagophyton et reine des prés). Journées Francophones de Nutrition, Nantes, 13-15 décembre 2017.

- Vareille M, Evrard B, Delort L, Vasson MP, Caldefie-Chézet F and Tridon A. Interactions between dendritic cells and mammary cancer cells: effect of aberrant glycosylation. 6th cancer scientific forum CLARA, 2011, Lyon, France.

- Vareille M, Evrard B, Delort L, Vasson MP, Caldefie-Chézet F and Tridon A. Evaluation de l'expression des glycosylations du cancer du sein et prédiction de leur interaction avec les cellules dendritiques : Etude préliminaire. Journée de L'Institut fédératif de Recherche Santé Auvergne, 2010, Clermont-Ferrand, France.

- Lagrèfeuille R, Miquel S, Chain F, Langella P, Nivoliez A, Bernardi T, Badel S, Rios L, Balestrino D, Vareille M et Forestier C. Activité anti-biofilm de *Lactobacillus* CBL, 2015.

- Vareille M, Airault C, Martin C and Gobert AP. Nitric oxide is a regulator of the locus of enterocyte effacement in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. 6th Joint INRA-RRI Symposium on Gut Microbiome, Functionality, Interaction with the Host and Impact on the Environment, 2008, Clermont-Ferrand, France.

- De Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP and Martin C. The human microbiota inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 6th Joint INRA-RRI Symposium on Gut Microbiome, Functionality, Interaction with the Host and Impact on the Environment, 2008, Clermont-Ferrand, France.

- Vareille M, Rannou F, Théliier N, Glasser AL, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Inhibition de l'expression de la NOS2 par des bactéries pathogènes : Implication de l'hème oxygénase. Journée de l'Institut Fédératif de Recherche Santé Auvergne, 2007, Clermont-Ferrand, France.

- Vareille M, Glasser AL, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Inhibition of nitric oxide production in human intestinal epithelial cells by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* results in increased Shiga-toxin synthesis. GREMI, 2007, Institut Pasteur, Paris.

V. Collaborations scientifiques

V.1 Collaborations locales ou nationales

Pr. Pascale Gueirard - Equipe « Interactions hôte-parasite », LMGE, Clermont-Ferrand.
Analyse par vidéomicroscopie des interactions précoces entre polynucléaires neutrophiles et microorganismes pathogènes.

Pr. Bertrand Souweine - Service de médecine intensive et réanimation, CHU Clermont-Ferrand.
Etude de la régulation de l'inflammasome NLRP3 chez des patients atteints de pneumopathies infectieuses.

Dr. David Cia - Equipe « Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur », Neuro-Dol, Clermont-Ferrand.
Analyse de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules épithéliales.

Pr. Pierre Charlard - SIGMA Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand.
Caractérisation des composés anti-inflammatoires de plantes issues de la flore auvergnate.

Pr. François Rannou - Unité de dégénération et plasticité du système locomoteur, INSERM U747, Université Paris Descartes, Paris.
*Implication de la protéine HO-1 dans les infections à *E. coli* entérohémorragiques.*

V.2 Collaborations internationales

Dr. Michael Edwards - Respiratory Medicine, St Mary's Campus, National Heart Lung Institute, London.
Rôle de l'interféron de type III dans le contrôle des infections à rhinovirus chez des patients

asthmatiques.

Pr Josée Harel - Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Aviaire (CRIPA), Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

Etude des gènes de E. coli O157 :H7 régulés par le monoxyde d'azote.

V.3 Collaborations avec des partenaires privés

Adrien Nivolez - Biose Industrie, Aurillac.

Etude des propriétés immunomodulatrices du probiotique Lcr35.

Jean-Yves Berthon - Greentech, Biopôle Clermont-Limagne, Saint-Beauzire.

Etude des propriétés anti-inflammatoires de plantes issues de la flore auvergnate.

Julien Priam - Dôme pharma, Pont-du-Château.

Etude des propriétés anti-inflammatoires de plantes issues de la flore auvergnate.

VI. Demande de financements

VI.1 Contrats publics

- Projet Recherche translationnelle CHU Clermont-Fd, 2023 (*porteur du projet, non retenu*)
Mécanisme d'action des corticoïdes lors d'infections pulmonaires à *K. pneumoniae* : l'inflammasome NLRP3 pour cible ?

- Mini-projet interne UMR LMGE, 2023 (*co-porteur du projet, retenu*)
Analyse par vidéo microscopie des interactions précoces entre polynucléaires neutrophiles et microorganismes pathogènes
Financement : 5000 euros

- Projet Région AURA Emergence, 2022 (*porteur du projet, non retenu*)
Axe intestin – poumons lors d'infections à *Klebsiella pneumoniae* : rôle du processus inflammatoire

- Projet Recherche translationnelle CHU Clermont-Fd, 2022 (*porteur du projet, non retenu*)
Corticothérapie et orage cytokinique lors d'infections pulmonaires : l'inflammasome NLRP3 au cœur d'une réponse exacerbée ?

- Projet Région AURA Emergence, 2021 (*porteur du projet, non retenu*)
Suractivation immunitaire lors d'infections à *Klebsiella pneumoniae* : rôles du pathogène, de l'organisme hôte et du microbiote

- Projet Plantinauv, FEDER-Région Auvergne Rhône Alpes, 2017-2020 (*partenaire du projet, retenu*)

« Plantes médicinales du territoire auvergnat »

Porteur du projet : Florence Caldéfie-Chezet

Partenaires industriels : Dômes Pharma, Greentech et Alto Phyto, Cluster Nutravita

- Bourse recherche filière cluster, 2013 (*co-porteur du projet, retenu*)
Activités anti-biofilm et immunomodulatrices de bactéries probiotiques vis-à-vis de pathogènes
Partenaire industriel : Biose industrie

- Bourse innovation transfert, 2013 – 2016 (partenaire du projet, retenu)
Caractérisation des propriétés immunomodulatrices du probiotique Lcr35® à visée thérapeutique dans le domaine des maladies dysimmunitaires
Partenaire industriel : Biose industrie

- Bourse postdoctorale RESPIRE, European Respiratory Society, 2009-2012
Clinical impact and pathophysiology of rhinovirus infections in cystic fibrosis lung disease

VI.2 Contrats privés

Etude de la cytotoxicité d'une souche de *Lactobacillus crispatus* sur les cellules épithéliales humaines – 2018 (*porteur du projet, retenu*)
Partenaire industriel : Biose Industrie
Financement : 5000 euros

VII. Prix scientifiques et distinctions

-Research Prize Department of clinical research of the University of Bern 2010: Day of clinical research, 2010, Bern, Switzerland.
-Young investigator's award 2009 : Swiss paediatric respiratory research meeting, 2009, Münchenwiller, Switzerland.
-Bourse postdoctorale Marie-Curie : Bern, Switzerland.
-Prix Jeune Chercheur de la ville de Clermont-Ferrand : finaliste, 2009, Clermont-Ferrand, France.
-Médaille de la ville de Clermont-Ferrand : pour la qualité de mes travaux scientifiques, 2008, Clermont-Ferrand, France.
-Bourse nationale « Pour les Femmes et la Science » : L'Oréal-Unesco, 2007, Paris, France.
-Prix de la meilleure présentation orale : Journée de l'institut fédératif de recherche Santé-Auvergne, 2006, Clermont-Ferrand, France.
-Prix Jeune Chercheur 2006 : Club NO national, 2006, Paris, France.
-Prix Hot Topic Session: 4th International Conference of Nitric Oxide Society, 2006, Monterey, USA.

VIII. Responsabilités diverses

➤ Responsabilités administratives :

- Co-Responsable Licence N2 Sciences de la Vie Parcours Nutrition Pharmacologie
- Responsable hiérarchique d'une technicienne supérieure de laboratoire
- Membre élu (collège B) au conseil de l'UFR de Pharmacie de 2014 à 2018
- Membre du groupe de travail « Vie étudiante » dans le cadre de l'autoévaluation CiDpharmef 2022-2023

- Membre du groupe de travail « Approche par compétences » de l'UFR de Biologie
- Membre de la commission pédagogique Sciences de la Vie de l'UFR de Biologie

➤ Expertise - Rayonnement :

- Evalueur d'articles scientifiques pour les journaux à comité de lecture : Plos One; Journal of Thoracic Disease, Journal of Immunology Research (2/3 par an).

- Membre de jury de thèse d'exercice : Julie Marsande, Clermont-Ferrand, 2023

- Membre de comités de thèse :

Rosyne Lagrafeuille, LMGE, UMR CNRS, Clermont-Ferrand, 2016, 2017

Juliette Cholet, ECREIN, UMR INRAE, Clermont-Ferrand, 2018, 2019

Clara Douadi, M2iSH, UMR Inserm/UCA, Clermont-Ferrand, 2019, 2020

- Participation à des réseaux de recherche :

Membre de la fédération des recherches en microbiologie de l'UCA SysMic

Membre du plateau Culturomic UCA Partner, référente pour l'appareil de mesure de résistance transépithéliales Zellscope.

Membre de l'Association pour la recherche en bactériologie et virologie

Membre de l'association des Enseignants d'Hématologie, d'Immunologie et de Biothérapies des Facultés de Pharmacie

- Vulgarisation scientifique :

Presse locale ou régionale : interview radio scoop, France bleu pays d'Auvergne (2007 et 2008).

Rédaction d'articles pour le journal La Montagne (2008), Info (2008), Semeur Hebdo (2020).

Animation scientifique pendant la fête de la science (2008) et Pint of science (2016).

- Participation annuelle au salon de l'étudiant Auversup et aux portes ouvertes de l'UFR de Pharmacie.

IX. Autres informations

Temps partiel 80% de droit pour 2^{ème} enfant : avril 2014 à septembre 2016

Temps partiel 80% de droit pour 3^{ème} enfant : septembre 2020 à juin 2023

Chapitre 2 - Activités d'enseignement et d'encadrement

I. Activités d'enseignement

I.1 Présentation synthétique de l'activité d'enseignement

Maitre de conférences en immunologie à l'UFR de Pharmacie, CNU 87 à l'Université Clermont Auvergne, j'assure avec un collègue MCU-PH l'intégralité de l'enseignement d'immunologie du cursus de Pharmacie et du parcours Nutrition-Pharmacologie en licence Science de la vie. Mes enseignements portent sur les sciences immunologiques : de la cellule immunitaire en passant par les dysfonctionnements du système immunitaire et les traitements d'immunothérapie innovants.

Je participe également à la formation continue, notamment dans la formation « Vaccination par les pharmaciens d'officine » qui a pour mission de former les pharmaciens d'officine à la vaccination. De plus, j'interviens tous les ans à la maison pour la Science auprès d'enseignants du secondaire pour la formation « Piquêre de rappel » sur le sujet de la vaccination et la formation « des microbes et des hommes » sur le microbiote intestinal.

Enfin, je suis impliquée dans le suivi des étudiants du cursus pharmacie à travers le projet d'orientation professionnelle (POP) et le projet professionnel personnel (PPP).

Mon service statutaire d'enseignement est en moyenne de 235 H eq TD par an (48 % de CM versus 52% de TP/TD). La répartition de mes cours est représentée dans le tableau ci-dessous.

Année	Niveau	Diplôme	Intitulé	Type de formation (1)	Nature (2)	Effectifs	Volume horaire annuel
PASS	Licence		UE Risques infectieux	FI	TD à distance	80	0.5h
2 ^{ème} année	Licence	DFGSP	UE Immunologie	FI	CM, TD	80	13h
			UE Infectiologie	FI	CM	80	1h
2 ^{ème} année + LAS	Licence	Licence Sciences de la vie	UE Immunologie appliquée à la santé	FI	CM, TD, TP	120	72h
			UE PPP	FI	TD	120	19h
3 ^{ème} année	Licence	DFGSP	UE Immunopathologies	FI	TP	100	45h
			UE Biothérapies	FI	CM	100	4h
			UE Recherche bibliographique	FI	TD	100	4h
			UE Douleur et inflammation	FI	CM	100	1.5h
	Licence	Licence professionnelle	UE Immunologie	FI	CM	25	4h
4 ^{ème} année	Master	DFASP	UE Stratégies anti-infectieuses	FI	CM	100	2h
			UE Biothérapies	FI	CM	100	2h
			UE prépa internat	FI	TD	100	2h
1 ^{ère} année	Master	Master Biologie-Santé	UE Microbiote intestinal	FI	CM	80	6h
			UE Immunité, Santé, Microbiote	FI	TD	30	6h
		Master Ingénierie santé	UE Immunologie	FI	CM, TP	30	8h
2 ^{ème} année	Master	Master Biologie Santé	UE Immunité anti-infectieuse	FI	TD	20	4.5h
		Master Microbiologie	UE Immunité anti-infectieuse	FI	TD	10	4.5h
	professionnel	Pharmaciens d'officine	Vaccination à l'officine	FC	CM à distance		
	professionnel	Enseignants secondaire	Des microbes et des hommes	FC	Intervention en présentielle avec expérimentations	20	4h
	professionnel	Enseignants secondaire	Piqûre de rappel	FC	Intervention en présentielle	20	4h

I.2 Responsabilités pédagogiques

➤ **Co-responsable pédagogique du parcours Nutrition-Pharmacologie** de la 2^{ème} année de licence mention Sciences de la vie.

Depuis juin 2020, j'assure la co-responsabilité de ce parcours qui comprend 200 et 250 étudiants, 25 responsables d'UE, plus de 70 intervenants, un service de scolarité et un service des examens répartis sur 2 UFR (parcours co-porté UFR de Pharmacie et UFR de Biologie). Ce parcours intègre des étudiants de biologie (environ 270 dont 70 étudiants en LAS2) et une dizaine d'étudiants en LAS2-Réadaptation.

➤ **Responsable d'UE :**

Je suis responsable ou co-responsable de 5 unités d'enseignement (UE) :

- UE « Immunologie appliquée à la santé » en N2 Sciences de la vie (Responsable)
- UE « Projet Professionnel Personnel » en N2 Sciences de la vie (Responsable)
- UE « Immunologie fondamentale » en Pharmacie 2^{ème} année (DFGSP2) (Responsable)
- UE « Immunologie » en Master 1 Ingénierie de la Santé (Responsable)
- UE Immunité anti-infectieuse en Master 2 Biologie-Santé et Master 2 Microbiologie (2019-2022) (co-responsable)

II. Activités d'encadrement

➤ **Thèse de doctorat d'Université**

« Etude de l'inflammasome NLRP3 dans les infections à *Klebsiella pneumoniae* » - Julien Verlaguet

Thèse en cours (2021-2024), Financement : Ecole Doctorale SVSAE UCA

Taux d'encadrement : 40%, Responsable : Christiane Forestier

« Caractérisation des effets anti-inflammatoires d'extraits végétaux issus de plantes auvergnates » - Juliette Cholet

Thèse soutenue en juin 2020 (2017-2020), Financement : FEDER/Région AURA

Taux de co-encadrement : 30%, Responsable : Florence Caldéfie-Chézet

➤ **Thèse d'exercice de Pharmacie**

« Aspects nutritionnels de la polyarthrite rhumatoïde » - Mélanie Champagne

Thèse débutée en novembre 2022

« L'allergie aux protéines de lait de vache chez les nourrissons : conseils à l'officine » - Oriane Romary

Thèse débutée en novembre 2023

➤ **Master 2**

« Effet de *Klebsiella pneumoniae* sur le recrutement et la nérose des polynucléaires neutrophiles » - Lilia Maaloul

Master 2 Microbiologie UCA, 2024

« Effets de *K. pneumoniae* sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules de l'immunité innée » - Julien Verlaguet

Master 2 Microbiologie UCA, 2021

« Comparaison des propriétés immunomodulatrices du Lcr35 au niveau vaginal et intestinal »
- Maeva Sanvoisin
Master 2 Ingénierie de la santé UCA, 2016

« Rôle du probiotique Lcr35 dans la modulation de la réponse épithéliale vaginale » - Mélanie Pelisse
Master 2 Biologie-Santé UCA, 2013

➤ **Master 1**

« Interaction entre *Klebsiella pneumoniae* et les polynucléaires neutrophiles : rôle de l'enterobactine » - Justine Loubet
Master 1 Microbiologie UCA, 2023

« Entérobactine et inflammation : un rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules pulmonaires humaines infectées par *Klebsiella pneumoniae* ? » - Thomas Laine
Master 1 Biologie-Santé UCA, 2022

« Etude de l'effet des principaux facteurs de virulence chez *Klebsiella pneumoniae* agissant sur l'inflammasome NLRP3 » - Alexandre Leonard
Master 1 Biologie-Santé UCA, 2021

« Effets de différentes plantes médicinales sur la polarisation lymphocytaire T : conséquences sur l'inflammation » - Alison Da Silva
Master 1 Biologie-Santé. UCA, 2019

« Effets de différents extraits végétaux sur les processus de cicatrisation et inflammatoires des fibroblastes dermiques humains » - Valentin Thomas
Master 1 Cancérologie, 2018

« Etude des propriétés immunomodulatrices du *Lactobacillus plantarum* dans un modèle murin d'infection à *Klebsiella pneumoniae* » - Pauline Martin
Master 1 Biologie-Santé UCA, 2017

« Rôle du probiotique Lcr35 dans les infections vaginales » - Robin Chautard
Master 1 Biologie-Santé UCA, 2016

« Etude de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales humaines infectées par *Klebsiella pneumoniae* – rôle du *Lactobacillus plantarum* » - Thomas Mille
Master 1 Microbiologie UCA, 2015

« Rôle du probiotique Lcr35 dans la modulation de la réponse épithéliale vaginale humaine » - Aurélie Martin
Master 1 Biologie-Santé UCA, 2014

« Effet de deux probiotiques sur une lignée de cellules épithéliales vaginales » - Bertrand Audouard
Master 1 Biologie-Santé UCA, 2013

« Effet des probiotiques sur la réponse immunitaire induite par les pathogènes sur les cellules vaginales » - Anne-Sophie Navarro
Master 1 Biologie-Santé UCA, 2011

« Interactions entre les cellules tumorales et les récepteurs solubles des cellules dendritiques »
- Pierre-Edouard Greil
Master 1 Biologie-Santé UCA, 2010

« Interaction entre le récepteur DC-SIGN des cellules dendritiques et les molécules normalement glycosylées au cours du développement du cancer du sein » - Adrien Biard
Master 1 Biologie-Santé UCA, 2010

➤ **Etudiants en Licence 2 ou Licence 3**

« Effet du probiotique Lcr35® sur la réponse inflammatoire et anti-bactérienne des cellules épithéliales vaginales humaines infectées par *Gardnerella vaginalis* » - Marianne Signoret
Licence 3 Sciences pour la santé, 2019

« Effet du probiotique *Lactobacillus plantarum* sur la réponse inflammatoire induite par le pathogène *Klebsiella pneumoniae* » - Maeva Sanvoisin
Licence 3 Sciences pour la santé, 2016

« Impact de la composante épithéliale sur la réponse des cellules dendritiques vis-à-vis du probiotique Lcr35 » - Mathilde Reyt
Licence 3 Sciences pour la santé, 2015

« Effet du probiotique Lcr35® sur la réponse des cellules épithéliales vaginales humaines » -
Maeva Sanvoisin
Licence 3 Sciences pour la santé, 2014

« Mise au point de deux techniques de dosages de molécules immunomodulatrices dans le sérum de patients cancéreux » - Elsa Boucheix
Licence professionnelle Biologie analytique, 2011

« Interactions entre les cellules tumorales et les cellules dendritiques » - Anne Pacros
Licence 3 Sciences pour la santé, 2011

« Interaction entre le récepteur DC-SIGN des cellules dendritiques et les cellules tumorales du cancer du sein » - Othman Gahaz
Licence 2 Sciences pour la santé, 2010

➤ **Etudiants en BTS**

« Effets de *Klebsiella pneumoniae* sur l'inflammasome NLRP3 dans les cellules immunitaires innées » - Tanguy Dagobert
BTS 2^{ème} année Biotechnologie, 2022

« Etude des propriétés immunomodulatrices du *Lactobacillus plantarum* dans un modèle murin d'infection à *Klebsiella pneumoniae* » - Kylian Le guily
BTS 2^{ème} année Biotechnologie, 2019

« Etude de la prolifération des cellules tumorales mammaires : effet de différentes souches de probiotiques » - Yohan Depardieu
BTS 2^{ème} année Biotechnologie, 2013

Chapitre 3 – Contexte de mes travaux de recherche

Particulièrement intéressée par l'immunologie et plus précisément par le domaine de la physiopathologie des réponses immunitaires, mes travaux de recherche gravitent, depuis le début de ma carrière scientifique, autour de l'étude des interactions hôte/pathogène au niveau des muqueuses. Une meilleure connaissance des mécanismes de défense d'un organisme dirigés contre un agent infectieux permettrait de proposer des stratégies d'immuno-intervention innovantes et ciblées.

Après mon stage de Master 2 au Laboratoire de Microbiologie et Pathologie infectieuse (INSERM U-431) à Montpellier portant sur la régulation du gène de la glutamine synthase chez *Brucella suis*, j'ai réalisé ma thèse au sein de l'unité de Microbiologie de l'INRAE de Theix. J'ai ainsi pu mettre en évidence l'importance de la production de monoxyde d'azote par les cellules intestinales dans le contrôle des infections à *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC). A la fin de ma thèse, j'ai souhaité parfaire mon expérience sur l'inflammation et la réponse des muqueuses en m'ouvrant sur une recherche plus clinique, en étudiant les interactions entre les virus et l'immunité pulmonaire chez des patients atteints de mucoviscidose. J'ai ensuite été recrutée en tant que Maître de conférences à l'Université Clermont Auvergne et j'ai alors développé des projets de recherche sur l'immunité vaginale et l'utilisation de probiotiques comme agents immunomodulateurs de la réponse des muqueuses face aux pathogènes.

Ces différents projets m'ont permis d'acquérir des compétences précieuses dans le domaine de l'immunité anti-infectieuse et j'ai acquis une solide expérience sur l'arsenal immunitaire déclenché aux niveaux des muqueuses intestinales, pulmonaires et vaginales au cours d'infections bactériennes ou virales.

Ce chapitre a pour but de faire un état de l'art sur les différents mécanismes impliqués dans l'immunité des muqueuses.

L'immunité des muqueuses : un système commun mais avec une spécificité à chaque interface...

Le système immunitaire des muqueuses (SIM) comprend environ 80 % des cellules immunitaires de l'organisme et constitue le plus important système lymphoïde chez les

mammifères (Gill et al., 2010; Silva-Sanchez & Randall, 2020). Ce système assure la protection des muqueuses gastro-intestinales, respiratoires, nasopharyngées, orales, oculaires et génito-urinaires et représente une surface totale supérieure à 300 m² chez l'Homme (Figure 1).

Le SIM remplit trois fonctions principales : (1) créer une barrière physique empêchant la colonisation et l'invasion de pathogènes ; (2) maintenir l'homéostasie des muqueuses vis-à-vis d'antigènes alimentaires, aériens ou commensaux et (3) interagir avec les microbiotes qui recouvrent ces muqueuses pour activer des mécanismes d'immunorégulation (réponses effectrices ou tolérogènes) et prévenir ainsi les réponses inflammatoires préjudiciables.

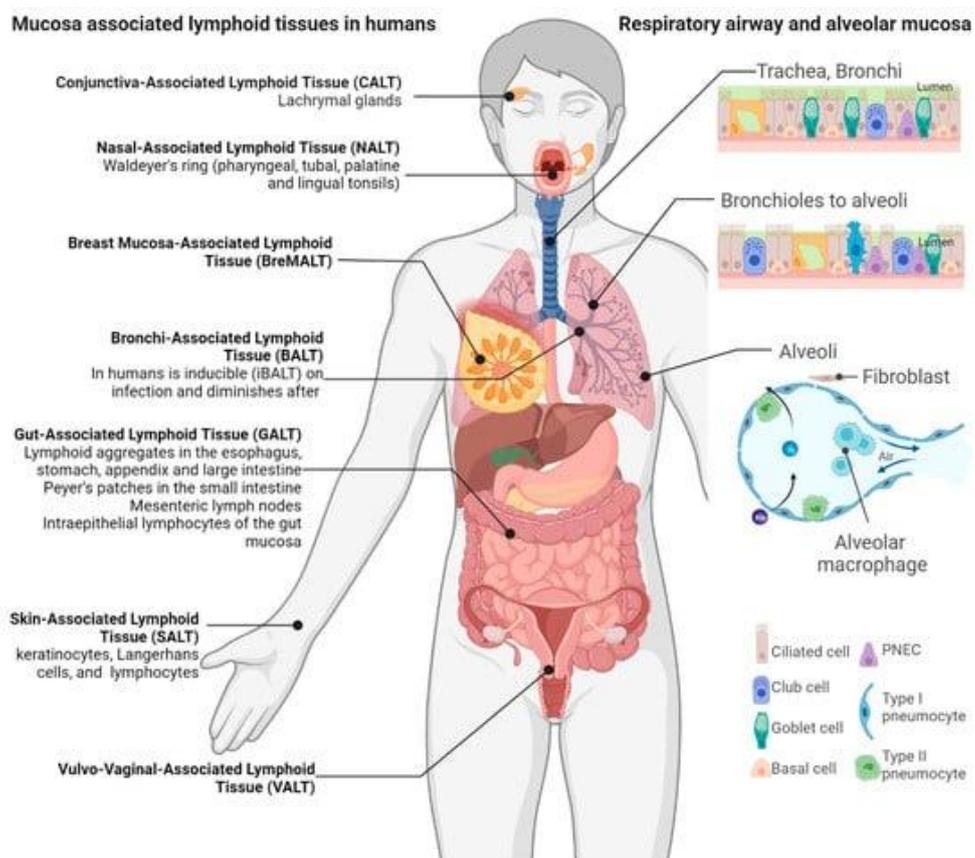


Figure 1. Le système immunitaire des muqueuses (d'après Lycke, 2012).

Le SIM possède des caractéristiques anatomiques et fonctionnelles communes comme par exemple la présence d'IgAs ou l'organisation structurée en sites inducteurs (les plaques de Peyer) et effecteurs (la lamina propria), ce qui lui a valu le terme de '*Common mucosal immunological system*' attribué il y a environ 50 ans par John Bienenstock (Gill et al., 2010).

De plus, des avancées récentes suggèrent que le SIM fonctionne comme un organe à part entière et constitue un vaste réseau interconnecté pour partager l'information entre les différents sites muqueux (Figure 2). La stimulation d'un compartiment muqueux peut entraîner des changements immunitaires dans les autres muqueuses anatomiquement éloignées. Ainsi, l'immunisation intranasale d'un adénovirus exprimant la glycoprotéine B du virus de l'herpès simplex de type 2 permet de protéger les souris contre l'infection génitale par ce virus (Sato et al., 2014). Des études cliniques menées sur des patients infectés par le virus de l'immunodéficiência humaine ont également montré que des concentrations élevées d'immunoglobuline A spécifique du virus de l'immunodéficiência humaine sont présentes dans les sécrétions de diverses muqueuses, notamment les sécrétions vaginales, les lavages nasaux, la salive et les sécrétions endocervicales (Kordy et al., 2019).

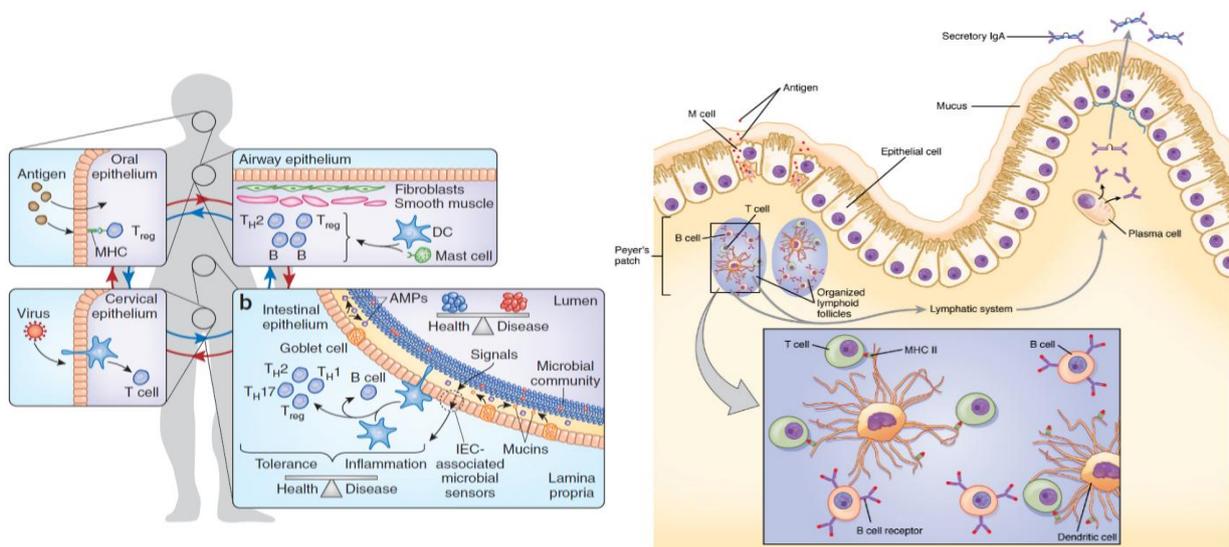


Figure 2. Interconnexion des systèmes immunitaires des muqueuses (d'après (Gill et al., 2010)).

Si le SIM partage de nombreuses caractéristiques architecturales et fonctionnelles, les mécanismes qui gèrent son fonctionnement sont souvent différents, en partie à cause du nombre et du type de communautés microbiennes auxquelles ils sont exposés et des pressions environnementales auxquelles ils sont soumis.

L'enjeu majeur des muqueuses : éliminer les pathogènes tout en tolérant les bactéries commensales...

Au niveau des muqueuses, le système immunitaire doit être capable de discriminer un

antigène « pathogène » vis-à-vis duquel il doit s'activer et induire des réponses innées et adaptatives - d'un antigène commensal qu'il doit au contraire tolérer. A l'heure actuelle, peu de choses sont connues sur la manière dont le système immunitaire des muqueuses régule cet équilibre or c'est un enjeu majeur pour la compréhension de la physiopathologie de nombreuses maladies immunes et/ou infectieuses.

De plus, malgré une stimulation antigénique constante, les processus inflammatoires doivent être extrêmement contrôlés afin de maintenir la barrière épithéliale intacte et l'homéostasie au niveau des muqueuses. Cette complexité a été mise en évidence par le fait que les mutations des gènes qui affectent la reconnaissance immunitaire innée (notamment les TLR) ainsi que la physiologie des cellules épithéliales sont toutes associées à une inflammation des muqueuses (Cario & Podolsky, 2000; Fitzgerald & Kagan, 2020).

Le microbiote : un allié indispensable au bon fonctionnement des muqueuses

Chaque muqueuse et tout particulièrement les cellules épithéliales sont en interaction constante avec le microbiote qui la recouvre. Une véritable symbiose « hôte-microbiote » s'est façonnée à chaque interface muqueuse permettant le maintien d'une tolérance vis-à-vis de cet écosystème. La qualité et la diversité des microbiotes expliquent en partie le maintien des fonctions homéostatiques des muqueuses associées. Il a été montré que certaines souches bactériennes issues des microbiotes intestinales, pulmonaires mais aussi vaginales régulent l'apparition des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4+, ce qui peut générer, selon les cas, des réponses pro-inflammatoires ou au contraire tolérogènes (Huynh et al., 2023; Shim et al., 2023). C'est le cas par exemple au niveau intestinal des bactéries filamenteuses segmentées qui induisent la production de lymphocytes Th17 dans la lamina propria, améliorant ainsi la réponse anti-infectieuse vis-à-vis de *Citrobacter rodentium* mais également de la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii* dont les propriétés anti-inflammatoires représentent un enjeu thérapeutique majeur dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Sokol et al., 2008; Woo et al., 2021).

Toute agression ou perturbation de l'hôte ou du microbiote a des répercussions sur l'un des protagonistes, sur l'équilibre inflammatoire de la muqueuse et un impact sur le statut général de l'organisme hôte.

Le microbiote est aujourd'hui considéré comme un véritable allié du SIM, en exerçant de multiples fonctions « régulatrices » de l'hôte. En retour, le microbiote subit également l'influence de l'hôte. De cet équilibre maintenu ou rompu pourrait s'établir les conditions de nombreuses pathologies immunes et/ou infectieuses. Ainsi, toute manipulation thérapeutique

ou préventive du microbiote par l'usage de probiotiques pourrait permettre de restaurer un microbiote altéré, d'induire des effets immunomodulateurs au niveau local et périphérique et par conséquent de lutter contre les maladies dysimmunitaires. Un exemple phare a été la découverte de l'axe « intestin-poumon » en 2014 par Trompette A et *al.* , démontrant l'impact d'un régime riche en fibres sur le ratio Firmicutes/Bacteroidetes au niveau intestinal et ses conséquences sur la diminution de la réponse Th2 au niveau pulmonaire permettant de réduire les symptômes allergiques chez les individus traités (Trompette et al., 2014).

L'anti-immunité des muqueuses : échappement des pathogènes au SIM

Les stratégies d'évasion immunitaire utilisées par les virus ou bactéries pathogènes pour éviter ou inactiver les défenses de l'hôte et assurer leur propre survie au sein des muqueuses sont multiples (Finlay & McFadden, 2006; Leseigneur et al., 2020; Tran & Ramarao, 2013). Si de nombreux pathogènes sont capables de détourner les systèmes de reconnaissance des cellules hôte, certains peuvent avoir i) une action directe sur les cellules immunitaires en exprimant des facteurs de pathogénicité. Par exemple, la présence d'une capsule chez *K. pneumoniae* inhibe la phagocytose des bactéries par les cellules dendritiques ou encore la shiga-toxine des EHEC entraîne la lyse des entérocytes ; ii) une action indirecte, en modulant les voies de signalisation et/ou la production de cytokines inflammatoires par les cellules de l'hôte (Bengoechea & Sa Pessoa, 2019; Evrard et al., 2010; Schüller, 2011).

Ces exemples font écho à l'ensemble de mon activité de recherche et renvoie à une approche intégrée en tenant compte des interactions entre le pathogène (et ses facteurs de virulence) et l'hôte (et ses systèmes de défense) dans la modulation des réponses immunitaires des muqueuses avec pour conséquence le développement de pathologies infectieuses.

En étudiant comment les pathogènes modulent la réponse des muqueuses, nous pouvons mieux comprendre les failles dans la défense de l'hôte conduisant à des désordres, et ainsi améliorer la compréhension de la pathogenèse microbienne. Avec l'apparition/l'émergence continue de nouvelles maladies infectieuses et la persistance des infections classiques, ces connaissances sont essentielles pour envisager de nouvelles mesures préventives et thérapeutiques.

Pour être complet et introduire mon projet de recherche, la contribution du microbiote dans les interactions « hôte-pathogène » et le concept d'une intervention nutritionnelle par le biais des probiotiques apparaissent aujourd'hui comme des composantes essentielles pour comprendre les mécanismes physiopathologiques. La modulation du microbiote permettra

d'étendre l'amplitude du contrôle homéostatique des muqueuses et lutter contre les altérations tissulaires induites par les pathogènes, en évitant la spirale conduisant à des réponses inflammatoires dégénérées.

Chapitre 4 – Travaux de recherche en doctorat et post-doctorat

I. La réponse mucosale intestinale lors des infections à *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) (Travaux effectués en doctorat ; 2005-2008)

Projet de recherche : La réponse immunitaire mucosale intestinale lors des infections par les *Escherichia coli* entérohémorragiques : Rôle et régulation du monoxyde d'azote

Les EHEC sont des pathogènes intestinaux responsables d'intoxications alimentaires se traduisant par des colites hémorragiques et pouvant évoluer vers un syndrome hémolytique et urémique (SHU), la première cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant à travers le monde. Les deux principales caractéristiques de la pathogénèse des EHEC sont la production de Shiga-toxines, responsables des symptômes cliniques associés au SHU, et la capacité à coloniser l'épithélium intestinal via la formation de lésions d'attachement et d'effacement (Figure 3).

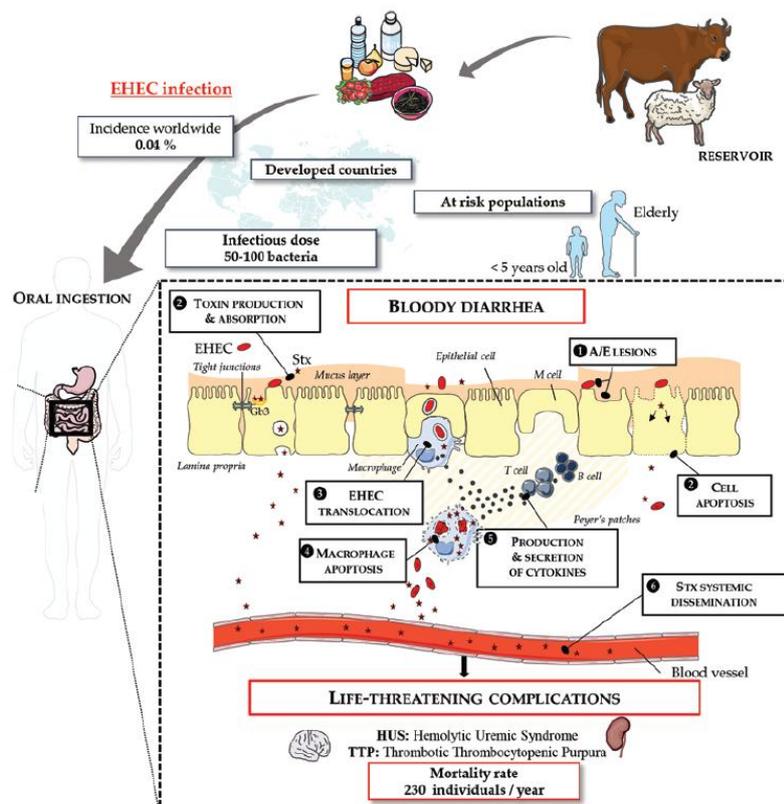


Figure 3. Physiopathologie des infections aux EHEC (Roussel et al., 2016).

A/E: Attaching and effacing lesions; Stx: Shiga toxin.

L'interaction entre les EHEC et les cellules épithéliales intestinales constitue la première étape de la colonisation. *In vitro*, l'activation des entérocytes par les EHEC est secondaire à la reconnaissance de la flagelline par le TLR5 et, dans une moindre mesure, par la reconnaissance du LPS par le TLR4 conduisant à l'activation de la voie NF- κ B et la libération de cytokines proinflammatoires IL-8, TNF- α , IL-18 (Luck et al., 2006). Ces dernières permettent le recrutement et l'activation d'autres cellules du système immunitaire et la destruction des pathogènes. Des études d'infection menées sur des porcelets gnotobiotiques montrent que les EHEC induisent une infiltration importante de cellules inflammatoires dans la lamina propria ainsi qu'une transmigration des cellules inflammatoires à travers l'épithélium intestinal dans la lumière intestinale (Gunzer et al., 2002). De même, les patients atteints d'une infection à EHEC présentent systématiquement une augmentation significative du nombre de leucocytes dans leurs selles (Karpman & Ståhl, 2014).

Cependant, il a été démontré que les EHEC peuvent inhiber la réponse immune innée en interférant avec différentes voies de signalisation et facteurs de transcription. À titre d'exemple, la protéine effectrice EspB produite par les EHEC de sérogroupes O26 et O157 entraîne une diminution de l'activation de NF- κ B (Bellmeyer et al., 2009) ou Stx (Gobert et al., 2007). Ainsi, les EHEC ont élaboré différentes stratégies pour moduler la réponse inflammatoire de l'hôte et permettre la pleine expression de leur virulence.

Il est donc primordial de comprendre les interactions entre les cellules de l'hôte et les EHEC afin de *i*) caractériser des marqueurs de susceptibilité chez l'Homme infecté, *ii*) mettre en évidence des facteurs bactériens associés à la virulence et *iii*) développer des stratégies thérapeutiques visant à favoriser la destruction des bactéries et limiter l'apparition des syndromes hémorragiques.

C'est dans ces axes thématiques que s'est inscrit mon travail de thèse ; plus précisément, j'ai étudié la réponse immunitaire innée et la production de monoxyde d'azote (NO) lors de l'infection par les EHEC.

Le NO, produit en grande quantité par la NOS inductible (iNOS ou NOS2), possède de nombreuses propriétés physiologiques, notamment des propriétés immunologiques en agissant sur l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et en favorisant l'inflammation (Leclerc et al., 2021; Porrini et al., 2020). De plus, les données présentes dans la littérature suggèrent que NO peut être cytotoxique pour les bactéries pathogènes (Hall et al., 2020) et peut induire des modifications transcriptionnelles en interagissant avec des senseurs de NO (Rodionov et al., 2005). Pour se protéger des effets délétères du NO, la réponse SOS semble être essentielle pour

les bactéries. Ainsi, des études ont montré que la délétion du gène *recA* conduit à une augmentation de la sensibilité au NO, suggérant que la réponse SOS est induite en réponse au NO (Spek et al., 2001).

Nous avons émis l'hypothèse que le NO pouvait agir sur la croissance des EHEC et/ou induire des modifications transcriptionnelles ; plus particulièrement, nous avons suggéré que NO pouvait modifier l'expression de gènes codant pour des facteurs de virulence. En retour, les EHEC pourraient moduler l'expression de la iNOS et/ou la production de NO dans les cellules épithéliales intestinales humaines.

Pour vérifier ces hypothèses, nous avons analysé l'effet du NO produit par des donneurs chimiques de NO et par les cellules épithéliales humaines sur la croissance des EHEC et la production de Stx, principal facteur de virulence des EHEC.

Nous avons ainsi démontré que le NO (libéré par un donneur de NO, NOR-4 ou produit par des cellules épithéliales intestinales) est capable d'inhiber l'expression des ARNm *stx2* à 18 h et 24 h dans la souche EHEC EDL933 et par conséquent de diminuer la production de Stx2 de façon significative, sans modifier la croissance ou la survie de la bactérie. De plus, l'utilisation d'un chélateur de NO, le cPTIO, permet de restaurer l'effet inhibiteur observé avec NOR-4, confirmant que l'inhibition de l'expression de *stx2* est due à NO (Figure 4).

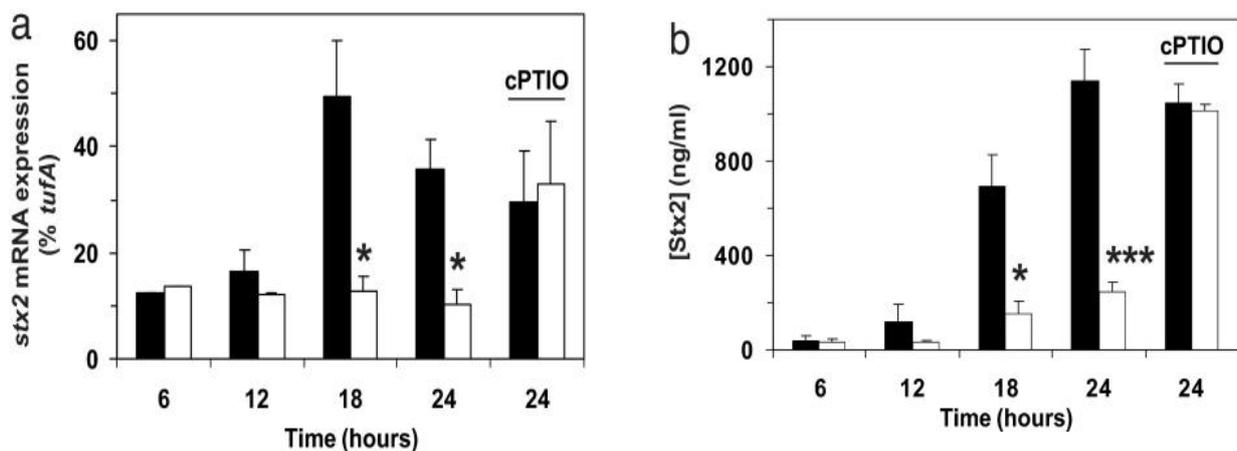


Figure 4. NOR-4 inhibe la production spontanée de Stx2 par EDL933. La souche EDL933 (10^6 bactéries/ml) a été cultivée en présence (barres roses) ou en absence (barres violettes) de NOR-4, avec ou sans cPTIO ou Hb. Le niveau d'ARNm *stx2* dans les bactéries (A) et la concentration Stx2 dans les surnageants de culture (B) ont été respectivement déterminés par RT-qPCR et par ELISA. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$ vs. EDL933; $n = 3-7$.

Par la suite, nous avons montré que NO inhibe l'expression du gène *stx2* via une inhibition de l'activation des deux principaux senseurs de NO chez *E. coli*, NorR et NsrR. En effet, la mutation des gènes *norR* et *nsrR* supprime l'inhibition de l'expression de *stx2* dépendante de NO, et le phénotype de la souche sauvage a été restauré dans les souches mutées complémentées.

En parallèle, nous avons recherché l'effet des EHEC sur la production de NO par les cellules épithéliales du côlon humain. Pour cela, nous avons étudié l'expression du gène codant la iNOS dans des cellules épithéliales intestinales humaines en présence ou absence de cytokines pro-inflammatoires et rechercher les mécanismes moléculaires responsables de cette modulation.

Nous avons montré qu'en conditions inflammatoires, les lignées épithéliales intestinales Hct-8, Caco-2 et HT-29 expriment les ARNm et la protéine NOS2 et produisent du NO (Figure 5). L'infection par les EHEC O157:H7 ou O113:H21 inhibent la transcription du gène *nos2* en induisant la protéine HO-1 dans les cellules stimulées.

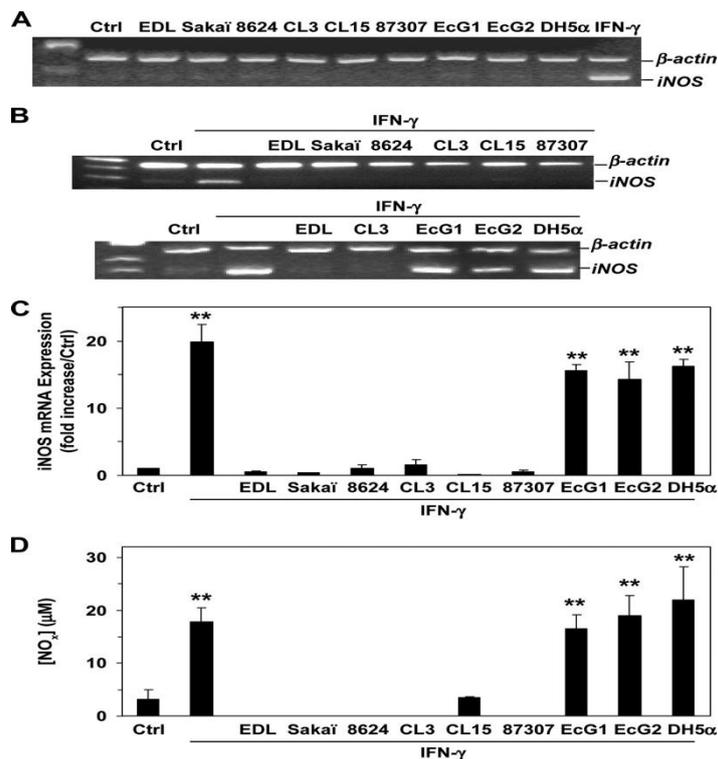


Figure 5. Effet des EHEC sur la production de NO par les cellules épithéliales intestinales. Les cellules Hct-8 ont été infectées avec différentes souches d'EHEC O157:H7 (EDL, Sakai, 8624, CL3, CL15) ou des *E. coli* non pathogènes (EcG1, EcG2, DH5a) en présence ou absence d'IFN-g. L'expression du gène iNOS a été analysée par RT-PCR (A + B) PCR en temps réel (C). La production de NO a été mesurée dans les surnageants cellulaires 24h post-infection. **, $P < 0.01$ vs. les cellules contrôles et les cellules stimulées avec les cytokines et infectées avec les souches d'EHEC. $n = 4$.

Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans un modèle d'infection par les EHEC chez le rat axénique : l'expression du gène codant la iNOS et l'induction de paramètres pro-inflammatoires est moindre dans le côlon des rats infectés par les EHEC en comparaison des rats infectés par un *E. coli* commensal. Inversement, les EHEC, et pas les *E. coli* commensaux, stimulent l'expression de HO-1 dans la muqueuse infectée.

En conclusion, NO peut agir comme inhibiteur de la synthèse de Stx2 et de l'adhésion des EHEC, sans affecter la survie ni la croissance des bactéries. En retour, les EHEC sont capables d'inhiber la production de NO par les cellules épithéliales intestinales pour favoriser leur propre virulence. Nous décrivons ainsi un nouveau mécanisme d'échappement de la réponse immune innée des muqueuses élaborées par les EHEC. A long terme, l'utilisation de donneurs de NO pour limiter l'adhésion des EHEC aux entérocytes et la production de Stx2 pourrait avoir un effet protecteur en diminuant les symptômes rénaux du SHU.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet de deux publications dans « PNAS » (Vareille et al., 2007) et « Journal of Immunology » (Vareille et al., 2008) présentées en annexe.

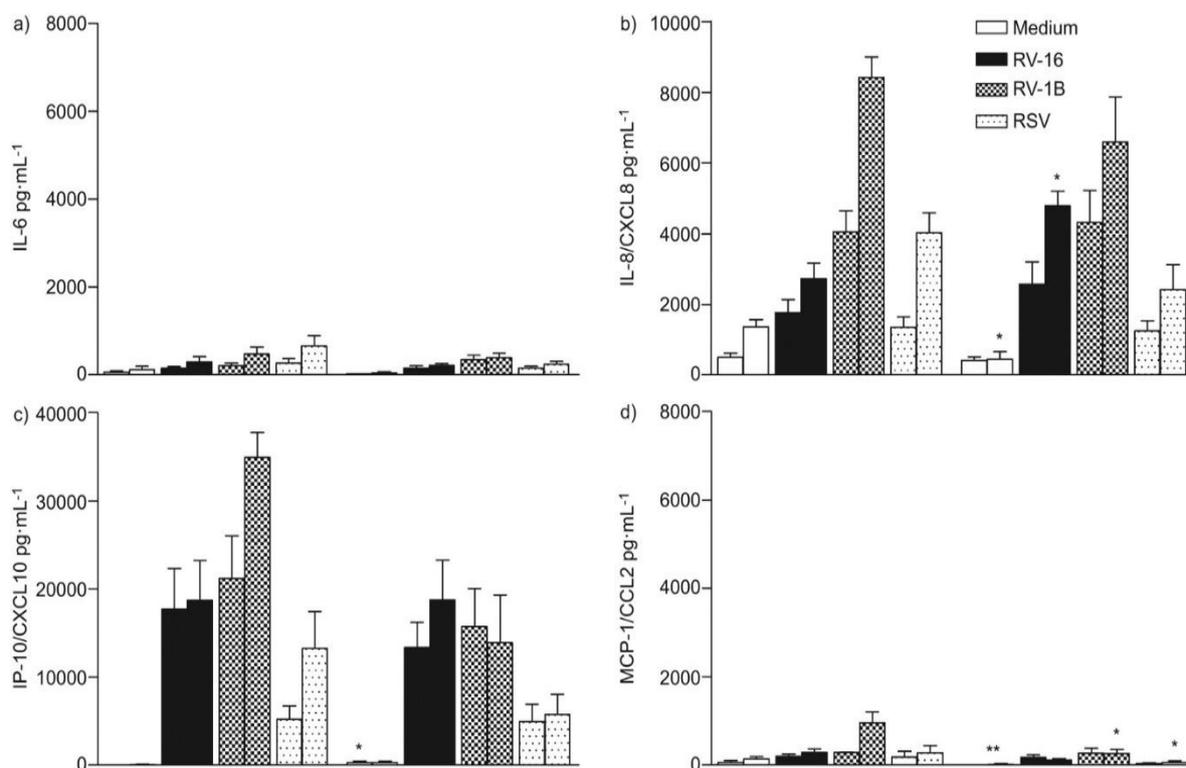
II. La réponse mucoale pulmonaire lors des infections à rhinovirus chez les patients atteints de mucoviscidose (Travaux effectués en post-doctorat ; 2009-2010)

Projet de recherche : Effet des rhinovirus sur la réponse inflammatoire de l'épithélium pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose.

La mucoviscidose est une maladie chronique héréditaire qui affecte les poumons et le système digestif d'environ 70 000 enfants dans le monde. Elle se caractérise par une inflammation chronique et une infection bactérienne des poumons, qui entraînent une détérioration irréversible de la fonction pulmonaire et une mort précoce. Les infections virales respiratoires ont un impact significatif sur les patients atteints de mucoviscidose. 40 % des exacerbations pulmonaires aiguës et la moitié des admissions à l'hôpital des nourrissons atteints de mucoviscidose sont associées à des infections par des virus respiratoires, notamment les rhinovirus (RV). Néanmoins le rôle des infections à RV dans l'induction de la réponse inflammatoire chez ces patients est peu étudié. Or la production exagérée de cytokines et chimiokines dérivées de l'épithélium, notamment IL-6, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, MCP-

1/CCL2, RANTES/CCL5 et GRO- α /CXCL1, est corrélée à l'ampleur de l'inflammation et de la morbidité respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose (Stecenko et al., 2001). Nous avons émis l'hypothèse d'une réponse inflammatoire exagérée de l'épithélium des voies respiratoires en cas d'infection virale et pour ce faire, nous avons évalué la production de cytokines et de chimiokines épithéliales lors de l'infection par différents virus respiratoires en utilisant des cellules nasales et bronchiques primaires et des lignées cellulaires.

L'infection par le RV-16, le RV-1B et le VRS de cellules nasales et bronchiques isolées chez des témoins sains et de patients atteints de mucoviscidose a effectivement induit une production significative et robuste d'IL-6, d'IL-8, d'IP-10, de MCP-1, de RANTES et de GRO- α , avec des valeurs dépassant plusieurs milliers de pg par ml pour certaines cytokines (Figure 6). Les résultats ont montré une production spontanée de cytokines comparable entre les cellules contrôles et les cellules CF. Après l'infection par les différents virus, la production de cytokines tend vers une diminution dans les cellules CF, en particulier dans les cellules nasales.



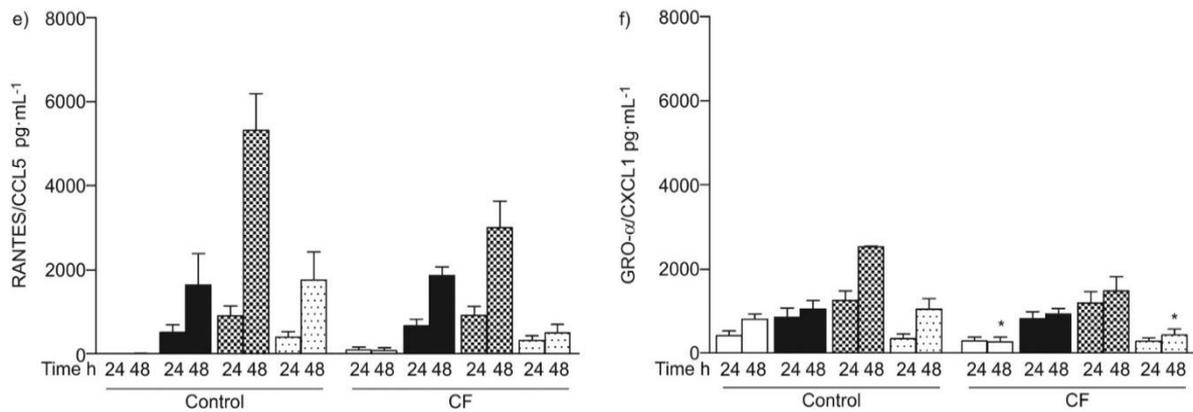


Figure 6. Analyse de la production de cytokines par les cellules épithéliales bronchiques de donneurs sains et patients atteints de mucoviscidose (CF) avant et après infection par des virus. La concentration des cytokines IL-6 (a), IL-8 (b), IP-10 (c), MCP-1 (d), RANTES (e) et GRO- α (f) a été mesurée dans les surnageants cellulaires par la technologie Luminex avant (Medium) et après infection par les rhinovirus (RV)-16, RV-1B et le virus respiratoire syncytial (RSV) à 24 et 48 h. CXCL: C-X-C motif chemokine; CCL: chemokine (C-C motif) ligand. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: both different to control cells.

De plus, nous avons observé une cytotoxicité plus élevée (par mesure de la LDH) dans les cellules épithéliales primaires des voies respiratoires de patients atteints de mucoviscidose après infection par les virus par rapport aux cellules contrôles.

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'augmentation de la morbidité chez les patients atteints de mucoviscidose après une infection virale n'est pas due à une réponse inflammatoire exagérée de l'épithélium des voies respiratoires, mais plutôt liée à une augmentation de la mort cellulaire. Ils justifieraient donc la mise en œuvre de thérapies visant à contrôler les virus et leur réplication plutôt que de cibler l'inflammation.

L'ensemble de ces travaux, réalisés avec le soutien d'une bourse postdoctorale RESPIRE, a fait l'objet d'une revue dans « Clinical microbiology » (Vareille et al., 2011) et une publication en 2^{ème} auteur dans le journal « European respiratory journal » (Kieninger et al., 2012) présentées en annexe.

Chapitre 5 – Travaux de recherche au sein de l'UMR INRA 1019 (2010-2019)

Les thématiques de recherche de l'équipe ECREIN de l'UMR INRAE 1019 Nutrition humaine que j'ai rejoint en 2010 s'inscrivent dans le domaine de l'immuno-nutrition. Cette équipe aborde notamment l'étude des relations entre les altérations immunitaires/inflammatoires et les désordres métaboliques en lien avec le statut nutritionnel en situation physio-pathologique (cancer du sein) et l'impact des apports nutritifs sur le fonctionnement des cellules immunocompétentes. Je me suis donc initialement intéressée à l'impact des glycosylations aberrantes - connues pour favoriser la progression du cancer en affectant la croissance tumorale et en régulant négativement les réponses immunitaires - dans les interactions entre cellules tumorales mammaires et cellules dendritiques (financement Ligue contre le cancer). J'ai ensuite développé des projets visant à caractériser l'activité immunomodulatrice de bactéries probiotiques sur la réponse des muqueuses lors d'infections avec des pathogènes vaginaux et pulmonaires, en collaboration avec l'équipe « Communautés Microbiennes : Ecotoxicologie – Santé », UMR CNRS 6023 « Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement » que j'ai ensuite intégrée.

I. Les probiotiques comme immunomodulateurs de la réponse des muqueuses

Les probiotiques sont par définition des microorganismes vivants, qui administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte (FAO/WHO, 2001). Leur utilisation (essentiellement des Lactobacilles et Bifidobactéries) s'est fortement développée depuis ces dernières années et leur efficacité a été démontrée en prévention ou en traitement dans des contextes pathologiques très variés, allant des pathologies infectieuses, aux troubles fonctionnels de l'intestin ou encore à l'allergie. Les modes d'action par lesquels les probiotiques peuvent contribuer à la santé humaine se classent en trois grandes catégories (Figure 7) : (1) en excluant ou en inhibant les pathogènes par compétitions directes via la sécrétion par les probiotiques de molécules antimicrobiennes (acide lactique, bactériocines...) ou indirectes vis-à-vis de nutriments ou de sites d'adhésion ; (2) en améliorant les fonctions barrières de la muqueuse via l'augmentation de la sécrétion de mucus et de défensines par les cellules épithéliales et en renforçant les jonctions serrées entre ces cellules ; (3) en modulant les

réponses immunitaires au niveau des muqueuses de l'hôte (Latif et al., 2023).

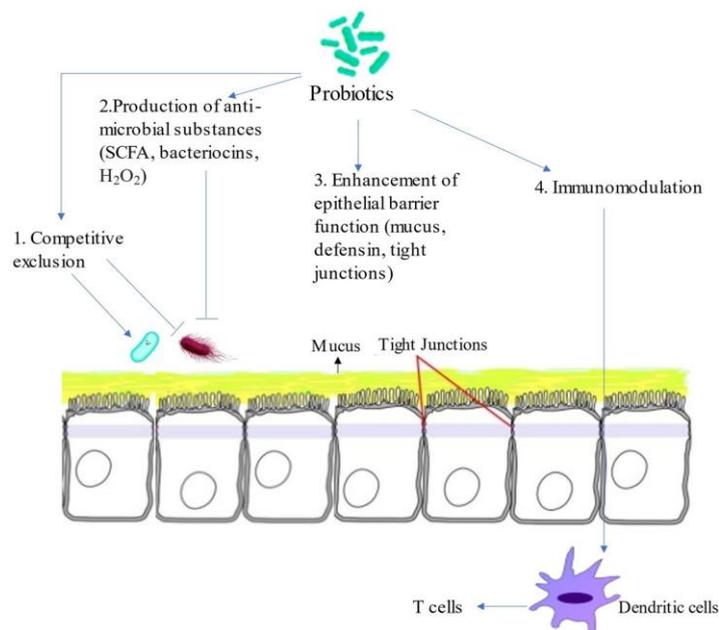


Figure 7. Mécanismes d'action des probiotiques (Latif et al., 2023)

Au niveau des muqueuses, les probiotiques interagissent avec les cellules épithéliales mais peuvent également se retrouver en contact direct avec les cellules de la sous-muqueuse (cellules dendritiques, macrophages). Ces interactions passent par la reconnaissance de motifs microbiens - notamment des constituants membranaires des bactéries probiotiques (peptidoglycane, acides téichoïques) - par les récepteurs des cellules immunitaires de type TLR (TLR2 en autre). En réponse à l'exposition aux probiotiques, les cellules sécrètent de grandes quantités de cytokines pro- ou anti-inflammatoires de façon souche-dépendante. Si un effet anti-inflammatoire a été montré, notamment par des *Lactobacillus* lors de co-infections avec des pathogènes ou avec des cellules épithéliales préalablement stimulées par des cytokines (traitement TNF- α et/ou IL-1 β), il semblerait qu'en condition basale, les probiotiques aient un effet plutôt immunostimulant ; tel est le cas des souches *L. helveticus* et *L. salivarius* qui induisent la sécrétion de TNF- α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ respectivement dans les cellules dendritiques et les macrophages humains (Taverniti et al., 2019; Udayan et al., 2021).

L'action des probiotiques ne se limite pas à l'intestin ; ils exercent également des effets bénéfiques sur des sites et des organes éloignés. Avec la découverte des axes de communication intestin-cerveau/-poumon/-foie/-cœur, les études expérimentales et cliniques sur l'action des

probiotiques contre les troubles extra-intestinaux tels que l'allergie, le diabète, les maladies cardiovasculaires ou neurologiques ont émergé ces dernières années (Kioussi et al., 2019). L'un des domaines de recherche les plus étudiés concerne leur impact fonctionnel potentiel sur le système nerveux et les maladies neurologiques. Des études menées sur des modèles animaux ont ainsi montré que la consommation de probiotiques peut entraîner une diminution des symptômes liés au stress et à l'anxiété (Arslanova et al., 2021; Lalonde & Strazielle, 2022). En outre, des études précliniques ont montré que les probiotiques suppriment les réponses pro-inflammatoires et les dommages oxydatifs dans le cerveau et minimisent ainsi les symptômes des maladies neurodégénératives et démyélinisantes (Castelli et al., 2021).

Toutefois, le manque de cohérence des résultats observés entre les études *in vitro*, animales et cliniques représente un obstacle majeur qui limite l'application clinique des souches probiotiques. A l'heure actuelle, il n'existe pas de recommandations spécifiques ni de lignes directrices médicales pour une administration appropriée des probiotiques dans les pathologies extra-intestinales. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'action des probiotiques sur la réponse immunitaire locale et/ou périphérique, en prenant en compte la spécificité de leur action en fonction de la souche, de l'hôte, ainsi que de la voie d'administration, pourrait maximiser leur efficacité et leur utilisation dans de multiples pathologies.

Dans ce contexte, j'ai ainsi pu développer un projet de recherche visant à décrypter les mécanismes immunomodulateurs de bactéries bénéfiques (le probiotique Lcr35® et une souche de *L. plantarum*) sur la réponse des muqueuses lors d'infections avec des pathogènes vaginaux et pulmonaires. Pour cela, deux modèles ont été développés dont un modèle *in vitro*, d'infection vaginale à *Gardnerella vaginalis* afin d'étudier l'effet du Lcr35 sur la réponse épithéliale vaginale et ses conséquences sur la réponse dendritique. Par la suite, un modèle murin de pneumonie à *K. pneumoniae* nous a permis d'évaluer la contribution distale de l'administration orale de *L. plantarum* sur la réponse inflammatoire pulmonaire dans un modèle murin de pneumonie induite par *K. pneumoniae*.

II. Etude n°1 : Caractérisation des propriétés immunomodulatrices du Lcr35 sur la réponse de la muqueuse vaginale lors des infections à *Gardnerella vaginalis*

La vaginose bactérienne (VB) est la plus commune des infections génitales basses de la femme en âge de procréer puisqu'elle touche 15 à 30 % des femmes dans le monde (Abbe &

Mitchell, 2023). Cliniquement, la moitié des patientes sont asymptomatiques tandis que les autres ne souffrent que de symptômes bénins, comme des pertes blanches, homogène avec une odeur d'amine. La VB se caractérise par une dysbiose du microbiote vaginal, avec la présence de *G. vaginalis* dans près de 94 % des cas. Cette espèce bactérienne serait la principale « colonisatrice précoce » qui déplacerait les lactobacilles commensaux, créant ainsi un environnement favorable à la colonisation par d'autres bactéries associées à la VB, telles que *Prevotella bivia*, *Atopobium vaginae* et *Megasphaera de type 1* (Kairys et al., 2024). La VB peut également provoquer un état d'immunosuppression locale à l'origine de l'augmentation de la sensibilité aux maladies sexuellement transmissibles. Contrairement à la candidose vulvovaginale et à la vaginite, la VB se distingue généralement par l'absence d'inflammation sans augmentation des concentrations d'IL-8 et du nombre de leucocytes. Une carence en peptides antimicrobiens, tels que les β -défensines-1 et -2 humaines et SLPI, a également été observée dans les sécrétions vaginales des femmes atteintes de VB (Fan et al., 2008).

L'administration d'antibiotiques (métronidazole et clindamycine) est le traitement actuellement recommandé pour traiter une VB est, mais les taux de récurrence sont extrêmement élevés et plus de 50% des femmes présentent des épisodes récurrents dans les 6 à 12 mois du fait d'une persistance de la dysbiose vaginale.

Dans ce contexte, les probiotiques apparaissent comme une stratégie alternative intéressante en raison de leur rôle dans le maintien d'un microbiote vaginal équilibré. *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35, récemment renommé *Lacticaseibacillus rhamnosus* Lcr35, est une souche probiotique bien caractérisée utilisée en pratique clinique depuis plus de 50 ans, notamment pour restaurer la santé vaginale (GynOphilus). Les effets antimicrobiens de cette souche probiotique ont été largement documentés au cours de la dernière décennie, mais ses interactions avec le système immunitaire vaginal sont peu documentées.

L'objectif était de caractériser l'effet immunomodulateur du Lcr35 sur les cellules vaginales innées infectées par *G. vaginalis*. Afin de mimer au mieux la muqueuse vaginale *in vitro* et d'étudier les interactions entre les cellules épithéliales vaginales et les cellules dendritiques en réponse à *G. vaginalis* et/ou Lcr35, j'ai développé un modèle de co-culture dans lequel des cellules épithéliales vaginales humaines (lignée VK2/E6E7), cultivées sur un filtre de type Transwell, étaient en contact avec des cellules dendritiques différenciées obtenues à partir de monocytes humains (Figure 8). Ce travail a nécessité une mise en point importante et a permis de prendre en compte la composante épithéliale dans la réponse dendritique en analysant la maturation et la production de cytokines par les cellules épithéliales en réponse à *G. vaginalis* associé ou non au Lcr35.

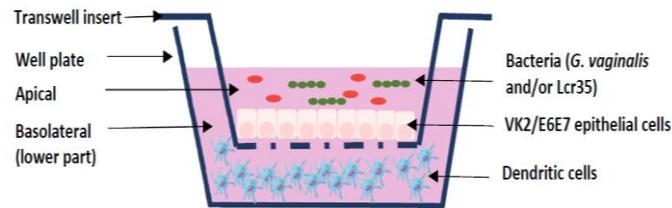


Figure 8. Représentation schématique du modèle de co-culture cellules épithéliales vaginales/cellules dendritiques

Nous avons ainsi montré que la présence de *G. vaginalis* (MOI 1-10) n'induit pas d'effets immunostimulants sur les cellules vaginales : seule une très faible production de cytokines pro-inflammatoires IL-8, IL-1 β et de β -défensine-2 (peptide anti-microbien) est observée dans les cellules épithéliales vaginales infectées par *G. vaginalis*. De façon similaire, l'augmentation de la maturation des cellules dendritiques et la production de cytokines associées sont non significatives par rapport aux taux observés avec cellules non infectées. Ces données *in vitro* confirment le rôle présumé de *G. vaginalis* dans la physiopathologie de la VB et suggèrent un mécanisme par lequel les changements dans la composition du microbiote vaginal survenant au cours de la VB impactent très peu l'immunité de l'hôte, participant ainsi au profil clinique atypique, non ou très peu inflammatoire, de la maladie. L'ajout du Lcr35 de façon simultanée à *G. vaginalis* dans ce même modèle expérimental entraîne une augmentation de la réponse des cellules épithéliales vaginales (cytokines pro-inflammatoires IL-8 et IL-1 β et β -défensine-2 via la voie NF- κ B) stimulant ainsi la défense des cellules épithéliales lors des infections à *G. vaginalis* (Figure 9).

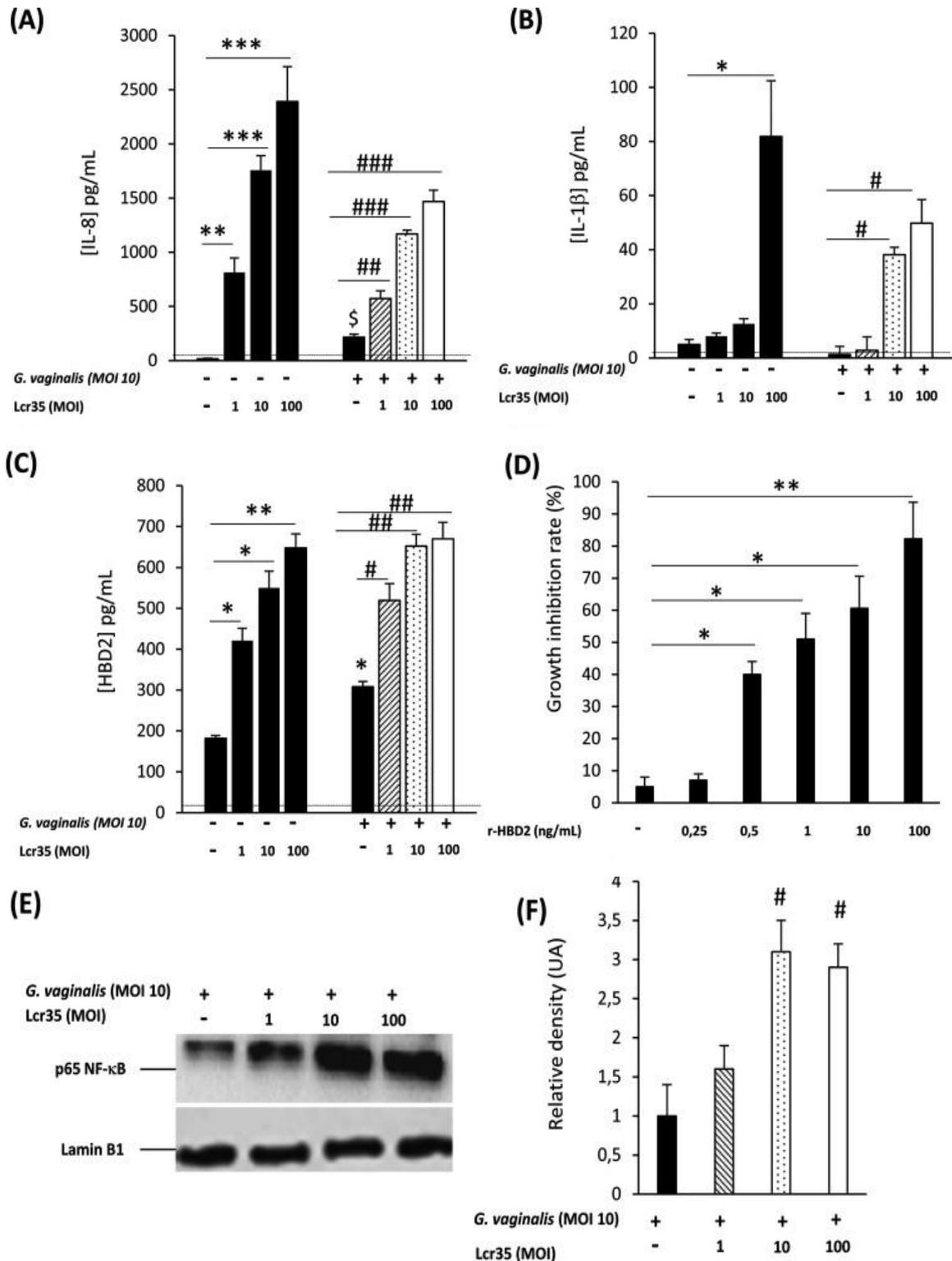


Figure 9. Effet du Lcr35 sur la réponse innée des cellules épithéliales vaginales infectées par *G. vaginalis*. La concentration d'IL-8 (A), IL-1 β (B), HBD-2 (C) a été mesurée 6h post-infection par ELISA. L'effet inhibiteur de HBD-2 sur la croissance de *G. vaginalis* a été mesuré après 4h de traitement. La présence des protéines p65 NF- κ B et Lamin B1 ont été détectée par Western-blot (E) et quantifiée grâce au logiciel Image Lab 2.0 ($n=3$) dans les lysats cellulaires. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ comparativement aux cellules non infectées. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ comparativement aux cellules infectées par *G. vaginalis*.

Nous avons montré que cet effet immunostimulant passe par une inhibition de SLPI, un peptide anti-microbien décrit pour ses capacités bactériostatiques vis-à-vis de pathogènes mais également pour ses effets anti-inflammatoires. De plus, dans notre modèle de co-culture cellules épithéliales vaginales/cellules dendritiques, l'ajout de Lcr35 au niveau basal de la monocouche de cellules épithéliales induit la maturation des cellules dendritiques et la sécrétion de chimiokines (IL-8 et CCL20) ainsi qu'une diminution de production de la cytokine immunosuppressive TGF- β . L'ensemble de ces résultats suggère que Lcr35, en activant les cellules épithéliales, est capable d'impacter la réponse globale de la muqueuse vaginale.

En résumé, cette étude a permis de montrer que le probiotique Lcr35 induit des réponses de l'hôte dirigées contre *G. vaginalis* en modulant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de peptides de défense dans les cellules vaginales et en renforçant le dialogue entre les cellules épithéliales et les cellules dendritiques (Figure 10). Ces propriétés immunostimulantes pourraient restaurer une réponse immunitaire locale bénéfique lors des infections à *G. vaginalis*, ce qui est parfaitement conforme aux effets bénéfiques observés dans les études cliniques.

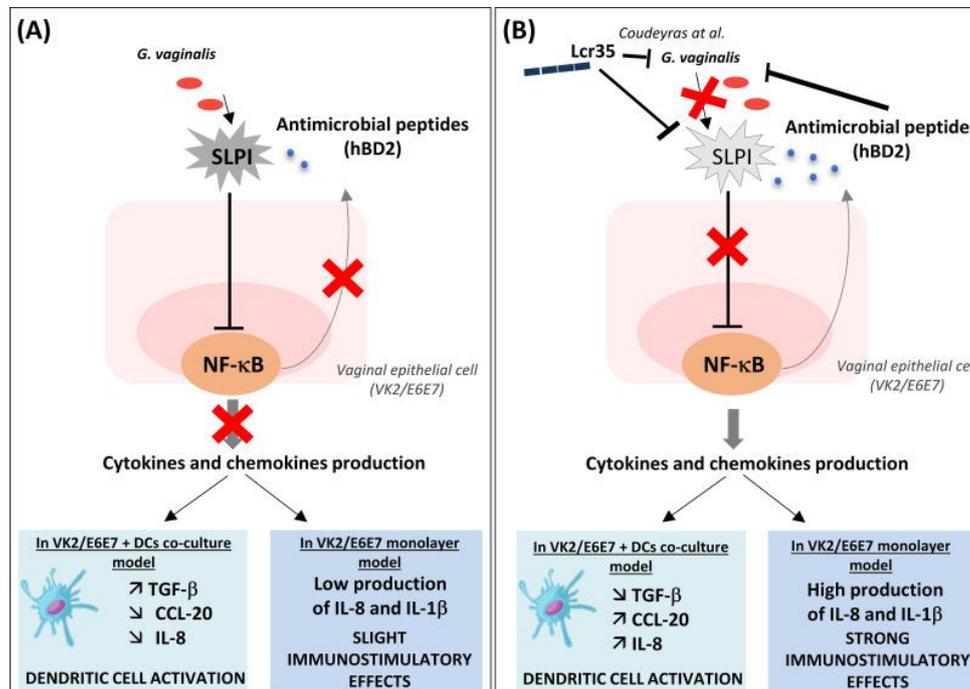


Figure 10. Modèle décrivant l'effet de *G. vaginalis* sur les cellules épithéliales vaginales et les conséquences sur la réponse innée (à gauche) et les effets immunostimulants du Lcr35 (à droite).

Cette étude a été publiée dans « *Infection and Immunity* » (Miquel S,...and Vareille-Delarbre M, 2022) (présentée en annexe) et financée par une bourse innovation transfert de la région Auvergne-Rhône-Alpes.

III. Etude n°2 : Caractérisation des propriétés immunomodulatrices d'une souche de *Lactobacillus plantarum* sur la réponse de la muqueuse pulmonaire lors des infections à *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae est une entérobactérie capsulée à Gram négatif qui colonise les muqueuses intestinales et nasopharyngées chez l'Homme. De façon similaire à *G. vaginalis*, *K. pneumoniae* est capable de se multiplier au niveau des muqueuses (en l'occurrence intestinale) et de créer ainsi un réservoir mais sans engendrer localement de processus inflammatoire (Opoku-Temeng et al., 2022).

Pathogène opportuniste associé à un nombre important de résistances aux antibiotiques, *K. pneumoniae* est capable d'entraîner des infections associées aux soins sévères chez des patients immunodéprimés, essentiellement des pneumonies, des infections urinaires et des bactériémies avec comme point de départ le tube digestif (Joseph et al., 2021).

Au niveau pulmonaire et contrairement à la sphère intestinale, la présence de *K. pneumoniae* se caractérise par une réponse immunitaire dérégulée, avec des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires ("tempête de cytokines") et une accumulation extrême de neutrophiles, ce qui se traduit par une inflammation pulmonaire aiguë accompagnée de lésions pulmonaires. Un concept émergent basé sur l'hypothèse de l'axe « intestin-poumon » suggère que l'activation de l'immunité pulmonaire est en partie sous le contrôle du microbiote. Jiang Q et al., ont ainsi montré que les infections à *K. pneumoniae* sont associées à une altération de la composition et de la diversité du microbiote intestinal (Jiang et al., 2022). Par conséquent, l'administration orale de bactéries bénéfiques pourrait constituer une stratégie thérapeutique alternative pour prévenir et/ou traiter les infections pulmonaires induites par *K. pneumoniae*. Non seulement l'apport de bactéries bénéfiques limiterait la prolifération intestinale de *K. pneumoniae*, mais elle modulerait également la réponse inflammatoire en améliorant l'immunité pulmonaire. Nous avons précédemment sélectionné une souche, *L. plantarum* CIRM653, pour sa capacité à réduire la colonisation de *K. pneumoniae* dans différents modèles

in vitro et *in vivo* (Lagrafeuille et al., 2018). Nous avons ensuite évalué la contribution distale de l'administration orale de cette souche sur la réponse inflammatoire pulmonaire dans un modèle murin de pneumonie induite par *K. pneumoniae*.

Nous avons ainsi montré *in vitro* que la présence de *K. pneumoniae* augmente de façon dose-dépendante la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales pulmonaires (lignée A549), par les cellules dendritiques et les cellules mononuclées du sang. Ce profil pro-inflammatoire a été confirmé *in vivo* au niveau pulmonaire chez des souris infectées par *K. pneumoniae* (modèle de pneumonie par instillation intra-nasale). L'ajout de *L. plantarum* CIRM653 réduit de manière significative la réponse immunitaire innée induite par le pathogène, avec des diminutions des niveaux de cytokines pro-inflammatoires à la fois *in vivo* et *in vitro* (KC, IL-6 et TNF- α) et une diminution de l'infiltration *in vivo* de macrophages et de neutrophiles dans les poumons des animaux. De plus, nous avons montré que l'administration orale de *L. plantarum* CIRM653 diminue et oriente la réponse lymphocytaire T : une diminution de l'expression d'IL-2 (facteur de croissance des cellules T), de T-bet (Th1) et de ROR- γ t (Th17) et une augmentation de l'expression de foxp3 (Treg) et IL-10 ont été observées dans les poumons des animaux 72 heures après l'infection comparativement aux souris infectées mais non stimulées par *L. plantarum* (Figure 11).

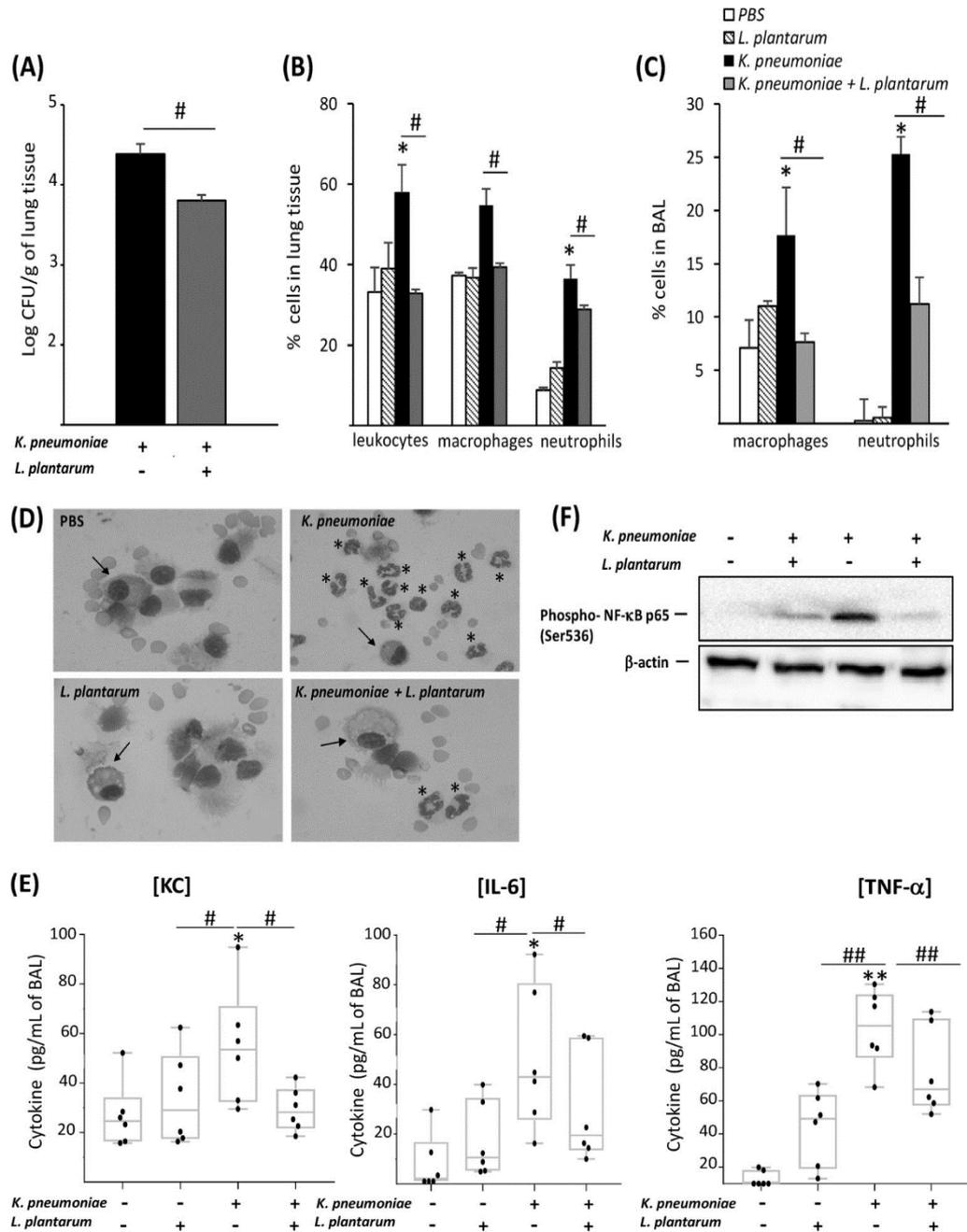


Figure 11. Effet de *L. plantarum* sur la réponse inflammatoire pulmonaire induite par *K. pneumoniae*. Les souris ont été gavées quotidiennement pendant 7 jours avec *L. plantarum* CIRM653 (108 CFU). Au 7ème jour, elles ont été infectées (instillation intra-nasale) avec 25 µl d'une suspension de *K. pneumoniae* (4.0×10^7 CFU/ml). Les populations cellulaires et les cytokines ont été analysées 24h après l'infection. (A) Mesure de la charge bactérienne. (B) Proportions (en pourcentage) de leucocytes, de macrophages et de neutrophiles dans les poumons. (C) Proportions (en pourcentage) de macrophages et de neutrophiles par rapport au nombre total de cellules dans le liquide bronchoalvéolaire (LBA). (D) Images représentatives de cytospin montrant des macrophages (flèches noires) et des neutrophiles (astérisques) dans le LBA. (E) Concentration en cytokines KC, IL-6 et TNF-α dans le LBA de souris mesurée par ELISA. (F) La présence des protéines NF-κB p65 phosphorylées (Ser536) et β-actine dans les tissus pulmonaires a été détectée par Western blotting. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM pour 6 à 8 souris. *, P < 0,05, et **, P < 0,01, par rapport aux animaux non infectés ; #, P < 0,05, et ##, P < 0,01, par rapport aux autres groupes.

In vitro, nos résultats confirment ceux obtenus précédemment *in vivo* : la présence de *L. plantarum* CIRM653 induit la production d'IL-10 et une diminution de la synthèse d'IL-23 par les cellules dendritiques infectées par *K. pneumoniae*, sans effet significatif sur la production d'IL-12p70. De plus, dans des expériences utilisant des cellules mononuclées du sang infectés à la fois par *K. pneumoniae* et *L. plantarum* CIRM653, une augmentation d'IL-10 et une diminution d'IFN- γ et d'IL-17A et de la prolifération des cellules T ont été mises en évidence.

Globalement, ces résultats suggèrent que *L. plantarum* CIRM653 exerce un effet immunosuppresseur sur la réponse inflammatoire induite par *K. pneumoniae* par l'intermédiaire de la production d'IL-10 par les cellules Treg. L'axe « intestin-poumon » serait ainsi impliqué dans les infections à *K. pneumoniae*, ce qui renforce l'hypothèse de l'immunomodulation distale par des bactéries bénéfiques.

Cette étude a été publiée dans « Infection and Immunity » (Vareille M et al., 2019) et est présentée en annexe.

Chapitre 6 – Travaux de recherche au sein de l'UMR CNRS 6023 (2020-aujourd'hui) :

Travaux actuels et futurs

Mon projet vise à décrypter les caractéristiques immunologiques des muqueuses intestinales et pulmonaires, et leur inter-connexion à travers l'axe « intestin-poumon » dans le cadre des mécanismes physiopathologiques déclenchés lors de l'infection par *K. pneumoniae*. Les objectifs sont 1) d'étudier la réponse inflammatoire pulmonaire et intestinale induite par *K. pneumoniae* mais également de comprendre comment ce pathogène est capable de moduler cette réponse en fonction des tissus ; 2) d'envisager une approche plus globale en caractérisant le pathobiome associé, via l'analyse des microbiotes pulmonaire et intestinal ainsi que les interactions pathogène-cellules immunitaires-microbiote à travers l'axe « intestin-poumon ».

Ces projets prennent une signification particulière à l'heure de la multirésistance bactérienne qui limite l'arsenal thérapeutique et à laquelle *K. pneumoniae* n'échappe pas. Ils pourraient ainsi contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies d'immuno-intervention complémentaires des traitements anti-infectieux.

Dans un premier temps, nous étudierons les mécanismes immunologiques impliqués dans la réponse inflammatoire induite au niveau pulmonaire. Pour cela, nous analyserons les interactions entre *K. pneumoniae* et les inflammasomes épithéliaux dans la muqueuse pulmonaire. Les inflammasomes représentent l'une des principales voies de reconnaissance des cellules de l'immunité innée. Ils constituent des plateformes multiprotéiques intracellulaires, membres de la famille des récepteurs intracellulaires de type Nod (NLR), et conduisent à l'activation spécifique d'une caspase inflammatoire, la caspase-1, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, IL-1 β et l'IL-18, ainsi qu'à l'induction d'une mort cellulaire programmée appelée pyroptose (Figure 12) (Almeida-da-Silva et al., 2023; Jamilloux & Henry, 2013).

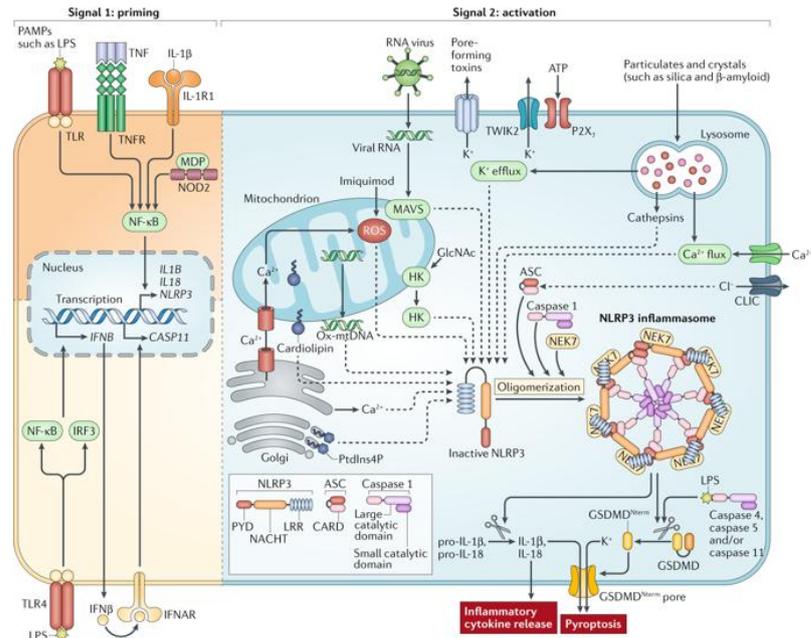


Figure 12. Formation et activation de l'inflammasome NLRP3 (Swanson et al., 2019).

Parmi les 22 NLRs identifiés chez l'Homme, NLRP3 est l'inflammasome le plus largement étudié et est impliqué dans la détection de nombreux motifs microbiens. Il est décrit comme un puissant activateur de l'inflammation notamment au niveau pulmonaire et est associé à de nombreuses pathologies inflammatoires et au développement de sepsis (He et al., 2023; Jamilloux et al., 2014). Quelques études ont examiné la contribution de l'inflammasome NLRP3 dans la défense vis-à-vis de *K. pneumoniae*. Elles montrent que la suppression de NLRP3 entraîne une augmentation de la charge bactérienne pulmonaire et de la mortalité dans les modèles murins de pneumonie à *K. pneumoniae*, mais d'autres études suggèrent que NLRP3 facilite la dissémination du pathogène et l'induction d'un état hyperinflammatoire au niveau des poumons (Castronovo et al., 2017; Codo et al., 2018).

Notre objectif est de caractériser les interactions entre *K. pneumoniae* et l'inflammasome NLRP3 dans les cellules épithéliales pulmonaires afin d'en définir le rôle exact.

Ce projet implique l'encadrement d'un étudiant en thèse (Julien Verlaguet ; 2021-2024). Une publication intitulée « Critical role of Klebsiella pneumoniae enterobactin in NLRP3 inflammasome activation in airway epithelial cells » est en cours de soumission dans « Infection and Immunity ».

Partie 1 : Immunité pulmonaire et *K. pneumoniae*

Caractérisation des interactions entre *K. pneumoniae* et l'inflammasome NLRP3 au niveau pulmonaire (projet en cours)

Dans un modèle *in vitro* avec cellules humaines épithéliales pulmonaires A549, nous avons observé une augmentation de l'expression des gènes *nlrp3*, *asc* et *pro-caspase-1* dans les cellules infectées par *K. pneumoniae* par rapport aux cellules non infectées. L'activité de la caspase-1, l'induction de la pyroptose et la libération d'IL-18 étaient également augmentées dans les cellules infectées. Pour comprendre quels étaient les éléments spécifiques à *K. pneumoniae* capables d'induire cette réponse médiée par NLRP3, nous avons testé dans les mêmes conditions expérimentales des mutants isogéniques de *K. pneumoniae* disponibles au laboratoire, délétés de gènes de structure de différents facteurs de pathogénicité. Les cellules infectées par un mutant déficient pour la production du sidérophore entérobactine (Δ *entB*) ont montré une activation du NLRP3 significativement moindre par rapport aux cellules infectées par la souche sauvage (Figure 13).

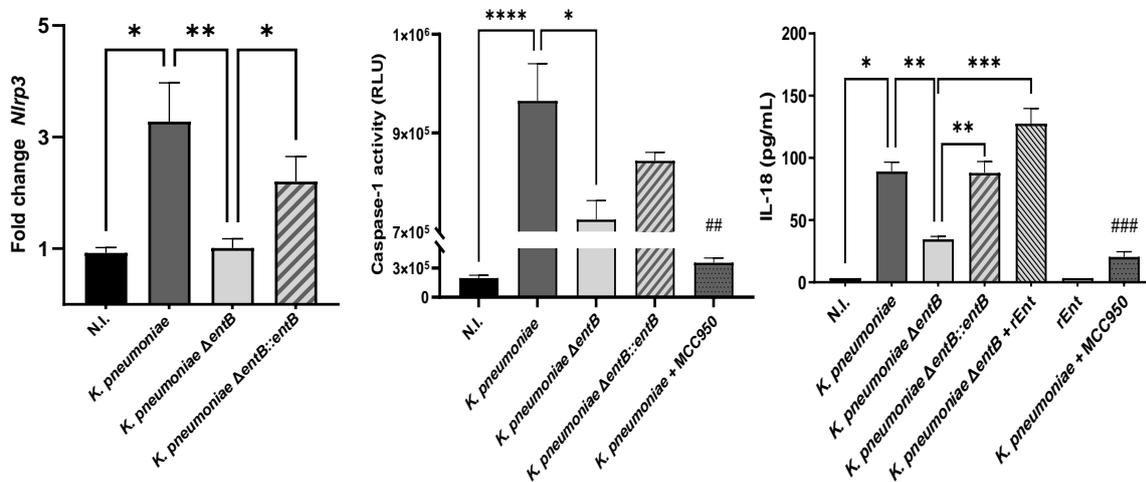


Figure 13. Effet de l'entérobactine EntB de *K. pneumoniae* sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules épithéliales pulmonaires. Les cellules A549 ont été infectées pendant 4h avec *K. pneumoniae* (MOI10) ou la souche déficiente pour EntB (Δ *entB*) ou la souche complétementée. (A) Expression de *nlrp3* par PCR quantitative. (B) Activité enzymatique caspase-1 mesurée par fluorimétrie. (C) concentration en IL-18 dans les surnageants cellulaires dosés par ELISA. *, $P < 0,05$, et **, $P < 0,01$, ***, $P < 0,001$ par rapport aux cellules non infectés (N.I.).

Ces résultats ont ensuite été confirmés *in vivo* : le tissu pulmonaire de souris infectées par *K. pneumoniae* Δ entB présente une activation NLRP3 inférieure à celle observée chez les souris infectées avec la souche sauvage. Néanmoins la réponse inflammatoire pulmonaire caractérisée par le nombre de cellules immunitaires innées (macrophages et neutrophiles) et de cytokines dans les poumons et la rate n'a pas été modifiée significativement dans les souris infectées par le mutant Δ entB par rapport aux données obtenues avec les souris infectées avec la souche sauvage.

Ces résultats indiquent que l'entérobactine interagit avec la défense immunitaire de l'hôte par l'intermédiaire de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules pulmonaires mais ne semble pas impacter la réponse inflammatoire au cours de l'infection pulmonaire par *K. pneumoniae*. Le rôle exact de NLRP3 dans l'immunité pulmonaire induite par *K. pneumoniae* et ses conséquences sur le devenir de l'infection restent donc à être précisés. Pour cela, il est nécessaire de comprendre comment l'entérobactine induit l'activation de NLRP3 mais également d'appréhender les interactions entre les inflammasomes au sein d'une même cellule.

Perspectives (1). Etude mécanistique de l'activation de NLRP3 par l'entérobactine EntB de *K. pneumoniae*

L'activation de l'inflammasome NLRP3 nécessite un processus en deux étapes, comprenant un signal d'amorçage (signal 1) et un signal d'activation (signal 2) (Figure 15). Le signal 1 implique la reconnaissance des pathogènes par les récepteurs de l'immunité innée, les TLR. L'amorçage conduit alors à l'activation de NF- κ B, augmentant ainsi la transcription des composants de l'inflammasome (comme NLRP3) et l'expression des formes pro-IL-1 β et pro-IL-18. Le second signal conduit à l'assemblage du complexe protéique et à l'activation finale de NLRP3. Les signaux d'activation sont le plus souvent induits par des agonistes de NLRP3, tels que l'efflux de K⁺, les signaux Ca²⁺ et les ROS.

L'objectif de cette partie est de caractériser les mécanismes (signal 1 + 2) par lesquelles l'entérobactine EntB de *K. pneumoniae* active NLRP3 dans les cellules épithéliales pulmonaires. Des résultats préliminaires ont montré que la supplémentation en entérobactine exogène ne complète pas le défaut d'activation du NLRP3 dans le mutant Δ entB, ce qui suggère que l'entérobactine seule n'est pas suffisante pour expliquer l'effet sur l'inflammasome NLRP3. D'autres éléments bactériens pourraient être impliqués dans ce processus ; des résultats

préliminaires ont également montré l'implication de la capsule de *K. pneumoniae* dans l'induction de NLRP3 par les cellules pulmonaires A549. Ces résultats seront à confirmer afin de mieux comprendre le rôle de ces facteurs de pathogénicité dans les signaux d'activation de NLRP3. Nous émettons l'hypothèse que la capsule permet l'activation de NF- κ B et la libération des composants de l'inflammasome (signal 1) tandis que le stress cellulaire lié à la privation en fer par l'entérobactine de *K. pneumoniae* induit la production de ROS et ainsi favorise l'assemblage de NLRP3 (signal 2). Pour cela, nous analyserons l'impact de la capsule et de l'entérobactine sur la voie NF- κ B par western-blot en utilisant des souches de *K. pneumoniae* mutées pour ces deux facteurs ($\Delta wecA$ et $\Delta entB$). Le dosage des ROS sera mesuré dans les cellules infectées par le pathogène et son implication dans l'activation de NLRP3 sera confirmée par l'utilisation d'un inhibiteur de la génération des ROS. Enfin, un double mutant $\Delta wecA \Delta entB$ permettra de confirmer le rôle de ces facteurs dans l'induction de NLRP3 dans les cellules épithéliales pulmonaires.

Par ailleurs, il a été démontré dans un modèle murin de syndrome de détresse respiratoire aiguë que l'HIF-1 α , un facteur de transcription régulé en condition d'hypoxie hautement exprimé dans la sphère respiratoire, module l'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'intermédiaire de NF- κ B ce qui favorise ensuite l'expression de l'IL-1 β (Huang et al., 2019). Évaluer l'impact de *K. pneumoniae* sur l'expression d'HIF-1 dans les cellules pulmonaires et ses conséquences sur la régulation de NLRP3 permettra de préciser le rôle de l'entérobactine sur le signal d'amorçage de NLRP3.

Perspectives (2). L'immunité nutritionnelle au cœur de l'immunité des muqueuses : la compétition pour le fer entre *K. pneumoniae* et la cellule épithéliale pulmonaire

En réponse aux perturbations de l'homéostasie du fer, les cellules épithéliales produisent la lipocaline-2 (Lcn-2), une protéine qui se lie aux sidérophores bactériens, inhibant ainsi l'absorption du fer par la bactérie, ce qui entraîne un défaut de croissance bactérienne. Ayant précédemment démontré que *K. pneumoniae* utilise l'entérobactine, son principal sidérophore, pour activer l'inflammasome NLRP3 dans les cellules épithéliales pulmonaires, l'étape suivante consistera à déterminer quels sont les liens entre entérobactine et lipocaline-2 et l'induction de l'inflammation via NLRP3.

Lors d'essais préliminaires, nous avons montré que l'ajout de Lcn-2 diminue la croissance de *K. pneumoniae* de façon dose-dépendante dans un environnement contrôlé en fer.

En parallèle, la quantité de Lcn-2 présente dans le surnageant de cellules A549 stimulées par IL-1 β et infectées par *K. pneumoniae* est moindre par rapport aux concentrations observées avec les cellules uniquement stimulées par IL-1 β . Un même résultat a été obtenu lorsque les cellules sont en contact avec du surnageant de culture de *K. pneumoniae*, ce qui suggère qu'un facteur sécrété par *K. pneumoniae* est responsable de l'inhibition de la production de Lcn-2 dans le surnageant des cellules épithéliales pulmonaires (Figure 14).

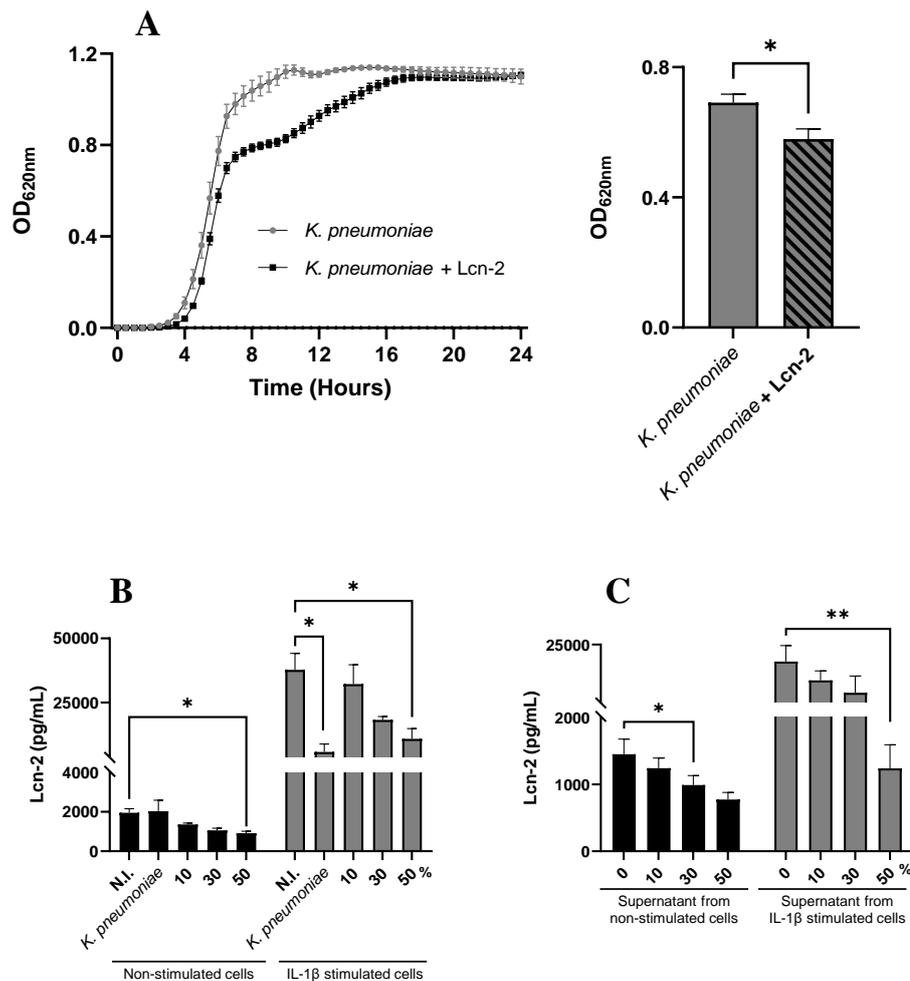


Figure 14. Impact de Lcn-2 dans les interactions entre *K. pneumoniae* et les cellules épithéliales pulmonaires. (A) Effet de Lcn-2 sur la croissance de *K. pneumoniae* au cours du temps. (B) Les cellules A549 ont été infectées pendant 24h avec *K. pneumoniae* (MOI10) ou du surnageant de *K. pneumoniae* (0-50%). La production de Lcn-2 a été mesurée dans les surnageants de culture par ELISA. (C) Des surnageants cellulaires issus de cellules A549 préalablement infectées par *k. pneumoniae* ont été mis en contact avec des surnageants de *K. pneumoniae* à différents ratios (0-50%). La concentration en Lcn-2 a été déterminée après 24h de contact. *, P < 0,05, et **, P < 0,01 par rapport aux cellules non infectés (N.I).

Récemment, Muselius B *et al.* ont analysé le profil du sécrétome de *K. pneumoniae* en réponse à la limitation en fer par une analyse protéomique (LC-MS/MS). Parmi les 121 protéines spécifiquement secrétées en absence de fer, la protéase Lon est la plus abondante lorsque la disponibilité en fer est faible. Des analyses complémentaires ont montré une diminution de la cytotoxicité des macrophages THP-1 infectés par la souche *K. pneumoniae* délétée du gène codant la protéine Lon (*Δlon*) suggérant un rôle de cette protéine dans la virulence de *K. pneumoniae* (Muselius et al., 2020).

L'objectif sera d'évaluer l'impact de Lon dans la modulation de Lcn-2 produite par les cellules épithéliales. Pour cela, des infections de cellules A549 seront réalisés avec le mutant *Δlon* (fourni gracieusement par Jennifer Geddes-McAlister, University of Guelph, Canada).

Si l'implication de la protéine Lon n'est pas mise en évidence, nous envisageons de poursuivre l'identification de ce facteur en testant l'impact de souches délétées pour d'autres facteurs de pathogénicité (capsule, LPS, pili, T6SS...) sur la production de Lcn-2. Nous réaliserons également des tests de *cut-off* et de traitement par la chaleur et par des protéases afin de déterminer la nature et le poids moléculaire de cette molécule. Si la nature protéique est avérée, une analyse protéomique par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse afin d'identifier cette protéine sera réalisée en collaboration avec la plateforme protéomique de l'INRAE de Theix.

Perspectives (3). Recherche translationnelle : Caractériser les interactions entre l'enterobactine de *K. pneumoniae* et l'inflammasome NLRP3 chez des patients en réanimation souffrant d'infections pulmonaires et/ou de sepsis

Les données obtenues *in vitro* avec des modèles cellulaires ou *in vivo* en modèle murin devront être validées en clinique. Pour cela, en collaboration avec une équipe de réanimateurs du CHU, nous collecterons les souches de *K. pneumoniae* isolées chez des patients en réanimation souffrant d'infections pulmonaires et/ou de sepsis, et déterminerons leurs effets sur l'activation de NLRP3 dans le modèle *in vitro* de cellules pulmonaires humaines. Une vingtaine de souches cliniques ont d'ores et déjà été isolées et les données des patients ont été également collectées par le partenaire clinicien du projet (avis Comité Ethique de la DRCI du CHU de Clermont- Ferrand (IRB00013412). L'activation de NLRP3 dans les cellules pulmonaires A549 au contact de ces bactéries sera évaluée par l'analyse de l'expression du gène *nlrp3* et la mesure de la production de cytokines associées, IL-1 β et IL-18. Les données ainsi générées permettront d'établir s'il existe une corrélation ou non entre la capacité des pathogènes à stimuler le

complexe NLRP3 et l'évolution clinique / la sévérité des atteintes pulmonaires des patients (développement de fibrose pulmonaire notamment).

Dans un second temps, nous étudierons l'impact de l'« environnement pulmonaire » sur la production *in vitro* de sidérophores par *K. pneumoniae* au contact de liquides broncho-alvéolaires (LBA) qualifiés issus de patients hospitalisés en réanimation. Nous émettons l'hypothèse que la production de sidérophores par *K. pneumoniae* serait augmentée chez les patients souffrants d'infections pulmonaires conduisant à une induction de l'inflammasome NLRP3 dans les poumons, via des molécules spécifiquement présentes dans le liquide alvéolaire.

Une collecte de 30 fonds de tube de LBA qualifiés (autorisation IRB00013412) et caractérisés sur le plan immunologique (immunophénotypage HLA, cytokines inflammatoires), bactériologique (présence ou non de *K. pneumoniae*) et biochimique (albumine) sera effectuée. Ces échantillons biologiques seront mis en contact avec *K. pneumoniae* et nous mesurerons l'expression induite des gènes codant les principaux sidérophores (enterobactine et salmochéline) par RT-qPCR ainsi que la croissance bactérienne pendant 24h. Un dosage du fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}) ainsi que l'anti-sidérophore Lcn-2 sera réalisé en parallèle dans les LBA collectés. Ces données permettront d'établir d'éventuelles corrélations entre l'environnement pulmonaire du patient (carence en fer, augmentation de Lcn-2) et la production de sidérophores par *K. pneumoniae*.

Nous envisageons de déposer ce projet en 2024 dans le cadre de l'AAP Recherche translationnelle en santé en collaboration avec le service de médecine intensive et réanimation du CHU de Clermont-Ferrand.

L'ensemble de ces perspectives de recherche permettra de mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance de *K. pneumoniae* par les cellules épithéliales pulmonaires, ce qui correspond à la première étape de mise en route de la réponse inflammatoire et du recrutement de cellules inflammatoires telles que les polynucléaires neutrophiles (PNN).

Analyser le recrutement et les propriétés fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles face à *K. pneumoniae*

Dans un second temps, nous proposons d'étudier l'impact de la composante épithéliale sur le recrutement des PNN lors des infections à *K. pneumoniae* et l'effet du pathogène sur les fonctions effectrices des PNN.

Les résultats acquis précédemment démontrent que *K. pneumoniae* interagit avec les cellules épithéliales pulmonaires, ce qui se traduit par une diminution de Lcn-2, une protéine connue pour favoriser le recrutement et l'activation des PNN. L'objectif de cette partie du projet est d'analyser l'impact de l'environnement cytokinique et/ou inflammatoire produit par les cellules épithéliales pulmonaires infectées par *K. pneumoniae* sur le recrutement des PNN. Pour cela, nous avons développé un modèle de migration trans-endothéliale afin de reproduire au mieux le passage physiologique des PNN du sang vers les tissus à travers la barrière endothéliale. Des cellules endothéliales HUVEC sont cultivées dans un système Transwell® (Figure 15) et la migration des neutrophiles humains (initialement introduits dans la partie supérieure du dispositif) à travers cette barrière endothéliale est évaluée par comptage en phase basolatérale après ajout de surnageants de cellules épithéliales pulmonaires préalablement infectées par *K. pneumoniae*.

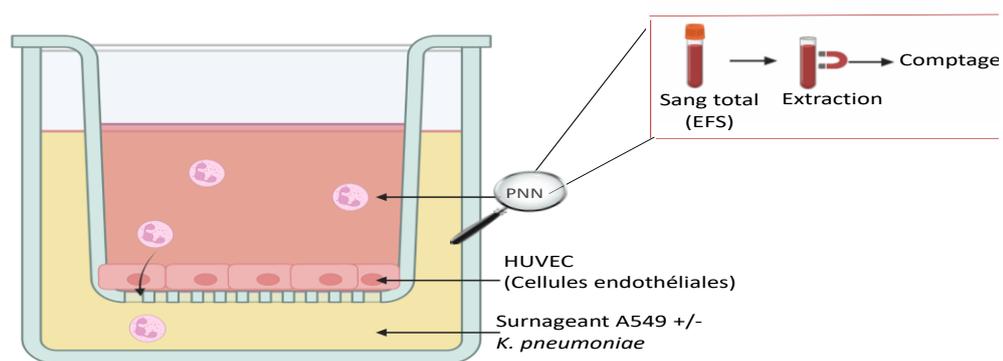


Figure 15. Modèle de migration trans-endothéliale

En parallèle, un modèle de vidéo-microscopie (microscopie confocale) permettra de suivre en temps réel le déplacement et la morphologie des neutrophiles au contact de *K. pneumoniae* et ainsi de mieux comprendre les mécanismes précoces d'activation de ces cellules. Pour cela, des neutrophiles de moelle osseuse issus de souris transgéniques (LysM-EGFP transgenic mice) seront incubés avec une souche de *K. pneumoniae* préalablement rendue fluorescente (GFP+). Le marquage spécifique au niveau des membranes cellulaires (Cell Mask Orange) permettra ensuite d'observer les changements membranaires des neutrophiles au contact du pathogène (Figure 16).

Ces expériences permettront de caractériser les paramètres de mobilité, d'activation

cellulaire et d'interaction entre le neutrophile et le pathogène et ainsi d'identifier de potentiels mécanismes d'échappement immunitaire développés par *K. pneumoniae*.

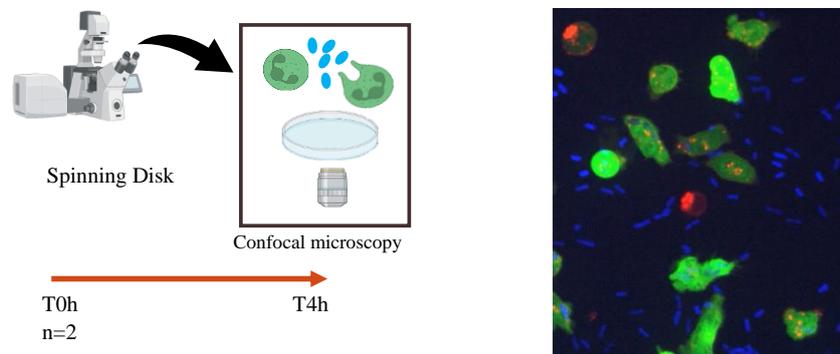


Figure 16. Modèle de vidéo-microscopie

Nous étudierons également l'impact de *K. pneumoniae* sur la phagocytose et la formation de NETs par les PNN. Ces réseaux extracellulaires contenant de la chromatine (ADN et histones) et des protéines granulaires microbicides, telles que l'élastase et la myéloperoxydase (MPO) sont capables de piéger des bactéries.

Des neutrophiles humains seront isolés à partir de donneurs sains (convention EFS) puis infectés avec *K. pneumoniae*. La formation de NET sera observée après marquage des composants d'ADN, MPO, et histone H3 citrullinée (H3Cit) par immunofluorescence et quantifiée par le dosage des complexes ADN/MPO (MPO-DNA ELISA) et de la neutrophile élastase.

La phagocytose sera analysée après lyse des cellules infectées par le dénombrement des bactéries phagocytées.

Cette étude a été initiée en collaboration avec Pascale Gueirard de l'équipe « Interactions hôte-parasite » du LMGE et le plateau technique de microscopie du GRED (financement interne LMGE en 2023). Ce projet implique actuellement l'encadrement d'une étudiante de M2 (janvier-juin 2024).

L'ensemble des travaux décrits dans cette première partie permettra de mieux comprendre l'impact de *K. pneumoniae* sur la réponse inflammatoire pulmonaire en déterminant les mécanismes de reconnaissance du pathogène par les cellules épithéliales

(e.g inflammasome NLRP3) et ses conséquences sur le recrutement des cellules inflammatoires et leurs fonctions effectrices.

Partie 2 : Immunité intestinale et *K. pneumoniae*

Une deuxième partie du projet sera consacrée à l'étude de la réponse inflammatoire intestinale vis-à-vis de *K. pneumoniae*. Plus précisément, nous souhaitons caractériser les interactions entre les cellules immunitaires intestinales et *K. pneumoniae* afin de comprendre le rôle de l'immunité intestinale dans le contrôle du passage du pathogène vers les organes extra-intestinaux.

Identification des mécanismes immunologiques impliqués dans l'effet anti-inflammatoire et/ou de tolérance immunitaire intestinale envers *K. pneumoniae*

Dans un premier temps, nous déterminerons s'il existe une « signature immunitaire intestinale » impliquée dans la colonisation et la translocation de *K. pneumoniae* par une analyse transcriptomique sur cellules uniques (scRNAseq) à partir du tissu intestinal de souris infectées. L'avantage de cette technique non ciblée est de séquencer le transcriptome de chaque cellule composant le tissu intestinal. L'analyse bioinformatique permettra de générer une matrice d'expression avec la quantité d'ARNm retrouvé par gène et par cellule. Une analyse en composantes principales permettra de visualiser des clusters cellulaires (plus les cellules sont proches, plus leurs expressions génétiques sont similaires) et ainsi d'évaluer les similitudes et les différences transcriptionnelles au sein d'une population de cellules. Cette étude a pour objectif de mettre en évidence l'hétérogénéité cellulaire, d'identifier d'éventuels sous populations cellulaires rares et de suivre la dynamique de l'évolution cellulaire au cours de l'infection à *K. pneumoniae*.

En parallèle, une étude plus ciblée sur l'analyse phénotypique par cytométrie en flux de deux populations anti-inflammatoires et tolérogènes, les cellules lymphoïdes innées -3 (ILC-3) et les cellules dendritiques tolérogènes CD103+, sera réalisée *in vivo* à différents temps post-infection dans un modèle murin de colonisation intestinale à *K. pneumoniae* afin de connaître l'impact de ce pathogène sur la modulation de la réponse inflammatoire intestinale. Des dénombrements bactériens dans les différents organes extra-intestinaux (foie, rate, poumon) et des suivis de mortalité et de perte de poids des animaux permettront de connaître la capacité de translocation, la dissémination du pathogène et la sévérité de l'infection.

Dans un second temps nous proposons de décrypter les interactions de *K. pneumoniae* avec les inflammasomes intestinaux. Des études ont montré que les inflammasomes NLRP6 et NLRP12 peuvent agir comme régulateurs négatifs des voies de signalisation NF- κ B et MAPK pour atténuer l'inflammation intestinale pendant l'infection par *K. pneumoniae* (Chen, 2014). De plus, l'émergence d'un axe « inflammasome–microbiote » basé sur la modulation de la composition du microbiote intestinal commensal par les inflammasomes ouvre de nouvelles pistes pour contrôler la réponse immunitaire aux infections systémiques et intestinales (Watanabe et al., 2021). Seregin et al. ont démontré que la production d'IL-18 dépendante de NLRP6 est responsable de la régulation du microbiote intestinal : des souris Il18^{-/-} présentent une sur-représentation d'*Akkermancia muciniphila* (Seregin et al., 2017).

Dans ce contexte, le projet proposé vise à analyser *in vitro* et *in vivo* l'expression des inflammasomes intestinaux en réponse au pathogène *K. pneumoniae* versus des bactéries commensales.

L'analyse de l'expression des différents inflammasomes (NLRP3, NLRC4, NLRP1, NLRP6, NLRP12) et le suivi de la production de cytokines inflammatoires par RT-qPCR et ELISA de cellules épithéliales intestinales co-infectées avec *K. pneumoniae* et différentes espèces commensales du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii* A2-165, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bacterioides thetaiotaomicron* VPI-5482, *Escherichia coli* MG155, pour le microbiote intestinale) seront réalisés. Les données permettront de caractériser le processus d'activation engendré et de 1) définir toute activation différentielle des inflammasomes en fonction des bactéries inductrices et 2) préciser le rôle des inflammasomes épithéliaux intestinaux et leurs éventuelles interactions.

Cette étude sera complétée et/ou élargie à une étude *in vivo* dans un modèle murin de colonisation intestinale par *K. pneumoniae*. A différents temps post-infection, une analyse de l'expression des inflammasomes par RT-qPCR et immunohistochimie à partir du tissu intestinal de souris infectées sera réalisée afin d'identifier le ou les inflammasomes exprimés au niveau intestinal. Ce modèle a l'avantage de prendre en compte les interactions globales entre le pathogène, l'hôte et son microbiote dans la régulation des inflammasomes et leurs conséquences sur l'immunité intestinale et plus largement sur la régulation de l'axe « intestin-poumon » (partie 3 du projet).

Cette étude fera l'objet d'une demande de financement dans le cadre de l'AAP Emergence en collaboration avec Charlene Guillot de l'équipe « Régulation dynamique de la

morphogenèse de l'axe du corps » du GRED qui possède une grande expertise dans l'analyse en scRNAseq. Un sujet de thèse sera également déposé au sein de l'école doctorale SVSAE en 2024 sur cette thématique.

L'ensemble des travaux décrits dans la partie 2 permettront de mieux comprendre les interactions entre le pathogène, son hôte et son environnement (cellules immunitaires, microbiote pulmonaire) au niveau intestinal et permettra ainsi d'améliorer les connaissances sur la pathogénie, la persistance et la transmission de *K. pneumoniae*.

Partie 3 : L'Axe « intestin-poumon » : impact des microbiotes intestinal et pulmonaire dans les infections à *K. pneumoniae*

Nous avons précédemment démontré l'existence de l'axe « intestin-poumon » dans les infections à *K. pneumoniae* et la capacité de bactéries lactiques à moduler la réponse inflammatoire pulmonaire (Vareille-Delarbre et al., 2019). Nous souhaitons poursuivre cette étude en étudiant les mécanismes par lesquels les microbiotes de l'intestin et des poumons influencent le trafic et la fonction des cellules immunitaires. La connaissance de ces éléments a pour objectif d'identifier des voies de régulation critiques et/ou des molécules clés impliquées dans la communication entre l'intestin et les poumons lors d'infections à *K. pneumoniae*.

Des études ont montré qu'au stade précoce de l'infection par *K. pneumoniae*, la richesse et la composition du microbiote intestinal et pulmonaire changent, en particulier le nombre de *Lactobacillus reuteri* et de *Bifidobacterium pseudolongum* diminue de manière significative au niveau intestinal ainsi que les Streptococcus au niveau pulmonaire (Wolff et al., 2021; Wu et al., 2020). Parmi le microbiote intestinal, les Bactéroidetes peuvent renforcer la barrière immunitaire intestinale par l'intermédiaire de l'IL-36 et des macrophages afin de prévenir la colonisation et la transmission de *K. pneumoniae* (Sequeira et al., 2020). Les acides gras à chaîne courte (AGCC), produits de fermentation de la flore intestinale, notamment l'acide acétique, l'acide butyrique et l'acide propionique, jouent un rôle essentiel dans la résistance à la colonisation et à l'inflammation de *K. pneumoniae*.

L'objectif de cette partie est d'évaluer le rôle du microbiote intestinal et pulmonaire sur la colonisation par *K. pneumoniae*, l'effet barrière des cellules épithéliales et la réponse inflammatoire des muqueuses et la communication entre l'intestin et les poumons.

Pour cela, l'impact de *K. pneumoniae* sur la composition des communautés des microbiotes sera déterminé dans deux modèles murins d'infection à *K. pneumoniae* : le modèle de colonisation intestinale et le modèle de pneumonie induite par instillation intranasale. Une analyse globale, par séquençage haut-débit des gènes codant les ARNr 16S (métabarcoding) combinée à une analyse bioinformatique et statistique des données sera réalisée en collaboration avec Stéphanie Bornes de l'UMRF d'Aurillac.

En parallèle, le statut inflammatoire des souris infectées (déterminé par le dosage de marqueurs inflammatoires) et la production des métabolites (tels que les AGCC, le tryptophane et l'indole) par les microbiotes sera déterminé au niveau sanguin, pulmonaire et intestinal. L'intégrité des épithéliums intestinal et pulmonaire sera évaluée par mesure de l'expression des jonctions serrées et de la quantité de mucines (et surfactant pour les poumons) produits.

L'ensemble des données générées permettra d'identifier une ou des espèces microbiennes impliquées dans la colonisation intestinale de *K. pneumoniae* et/ou la modulation des réponses immunitaires intestinales et pulmonaires ainsi la transmission d'informations bactériennes et immunologiques à travers l'axe « intestin-poumon ».

L'identification de bactéries commensales immunomodulatrices permettra le développement de bactéries bénéfiques ou d'interventions nutritionnelles ciblées chez des patients atteints de pathologies respiratoires infectieuses et/ou inflammatoires.

Conclusion générale

L'immunité des muqueuses représente la première ligne de défense face aux pathogènes. L'identification des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans son activation représente une étape cruciale dans la compréhension des processus physiopathologiques des maladies infectieuses.

Mes projets en cours et futurs ont pour objectif de mettre en lumière des voies de régulation critiques et/ou des molécules clés impliquées dans la réponse des muqueuses face aux pathogènes tout en prenant en compte les interactions entre le pathogène, l'hôte et son microbiote dans une approche globale et intégrée pour comprendre le fonctionnement d'un holobionte et pouvoir ainsi le moduler à des fins thérapeutiques.

Les différentes plateformes de l'Université Clermont Auvergne (microscopie confocale, animalerie, cytométrie en flux...), les compétences du laboratoire ainsi que les différentes collaborations que nous avons développées sont un atout majeur pour le développement de ces projets.

Par ailleurs, la bactérie *K. pneumoniae* est utilisée comme modèle dans ces projets, mais les données recueillies pourront être transférables à d'autres pathogènes bactériens ou viraux également responsable de pathologies inflammatoires pulmonaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbe, C., & Mitchell, C. M. (2023). Bacterial vaginosis : A review of approaches to treatment and prevention. *Frontiers in Reproductive Health*, *5*, 1100029.
- Almeida-da-Silva, C. L. C., Savio, L. E. B., Coutinho-Silva, R., & Ojcius, D. M. (2023). The role of NOD-like receptors in innate immunity. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1122586.
- Arslanova, A., Tarasova, A., Alexandrova, A., Novoselova, V., Shaidulloev, I., Khusnutdinova, D., Grigoryeva, T., Yarullina, D., Yakovleva, O., & Sitdikova, G. (2021). Protective Effects of Probiotics on Cognitive and Motor Functions, Anxiety Level, Visceral Sensitivity, Oxidative Stress and Microbiota in Mice with Antibiotic-Induced Dysbiosis. *Life*, *11*(8), 764.
- Bellmeyer, A., Cotton, C., Kanteti, R., Koutsouris, A., Viswanathan, V. K., & Hecht, G. (2009). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* suppresses inflammatory response to cytokines and its own toxin. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *297*(3), G576-G581.
- Bengoechea, J. A., & Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology : Living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, *43*(2), 123-144.
- Cario, E., & Podolsky, D. K. (2000). Differential Alteration in Intestinal Epithelial Cell Expression of Toll-Like Receptor 3 (TLR3) and TLR4 in Inflammatory Bowel Disease. *Infection and Immunity*, *68*(12), 7010-7017.
- Castelli, V., d'Angelo, M., Quintiliani, M., Benedetti, E., Cifone, M., & Cimini, A. (2021). The emerging role of probiotics in neurodegenerative diseases : New hope for Parkinson's disease? *Neural Regeneration Research*, *16*(4), 628.
- Castronovo, G., Clemente, A. M., Antonelli, A., D'Andrea, M. M., Tanturli, M., Perissi, E., Paccosi, S., Parenti, A., Cozzolino, F., Rossolini, G. M., & Torcia, M. G. (2017). Differences in Inflammatory Response Induced by Two Representatives of Clades of the Pandemic ST258 *Klebsiella pneumoniae* Clonal Lineage Producing KPC-Type Carbapenemases. *PLOS ONE*, *12*(1), e0170125.
- Chen, G. Y. (2014). Role of Nlrp6 and Nlrp12 in the maintenance of intestinal homeostasis. *European Journal of Immunology*, *44*(2), 321-327.
- Codo, A. C., Saraiva, A. C., Dos Santos, L. L., Visconde, M. F., Gales, A. C., Zamboni, D. S., & Medeiros, A. I. (2018). Inhibition of inflammasome activation by a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae* impairs efferocytosis and leads to bacterial dissemination. *Cell Death & Disease*, *9*(12), 1182.
- Evrard, B., Balestrino, D., Dosgilbert, A., Bouya-Gachancard, J.-L. J., Charbonnel, N., Forestier, C., & Tridon, A. (2010). Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, *78*(1), 210-219.
- Fan, S. R., Liu, X. P., & Liao, Q. P. (2008). Human defensins and cytokines in vaginal lavage fluid of women with bacterial vaginosis. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, *103*(1), 50-54.
- Finlay, B. B., & McFadden, G. (2006). Anti-Immunology : Evasion of the Host Immune System by Bacterial and Viral Pathogens. *Cell*, *124*(4), 767-782.
- Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, *180*(6), 1044-1066.

- Gill, N., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2010). The future of mucosal immunology : Studying an integrated system-wide organ. *Nature Immunology*, *11*(7), 558-560.
- Gobert, A. P., Vareille, M., Glasser, A.-L., Hindré, T., De Sablet, T., & Martin, C. (2007). Shiga Toxin Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Inhibits PI3K/NF- κ B Signaling Pathway in Globotriaosylceramide-3-Negative Human Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, *178*(12), 8168-8174.
- Gunzer, F., Hennig-Pauka, I., Waldmann, K.-H., Sandhoff, R., Gröne, H.-J., Kreipe, H.-H., Matussek, A., & Mengel, M. (2002). Gnotobiotic Piglets Develop Thrombotic Microangiopathy After Oral Infection With Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *American Journal of Clinical Pathology*, *118*(3), 364-375.
- Hall, J. R., Rouillard, K. R., Suchyta, D. J., Brown, M. D., Ahonen, M. J. R., & Schoenfisch, M. H. (2020). Mode of Nitric Oxide Delivery Affects Antibacterial Action. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *6*(1), 433-441.
- He, W., Dong, H., Wu, C., Zhong, Y., & Li, J. (2023). The role of NLRP3 inflammasome in sepsis : A potential therapeutic target. *International Immunopharmacology*, *115*, 109697.
- Huang, J.-J., Xia, J., Huang, L.-L., & Li, Y.-C. (2019). HIF-1 α promotes NLRP3 inflammasome activation in bleomycin-induced acute lung injury. *Molecular Medicine Reports*, *20*(4), 3424-3432.
- Huynh, M., Crane, M. J., & Jamieson, A. M. (2023). The lung, the niche, and the microbe : Exploring the lung microbiome in cancer and immunity. *Frontiers in Immunology*, *13*, 1094110.
- Jamilloux, Y., & Henry, T. (2013). [The inflammasomes : Platforms of innate immunity]. *Medecine Sciences: M/S*, *29*(11), 975-984.
- Jamilloux, Y., Sève, P., & Henry, T. (2014). Les inflammasomes et les maladies humaines. *La Revue de Médecine Interne*, *35*(11), 730-741.
- Jiang, Q., Xu, Q., Kenéz, Á., Chen, S., & Yang, G. (2022). Klebsiella pneumoniae infection is associated with alterations in the gut microbiome and lung metabolome. *Microbiological Research*, *263*, 127139.
- Joseph, L., Merciecca, T., Forestier, C., Balestrino, D., & Miquel, S. (2021). From Klebsiella pneumoniae Colonization to Dissemination : An Overview of Studies Implementing Murine Models. *Microorganisms*, *9*(6), 1282.
- Kairys, N., Carlson, K., & Garg, M. (2024). Gardnerella Vaginalis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Karpman, D., & Ståhl, A.-L. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Pathogenesis and the Host Response. *Microbiology Spectrum*, *2*(5), 2.5.18.
- Kieninger, E., Vareille, M., Kopf, B. S., Blank, F., Alves, M. P., Gisler, F. M., Latzin, P., Casaulta, C., Geiser, T., Johnston, S. L., Edwards, M. R., & Regamey, N. (2012). Lack of an exaggerated inflammatory response on virus infection in cystic fibrosis. *The European Respiratory Journal*, *39*(2), 297-304.
- Kioui, D., Karapetsas, A., Karolidou, K., Panayiotidis, M., Pappa, A., & Galanis, A. (2019). Probiotics in Extraintestinal Diseases : Current Trends and New Directions. *Nutrients*, *11*(4), 788.

Kordy, K., Tobin, N. H., & Aldrovandi, G. M. (2019). HIV and SIV in Body Fluids : From Breast Milk to the Genitourinary Tract. *Current Immunology Reviews*, 15(1), 139-152.

Lagrafeuille, R., Miquel, S., Balestrino, D., Varelle-Delarbre, M., Chain, F., Langella, P., & Forestier, C. (2018). Opposing effect of Lactobacillus on in vitro Klebsiella pneumoniae in biofilm and in an in vivo intestinal colonisation model. *Beneficial Microbes*, 9(1), 87-100.

Lalonde, R., & Strazielle, C. (2022). Probiotic effects on anxiety-like behavior in animal models. *Reviews in the Neurosciences*, 33(6), 691-701.

Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman, A., Riaz, T., Aadil, R. M., Khan, I. M., Özogul, F., Rocha, J. M., Esatbeyoglu, T., & Korma, S. A. (2023). Probiotics : Mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1216674.

Leclerc, M., Bedu-Ferrari, C., Etienne-Mesmin, L., Mariadassou, M., Lebreuilly, L., Tran, S.-L., Brazeau, L., Mayeur, C., Delmas, J., Rué, O., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Ramarao, N. (2021). Nitric Oxide Impacts Human Gut Microbiota Diversity and Functionalities. *mSystems*, 6(5), e0055821.

Leseigneur, C., Lê-Bury, P., Pizarro-Cerdá, J., & Dussurget, O. (2020). Emerging Evasion Mechanisms of Macrophage Defenses by Pathogenic Bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 577559.

Luck, S. N., Badea, L., Bennett-Wood, V., Robins-Browne, R., & Hartland, E. L. (2006). Contribution of FliC to Epithelial Cell Invasion by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O113:H21. *Infection and Immunity*, 74(12), 6999-7004.

Lycke, N. (2012). Recent progress in mucosal vaccine development : Potential and limitations. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 592-605.

Muselius, B., Sukumaran, A., Yeung, J., & Geddes-McAlister, J. (2020). Iron Limitation in Klebsiella pneumoniae Defines New Roles for Lon Protease in Homeostasis and Degradation by Quantitative Proteomics. *Frontiers in Microbiology*, 11, 546.

Opoku-Temeng, C., Malachowa, N., Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2022). Innate Host Defense against *Klebsiella pneumoniae* and the Outlook for Development of Immunotherapies. *Journal of Innate Immunity*, 14(3), 167-181.

Porrini, C., Ramarao, N., & Tran, S.-L. (2020). Dr. NO and Mr. Toxic – the versatile role of nitric oxide. *Biological Chemistry*, 401(5), 547-572.

Rodionov, D. A., Dubchak, I. L., Arkin, A. P., Alm, E. J., & Gelfand, M. S. (2005). Dissimilatory Metabolism of Nitrogen Oxides in Bacteria: Comparative Reconstruction of Transcriptional Networks. *PLoS Computational Biology*, 1(5), e55.

Roussel, C., Cordonnier, C., Galia, W., Le Goff, O., Thévenot, J., Chalancon, S., Alric, M., Thevenot-Sergentet, D., Leriche, F., Van De Wiele, T., Livrelli, V., & Blanquet-Diot, S. (2016). Increased EHEC survival and virulence gene expression indicate an enhanced pathogenicity upon simulated pediatric gastrointestinal conditions. *Pediatric Research*, 80(5), 734-743.

Sato, A., Suwanto, A., Okabe, M., Sato, S., Nochi, T., Imai, T., Koyanagi, N., Kunisawa, J., Kawaguchi, Y., & Kiyono, H. (2014). Vaginal Memory T Cells Induced by Intranasal Vaccination Are Critical for Protective T Cell Recruitment and Prevention of Genital HSV-2 Disease. *Journal of Virology*, 88(23), 13699-13708.

- Schüller, S. (2011). Shiga Toxin Interaction with Human Intestinal Epithelium. *Toxins*, 3(6), 626-639.
- Sequeira, R. P., McDonald, J. A. K., Marchesi, J. R., & Clarke, T. B. (2020). Commensal Bacteroidetes protect against *Klebsiella pneumoniae* colonization and transmission through IL-36 signalling. *Nature Microbiology*, 5(2), 304-313.
- Seregin, S. S., Golovchenko, N., Schaf, B., Chen, J., Pudlo, N. A., Mitchell, J., Baxter, N. T., Zhao, L., Schloss, P. D., Martens, E. C., Eaton, K. A., & Chen, G. Y. (2017). NLRP6 Protects I10 Mice from Colitis by Limiting Colonization of *Akkermansia muciniphila*. *Cell Reports*, 19(4), 733-745.
- Shim, J. A., Ryu, J. H., Jo, Y., & Hong, C. (2023). The role of gut microbiota in T cell immunity and immune mediated disorders. *International Journal of Biological Sciences*, 19(4), 1178-1191.
- Silva-Sanchez, A., & Randall, T. D. (2020). Anatomical Uniqueness of the Mucosal Immune System (GALT, NALT, iBALT) for the Induction and Regulation of Mucosal Immunity and Tolerance. In *Mucosal Vaccines* (p. 21-54). Elsevier.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., & Langella, P. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731-16736.
- Spek, E. J., Wright, T. L., Stitt, M. S., Taghizadeh, N. R., Tannenbaum, S. R., Marinus, M. G., & Engelward, B. P. (2001). Recombinational repair is critical for survival of *Escherichia coli* exposed to nitric oxide. *Journal of Bacteriology*, 183(1), 131-138.
- Stecenko, A. A., King, G., Torii, K., Breyer, R. M., Dworski, R., Blackwell, T. S., Christman, J. W., & Brigham, K. L. (2001). Dysregulated cytokine production in human cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Inflammation*, 25(3), 145-155.
- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P.-Y. (2019). The NLRP3 inflammasome : Molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews. Immunology*, 19(8), 477-489.
- Taverniti, V., Marengo, M., Fuglsang, E., Skovsted, H. M., Arioli, S., Mantegazza, G., Gargari, G., Iametti, S., Bonomi, F., Guglielmetti, S., & Frøkiær, H. (2019). Surface Layer of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 Promotes Endocytosis by Dendritic Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(9), e00138-19.
- Tran, S.-L., & Ramarao, N. (2013). *Bacillus cereus* immune escape : A journey within macrophages. *FEMS Microbiology Letters*, 347(1), 1-6.
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L. P., Harris, N. L., & Marsland, B. J. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine*, 20(2), 159-166.
- Udayan, S., Buttó, L. F., Rossini, V., Velmurugan, J., Martinez-Lopez, M., Sancho, D., Melgar, S., O'Toole, P. W., & Nally, K. (2021). Macrophage cytokine responses to commensal Gram-positive *Lactobacillus salivarius* strains are TLR2-independent and Myd88-dependent. *Scientific Reports*, 11(1), 5896.

Vareille, M., de Sablet, T., Hindré, T., Martin, C., & Gobert, A. P. (2007). Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(24), 10199-10204.

Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M. R., & Regamey, N. (2011). The airway epithelium : Soldier in the fight against respiratory viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(1), 210-229.

Vareille, M., Rannou, F., Théliér, N., Glasser, A.-L., de Sablet, T., Martin, C., & Gobert, A. P. (2008). Heme oxygenase-1 is a critical regulator of nitric oxide production in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected human enterocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *180*(8), 5720-5726.

Vareille-Delarbre, M., Miquel, S., Garcin, S., Bertran, T., Balestrino, D., Evrard, B., & Forestier, C. (2019). Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* on Inflammatory Response Induced by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, *87*(11), e00570-19.

Watanabe, D., Guo, Y., & Kamada, N. (2021). Interaction between the inflammasome and commensal microorganisms in gastrointestinal health and disease. *EMBO Molecular Medicine*, *13*(12), e13452.

Wolff, N. S., Jacobs, M. C., Wiersinga, W. J., & Hugenholtz, F. (2021). Pulmonary and intestinal microbiota dynamics during Gram-negative pneumonia-derived sepsis. *Intensive Care Medicine Experimental*, *9*(1), 35.

Woo, V., Eshleman, E. M., Hashimoto-Hill, S., Whitt, J., Wu, S., Engleman, L., Rice, T., Karns, R., Qualls, J. E., Haslam, D. B., Vallance, B. A., & Alenghat, T. (2021). Commensal segmented filamentous bacteria-derived retinoic acid primes host defense to intestinal infection. *Cell Host & Microbe*, *29*(12), 1744-1756.e5.

Wu, T., Xu, F., Su, C., Li, H., Lv, N., Liu, Y., Gao, Y., Lan, Y., & Li, J. (2020). Alterations in the Gut Microbiome and Cecal Metabolome During *Klebsiella pneumoniae*-Induced Pneumosepsis. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1331.

ANNEXES

Publication n°1 : Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Vareille M, de Sablet T, Hindré T, Martin C and Gobert AP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007, 104 (24): 10199-10204.

Publication n°2 : Heme oxygenase is a critical regulator of NO production in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected human enterocytes. Vareille M, Rannou F, Théliier N, Glasser AL, de Sablet T, Martin C and Gobert AP.. J. Immunol. 2008, 180(8):5720-6.

Publication n°3: Lack of an exaggerated inflammatory response upon virus infection in cystic fibrosis. Kieninger E, Vareille M, Kopf BS, Blank F, Alves MP, Gisler FM, Latzin P, Casaulta C, Geiser T, Johnston SL, Edwards MR, Regamey N. Eur Respir J. 2012 Feb;39(2):297-304.

Publication n°4: The airway epithelium: Soldier in the fight against respiratory viruses. Vareille M, Kieninger E, Johnston SL, Edwards MR and Regamey N. Clin. Microbiol. Rev., 2011 Jan;24(1):210-29.

Publication n°5: *Lactobacillus rhamnosus Lcr35*® stimulates epithelial vaginal defenses upon *Gardnerella vaginalis* infection. Miquel S, Verlaquet J, Garcin S, Evrard B, Forestier C and Vareille-Delarbre M. Infect Immun, 2022;90(9):e0030922.

Publication n°6: Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* on Inflammatory Response Induced by *Klebsiella pneumoniae*. Vareille-Delarbre M, Miquel S, Garcin S, Bertran T, Balestrino D, Evrard B, Forestier C. Infect Immun. 2019 Oct 18;87(11):e00570-19.