



**HAL**  
open science

# Vers une approche holistique de l'étude de l'interaction hôte pathogène et applications médicales

Audrey Le Gouellec

## ► To cite this version:

Audrey Le Gouellec. Vers une approche holistique de l'étude de l'interaction hôte pathogène et applications médicales. Bactériologie. Université Grenoble Alpes, 2021. <tel-04955358>

**HAL Id: tel-04955358**

**<https://hal.science/tel-04955358v1>**

Submitted on 18 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.



HAL Authorization

# Habilitation à Diriger des Recherches

Délivrée par  
Université Grenoble Alpes



École doctorale  
Ingénierie pour la Santé, la Cognition, et l'Environnement

**Discipline ou spécialité :**  
Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

---

Présenté par  
Dr. Audrey LE GOUELLEC épouse LE PISSART  
Née le 19 Février 1981  
à Sainte Foy les Lyon (69)

Le 4 Octobre 2021

intitulé  
**Vers une approche holistique de l'étude de l'interaction hôte  
pathogène et applications médicales**

---

## MEMBRES DU JURY

Dr Anne DOLEANS-JORDHEIM, MCU-PH Université Claude Bernard Lyon1	Rapporteur
Pr Sophie BLEVES, Professeur Université Aix Marseille	Rapporteur
Pr Mustapha SI TAHAR, Professeur Université Tour	Rapporteur
Pr Olivier EPAULARD, PU-PH Université Grenoble Alpes	Examineur
Pr Johannes GESEILMAN, Professeur Université Grenoble Alpes	Examineur
Pr Bertrand TOUSSAINT, PU-PH en Biochimie, Université Grenoble Alpes	Examineur

---

Unité de recherche : Laboratoire TIMC (UMR 5525) CNRS/UGA/VetAgroSup  
Équipe de recherche **Translational microbial Evolution and Engineering (TrEE)**

## Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement toutes celles et ceux qui par leur présence, par leur travail, par leur passion de la vérité et par leur envie de faire progresser la Science et le progrès de l'humanité ont su m'aider à lutter contre l'obscurantisme et ainsi contribuer à la réalisation de ce manuscrit. Je vous suis éternellement reconnaissante d'être là et je vous dédie ces quelques mots dans ce mémoire.

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres de mon jury, le docteur Anne DOLEANS-JORDHEIM pour avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteur. Dr Doleans-Jordheim est MCU-PH en bactériologie à l'université de Lyon et spécialiste de l'étude des microbiotes des voies respiratoires et de l'interaction bactérienne dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Je vous remercie Anne, d'avoir accepté d'être rapporteur de mon mémoire. Vous qui êtes sensible à la difficulté de tenir une position de MCU-PH, à la triple mission d'enseignant, de chercheur et de praticien hospitalier.

J'ai eu la chance de rencontrer le Pr Sophie BLEVES dans notre groupe de recherche *Pseudomonas* à de maintes reprises et dans des conditions souvent très agréables. C'est un honneur que le Pr Bleves me fait en acceptant d'être rapporteur. Elle, qui est spécialiste des facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, saura apprécier la qualité et la quantité du travail mené depuis 12 ans maintenant dans notre équipe sur le Système de Sécrétion de type 3 et son détournement pour en faire un vaccin.

J'ai également eu la chance de rencontrer Pr Mustapha SI TAHAR dans un congrès de Vaincre la mucoviscidose, nos chemins se sont souvent croisés par ailleurs comme récemment encore, lors de notre séminaire pédagogique sur l'inflammation organisé par le Collège National des Maîtres de conférence et Professeur de Biochimie et Biologie Moléculaire Médicale (section CNU 44.01). Pr Si Tahar est un expert de l'inflammation et travail sur le concept de métabokines, concept cher à mon cœur comme vous en conviendrez sûrement à la fin de la lecture de ce mémoire.

Au professeur Olivier EPAULARD, je voudrais te remercier pour toutes nos interactions depuis mon arrivée au laboratoire TIMC en 2008 où nous nous sommes croisés pour la première fois jusqu'à nos travaux récents sur la COVID. Ton humilité, ta bienveillance et ton génie font de toi un homme extraordinaire, en tous cas que j'admire. Je suis si fière que tu aies accepté de juger mon travail et si honorée de ta présence dans mon jury.

Au professeur Johannes GESEILMAN, il y a 13 ans, tu acceptais d'être président de mon jury de thèse. Je me souviens de tous tes cours à l'université qui m'ont donné l'envie et la passion d'exercer ce métier. Merci d'avoir accepté de juger ce mémoire, je suis honorée de ta présence.

Au professeur Bertrand TOUSSAINT, je voudrais te remercier d'être là au quotidien, de m'avoir intégrée dans cette équipe TrEE. Sans toi, la passion et la recherche de la vérité n'auraient pas la même saveur. Tu es un guide pour moi, et j'essaye chaque jour de mettre mes pas dans les tiens pour ne pas m'égarer sur le chemin de la connaissance. Je compte sur toi encore quelques années et du fond du cœur MERCI pour être tel que tu es, un chef compréhensif, bienveillant et talentueux. Tu es une des rares personnes à savoir me faire douter de tout et pour ça merci.

Au professeur Benoît POLACK, ton récent départ à la retraite m'a fait prendre conscience de la chance que j'ai eu de te croiser, toi éminent hématologue, qui a su croire en moi et m'aider à trouver ma place au sein de la communauté des biologistes des hôpitaux du CHU de Grenoble. Merci de m'avoir accordé ta confiance et bon vent Benoît.

A tous mes collègues passés de l'IBS, du groupe pneumocoque, A. Zapun, T. Vernet, A.M Di Guilmi, C. Morlot, C. Durmort, B. Gallet, M. Noirclerc-Savoie mais également du CEA Grenoble I. Attree, E. Faudry, P. Hubert, S. Elsen, F. Cretin, V. Job, A. Dessen, avec qui j'ai toujours aimé dialoguer et parler de Science, de biochimie et des microbes.

A tous mes collègues présents ou passés du laboratoire TIMC, de notre équipe de recherche J.L Lenormand, B. Schaack, M. Cornet, D. Aldebert, H. Coradin, D. Hannani, M.C Dagher, M.J Stasia, J. Brault, C. Mercier, H. Mathé, F. Pierrel, N. Varoquaux, S. Abby, D. Schneider, A. Suau Pernet, I. Junier, L. Pelosi, M. Martin, F. Blanquet et tous les étudiants que j'ai eu la chance d'encadrer ou de croiser au laboratoire. Merci pour les bons moments passés ensemble autour de gâteaux ou dans des soirées endiablées de l'équipe. Une mention spéciale, pour Xavier, Oriane, Clément mes 3 premiers thésards. Mais aussi les médecins Elodie, Boubou, Geoffroy et les autres ...

A mes collègues des autres équipes du TIMC ou d'ailleurs comme B. Favier, X. Romand, M.H. Paquet, B. Lardy, A. Baillet, C. Trocme, S. Berthier. Sylvie, ma Team-mate de l'IBP avec qui j'ai pu nouer une relation particulière en ces temps COVID au CHU.

A mes collègues de la plateforme de Métabolomique, sans qui aujourd'hui rien n'existerait, V. Cunin, S. Michelland, M. Sève, P. Faure, F. Fiorini, C. Plazy, A. Agasse, A. Metz, C. Combaz, P. Grenard-Ecuyer, C. Botté, B. Elena-Hermann et P. Hainaut.

A tous mes amis, présents au quotidien, qui m'aident à relâcher la pression. Cette année passée a été probablement la plus éprouvante de ma carrière et sans vous je n'aurais pas tenu le choc. Vous êtes là dans les bons et les mauvais moments. Et comme disait Evelyne Pisier « L'intensité d'une amitié, ça vous fait une joie pour mille ans, c'est comme un amour, ça vous rentre par le nombril et vous inonde tout entier » Alors pour cela, je tenais à vous remercier. Merci à Mick&Co, à Carine&Fred, à Sandrine&Hervé, à Marie Christine, Nadège, Isabelle&Chrichri, Gilles&Flo, Mel&Olivier, Karine, Amandine, Poupak, Liliane&Hub, Edith&Ju, Elsa&Alain, Laura&Christophe, Myriam, nos chers voisins, et j'en oublie sûrement. Les phénomènes sont et resteront dans mon cœur à jamais.

A toute ma famille, mes frères Valentin, Maxime, Benoit et Arnaud, et à mes parents sans qui je ne saurais être moi, hypersensible et passionnée de tout. Vous avez su m'inculquer le goût des choses, le goût de la vie et la curiosité à l'infini, qualités qui me semblent indissociables du métier de chercheur. Sans compter la transmission de vos valeurs sur l'envie d'aider et surtout d'aimer les autres.

À mon Amour, la vie nous a rassemblés très tôt. Quel cadeau ! Grâce à toi, je trouve mon équilibre au quotidien, tu es tour à tour, ma bouée, ma canne, mon air pur. Tu me nourris et m'ensorcelle. Parce que c'est toi parce que je t'aime. Si je n'ai qu'un vœu à prononcer alors ça serait que tu sois à mes côtés pour l'éternité.

À mes amours, Pauline et Emma. La Science n'est rien à côté de ces deux petites merveilles. Je suis si fière de vous, de ce que vous êtes « en devenir ». Être maman, c'est être là au quotidien pour les petits et les grands moments de la vie. Donner la vie, transmettre, a été pour moi le plus beau des cadeaux que la vie m'ait faite. Je vous aime de tout mon cœur.



C'est la foi scientifique qui donne l'ardeur au travail, l'imagination qui inspire les idées, la persévérance qui les poursuit, la critique qui les contrôle, la rigueur expérimentale qui les prouve et aussi l'indépendance et le désintéressement qui sont une conséquence de l'amour passionnée de la vérité ».

Émile Roux

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>2</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Motivation de la demande</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Curriculum vitae</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Activités de recherche : production et implication scientifique</b> .....	<b>12</b>
3.1. <i>Liste des publications et brevets</i> .....	12
3.2. <i>Responsabilités administratives et collectives</i> .....	15
3.3. <i>Collaborations internationales</i> .....	15
3.4. <i>Subventions obtenues pour mes projets de recherche</i> .....	16
3.5. <i>Rayonnement depuis ma nomination en 2016</i> .....	17
3.6. <i>Valorisation et communication orales et affichées</i> .....	18
3.7. <i>Membres de sociétés savantes</i> .....	19
<b>4. Activités pédagogiques</b> .....	<b>20</b>
4.1. <i>Formation à la pédagogie</i> .....	20
4.2. <i>Liste des Enseignements et responsabilités</i> .....	20
4.3. <i>Encadrement doctoral et scientifique</i> .....	23
4.1. <i>Participation à des jurys de thèse</i> .....	26
4.2. <i>Innovation et recherche pédagogiques</i> .....	26
<b>5. Activités de diagnostic et de soins</b> .....	<b>27</b>
5.1. <i>Activité de biochimie de routine et d'urgence</i> .....	28
5.2. <i>Description qualitative et quantitative de l'activité</i> .....	28
<b>6. Synthèse des travaux de recherche</b> .....	<b>29</b>
<i>Préambule et mise en contexte historique</i> .....	29
<i>Synthèse des travaux de recherche</i> .....	32
6.1. <i>Master 2 Ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement : Activité D,D-carboxypeptidase de l'enzyme « Penicillin binding protein-3 » de S. pneumoniae</i> .....	32
6.1.1. <i>Contexte : Synthèse de peptidoglycane par S. pneumoniae</i> .....	32
6.1.2. <i>Présentation des travaux de Master 2</i> .....	33
6.2. <i>Doctorat en sciences : Étude de la division bactérienne et du rôle de trois protéines de la division, DivIB, DivIC et FtsL chez S. pneumoniae</i> .....	33
6.2.1. <i>Contexte épidémiologique et intérêt de l'étude de la division chez S. pneumoniae</i> .....	34
6.2.2. <i>Présentation des travaux de thèse</i> .....	37
6.3. <i>Travaux de recherche actuels</i> .....	47
<i>Partie 1. Étude de l'interaction de Pseudomonas aeruginosa avec son hôte</i> .....	47
6.3.1. <i>Contexte de mes travaux</i> .....	50
6.3.2. <i>Présentation de mes travaux</i> .....	71
<i>Partie 2. Applications médicales</i> .....	94
6.3.3. <i>BacVac : un vaccin thérapeutique anti-cancer</i> .....	94
6.3.4. <i>BacVac : un vaccin anti-Pseudomonas aeruginosa</i> .....	119
6.3.5. <i>Stratégies de modulation du microbiote</i> .....	132
<b>7. Projet de recherche (perspectives)</b> .....	<b>135</b>
7.1. <i>Physiopathologie des infections à P. aeruginosa</i> .....	136
7.2. <i>Ingénierie microbienne à visée thérapeutique</i> .....	138
7.2.1. <i>Développement d'un vaccin anti-P. aeruginosa</i> .....	139
7.2.2. <i>Développement d'un probiotique ingénieré</i> .....	139
7.3. <i>Mise en œuvre du projet de recherche : renforcer le développement de la métabolomique</i> .....	140
7.3.1. <i>Projet Grenoble Excellence in Metabolomics and Lipidomics (GEMELI)</i> .....	140
7.3.2. <i>Un exemple : Projet de recherche clinique COVID-19</i> .....	147
<b>8. Conclusion</b> .....	<b>150</b>
<b>9. Références</b> .....	<b>151</b>

# Abréviations

**CD** : Cellules dendritiques  
**CF** : Cystic Fibrosis ou mucoviscidose en français  
**CFTR** : « Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator »  
**CFU**: Colonie formant unité  
**COFRAC** : Comité Français accréditation  
**CRP** : Protéine C-réactive  
**ELISpot** : Enzyme-linked immunosorbent spot  
**ERA** : Espèces réactives de l'azote  
**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène  
**IDEX** : Initiative d'excellence  
**ILC** : Innate lymphoid cell  
**KBMA** : « Killed but metabolically active »  
**LC-MS** : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse  
**LCR** : Liquide céphalorachidien  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**MCU-PH** : Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier  
**MMA**: Morte mais métaboliquement active  
**MOI** : multiplicity of infection  
**NLR** : Nod-like receptor  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**QS** : Quorum sensing  
**PBS** : Phosphate Buffer solution  
**RFMF** : Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique  
*s.c.* : Sous cutanée  
**SST3** : Système de sécrétion de type 3  
**TCM** : cellules T CD8+ spécifiques à mémoire centrale  
**T<sub>EFF</sub>** : cellules T CD8+ effectrices  
**TEM** : cellules T CD8+ spécifiques à mémoire effectrice  
**TIL** : Lymphocyte infiltrant la tumeur  
**Th** : Lymphocyte T helper ou auxiliaire  
**TheREx** : Thérapeutiques Recombinantes Experimentales  
**TIMC** : Translational Innovation in Medicine and Complexity  
**TLR** : Toll-like receptor  
**TrEE** : Translational microbial Evolution and Engineering  
**UGA** : Université Grenoble Alpes  
**VEMS** : Volume expiratoire maximal par seconde

# 1. Motivation de la demande

Cette démarche de candidature au diplôme d'habilitation à diriger des recherches s'inscrit dans la suite logique de mon parcours professionnel avec l'intention de construire une équipe de recherche translationnelle en santé en lien avec mes activités de prise en charge des patients hospitalisés et de formations notamment des jeunes chercheurs.

Mon parcours scientifique et clinique est orienté vers la biochimie médicale et les biotechnologies.

Sur le plan scientifique, j'ai effectué au cours de mes études des stages dans l'industrie pharmaceutique et dans des laboratoires académiques et notamment durant mon doctorat à l'institut de Biologie Structurale de Grenoble, et dans la spécialité biochimie et biologie moléculaire. Cela m'a permis d'acquérir un savoir-faire et des connaissances du monde académique de la recherche et du fonctionnement d'une équipe de recherche. J'ai intégré l'équipe TheREx du laboratoire TIMC (UMR5525 CNRS-UGA), en 2008, équipe spécialisée dans l'étude du dialogue inter-règne et dans la mise au point de thérapies recombinantes expérimentales et autres applications médicales. Ceci m'a permis d'approfondir mes connaissances des molécules de dialogue hôte-pathogène et des facteurs de virulence, en particulier dans le modèle d'infection chronique des patients atteints de mucoviscidose à *Pseudomonas aeruginosa*. Depuis ma nomination en tant que MCU-PH, je mène mes activités de recherche sur l'étude et le contrôle de la réponse aux signaux de danger au travers d'un axe fondamental s'appuyant sur le modèle de la réponse à l'infection et d'un axe plus bioclinique où d'autres situations physiopathologiques comme l'inflammation aigüe ou chronique. A chaque fois les développements de biotechnologies pour la santé (outils thérapeutiques ou diagnostiques) sont envisagés. J'ai réalisé 14 demandes de financements et obtenu des aides publiques pour un montant total de 756 k€ en 8 ans. J'ai valorisé mes travaux lors de communications orales dans des congrès nationaux et internationaux (28 au total) et par des communications affichées (Nombre =21), et ai publié plus de 30 publications scientifiques (IF moy 6,7 ; score SIGAPS 302) et suis co-inventrice de 3 brevets.

Sur le plan de mes activités de soin, je participe à l'activité de l'unité médicale Biochimie des Enzymes et des Protéines (dirigée par Pr Toussaint) du service de Biochimie, Biologie moléculaire et Toxicologie Environnementale (SB2TE). Je participe à la validation de 36 paramètres du soin quotidien, à l'accréditation COFRAC (validation de méthode, SH Form). Responsable scientifique de la plateforme de spectrométrie de masse de la Métabolomique grenobloise (GEMELI-GExiM), je renforce et développe des méthodes d'analyse en métabolomique non ciblée et participe à des projets de médecine systémique. Mon objectif est de pouvoir obtenir le diplôme d'HDR au cours de l'année 2021.

Audrey Le Pissart née Le Gouëllec



## 2. Curriculum vitae

### AUDREY LE GOUELLEC épouse LE PISSART

Née le 19/02/1981 à Saint Foy les Lyon (69)

Nationalité : Française

Mariée et mère de 2 enfants

### COORDONNÉES

**Adresse personnelle :** 595 Route du bouloud 38410 SAINT MARTIN URIAGE

**Portable:** +33.6.86.76.31.71

**Tel:** +33.4.76.89.17.76

**Mail :** [audrey.legouellec@gmail.com](mailto:audrey.legouellec@gmail.com)

#### Université

Adresse :

Faculté de médecine de l'université Grenoble Alpes

Laboratoire TIMC UMR 5525 (CNRS-UGA)

Equipe TrEE (Translational microbial Evolution and Engineering)

Insitut Jean Roget 8<sup>ème</sup> étage 38700 LA TRONCHE

Téléphone : +33(0)4 76 63 75 58



#### Hôpital

Adresse :

CHU Grenoble Alpes

Institut de Biologie et de Pathologie

Service de Biochimie, Biologie moléculaire, et Toxicologie Environnementale (SB2TE)

Unité Médicale de Biochimie des Enzymes et des Protéines

CS10217

38043 GRENOBLE CEDEX 9

Téléphone : +33 (0)4 76 76 63 76

Courriel : [Alegouellec@chu-grenoble.fr](mailto:Alegouellec@chu-grenoble.fr)



### SITUATION ACTUELLE

Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier depuis le 1/09/2016 1<sup>ère</sup> classe

Discipline : section CNU 44-01 Biochimie-Biologie moléculaire

### FORMATION ET DIPLOMES

- |           |                                                                                                                                                        |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2013      | Diplôme Universitaire (DU) Pédagogie médicale UFR de Médecine de Grenoble                                                                              |
| 2010      | Diplôme Universitaire (DU) Expérimentation animale Niveau I n°381120                                                                                   |
| 2004-2008 | Doctorat ès Sciences de l'université Joseph Fourier de Grenoble (soutenue le 28 mai 2008 ) : « Rôle d'un complexe de trois protéines centrales dans la |

division du pneumocoque : DivIB, DivIC et FtsL. Cible thérapeutique ? »  
UMR5075 (CEA, CNRS et Université Joseph Fourier I) Institut de biologie  
structurale de Grenoble, Laboratoire d'ingénierie des macromolécules. (Thèse  
co-dirigée par Thierry Vernet et André Zapun)

2004 Master 2 Recherche Ingénierie pour la Santé et le Médicament option  
Biotechnologie Santé et Management. (Major de promotion).  
« Caractérisation fonctionnelle de l'enzyme « Protéine liant la pénicilline » ou  
PBP3, impliquée dans le remodelage de la paroi bactérienne » Encadrant A. Zapun

2001-2004 Double diplôme Magistère Biotechnologie Santé et création d'entreprise  
Grenoble Ecole Management (réseau des IAE) et Université Joseph Fourier

## PARCOURS PROFESSIONNEL

06-09/2019 Chercheur Visiteur international 3 mois dans le laboratoire de Pieter Dorrestein,  
Université de Californie San Diego (UCSD), Californie, États-Unis.

2017-Présent Coach de l'équipe iGEM Grenoble pour la compétition international de  
biologie de synthèse iGEM.

Depuis 09/2016

### **Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier**

- *Rattachement hospitalier* : CHU Grenoble Alpes, Institut de Biologie et de Pathologie, Service de Biochimie, Biologie moléculaire, et Toxicologie Environnementale (SB2TE), Unité Médicale de Biochimie des Enzymes et des Protéines (Pr Toussaint)
- *Rattachement pédagogique* : Faculté de médecine, Biochimie médicale, Université Grenoble Alpes (UGA) (Pr Toussaint)
- *Rattachement scientifique* : Équipe TrEE Laboratoire TIMC UMR 5525 (CNRS, UGA) (Pr Toussaint)

2014-2016

### **Chef de Clinique associé**

- *Rattachement hospitalier* : CHU Grenoble Alpes, Institut de Biologie et de Pathologie, Service de Biochimie, Biologie moléculaire, et Toxicologie Environnementale (SB2TE), Unité Médicale de Biochimie des Enzymes et des Protéines (Pr Toussaint)
- *Rattachement pédagogique* : Faculté de médecine, Biochimie médicale, Université Grenoble Alpes (UGA) (Pr Toussaint)
- *Rattachement scientifique* : Équipe TheREx Laboratoire TIMC UMR 5525 (CNRS, UGA) (Pr Toussaint)

07/2013-05/2014

### **Responsable projet R&D Floralis, UJF Filiale SAS**

03/2013-06/2013

**Chargé de recherche R&D Bioscience**, Biomérieux, Centre Christophe Mérieux.

2008-2012

**Assistante hospitalo-universitaire**

- *Rattachement hospitalier* : CHU Grenoble Alpes, Institut de Biologie et de Pathologie, Service de Biochimie, Biologie moléculaire, et Toxicologie Environnementale (SB2TE), Unité Médicale de Biochimie des Enzymes et des Protéines (Pr Toussaint)
- *Rattachement pédagogique* : Faculté de médecine, Biochimie médicale, Université Grenoble Alpes (UGA) (Pr Toussaint)
- *Rattachement scientifique* : Équipe TheREx Laboratoire TIMC UMR 5525 (CNRS, UGA) (Pr Toussaint)

2008

**Ingénieur de recherche** Post-doc financement ANR « Émergence et Maturation de Projets de biotechnologie à fort potentiel de valorisation » Équipe TheREx Laboratoire TIMC UMR 5525 (CNRS, UGA) (Pr Toussaint)

2004-2008

**Ingénieur de recherche** (en thèse) – UMR5075 (CEA, CNRS et Université Joseph Fourier I) Institut de biologie structurale de Grenoble, Laboratoire d'ingénierie des macromolécules : Identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour de nouvelles antibiothérapies contre le pneumocoque. Collaborations internationales avec le groupe du Dr Paolozzi (Université de Rome, Italie) et le Dr Massidda (Université de Cagliari, Italie).

Printemps 2004

**Ingénieur de recherche** (stagiaire) UMR5075 (CEA, CNRS et Université Joseph Fourier I) Institut de biologie structurale de Grenoble, Laboratoire d'ingénierie des macromolécules. « Caractérisation fonctionnelle d'une enzyme impliquée dans le remodelage de la paroi bactérienne ».

Été 2003

**Chef de Projet** (stagiaire) – Protein'eXpert (CA 1,5 M€, 20 salariés)  
Évaluation d'un nouveau vecteur d'expression de protéines recombinantes.

Printemps 2003

**Ingénieur de recherche** (stagiaire) – UMR5075 (CEA, CNRS et Université Joseph Fourier I) Institut de biologie structurale de Grenoble, Laboratoire d'ingénierie des macromolécules. « Caractérisation d'une enzyme impliquée dans la résistance aux antibiotiques type pénicilline. »

Été 2001

**Assistant de recherche** (stagiaire) – Mymetics Recherche et Analyse de documentation relative à la protéine Gp41 du HIV

### 3. Activités de recherche : production et implication scientifique

#### 3.1. Liste des publications et brevets

Voir comment accéder au PDF entiers<sup>1</sup> ou au dossier [Liste des publications](#)

**P1** : Pernot, L., Chesnel, L., **Le Gouellec, A.**, Croize, J., Vernet, T., Dideberg, O., & Dessen, A. (2004). A PBP2x from a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* exhibits an alternative mechanism for reduction of susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16463–16470. <http://doi.org/10.1074/jbc.M313492200> (SIGAPS B, IF 6,35)

**P2** : Noirclerc-Savoie, M., **Le Gouellec, A.**, Morlot, C., Dideberg, O., Vernet, T., & Zapun, A. (2005). In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 55(2), 413–424. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04408.x> (SIGAPS B, IF 6,2) 2ème auteur

**P3** : Morlot, C., Pernot, L., **Le Gouellec, A.**, Di Guilmi, A. M., Vernet, T., Dideberg, O., & Dessen, A. (2005). Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 15984–15991. <http://doi.org/10.1074/jbc.M408446200> (SIGAPS B, IF 5,85)

**P4** : **Le Gouellec, A.**, Roux, L., Fadda, D., Massidda, O., Vernet, T., & Zapun, A. (2008). Roles of pneumococcal DivIB in cell division. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4501–4511. <http://doi.org/10.1128/jb.00376-08> (SIGAPS B, IF 3,63) 1er auteur

**P5** : Masson, S., Kern, T., **Le Gouellec, A.**, Giustini, C., Simorre, J. P., Callow, P., ... Zapun, A. (2009). Central Domain of DivIB Caps the C-terminal Regions of the FtsL/DivIC Coiled-coil Rod. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), 27687–27700. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.019471> (SIGAPS B, IF 5,32)

**P6** : Derouazi, M., Wang, Y., Marlu, R., Epaulard, O., Mayol, J-F., Pasqual, N., **Le Gouellec, A.**, Polack, B. and Toussaint, B., “Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector Application to TRP-2,” *Bioeng. Bugs*, vol. 1, no. 1, pp. 51–60, 2010.

**P7** : **Le Gouellec, A.**, Chauchet, X., Polack, B., Buffat, L., & Toussaint, B. (2012). Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(10), 1454–1458. <http://doi.org/10.4161/hv.21429> (SIGAPS D, IF 2,1) 1er auteur

**P8** : Wang, Y., **Le Gouellec, A.**, Chaker, H., Asrih, H., Polack, B., & Toussaint, B. (2012). Optimization of Antitumor Immunotherapy Mediated by Type III Secretion System-based Live Attenuated Bacterial Vectors. *Journal of Immunotherapy*, 35(3), 223–234. <http://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31824747e5> (SIGAPS C, IF 3,46) 2ème auteur

**P9** : **Le Gouellec, A.**, Polack, B., & Toussaint, B. (2012). Regulation of the expression of type 3 secretion system : an exemple from *P. aeruginosa*. *Regulation of Bacterial Virulence*. Book ASM

**P10** : **Le Gouellec, A.**, Chauchet X, Laurin D, Asporid C, Verove J, Wang Y, Genestet C, Trocme C, Ahmadi M, Martin S, Broisat A, Cretin F, Ghezzi C, Polack B, Plumaz J, Toussaint B. A safe bacterial microsyringe for in vivo antigen delivery and immunotherapy *Mol Ther*. 2013 May;21(5):1076-86. (SIGAPS A IF 6,42) 1er auteur + [Couverture de la revue](#)

**P11** : Polack B. Berthoin L., **Le Gouellec, A.**, Lenormand J.-L., Toussaint B., Garban F., L. D. (2013). IPS sécurisées : perspectives pour la thérapie cellulaire. *Transfusion Clinique et Biologique*.

**P12** : Toussaint, B., Chauchet, X., Wang, Y., Polack, B., & **Le Gouellec, A.** (2013). Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector. *Expert Rev Vaccines*, 12(10), 1139–1154. <http://doi.org/10.1586/14760584.2013.836914> (SIGAPS B, IF 4,2) Dernier auteur

**P13** : Wang, Y., Toussaint, B., & **Le Gouellec, A.** (2014). Bacterial vectors for the delivery of tumor antigens. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1139, 429–441. [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-0345-0\\_33](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-0345-0_33) (SIGAPS NC) Dernier auteur

**P14** : Genestet, C., **Le Gouellec, A.**, Chaker, H., Polack, B., Guery, B., Toussaint, B., & Stasia, M. J. (2014). Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 400–410. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.003> (SIGAPS B, IF 5,7) 2ème auteur

---

<sup>1</sup> En cliquant sur les numéros des publications et plus généralement sur les textes en bleu soulignés, vous avez accès au PDF en ligne directement.

- P15** : Boulet, L., Flore, P., **Le Gouellec, A.**, Toussaint, B., Pepin, J. L., & Faure, P. (2015). Is tryptophan metabolism involved in sleep apnea-related cardiovascular co-morbidities and cancer progression? *Med Hypotheses*, 85(4), 415–423. <http://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.06.022> (SIGAPS E, IF 1,1)
- P16** : Chauchet, X., Hannani, D., Djebali, S., Laurin, D., Polack, B., Marvel, J., ... **Le Gouellec, A.** (2016). Poly-functional and long-lasting anticancer immune response elicited by a safe attenuated *Pseudomonas aeruginosa* vector for antigens delivery. *Mol Ther Oncolytics*, 3, 16033. <http://doi.org/10.1038/mto.2016.33> (SIGAPS E, IF 1,25) Dernier auteur
- P17** : Bortolotti, P., Hennart, B., Thieffry, C., Jausions, G., Faure, E., Grandjean, T., ... **Le Gouellec, A.** (2016). Tryptophan catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and potential for inter-kingdom relationship. *BMC Microbiol*, 16(1), 137. <http://doi.org/10.1186/s12866-016-0756-x> (SIGAPS C, IF 2,64) Dernier auteur
- P18** : Berthoin, L., Toussaint, B., Garban, F., **Le Gouellec, A.**, Caulier, B., Polack, B., & Laurin, D. (2016). Targeted release of transcription factors for cell reprogramming by a natural micro-syringe. *Int J Pharm*, 513(1–2), 678–687. (SIGAPS B, IF 3,65)
- P19** : Richard, E., Pifferi, C., Fiore, M., Samain, E., **Le Gouellec, A.**, Fort, S., ... Priem, B. (2017). Chemobacterial Synthesis of a Sialyl-Tn Cyclopeptide Vaccine Candidate. *Chembiochem*, 18(17), 1730–1734. <http://doi.org/10.1002/cbic.201700240> (SIGAPS D, IF 2,77)
- P20** : **Le Gouellec, A.**, Toussaint, B., & Park, S. (2017). Cibler les mécanismes immunosuppresseurs de la réponse immune antitumorale en onco-hématologie : une nouvelle stratégie thérapeutique ? Immune checkpoint blockade in onco-hematology therapy. *Innovations et Thérapeutiques En Oncologie*, 3(Numéro 2). <http://doi.org/10.1684/ito.2017.0078> (SIGAPS NC) 1er auteur
- P21** : Meynet, E., Laurin, D., Lenormand, J. L., Camara, B., Toussaint, B., & **Le Gouellec, A.** (2018). Killed but metabolically active *Pseudomonas aeruginosa*-based vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. *Vaccine*, 36(14), 1893–1900. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.040> (SIGAPS C, IF 3,27) Dernier auteur
- P22** : Cachat, J., Deffert, C., Alessandrini, M., Roux-Lombard, P., **Le Gouellec, A.**, Stasia, M. J., ... Krause, K. H. (2018). Altered Humoral Immune Responses and IgG Subtypes in NOX2-Deficient Mice and Patients: A Key Role for NOX2 in Antigen-Presenting Cells. *Front Immunol*, 9, 1555. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01555> (SIGAPS C, IF 4,71)
- P23** : **Le Gouellec, A.**, Moyne, O., Meynet, E., Toussaint, B., & Fauvelle, F. (2018). HR-MAS NMR-based metabolomics reveals metabolic changes in lung of mice infected with *P. aeruginosa* consistent with the degree of disease severity, and is a powerful evaluation tool for new treatment. *J Proteome Res*. <http://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00306> (SIGAPS B, IF 3,78) 1er auteur
- P24** : Marlu, R., Malvezzi, P., Seyve, L., Jouve, T., Maurizi, J., Defendi, F., **Le Gouellec, A.** ... Rostaing, L. (2018b). Effect of double-filtration plasmapheresis for antibody-mediated rejection on hemostasis parameters and thrombin generation. *Thromb Res*, 166, 113–121. <http://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.04.018> (SIGAPS C, IF 3,26)
- P25** : Marlu, R., Malvezzi, P., Seyve, L., Jouve, T., Maurizi, J., Defendi, F., **Le Gouellec, A.**... Rostaing, L. (2018a). Corrigendum to “Effect of double-filtration plasmapheresis for antibody-mediated rejection on hemostasis parameters and thrombin generation” [*Thromb. Res.* 166 (2018) 113-121]. *Thromb Res*, 171, 200. <http://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.05.033>
- P26** : Fuertes E., Carsin A.E., Garcia Larsen V., Guerra S., Pin I., Leynaert B., Accordini S., Martinez-Moratalla J., M Anto J., Urrutia I., **Le Gouellec A.**, Heinrich J., Gislason T., Jögi R., Janson C., Jarvis D., Garcia-Aymerich J., "Mediation analysis of CRP on the association of physical activity with FEV1 and FVC: the ECRHS study." *European Respiratory Journal* 2018 52 : PA4483
- P27** : Deloule V, Boisset C, Hannani D, Suau A, **Le Gouellec A**, Chroboczek J, Botté C, Yamaryo Y, Chirat C, “Prebiotic role of softwood hemicellulose in healthy mice model,” *J. Funct. Foods*, vol. 64, 2020. (SIGAPS NC)
- P28** : Fuertes E, Carsin AE, Garcia-Larsen V, Guerra S, Pin I, Leynaert B, Accordini S, Martinez-Moratalla J, Antó JM, Urrutia I, **Le Gouellec A**, Heinrich J, Gislason T, Jögi R, Janson C, Jarvis D, Garcia-Aymerich J. The role of C-reactive protein levels on the association of physical activity with lung function in adults. *PLoS One*. 2019 Sep 23;14(9) (SIGAPS C, IF 2,74)
- P29** : Jarmusch, Alan K., Mingxun Wang, Christine M. Aceves, Rohit S. Advani, Shaden Aguirre, Alexander A. Aksenov, Gajender Aleti, ..., **Le Gouellec A.**, ..., P. Dorrestein. “ReDU: A Framework to Find and Reanalyze Public Mass Spectrometry Data.” *Nature Methods*, 2020 August, 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0916-7> (SIGAPS A, IF 30,82)
- P30** : Nothias, Louis-Félix, Daniel Petras, Robin Schmid, Kai Dührkop, Johannes Rainer, Abinеш Sarvepalli, Ivan Protsyuk, ..., **Le Gouellec A.**, ..., P. Dorrestein. “Feature-Based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment.” *Nature Methods*, 2020 August, 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>. (SIGAPS A, IF 30,82)

**P31** : Méry G, Epaulard O, Borel AL, Toussaint B, **Le Gouellec A**. COVID-19: Underlying Adipokine Storm and Angiotensin 1-7 Umbrella. *Front Immunol*. 2020 Jul 21;11:1714. doi: 10.3389/fimmu.2020.01714. PMID: 32793244; PMCID: PMC7385229. (SIGAPS B, IF 5,085) Dernier auteur

**P32** : Moyne, O., Castelli, F., Bicout, D. J., Boccard, J., Camara, B., Cournoyer, B., ... **Le Gouellec, A.** (2021). Metabotypes of *Pseudomonas aeruginosa* correlate with antibiotic resistance, virulence and clinical outcome in cystic fibrosis chronic infections. *Metabolites*, 11(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/metabo11020063> (SIGAPS C, IF 4,097) Dernier auteur

**P33** : Schmid, Robin, Daniel Petras, Louis-Félix Nothias, Mingxun Wang, Allegra T Aron, Annika Jagels, Hiroshi Tsugawa, **Le Gouellec A**,... et al. 2020. "Ion Identity Molecular Networking in the GNPS Environment." *BioRxiv*, January, 2020.05.11.088948. <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088948>. en révision dans *Nature communication*

**P34** : Caffaratti, Clément, Caroline Plazy, Geoffroy Mery, Abdoul-Razak Tidjani, Federica Fiorini, Sarah Thiroux, Bertrand Toussaint, Dalil Hannani, and **Audrey Le Gouellec**. 2021. "What We Know So Far about the Metabolite-Mediated Microbiota-Intestinal Immunity Dialogue and How to Hear the Sound of This Crosstalk." *Metabolites* 11 (6): 406. <https://doi.org/10.3390/metabo11060406>.

**P35** : Sannicolo, Sarah, Matteo Giaj Levra, **Audrey Le Gouellec**, Caroline Aspord, Julien Boccard, Laurence Chaperot, Bertrand Toussaint, Denis Moro-Sibilot, Dalil Hannani, and Anne-Claire Toffart. 2021. "Identification of a Predictive Metabolic Signature of Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer: METABO-ICI Clinical Study Protocol." *Respiratory Medicine and Research*, June, 100845. <https://doi.org/10.1016/j.resmer.2021.100845>.

#### Soumises non acceptées :

**P36** : Vanhaverbeke Cécile, Touboul David, Elie Nicolas, Prévost Martine, Meunier Cécile, Michelland Sylvie, Cunin Valérie, Ma Ling, Vermijlen David, Delporte Cédric, Pochet Stéphanie, **Le Gouellec Audrey**, Sève Michel, Van Antwerpen Pierre and Souard Florence. What's up on the chemical composition of commercial Mistletoe extracts used during cancer?

**P37** : Clavarino Giovanna, Coentlin Leroy, Olivier Epaulard, Tatiana Raskovalova, Antoine Vilotitch, Martine Pernollet, Chantal Dumestre-Pérard, Federica Defendi, Marion Le Marechal, **Audrey Le Gouellec**, Jean-Luc Bosson, Pascal Poignard, Matthieu Roustit, Marie-Christine Jacob, Jean-Yves Cesbron. Fine analysis of lymphocyte subpopulations in SARS-CoV-2 infected patients: toward a differential profiling of patients with severe outcome soumis à *Clinical Infectious Diseases*.

**P38** : Antoine Guillon, Deborah Bréa-Diakite, Adeline Cezard, Alan Wacquiez, Thomas Baranek, Jérôme Bourgeois, Frédéric Picou, Virginie Vasseur, Léa Meyer, Adrien Auvet, José M. Carballido, Lydie Nadal Desbarats, Florent Dingli, Andrei Turtoi, **Audrey Le Gouellec**, Florence Fauvelle, Amélie Donchet, Thibaut Crépin, Pieter S. Hiemstra, Christophe Paget, Damarys Loew, Olivier Herault, Nadia Naffakh, Ronan Le Goffic and Mustapha Si-Tahar The metabolite succinate inhibits influenza virus replication through succinylation and nuclear retention of the viral nucleoprotein soumis à *The Journal of Clinical Investigation*

#### ----Brevets----

Inventeur de 3 brevets :

**B1** : **International Patent UJF/CHU WO 2013/087667** Inventeurs : **Le Gouellec, A.** Polack, B. Toussaint, B. Attenuated and adapted strain of *P. aeruginosa* for delivering antigens (2013)

**B2** : **International Patent – Implantable reactor for gut WO 2016/156612 A1** Inventeurs : Cinquin, P.schneider, D.Maurin, M.Martin, D. El, I.S. Zebda, A. Alcaraz, J.P. Reche, F. Tuvignon, P. **Le Gouellec**, A. Toussaint, B. Thelu, J. (2016)

**B3** : **International Patent WO 2018/149904 A1 – Attenuated strains of Pseudomonas aeruginosa as vaccine** Inventeurs: Meynet, E. Lenormand, JL. Toussaint, B. Laurin, D. et **Le Gouellec, A.** (2017)

## 3.2. Responsabilités administratives et collectives

- Membre du conseil de laboratoire TIMC représentant du corps Enseignant-Chercheur 2016-2020
- Membre d'expertise élu du ComEth - Comité d'éthique en expérimentation animale de Grenoble 2015-2017
- Membre actif de la commission recherche du pôle de Biologie du CHUGA depuis 2020
- Membre du bureau et du conseil d'administration du Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique depuis 2019
- Coordinatrice du réseau régional MARS (Métabolomique en Auvergne Rhône Alpes Suisse) depuis 2019
- Directrice adjointe de l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la cognition et l'Environnement (EDISCE) depuis 2020
- Relecteur d'articles dans les journaux scientifiques « Nature Scientific reports » et « MDPI Metabolites » depuis 2021.

## 3.3. Collaborations internationales

### Soins

- Projet : « Rôle du dosage de la CRPus dans l'association de l'exercice physique et de la fonction pulmonaire chez les adultes »
- Elaine Fuertes : ISGLocal, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona Spain

Cette collaboration a donné lieu à plusieurs publications :

[P26](#) : Fuertes E., Carsin A.E., Garcia Larsen V., Guerra S., Pin I., Leynaert B., Accordini S., Martinez-Moratalla J., M Anto J., Urrutia I., Le Gouellec A., Heinrich J., Gislason T., Jögi R., Janson C., Jarvis D., Garcia-Aymerich J., "Mediation analysis of CRP on the association of physical activity with FEV1 and FVC: the ECRHS study." European Respiratory Journal 2018 52 : PA4483

[P28](#) : Fuertes E, Carsin AE, Garcia-Larsen V, Guerra S, Pin I, Leynaert B, Accordini S, Martinez-Moratalla J, Antó JM, Urrutia I, Le Gouellec A, Heinrich J, Gislason T, Jögi R, Janson C, Jarvis D, Garcia-Aymerich J. The role of C-reactive protein levels on the association of physical activity with lung function in adults. PLoS One. 2019 Sep 23;14(9)

- Projet Métabolomique ciblé sur les catabolites du tryptophane dans le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer.
- Dr Ivanisevic Julijana, Université de Lausanne, Suisse
- Dr Hector Gallart Ayala, Université de Lausanne, Suisse

### Recherche

- Projet Mucoviscidose et infection chronique à *Pseudomonas aeruginosa*
  - Rob Quinn: Associate Professor Michigan University, États-Unis
- Projet de Métabolomique et réseau moléculaire
  - Pr Pieter Dorrestein, Full Professor University California San Diego, États-Unis
  - Dr Julien Boccard et Pr Serge Rudaz, Université de Genève, Suisse
  - Dr Alan Jarmusch, NIEHS (National Institute for Environmental Health Sciences) part of NIH

Cette collaboration active a donné lieu à plusieurs publications :

**P29** : Jarmusch, Alan K., Mingxun Wang, Christine M. Aceves, Rohit S. Advani, Shaden Aguirre, Alexander A. Aksenov, Gajender Aleti,..., **Le Gouellec A.**,..., P. Dorrestein. "ReDU: A Framework to Find and Reanalyze Public Mass Spectrometry Data." *Nature Methods*, 2020 August, 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0916-7> (SIGAPS A, IF 30,82)

**P30** : Nothias, Louis-Félix, Daniel Petras, Robin Schmid, Kai Dührkop, Johannes Rainer, Abinesh Sarvepalli, Ivan Protsyuk,..., **Le Gouellec A.**,..., P. Dorrestein. "Feature-Based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment." *Nature Methods*, 2020 August, 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>. (SIGAPS A, IF 30,82)

**P33** : Schmid, Robin, Daniel Petras, Louis-Félix Nothias, Mingxun Wang, Allegra T Aron, Annika Jagels, Hiroshi Tsugawa, **Le Gouellec A.**,... et al. 2020. "Ton Identity Molecular Networking in the GNPS Environment." *BioRxiv*, January, 2020.05.11.088948. <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088948>. en révision dans *Nature communication*

### 3.4. Subventions obtenues pour mes projets de recherche

- Financement de l'agence national pour la recherche (ANR) Projet AMN « Artificial Metabolic Networks **500 k€ (dont 20 k€ pour l'équipe TIMC)**. Collaboration avec J.L Faulon INRAE MICALIS
- 3 Financements de l'Association Vaincre la mucoviscidose pour lesquelles j'ai piloté la rédaction et le dépôt des demandes.
  - 2018 Grant #RF20180502189 Co-Investigateur Principal **35k€**
  - 2019 Grant #RF20190502416 Co-Investigateur Principal **55k€**
  - 2021 Grant #RF20210502854 Investigateur Principal **75k€**

Et qui ont servi à financer le projet de thèse d'Oriane Moyne et Razak Tidjani actuellement :

- **P23** : **Le Gouellec, A\***, Moyne, O.\*, Meynet, E., Toussaint, B., & Fauvelle, F. (2018). HR-MAS NMR-based metabolomics reveals metabolic changes in lung of mice infected with *P. aeruginosa* consistent with the degree of disease severity, and is a powerful evaluation tool for new treatment. *J Proteome Res*. <http://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00306> (SIGAPS B, IF 3,78) \*Co-first author
- **P30** : Nothias, Louis-Félix, Daniel Petras, Robin Schmid, Kai Dührkop, Johannes Rainer, Abinesh Sarvepalli, Ivan Protsyuk,..., **Le Gouellec A.**,..., P. Dorrestein. "Feature-Based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment." *Nature Methods*, 2020 August, 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>. (SIGAPS A, IF 30,82)
- **P32** : Moyne, O., Castelli, F., Bicout, D. J., Boccard, J., Camara, B., Cournoyer, B., ... **Le Gouellec, A.** (2021). Metatypes of *pseudomonas aeruginosa* correlate with antibiotic resistance, virulence and clinical outcome in cystic fibrosis chronic infections. *Metabolites*, 11(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/metabo11020063> (SIGAPS C, IF 4,097) Dernier auteur

- Financement Maturation SATT Linksum 2020 - Investigateur Principal **221k€**

Projet de développement d'un vaccin mort mais métaboliquement actif anti-*Pseudomonas aeruginosa*. Projet débuté en Janvier 2021 qui sert à financer Sarah Thiroux Post doctorante.

- Pour la recherche clinique : patients en cours de recrutement.

Financement VLM Projet de Recherche clinique des patients atteints de mucoviscidose intitulé DYSBIOSE Collaboratrice **30k€**

Financement Agir A DOM Recherche clinique DYSBIOSE Collaboratrice **40k€**

- Financement IDEX Équipement 2018 et Financement de la région AURA 2018 Investigateur Principal pour un montant total de **330k€** pour l'obtention d'un spectromètre de masse haute résolution pour la plateforme de spectrométrie de masse clinique GExIM dont je suis responsable scientifique.
- Financement de la Fondation UGA **165k€** pour étude BIOMARCOVID. Recherche de biomarqueurs de la sévérité de l'infection à SARS-Cov2 de patients hospitalisés au CHUGA. Métabolomique et marqueurs de l'inflammation.
- Participation à d'autres financements :

Financement LIGUE contre le cancer 16k€ 2012

Financement Vaincre la mucoviscidose 2012 et 2013 40k€

Financement « Preuve du concept CLARA » 255 k€

Financement GEFLUC 2014 projet IDO et cancer en collaboration avec P. Hainaut 15k€

Financement LIGUE Régional 16kEUros

### 3.5. Rayonnement depuis ma nomination en 2016

#### Organisation de congrès /journées d'étude/conférence et Workshop

26-10-2017	Conférence Éthique et Biologie de synthèse Invité Thierry Menissier Amphi Central Faculté de médecine
20-11-2018	Conférence invitée Rob Quinn, Associate Professor, Michigan University Lungs, Germs and Steel: Fighting the Cystic Fibrosis Lung Microbiome
2018	Comité d'organisation du séminaire d'automne du collège national des maîtres de Conférences et Professeur de Biochimie et Biologie Moléculaire Médicale à Grenoble
13-12-2020	Organisation d'une journée dédiée à la Création d'un réseau régional de métabolomique Auvergne Rhône Alpes Suisse (MARS)
22/24-01-2020	Participation au Conseil scientifique du congrès européen de métabolomique METABOMEETING Toulouse
26-12-2020	Membre du comité d'organisation et chairman d'une session d'un congrès international de métabolomique « GNPS zoom user meeting ».
31-08-2020	Réunion scientifique du réseau MARS (Métabolomique en région Auvergne Rhône Alpes Suisse) Comité d'organisation et présentation de l'outil Slack et une présentation scientifique.
14-01-2021	Comité d'organisation 1 <sup>er</sup> webinaire du RFMF
22/24-11-2021	Membre de l'organisation des <a href="#">14<sup>ème</sup> JS du RFMF</a> à Aussois (Savoie)

### 3.6. Valorisation et communication orales et affichées

#### COMMUNICATIONS ORALES DEPUIS MA NOMINATION EN 2016

---

Février 2016	Colloque français de vaincre la mucoviscidose « Empreinte métabolique d'infection pulmonaire à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> »
16 février 2017	Congrès européen des jeunes chercheurs pour vaincre la mucoviscidose (EYIM 2017, Institut Pasteur Paris) « Live Biological product : a new way to get an anti- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vaccine ? »
17-18 septembre 2018	Mini colloque Pseudomonas, Marseille, Institut de Microbiologie de la Méditerranée. HR-MAS NMR-based metabolomics reveals metabolic changes in lung of mice infected with <i>P. aeruginosa</i> consistent with the degree of disease severity, and is a powerful evaluation tool for new treatment.
8 Octobre 2018	Séminaire interne au sein des Joint meetings of Dorrestein and Knight Labs, San Diego, Californie, États-Unis. Metabolomics and its Application to Acute Lung Infection with <i>P. aeruginosa</i> .
17 avril 2019	BactoGre, CEA Grenoble <i>Pseudomonas aeruginosa</i> evolution in CF lungs
8 Juillet 2019	Séminaire invité à l'Université de Californie San Diego, Pieter Dorrestein and Rob Knight Lab Evolutionary adaptation of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> during chronic lung infections in patients with Cystic Fibrosis
4 décembre 2019	Pharmabiotic research institute day, Paris "TIMC and conception of smart probiotics"
13 décembre 2019	Journée du réseau MARS, Lyon Titre « Grenoble Metabolomique et Lipidomique »
6 février 2020	Présentation de la plateforme de métabolomique « Grenoble Expertise in Metabolomics » au Jeudi de la recherche de l'Institut de Biologie et de Pathologie du CHU Grenoble Alpes
7 février 2020	Metabolomics Day Grenoble (IAB) Présentation de la plateforme de métabolomique GExiM et application à la découverte de solution thérapeutique anti <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
13 février 2020	Comité d'investissement de la SATT Linksium « Un vaccin anti Pseudomonas aeruginosa »
3 mars 2020	Séminaire interne du Laboratoire TIMC, équipe TrEE « Evolutionary adaptation of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> during chronic lung infections in patients with Cystic Fibrosis »
31 aout 2020	Réunion scientifique du réseau MARS (Métabolomique en région Auvergne Rhône Alpes Suisse) Présentation de l'outils Slack et une présentation scientifique «Feature-Based Molecular Networking for Advanced Metabolomics Data Analysis with GNPS».
6 novembre 2020	Étude des biomarqueurs biochimiques de la sévérité de la COVID à la fondation UGA et ses mécènes.
12 novembre 2020	Séminaire interne Laboratoire TIMC équipe TrEE. Présentation de l'étude clinique RNIPH BIOMARCOVID, Biomarqueurs biochimiques de la sévérité de la COVID.
1 Décembre 2020	Séminaire interne de l'hôpital CHU Grenoble Alpes – Présentation à 2 voix avec l'infectiologue Pr Épaulard des résultats de l'étude BIOMARCOVID (Biomarqueurs de la sévérité de la COVID)
21 Juin 2021	Conférence russo-française en ligne "COVID-19 : actualités d'une nouvelle infection à coronavirus" Titre : Identification de biomarqueurs prédictifs de la sévérité de l'infection au SARS-CoV-2.

#### PARTICIPATION AU CONGRÈS SANS POSTER

---

11 février 2016	BactoGre Structural and cellular bacteriology in Grenoble
6-7 octobre 2016	CESI Symposium Amsterdam Pays Bas
15 décembre 2016	Journée des infections nosocomiales Lyon
30 mars 2017	BactoGre- Structural and cellular bacteriology in Grenoble
11-12 octobre 2018	5th Annual Drug Discovery USA Congress, 3rd Annual Biomarkers Precision Medicine USA Congress Advances in Immuno-Oncology USA Congress. San Diego, USA

## COMMUNICATIONS AFFICHEES DEPUIS MA NOMINATION

---

**Février 2016** 17ème Colloque des jeunes chercheurs Vaincre la mucoviscidose « Empreinte métabolique d'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* » A. Le Gouëllec, F. Fauvelle, O. Moyne, D.J. Bicout, M. Maurin and B. Toussaint.

**3-5 avril 2016** International Workshop on Assembly, Structure, and Function of Bacterial Type III Secretion Systems. Tübingen, Germany. Minicells equipped with T3SS syringe for active and specific immunotherapy. Wang Y, Le Gouëllec A, Toussaint B

**25 octobre 2016** Journée scientifique du pôle chimie-biologie-santé, UGA Grenoble « Évolution métabolique de *Pseudomonas aeruginosa* au cours des infections chroniques dans la mucoviscidose » O. Moyne, B. Cournoyer, F. Castelli, D.J. Bicout, M. Maurin, B. Toussaint and A. Le Gouëllec

**20-21 mars 2017** 10th symposium of vaccinology – Lyon.

**Poster 1** : Killed but metabolically active *Pseudomonas aeruginosa* based-vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against *Pseudomonas aeruginosa* infections. Elodie Meynet, David Laurin, Jean Luc Lenormand, Boubou Camara, Bertrand Toussaint, Florence Fauvelle, and Audrey Le Gouëllec.

**Poster 2** : Poly-functional and long-lasting anticancer immune response elicited by a safe attenuated *Pseudomonas aeruginosa* vector for antigens delivery Xavier Chauchet, Dalil Hannani, Sophia Djebali, David Laurin, Benoit Polack, Jacqueline Marvel, Laurent Buffat, Bertrand Toussaint, and Audrey Le Gouëllec **Prix du poster**

**4-6 octobre 2017** Congrès SMMAP (Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique), Paris.

**Poster 1** : Intérêt de la RMN des solides haute résolution à l'angle magique pour modéliser l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* et tester de nouvelles thérapies. A. Le Gouëllec, E. Meynet, B. Toussaint, F. Fauvelle.

**Poster 2** : Étude longitudinale du métabolome de *Pseudomonas aeruginosa* au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose. O. Moyne, B. Cournoyer, F. Castelli, F. Fenaille, P. Lamourette, C. Junot, C. Léger, D.J. Bicout, M. Maurin, B. Toussaint, and A. Le Gouëllec.

**22-24 Janvier 2020** Congrès européen de métabolomique 3 posters intitulés :

**Poster 1**. Rapid extraction and High-Resolution Tandem Mass Spectrometry analysis of the acyl-CoA metabolome. Cécile MEUNIER; Nour ZEAITER; Saadi KHOCHBIN, Patrice FAURE, Audrey LE GOUELLEC, Uwe SCHLATTNER.

**Poster 2** : Optimization of the untargeted metabolomics workflow for studying the impact of dysbiosis on the host. Valérie CUNIN; Dalil HANANNI; Michel SEVE; Pieter DORRESTEIN; Audrey LE GOUELLEC; Bertrand TOUSSAINT

**Poster 3**: Metabolomic study of commercial mistletoe extracts used in alternative anticancer therapy. Cécile VANHAVERBEKE, Sylvie MICHELLAND, Valérie CUNIN, Cécile MEUNIER, Michel SEVE, Audrey LE GOUELLEC, Bertrand TOUSSAINT, David TOUBOUL, and Florence SOUARD

### 3.7. Membres de sociétés savantes

Depuis 2010 Membre du Collège Nationale des Maîtres de conférences et Professeur de Biochimie et Biologie Moléculaire Médicale (CNBBMM)

Depuis 2020 Membre de l' "American Association for the Advancement of Science" (AAAS Member ID 60182424)

Depuis 2014 Membre du réseau francophone de métabolomique et de Fluxomique (RFMF)

Depuis 2019 Membre du réseau PRI (Pharmabiotic Research Institute)

## 4. Activités pédagogiques

### 4.1. Formation à la pédagogie

#### - Formation personnelle à la pédagogie :

- DU de pédagogie médicale UFR de médecine de Grenoble (2012-2013)
- Module « Pratiques Pédagogiques en Sciences » 7H CIES
- Module « Didactique générale dans l'enseignement supérieur » 12H CIES
- Module « Rendre les étudiants actifs en cours » 8H CNAM Service Universitaire Pédagogique UJF (Avril 2012) Niveau 1 et 2
- Séminaires pédagogiques de l'association des maîtres de conférence et professeur en Biochimie et Biologie moléculaire (section CNU 44.01) : 16-18 mai 2012 : Protéines, Protéome et pathologies (Isle sur la sorgue) ; 29-31 mai 2013 Métabolomique et fluxomique (Guidel, Morbihan) ; 21-23 mai 2014 Vitamines et micro-nutriment (Guidel, Morbihan) ; 19-21 mai 2015 : Lipides, signalisation et physiopathologie (Anglet) ; 18-20 mai 2016 : Diagnostic biologique des maladies neurodégénératives (Anglet) ; 16-18 mai 2018 Biologie moléculaire et Médecine : du Kaplan-Delpech à nos jours... (Arles) ; 22-24 mai 2019 Avancées récentes en biologie du cancer (Arles)

#### - Formation personnelle :

- 8e Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique 19 mai 2014
- École chercheur "Spectrométrie de masse et métabolomique" du 6 au 10 octobre 2014 à la colle sur Loup
- Systems Medicine, Personalized Health and Therapy 25-27 septembre 2014 Grèce
- Formation « réseaux métaboliques », Métabolomique et Fluxomique Toulouse 9-10 avril 2015
- Formation à MetExplore, webserveur pour l'étude des réseaux métaboliques Toulouse Sept 2015
- Atelier Immunité aux changements (Immunity to change Robert KEGAN, Lisa LASKOW LAHE Harvard University) Grenoble
- MOOC U-Lab et « Data Analysis for the Life Sciences 1 », Logiciel R, sur la Plateforme EdX
- MOOC UDEMY R data science (été 2019)

#### - Contribution à la formation pédagogique des enseignants: communications orales lors de congrès pédagogiques

- Séminaires d'automne de l'association des maîtres de conférence et professeur en Biochimie et Biologie moléculaire Marseille : présentation orale Marseille Sept 2015  
« Métabolisme du tryptophane : intérêt du dosage et stratégie d'immunothérapie innovante »

### 4.2. Liste des Enseignements et responsabilités

#### - Enseignements théoriques local (Faculté de médecine, Université Grenoble Alpes)

Université Grenoble Alpes, UFR de Médecine et de Pharmacie

Master Ingénierie pour la santé et le médicament (campus Santé)

École doctorale Ingénierie pour la santé la cognition et l'environnement (EDISCE)

9 Collègues Hospitalo-Universitaires de Biochimie médicale : 1 PU-PH, 7 MCU-PH , 1-AHU

Nombre d'heures (sur les 5 dernières années, à insérer dans le tableau)

	n-5	n-4	n-3	n-2	n-1
	2016	2017	2018	2019	2020
de la discipline	550	450	450	450	450
du candidat	64	89	89	89	100
dont en 1er cycle	7,5	6	0	0	0

**Score SIAPS activité** : 404 (310+28+66)

### **Résumé des activités d'enseignement**

#### **1<sup>er</sup> cycle**

2011-2017 PACES1 Tutorat de Biochimie (6h/an)

2014-2016 TD L2 Biotech (1h30/an)

2014 TD L2 Biotech (2h/an)

#### **2<sup>ème</sup> cycle**

##### UFR de Médecine

-Responsable enseignement de Biochimie à l'UFR de médecine 2<sup>ème</sup> année (DFGSM2) du module inflammation 1<sup>er</sup> semestre + Examen

-Évaluations : Évaluation positive (bien/très bien) de la biochimie en PACES à 85% par les étudiants

2011-2012 DFGSM2: TP de Biochimie Médicale (50h) TP/TD

2016-2021 DFGSM2 Module Biochimie de Inflammation CM Séance enseignement en présentiel interactif (SEPI) 2h/an

2016-2021 DFGSM2 CM "Biotechnologie et médicaments innovants" (2h/an)

2013-2021 DFGSM2 TD de Biochimie Médicale « Sémiobiologie de l'inflammation et biomarqueurs (6h/an)

2014 DFGSM2 TD de Biochimie Médicale « Les enzymes » (4h/an)

2014 DFGSM2 TD de Biochimie Médicale « La granulomatose septique » (2h/an)

##### UFR de Médecine/Pharmacie

2018-2021 Master 2 Ingénierie de la Santé MITI UE transversale "Spectrométrie de masse et métabolomique" CM/TD (6h/an)

2020-2021 Master 2 MRESTE CM « Analyse métabolomique » (2h/an)

2020-2021 Master 2 MRESTE TD « Analyse métabolomique : Utilisation de MZmine et GNPS» (2h/an)

2019-2021 Master 1 Ingénierie pour la Santé et le médicament APP Méthode d'étude et de production des cellules et de protéines à usage médical (4h/an)

2014-2021 Master 1 Ingénierie pour la Santé et le médicament UE Maladie Transmissible (3h/an)

2016-2021 Master 1 Ingénierie pour la Santé et le médicament « Biologie de synthèse » (2h/an)

2014-2021 Master 2 Ingénierie pour la Santé et le médicament UR Lutte contre les agents infectieux (2h/an)

2016- 2019 Master 2 « Biologie Cellulaire et Intégrative», CM « Bacteria for cancer immunotherapy » (2h/an)

2016-2018 Master 2 Ingénierie pour la Santé et le médicament CM « Immunothérapie des cancers » (3h/an)

2020-2021 Master 2 Ingénierie pour la Santé et le médicament "The contribution of Metabolomics for Translational Health research" (2h/an)

### 3<sup>ème</sup> cycle

2016-2021 DES de Biologie Médicale Formation des internes de Biologie Médicale « Biochimie du LCR » 1h/ 2x/ an (2h/an)

2021 DES De Biologie Médicale – Plateforme d’enseignement SIDES Cours enregistré sur la métabolomique (2h/an)

2020-2021 Surveillance des EcNi (4h/an)

2020 Accompagnement référent du service sanitaire (4h/an)

2016-2021 Coach équipe iGEM (30h/an)

2009-2021 Jury de stage de Master 2 et entretien de recrutement (160 heures environ) (30h/an)

2021 DU Microbiote : Cours « Microbiote, comportement et santé mentale » ; « microbiote et métabolomique comme outils d’étude de la fonctionnalité » ; « Probiotiques ingénierés comme thérapie innovante » (3x 2h/an)

#### **- Enseignements inter-régional**

Participation à la correction des ECN Blanc (jusqu’à 2015-2016) et évaluations des demandes d’entrée en PACES sur la plateforme APB (jusqu’à 2015-2016)

Participation au ECNi (2019-2020/2020-2021)

#### **- Enseignements pratique :**

Stages cliniques hospitaliers

Référent de stage :

-Interne DES de Biologie Médicale :

-Jeanne Marion (Octobre 2020-Mai 2021) : Mise en place de l’index kappa en complément des isofocalisations des LCR 50%

-Jean Escal (Mai-Octobre 2017) Mise en place de collection biologique des LCR de patients Alzheimer et maladies neurodégénératives apparentés – Collection Biologique DC2016-2816 (1/2 semestre de niveau 1) 100%

-Interne de pharmacie spécialisée :

-Caroline Plazy mai 2018-maintenant (5 semestres) Étude Métabolomique sur isolats de patients Muco 50%. Doctorat de science en cours

-Judith Ducruet (Interne Nov-Mai 2015 Maladies neurodégénératives : intérêt du dosage des biomarqueurs Alzheimer et internalisation au CHU de Grenoble)

-BTS : Lisa Vernet : Mise au point du dosage des catabolites du tryptophane dans le LCR 2014-2015 100%

- Projet pédagogique innovant iGEM

Encadrante depuis 4 ans (2016-2017, 2017-2018, 2018-2019, 2019-2020), chaque année d’une équipe de 10 étudiants participant à un concours international de biologie de synthèse organisé par la fondation iGEM (Boston, USA)

Les étudiants sont inscrits à l’Université Grenoble Alpes intégrée (Etudiants de L2 à M2 de l’UFR de pharmacie/médecine, Ingénieurs Phelma, Science Po, Grenoble Ecole de Management, ...)

2016-2017 : Clément Caffaratti, Romy Rouzeau, Emline Léon, Yusuf Emery, Cassandra Vivier boudry, Noreen Louis, Guillaume Jubien, Martin Lenglet, Nicolas Iasparro => Accompagnement à Boston Médaille Or

2017-2018 : Thomas Goyet, Fanny Garon, Vincent Radziejewski, Cecile Razimbaud, Yasmine Taveau, Elise Aubert, Lucas Sanceré, Xandre Gallard, Charles Jabour, Perrine Rochas. Médaille de Bronze et nomination au Hardware

2018-2019: Aline MORESTIN, Nina YOUSOUFOU, Mélodie DUPRE, Fahd TIBOURTINE, Marine ROLLO, Pauline CHEVALIER, Lucas PINERO, Marvin JACQUET, Pierre BOUVET, Hajar AJIYEL, Antoine ZERBIB, Gaspard DEBUSSCHE. Médaille d'or et nominations

2019-2020 : Sara Salhi, Moska Levska, Noemi Garnier, Elouen Le garrec, Mathieu Clavel, Florian Laffont, Mandy Leger, Mattis Beilleau, Mehdy Berterboul, Hugo Techer, Sebastien Rigollet. Médaille d'or.

30 à 40 heures par an sont consacrées à l'accompagnement de ces étudiants

1 journée sélection de l'équipe sur entretien (8h)

1 réunion de 2h par semaine pendant les 3 premiers mois (24h)

1 réunion tous les 15 jours de 1h pour le projet (4 mois) (8h)

1 année sur 3 : Présence de 3 jours à la jamboree de Boston

Préparation et organisation de conférences (T. Menissier, Remise de diplôme, ...) (4-6h)

### 4.3. Encadrement doctoral et scientifique

#### Encadrement et référent de travaux pédagogiques, mémoires, Thèses, Doctorants :

J'ai participé à l'encadrement actif de 2 doctorants et d'une thèse d'exercice de Médecine.

- Xavier Chauchet Doctorat d'université 1/10/2011 -> 1/10/14 (Co-encadrement officieusement à 50%)

Titre de la thèse « Développement d'un vecteur bactérien pour l'immunothérapie anti-tumorale active et spécifique et caractérisation de la réponse immune induite »

- **P10**: Le Gouëllec A, Chauchet X, Laurin D, Aspard C, Verove J, Wang Y, Genestet C, Trocme C, Ahmadi M, Martin S, Broisat A, Cretin F, Ghezzi C, Polack B, Plumas J, Toussaint B. A safe bacterial microsyringe for in vivo antigen delivery and immunotherapy Mol Ther. 2013 May;21(5):1076-86. (SIGAPS A IF 6,42) 1er auteur + [Couverture de la revue](#)
- **P12**: Toussaint, B., Chauchet, X., Wang, Y., Polack, B., & Le Gouëllec, A. (2013). Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector. Expert Rev Vaccines, 12(10), 1139–1154. <http://doi.org/10.1586/14760584.2013.836914> (SIGAPS B, IF 4,2)
- **P16**: Chauchet, X., Hannani, D., Djebali, S., Laurin, D., Polack, B., Marvel, J., ... Le Gouellec, A. (2016). Poly-functional and long-lasting anticancer immune response elicited by a safe attenuated *Pseudomonas aeruginosa* vector for antigens delivery. Mol Ther Oncolytics, 3, 16033. <http://doi.org/10.1038/mto.2016.33> (SIGAPS E, IF 1,25)
- Elodie Meynet Doctorat de Médecine 1/11/2015 – 9/06/2017 (100%)

Titre de la thèse « Une souche de *Pseudomonas aeruginosa* morte mais métaboliquement active comme candidat vaccin induit une immunité humorale et cellulaire protectrice contre les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*. »

- **P21**: Meynet, E., Laurin, D., Lenormand, J. L., Camara, B., Toussaint, B., & Le Gouellec, A. (2018). Killed but metabolically active *Pseudomonas aeruginosa*-based vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. Vaccine, 36(14), 1893–1900. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.040> (SIGAPS C, IF 3,27)

- **P23** : **Le Gouellec, A.**, Moyne, O., **Meynet, E.**, Toussaint, B., & Fauvelle, F. (2018). HR-MAS NMR-based metabolomics reveals metabolic changes in lung of mice infected with *P. aeruginosa* consistent with the degree of disease severity, and is a powerful evaluation tool for new treatment. *J Proteome Res.* <http://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00306> (SIGAPS B, IF 3,78)
- Oriane Moyne Doctorat d'université 1/10/2015-29/03/2019 (25%)

Titre de la thèse « Approche métabolomique pour l'étude de l'évolution adaptative de *Pseudomonas aeruginosa* au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose. »

- **P23** : **Le Gouellec, A\***, **Moyne, O.\***, Meynet, E., Toussaint, B., & Fauvelle, F. (2018). HR-MAS NMR-based metabolomics reveals metabolic changes in lung of mice infected with *P. aeruginosa* consistent with the degree of disease severity, and is a powerful evaluation tool for new treatment. *J Proteome Res.* <http://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00306> (SIGAPS B, IF 3,78) \*Co-first author
- **P30** : Nothias, Louis-Félix, Daniel Petras, Robin Schmid, Kai Dührkop, Johannes Rainer, Abinesh Sarvepalli, Ivan Protsyuk, ..., **Le Gouellec A.**, ..., P. Dorrestein. "Feature-Based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment." *Nature Methods*, 2020 August, 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>. (SIGAPS A, IF 30,82)
- **P32** : **Moyne, O.**, Castelli, F., Bicout, D. J., Boccard, J., Camara, B., Cournoyer, B., ... **Le Gouellec, A.** (2021). Metabotypes of *pseudomonas aeruginosa* correlate with antibiotic resistance, virulence and clinical outcome in cystic fibrosis chronic infections. *Metabolites*, 11(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/metabo11020063> (SIGAPS C, IF 4,097)
- Clément Caffaratti Doctorat d'université 1/10/2019-en cours (50%)

Titre de la thèse : « Développement de biomédicaments vivants ingénierés au métabolisme contrôlé en vue d'une utilisation en tant que thérapie innovante dans le domaine de l'immunothérapie »

- **P34** : **Caffaratti, Clément**, Caroline Plazy, Geoffroy Mery, Abdoul-Razak Tidjani, Federica Fiorini, Sarah Thiroux, Bertrand Toussaint, Dalil Hannani, and **Audrey Le Gouellec**. 2021. "What We Know So Far about the Metabolite-Mediated Microbiota-Intestinal Immunity Dialogue and How to Hear the Sound of This Crosstalk." *Metabolites* 11 (6): 406.

## Encadrement scientifique d'étudiants de niveau licence et master :

Différents étudiants de L1 stage excellence à L3 (Simon Sevenier, Marion Fiorucci, ...)

Master 1 Gérald THEILLET 31/03 au 23/05/2014

Master 1 Sarah El KENNANI 31/03 au 23/05/2014

Master 1 Sarah Huot Marchand 3/04/18 au 1/06/2018

- **P32** : Moyne, O., Castelli, F., Bicout, D. J., Boccard, J., Camara, B., Cournoyer, B., ... **Le Gouellec, A.** (2021). Metabotypes of *pseudomonas aeruginosa* correlate with antibiotic resistance, virulence and clinical outcome in cystic fibrosis chronic infections. *Metabolites*, 11(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/metabo11020063> (SIGAPS C, IF 4,097) Dernier auteur

Master 1 Claire Leger 11/04/17\_02/06/17

- **P32** : Moyne, O., Castelli, F., Bicout, D. J., Boccard, J., Camara, B., Cournoyer, B., ... **Le Gouellec, A.** (2021). Metabotypes of *pseudomonas aeruginosa* correlate with antibiotic resistance, virulence and clinical outcome in cystic fibrosis chronic infections. *Metabolites*, 11(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/metabo11020063> (SIGAPS C, IF 4,097) Dernier auteur

Master 1 et 2 (2010 et 2011) Charlotte GENESTET

- **P14** : Genestet, C., **Le Gouellec, A.**, Chaker, H., Polack, B., Guery, B., Toussaint, B., & Stasia, M. J. (2014). Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 400–410. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.003> (SIGAPS B, IF 5,7) 2ème auteur

Master 2 - 1/11/2015-9/06/2017 ; Elodie Meynet Mémoire de Master 2 (Année recherche) “Immunogenicity of engineered killed but metabolically active *Pseudomonas aeruginosa* as a vaccine candidate” (100%)

Master 2 - 11/01/2016-8/07/2016 - Simsa Robin Mémoire du Master 2 International Biohealth computing “Influence of tryptophan metabolites produced by *P. aeruginosa* on its capacity as a vector of recombinant proteins” (100%)

Master 2 - 01/05/2017-30/09/2017 ; Jean Escal Mémoire de Master 2 “Study of two mechanisms involved in Alzheimer's disease to identify new therapeutic targets” (100%)

Master 1 - 4/03/2019-19/04/2019- Yann Boudart Mémoire de Master 1 – Médecine Double cursus ; “Th1 Immune Response Is Enhanced by Dietary prebiotic Inulin in Mice vaccinated With Killed But Metabolically Active *Pseudomonas aeruginosa* » (100%)

Master 1 - 25/11/2019-31/01/2020 - Alexis Dechosal - Mémoire de Master 1 – Médecine Double cursus ; « Genetic engineering of *Escherichia Coli* Nissle 1917 as therapeutic tool for the ulcerous colitis » (100%)

Master 2 - 1/11/2019-31/10/2020 - Geoffroy Mery Master 2 + Année Recherche - Mémoire « Evaluation de l'influence du microbiote digestif et de ses modulations sur la réponse vaccinale en modèle murin » (100%) + Bibliographie COVID pendant le confinement

- [P31](#) ; Méry G, Epaulard O, Borel AL, Toussaint B, [Le Gouellec A](#). COVID-19: Underlying Adipokine Storm and Angiotensin 1-7 Umbrella. *Front Immunol.* 2020 Jul 21;11:1714. doi: 10.3389/fimmu.2020.01714. PMID: 32793244; PMCID: PMC7385229. (SIGAPS B, IF 5,085) Dernier auteur

Master 2 - 1/02/2020-1/08/2020 - Hala Sidani Mémoire du Master 2 International “Development of Untargeted Screening Methodology and Evaluation of its Applications to the Monitoring of Blood Metabolomics Fingerprint From Grenoble Hospital’s Patients” (100%).

**Tableau récapitulatif des encadrements** depuis ma nomination en 2016

<b>Encadrements</b>			
<b>Dates d'encadrement</b>	<b>Nom Prénom de l'étudiant</b>	<b>Type d'encadrement (Post doctorants, Thèse Université, Master 2, Thèse d'exercice, Mémoire de DES)</b>	<b>Pourcentage d'encadrement (%)</b>
11/04/2017-02/06/2017	Claire Leger	Master 1	100%
01/05/2017-30/09/2017	Jean Escal	Master 2 Année Recherche, IPR Pharmacie	100%
3/04/18- 1/06/2018	Sarah Huot Marchand	Master 1	100%
1/11/2015-9/06/2017	Elodie Meynet	Master 2 (Année recherche)+ Doctorat de Médecine (Mémoire de DES)	80%
25/11/2019-31/01/2020	Alexis Dechosal	Master 1 – Médecine Double cursus	100%
4/03/2019-19/04/2019	Yann Boudart	Master 1 – Médecine Double cursus	100%
1/10/2015-29/03/2019	Oriane Moyne	Doctorat d'université	25%
1/11/2019-31/10/2020	Geoffroy Mery	Master 2 + Année Recherche	100%
1/02/2020-1/08/2020	Hala Sidani	Master 2 International	100%
1/02/2021-en cours	Razak Tidjani	Post-doctorant	100%
1/03/2021- en cours	Sarah Thiroux	Post-doctorant	100%
1/10/2019-en cours	Clément Caffaratti	Doctorat d'université	50%

#### **4.1. Participation à des jurys de thèse**

Participation au Jury de thèse de Science d'Oriane Moyne

Participation au jury de thèse de médecine d'Elodie Meynet

Examineur du jury de thèse de Science de Mélanie Grosjean - Besançon le 8/03/2021.

Participation au Comité de suivi de thèse de Nour ZEAITER (Direction Pr U. Schlattner, Laboratoire LBFA, UGA)

#### **4.2. Innovation et recherche pédagogiques**

##### **- Création de supports pédagogiques :**

Participation à la rédaction de 2 chapitres de livre « Introduction aux Biotechnologies en santé », Edition Lavoisier, paru en 2016. Chapitre 4 : La cellule procaryote en biotechnologies et chapitre 5 : La cellule eucaryote en biotechnologies

##### **Rédaction de 2 chapitres d'ouvrage :**

1. **Le Gouellec**, B. Polack. B. Toussaint., Ed. (2012). Regulation of type 3 secretion in *P. aeruginosa*. in Regulation of Bacterial Virulence.
2. Wang, Y., B. Toussaint and **A. Le Gouellec** (2014). "Bacterial vectors for the delivery of tumor antigens." *Methods Mol Biol* **1139**: 429-441.

#### - Obtention de financement pour les enseignements :

- Financement IDEX Projet HERBS 75kEuros

Participation à l'appel à projet Transformations pédagogiques et plateforme learning by doing (IDEX) intitulé HERBS : Hybrid English Roads for Biotechnology Students – Hybridation des Enseignements d'Anglais Spécialisé pour la Santé Et Biotechnologies. Camille BIROS, département d'anglais de la faculté de médecine/pharmacie

- Financement IDEX BiotechLab 86,5kEuros

Participation à l'appel à projet Transformations pédagogiques et plateforme learning by doing (IDEX) BiotechLab. Resp : Pierre cavailles, UFR de pharmacie

- Financement de la Fondation UGA Coup de cœur depuis 4 ans et de la Graduate school de 2 bourses de stages pour les étudiants iGEM.

- **Coordinatrice d'une action nationale de mentorat pour les membres du réseau francophone de métabolomique et fluxomique depuis 2021. Action et programme [ici](#)**

## 5. Activités de diagnostic et de soins

L'hôpital de Grenoble est divisé en pôles. J'exerce mon activité de soin au sein du pôle de Biologie dans le service de Biochimie, Biologie moléculaire et Toxicologie Environnementale (SB2TE, dirigé par Pr Faure). Ce service est divisé en Unité fonctionnelle ou médicale. L'unité médicale de Biochimie des Enzymes et des Protéines (BEP), dirigée par le Pr B. Toussaint, a pour mission de développer et de proposer les explorations biologiques permettant d'assurer le diagnostic et la prise en charge en soin quotidien de patients atteints de pathologies inflammatoires, dysimmunitaires, de dégénérescence cellulaire ou tissulaire ou de certains déficits innés du métabolisme par la mesure de paramètres enzymatiques et protéiques. Elle comporte plusieurs secteurs dont les activités sont centrés sur l'analyse des:

- Marqueurs enzymatiques et protéiques du soin quotidien.
- La dégénérescence tissulaire, cellulaire, alarmines et signaux de danger, remodelage de la matrice extracellulaire.
- Anomalie de synthèse des immunoglobulines, cryoglobulines, électrophorèse sérique, urinaire et LCR, isoelectro-focalisations.
- Diagnostic d'enzymopathies lysosomales, mucopolysaccharidoses, glycolyse et glycogénolyse, granulomatose septique chronique, anomalies fonctionnelles du neutrophile.

La liste des biologistes responsable des secteurs spécialisés est la suivante :

- B Toussaint (PU-PH), responsable d'unité. Activité de recherche universitaire TIMC- TrEE.
- B Lardy (MCU-PH) : Secteur Protéines et Enzymes. Activité de recherche universitaire TIMC-GREPI
- MH Paquet (MCU-PH) : Secteur Protéines et Enzymes (macro, isoenzymes). Activité de recherche universitaire GREPI
- S Vergnaud (PH) : secteur enzymopathies.
- MJ Stasia (MCU-PH), en charge de l'unité fonctionnelle « Centre de Recherche et Diagnostique de la Granulomatose septique ». Activité de recherche universitaire IBS F. Fieschi
- Audrey Le Gouellec : Secteur Protéine et Enzyme (voir mes activités)

L'UM BEP est un membre actif des réseaux DHOS « maladies neuromusculaires », et « maladies métaboliques ». Elle est par ailleurs associée directement à deux Centres de Références Maladies Rares nationaux du CHU de Grenoble : « Maladies neuromusculaires, Dr E. Lagrange », « Anomalies du développement, Pr PS Jouk ». Le recrutement des secteurs « enzymopathies » et « CGD » dépasse largement l'environnement local ou régional et l'UM apparaît comme laboratoire référent pour différents dépistages au niveau national voire international. L'implication de l'unité médicale dans ces différents domaines et dans le domaine de la dégénérescence tissulaire liée aux maladies chroniques (fibrose, remodelage matriciel) lui donne maintenant une visibilité significative qui lui a permis d'être associé à 4 PHRC nationaux au cours des dernières années et de nombreux projets DRCI et à un projet FP7 de Médecine systémique (Protéomique dans le rejet chronique d'allogreffe pulmonaire).

## 5.1. Activité de biochimie de routine et d'urgence

Mes Activités cliniques ou médico-techniques des 3 dernières années :

	n-3	n-2	n-1
Nombre d'actes en Million de B(/an) =	0,9	0,9	0,9
Nombre de Validation (Nb de j/an) =	70	70	70

## 5.2. Description qualitative et quantitative de l'activité

1/ **Validation de paramètres spécialisés** (électrophorèse sérique (4000/an, 212.000B) et urinaire (780/an, 42.900B), isofocalisation du LCR (700/an, 161.000 B), Immunofixation des protéines sériques (520/an, 83.200B), immunofixation des urines (500/an, 80.000), protéines de l'inflammation comme l'alpha 1 antitrypsine (530/an, 15900), l'orosomucoïde, la CRPus (422/an, 3798), ou autres, ..) dont certains examens de biologie médicale nécessitent une expertise et une implication non négligeable en concertation avec les services cliniques pour une bonne interprétation des données (1,5 validation par semaine en moyenne).

2/ **Responsabilité biologique des paramètres suivants** : (nb actes/an, nb de B/BHN)

Alpha 2 Macroglobuline (450/an ; 14.400),  
 Ceruloplasmine (517/an ; 15.510),  
 Orosomucoïde (570/an ; 17.100),  
 Alpha 1 antitrypsine (531/an ; 15.930),  
 C-Reactive Protein ultrasensible (420/an ; 14.700),  
 Isofocalisation LCR (700/an ; 161.000),  
 Marqueurs Alzheimer (190/an ; 79.800)  
 Clairance de l'alpha 1 anti-trypsine (10/an, 1000).

Nb Actes total /an = 10.140

Nb de B/BHN = 918.238

Participation à l'accréditation COFRAC de la PCT en 2016 (validation de méthode, rédaction SH Form) et rédaction des SH Form pour A2M et autres en cours. Gestion des contrôles qualité interne via l'URT (Biorad).

## 6. Synthèse des travaux de recherche

### Préambule et mise en contexte historique

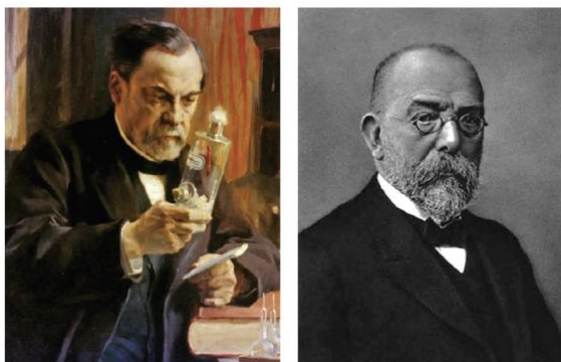
Même s'il est fragile, le progrès humain existe, il suffit de regarder les chiffres sur l'évolution de la santé dans le monde au cours des deux derniers siècles. La mortalité infantile a chuté et l'espérance de vie moyenne dans le monde est passée d'environ 26 ans en 1820 à 73 ans en 2020 (avec des disparités géographiques à noter)<sup>1</sup>. Prévenir, diagnostiquer et traiter sont les 3 piliers de la santé. La vaccination et l'antibiothérapie sont en grande partie responsables de cette amélioration de l'espérance de vie. Au cours du siècle dernier, la vaccination a été l'intervention médicale de prévention la plus efficace pour réduire la mortalité et la morbidité dues aux maladies infectieuses. On estime que les vaccins sauvent au moins 2 à 3 millions de vies par an dans le monde<sup>2</sup>. Le virus de la variole en 1979 et le virus sauvage de la polio de type 3 ont été proclamés comme éradiqués dans le monde grâce aux campagnes mondiales de vaccination de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). La plupart des infections virales et bactériennes qui affectaient traditionnellement les enfants ont été considérablement réduites grâce aux programmes nationaux de vaccination dans les pays développés. Des efforts importants sont menés par la communauté scientifique à travers la mise en place d'essais cliniques de vaccins pour les principaux besoins médicaux non satisfaits tels que le VIH, le paludisme, la tuberculose et le cancer<sup>2</sup>. Les technologies évoluent comme en témoigne récemment l'avènement des vaccins à ARNm contre le SARS-Cov2.

Dans cette course à la vie, chaque être vivant de la planète se reproduit et essaye de tirer parti des ressources disponibles. La biochimie est la discipline, qui comme son nom le sous-entend, s'attèle à comprendre le vivant en s'intéressant à l'étude des molécules biochimiques (glucides, lipides, protéines, métabolites et acides nucléiques), leur composition, leur interaction ainsi que les processus biologiques (métabolisme) qu'elles initient. Le biochimiste étudie et analyse les organismes vivants au niveau moléculaire pour percer leur mode de fonctionnement. Durant ces années de recherche (depuis 2002 jusqu'à aujourd'hui), j'ai forgé mon expérience et mes connaissances à travers l'étude de la division bactérienne du pneumocoque, de sa résistance aux antibiotiques, de l'étude de la virulence de *P. aeruginosa* et de son interaction avec les cellules de l'immunité, des dégâts causés à l'Homme lors des infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose, sans jamais oublier que je pouvais essayer d'apporter des idées de nouveaux traitements en détournant leur mode de fonctionnement initiaux, comme le développement de vaccin anti-cancer ou encore anti-*P. aeruginosa*.

De nombreux ouvrages de bactériologie relatent l'histoire de la découverte des cellules procaryotes, nommées aussi bactéries. Comme souvent dans l'histoire des sciences, c'est la mise au point de nouvelles technologies, dans ce cas précis, la mise au point du premier microscope optique par le naturaliste de Delft, Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723), qui a permis de confirmer l'hypothèse de la présence des bactéries dans l'environnement. Un siècle et demi plus tard, Louis Pasteur et Robert Koch amorcent l'âge d'or de la microbiologie avec l'observation et la description des bactéries pathogènes, et enfonce le clou du déterminisme des maladies en établissant un lien causal entre présence de bactéries et infection (figure 1). Louis Pasteur est le fondateur de la « théorie des germes » que nous connaissons actuellement. Grâce à ses travaux sur la bière qui ont démontré en 1857 que la fermentation est liée à la présence d'organismes vivants microscopiques mais aussi grâce à ses expériences sur les ballons « à col de cygne », il a montré que la croissance des microorganismes n'étaient pas dues à la génération spontanée mais à leur reproduction. En 1884, Robert Koch a établi un postulat qui repose sur le fait qu'un microorganisme donné est responsable d'une maladie donnée si la relation causale entre la maladie et le microorganisme répond aux critères suivants : (i) le microorganisme doit être présent chez tous les individus présentant la pathologie et absent chez tous les individus ne présentant pas la pathologie ; (ii) le microorganisme peut être isolé et multiplié en culture ; (iii) l'introduction du microorganisme à partir d'une culture, chez l'hôte en bonne santé, induit le développement de la pathologie ; (iv) il est possible d'isoler le microorganisme à partir de l'hôte infecté et de l'identifier comme identique au microorganisme initial utilisé pour induire le développement de la pathologie. Par ailleurs, les travaux de Robert Koch sur le bacille de la tuberculose (nommé aussi bacille de Koch) et sa contribution à la démonstration de la validité de la théorie des germes, lui vaudront le prix Nobel de médecine en 1905. Actuellement, l'avènement de la métagénomique bouleverse l'état des connaissances du postulat « un microbe, une maladie ». En effet, les découvertes récentes de l'existence d'un microbiote humain met en exergue la présence de nombreuses bactéries identifiées au préalable comme agent pathogène chez des individus ne présentant pas de pathologie, ou encore a permis de montrer l'origine poly microbienne (on parle de dysbiose) d'une pathologie. A tel point que certains remettent en question le postulat de Koch<sup>3</sup>.

L'Homme vit en équilibre complexe avec sa flore microbienne, et leurs interactions synergiques ont fait, et font encore l'objet d'intenses recherches. En 1991, Lynn Margulis a introduit le concept d'"holobionte" dans son livre "Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation" ; selon cette définition, le corps humain peut être décrit comme un assemblage de l'hôte et des

nombreuses espèces qui vivent en son sein ou autour de lui<sup>4</sup>. Les composants d'un holobionte sont des espèces individuelles ou biontes, tandis que les génomes de ces biontes, y compris le génome humain, le virome, le mycobiome, le microbiome, définissent ensemble l'hologénome. Le microbiote est constitué de  $10^{14}$  bactéries appartenant principalement à 4 phylums sur les 70 existants sur notre planète. Ce microbiote joue un rôle primordial pour l'homme et, du fait de sa prépondérance dans notre tube digestif, est finalement assimilé à un nouvel organe chez l'Homme, d'une importance égale au rôle que peut avoir le foie ou le cerveau. Ces microbes aident à la digestion, à la transformation de toxiques, à la mise en place de l'immunité au cours de la vie, mais également protègent contre des infections opportunistes au long court. Ces bactéries sont pourtant constituées de motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPs. Comment comprendre alors ce qui rend les hommes malades, ce qui déclenche la réponse immune appropriée. Une réponse efficace lorsque l'agent bactérien devient pathogène ou une absence de réponse vis-à-vis de notre microbiote. L'environnement semble jouer un rôle fondamental dans le dérèglement de l'homéostasie Hôte-microbe. Les métabolites petites molécules <1,5 kDa sont des éléments importants de cet environnement et de nouveaux outils nous permettent d'envisager l'étude de leur rôle dans la relation hôte-microbe (voir section perspectives). Comme le décrivait en 1859, Darwin dans « l'origine des espèces »<sup>5</sup>, chaque individu lutte pour la vie. Au fil du temps, s'accumule des variations (dont nous comprendront plus tard qu'elles sont présentes sur le génome des individus) qui se transmettent à leur descendance pourvu qu'elles soient utiles à ces individus dans leur rapport aussi complexe avec les autres êtres vivants et avec la nature extérieure. Ce principe de *sélection naturelle* est d'actualité, et à nous de continuer d'en comprendre le fonctionnement.



**Figure 1 :** Louis Pasteur (1822-1895) et Robert Koch (1843-1910), pionniers de la microbiologie.

## Synthèse des travaux de recherche

*Dans ce mémoire, et étant donné la diversité des sujets abordés au cours de ma carrière, j'ai souhaité redonner le contexte scientifique et introduire l'état de l'art, avant de présenter mes travaux. Je laisse le choix aux lecteurs de lire ou ne pas lire ces parties « Contexte » qui ne sont pas essentielles à l'évaluation de ma capacité d'habilitation à diriger des recherches.*

### **6.1. Master 2 Ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement : Activité D,D-carboxypeptidase de l'enzyme « Penicillin binding protein-3 » de *S. pneumoniae*.**

**Encadrant :** Cécile Morlot/Thierry Vernet

**Laboratoire d'accueil :** équipe de recherche Laboratoire d'ingénierie des macromolécules (LIM)- Institut de Biologie Structurale (Resp : Pr T. Vernet)

**Mots clés :** *S. Pneumoniae*, Activité enzymatique, synthèse du peptidoglycane, antibio-resistance

#### **6.1.1. Contexte : Synthèse de peptidoglycane par *S. pneumoniae***

*S. pneumoniae* est une cause majeure d'infections respiratoires communautaires, notamment la pneumonie, l'otite aiguë et la sinusite, ainsi que d'infections invasives telles que la bactériémie et la méningite<sup>6</sup>. Les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines sont actuellement les molécules les plus utilisées pour lutter contre les infections à pneumocoques. Cependant, dès l'introduction de la pénicilline à la fin des années 40, des souches de *S. pneumoniae* résistantes aux  $\beta$ -lactamines se sont répandues dans le monde entier<sup>7</sup>. La bactérie *S. pneumoniae* est entourée d'une épaisse paroi cellulaire dont le principal composant est le peptidoglycane, une maille hautement réticulée qui est essentielle à la division cellulaire bactérienne et à la protection contre le choc osmotique et la lyse. La synthèse du peptidoglycane s'effectue par une voie de biosynthèse qui débute dans le cytoplasme bactérien ; les dernières étapes se déroulent sur le côté périplasmique de la membrane bactérienne. Les étapes cytoplasmiques de la voie sont catalysées par des enzymes Mur et aboutissent à la synthèse de molécules de lipides II, qui abritent les unités de construction du peptidoglycane et sont ensuite transférées à travers la membrane cytoplasmique<sup>8</sup>. Les étapes finales de la synthèse, à savoir la polymérisation des chaînes de glycanes et leur réticulation, sont catalysées par les activités glycosyltransférase et transpeptidase des protéines liant la pénicilline (PBP)<sup>9,10</sup>. Chez *S. pneumoniae*, six PBP ont été identifiées et classées sur la base de leurs similarités de séquence<sup>11,12</sup>. Les PBP de masse moléculaire élevée sont des enzymes bifonctionnelles (de classe A) abritant des activités glycosyltransférase et transpeptidase (TP) (PBP 1a, 1b, 2a) ou des enzymes monofonctionnelles (de classe B) (PBP2b, 2x) avec uniquement l'activité TP. Enfin, une seule PBP de faible masse moléculaire présente une activité D-Ala,D-Ala (D,D) carboxypeptidase (PBP3)<sup>13</sup>.

### 6.1.2. Présentation des travaux de Master 2

L'objectif principal de mes travaux de master 2 a consisté à produire la protéine recombinante PBP3 et à mesurer l'activité D,D-carboxypeptidase de PBP3, une enzyme de remodelage de la paroi du pneumocoque ([Morlot et al. 2005](#)). J'avais au préalable réalisé un stage de Master 1 dans la même équipe sous la direction de L. Chesnel et mes travaux de recherche consistaient à étudier le mécanisme moléculaire de résistance aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines. J'ai produit et purifié la protéine recombinante PBP2x mutée en position 552 et démontré que cette mutation présente dans les souches résistantes provoque une vitesse déacétylation plus importante de son substrat. Ces travaux ont permis d'illustrer les mécanismes moléculaires de résistance aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines chez le pneumocoque et ont donné lieu à 2 publications ([Pernot et al. 2004](#) et [Morlot et al. 2005](#)).

**Bilan :** Ces travaux m'ont permis d'être autrice dans 2 publications (P1 : [Pernot et al. 2004](#) et P3 : [Morlot et al. 2005](#)).

### 6.2. Doctorat en sciences : Étude de la division bactérienne et du rôle de trois protéines de la division, DivIB, DivIC et FtsL chez *S. pneumoniae*

**Encadrant :** André Zapun/Thierry Vernet

**Laboratoire d'accueil :** équipe de recherche Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules (LIM)- Institut de Biologie Structurale (Resp : Pr T. Vernet)

**Mots clés :** *S. pneumoniae*, Activité enzymatique, division bactérienne

Mon travail de thèse avait pour objectif de faire progresser les connaissances sur la fonction d'un complexe de trois protéines, DivIB, DivIC et FtsL, centrales au processus de division chez les bactéries. La bactérie *S. pneumoniae* a été choisie en raison du peu de connaissances actuelles sur la division des ovocoques par rapport à celles des bacilles et du fait qu'il s'agit d'un pathogène majeur pour l'homme. Nous avons combiné des études *in vivo* chez le pneumocoque avec des analyses biochimiques *in vitro* permettant d'établir les relations entre les trois protéines du complexe ternaire. Cet objectif général a été poursuivi de quatre façons:

1. Quelle est la localisation de ces 3 protéines chez *S. pneumoniae* ?
2. DivIB, DivIC et FtsL forment elles un complexe ternaire *in vitro* ?
3. DivIB, DivIC et FtsL forment elles un complexe ternaire *in vivo* ?
4. Quel est le rôle du complexe ternaire dans la division ?

### 6.2.1. Contexte épidémiologique et intérêt de l'étude de la division chez *S.*

#### *pneumoniae*

Il y a plus d'un siècle, George Miller Sternberg injectait sa propre salive à un lapin et retrouvait du pneumocoque dans l'animal abattu. *Streptococcus pneumoniae*, ou pneumocoque est un coque à Gram positif d'aspect lancéolé. Il appartient à la division des Firmicutes, à la classe des Bacilli, à l'ordre des Lactobacillales, à la famille des Streptococcaceae et au genre *Streptococcus*. *S. pneumoniae* colonise de façon asymptomatique le nasopharynx. Il est présent dans 20 à 40% de la population <sup>14</sup>. Mais sa « renommée » tient au fait que c'est une bactérie pathogène responsable d'une importante morbidité et mortalité, surtout dans les pathologies infectieuses pédiatriques. Selon l'OMS, *S. pneumoniae* cause la mort de plus d'un million de personnes par an dans le monde <sup>15</sup>. Tout comme *P. aeruginosa*, le paradoxe de cette bactérie réside dans ces deux mots : commensale et pathogène. L'étude de la biologie de ce micro-organisme est donc importante puisqu'elle permettrait d'améliorer les connaissances quant à l'étiologie des maladies à pneumocoque.

*S. pneumoniae* se transmet par contact direct avec les sécrétions respiratoires des personnes infectées ou bien des personnes porteuses asymptomatiques. Après cette mise en contact, il peut coloniser le nasopharynx de son nouvel hôte et peut rester ainsi pendant plusieurs semaines ou mois. De temps en temps, il peut échapper aux mécanismes de défense de l'hôte et entraîner la maladie. Les maladies à pneumocoque peuvent être classées en deux catégories : les infections invasives et non invasives. Parmi ces dernières, l'otite moyenne, la sinusite, la bronchite et la pneumonie non-bactériémique sont les manifestations les plus courantes et les moins graves. Par ailleurs, il existe trois grands types d'infections dites invasives, la pneumonie, la méningite et l'infection systémique ou bactériémie, qui présentent un caractère de gravité plus important notamment chez les personnes présentant un déficit immunitaire, et plus généralement les enfants de moins de 2 ans et les personnes de plus de 65 ans. Ainsi, on considère que chaque année dans le monde plus d'un million d'enfants de moins de 5 ans décèdent d'une infection respiratoire aiguë, dont la majorité est due à *S. pneumoniae*. La pneumonie à pneumocoque est la plus courante des pneumonies bactériennes, et elle représente la majorité des pneumonies acquises en communauté. Elle peut être sporadique mais elle est plus fréquente en hiver. Elle se caractérise par une fièvre élevée, des frissons et une toux productive associée à des douleurs pulmonaires et une difficulté respiratoire. Le taux de létalité associée est élevé, 10%, plus particulièrement chez les nourrissons de moins de 1 an et les personnes âgées ou présentant un facteur de risque. Une pneumonie mal traitée ou résistante aux antibiotiques peut se compliquer

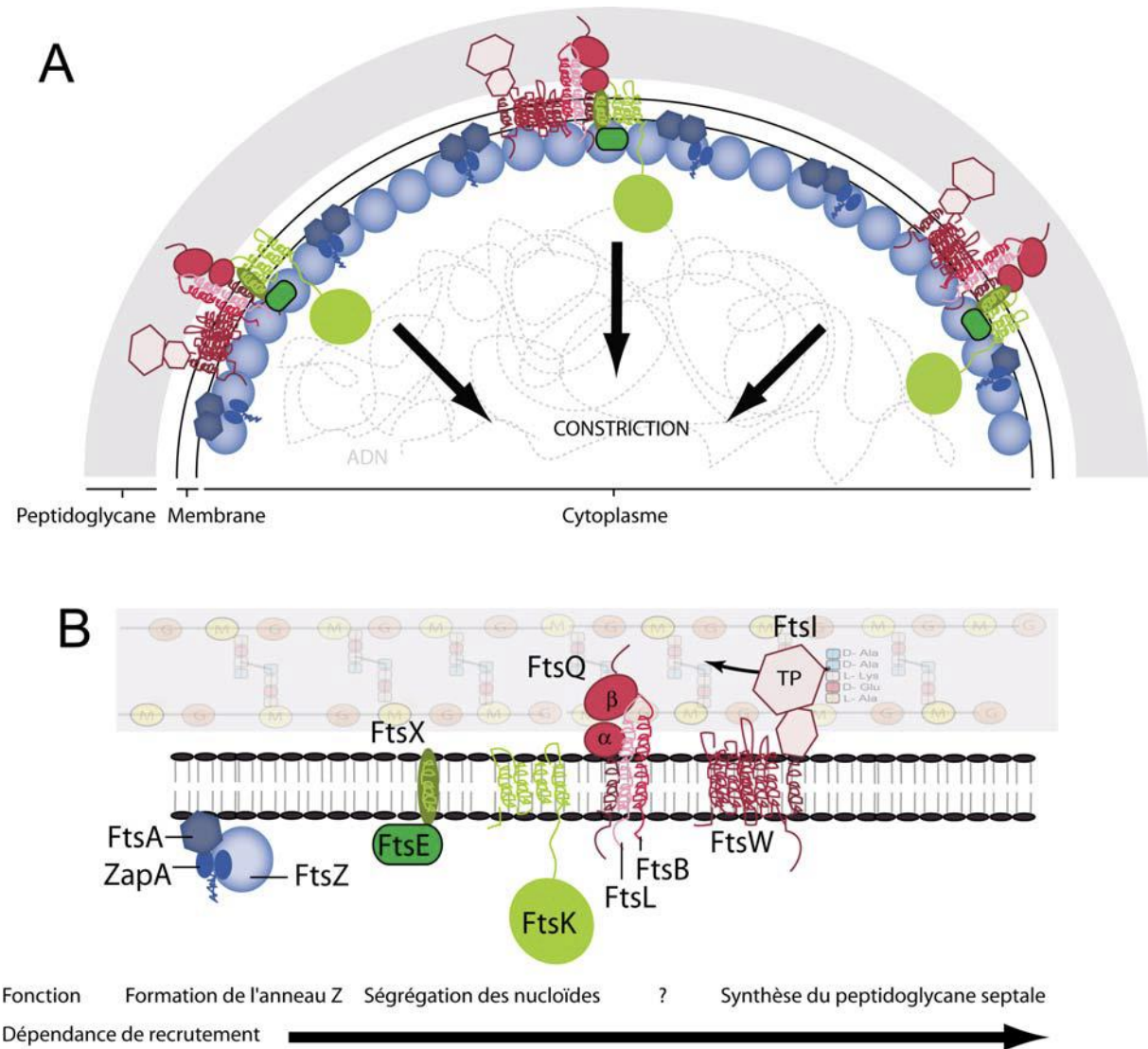
par extension extra-pulmonaire de l'infection. Le taux de mortalité associé à la méningite à pneumocoque est de 30%, mais peut aller jusqu'à 80% chez les personnes âgées.

Pour la perpétuation des espèces du vivant, la croissance est indispensable. Le mécanisme de division bactérienne support de la croissance des populations est donc un mécanisme indispensable à la vie. Pour étudier la division bactérienne, il faut des milieux de culture, c'est-à-dire un milieu nutritif liquide de composition déterminée : 1. Permettant la croissance 2. Éventuellement mimant les conditions environnementales de la bactérie. La plupart des bactéries croissent et se divisent selon un mode de fission binaire, c'est-à-dire qu'une cellule mère donne naissance à deux cellules filles de taille et de forme identiques. La division bactérienne a été décrite principalement chez deux organismes modèles *Escherichia Coli* et *Bacillus subtilis*. Lors de la division, les processus de constriction de la membrane cytoplasmique, de ségrégation des nucléoïdes et de synthèse de la paroi septale doivent être coordonnés dans l'espace et dans le temps. Les acteurs moléculaires en charge de ce processus ont été mis en évidence principalement chez des mutants sensibles à la température (ou « filamentous thermosensitive » ou fts). Ces protéines constituent le divisome, qui se définit comme un ensemble de protéines localisées au site de division participant à la formation du septum de division. Certaines protéines comme FtsZ, FtsA, FtsK, FtsQ (ou DivIB<sup>2</sup>), FtsL, FtsB (ou DivIC<sup>3</sup>), FtsW et FtsI sont très conservées et présentes dans quasiment toutes les bactéries à paroi cellulaire, d'autres protéines peuvent ou non être impliquées (Figure 2). Des processus de régulation existent pour moduler le divisome (son assemblage, son positionnement et son désassemblage). Deux mécanismes distincts contribuent au positionnement précis de la machinerie de division, le système Min et le système d'occlusion par les nucléoïdes<sup>16,17</sup>. La présence de FtsZ au site de division est requise pour le positionnement des autres protéines et pour initier, avec FtsX et FtsA, l'invagination des membranes au site de division. Le rôle de FtsK est établi pour la ségrégation des nucléoïdes dans les 2 cellules filles. Les protéines FtsI ou PBP2x et FtsW jouent un rôle important dans la synthèse de la néo paroi au site de division ou septum. Mais le rôle des protéines DivIB, DivIC et FtsL, protéines centrales du divisome est inconnu.

---

<sup>2</sup> Nommée FtsQ chez *E. Coli*, et DivIB chez *B. Subtilis* et *S. pneumoniae*

<sup>3</sup> Nommée FtsB chez *E. Coli*, et DivIC chez *B. Subtilis* et *S. pneumoniae*



**Figure 2** : Modèle d'assemblage des protéines conservées du divisome. **A**. Coupe transversale d'une bactérie en division. Les protéines colorées en bleu se localisent au site de division pour former et stabiliser l'anneau Z. Puis les protéines colorées en rouge sont recrutées à l'anneau de division. Le moment de recrutement des protéines représentées en vert (FtsK, FtsE et FtsX) n'est pas connu. Les interactions entre protéines sont respectées dans la mesure du possible **B**. La représentation intègre les données de dépendance et de moment de recrutement et la fonction. Le nom des protéines est indiqué.

Les interactions entre les protéines de la division, déduites de deux cribles indépendants de type double hybride, sont complexes. Des protéines recrutées tôt au site de division, comme FtsA, peuvent interagir avec des protéines nécessitant la localisation de toutes les autres protéines, comme FtsI et FtsN. Ceci indique que le recrutement séquentiel de ces protéines au site de division d'*E. coli* ne s'explique pas par un modèle d'interaction des protéines deux à deux. Le fait que beaucoup de protéines Fts établissent de multiples interactions, même faible avec d'autres protéines de la division, suggèrent un modèle d'assemblage au septum de type coopératif.

Dans le schéma d'interdépendance des protéines pour leur localisation septale, les trois protéines DivIB, DivIC et FtsL sont centrales. Elles dépendent de la localisation au septum de protéines importantes pour la constriction de la membrane et de la ségrégation des nucléoïdes et sont nécessaires à la localisation de protéines impliquées entre autres dans la synthèse de la paroi. Or, nous avons insisté sur la nécessité de coordination de tous ces processus de façon spatio-temporelle afin de garantir une division bactérienne correcte (Figure 2). L'étude de la fonction de ces trois protéines s'avère donc essentielle à la compréhension de la division bactérienne.

### 6.2.2. Présentation des travaux de thèse

DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL ont une topologie similaire, bitopique membranaire, avec un domaine N-terminal cytoplasmique (Figure 3). Mais bien qu'elles soient conservées dans de nombreuses espèces, elles ont une identité de séquence non significative d'une espèce à une autre. Les expériences de quantification montrent que FtsQ et FtsL sont présentes en quantité équivalente chez *E. coli*. DivIC semble dix fois plus abondante que DivIB chez *B. subtilis*. Enfin, DivIB est cent fois plus abondante chez *B. subtilis* que chez *E. coli*. Il a été suggéré que cette différence d'abondance correspond à la nécessité de fabriquer une paroi plus épaisse chez les bactéries à Gram positif.

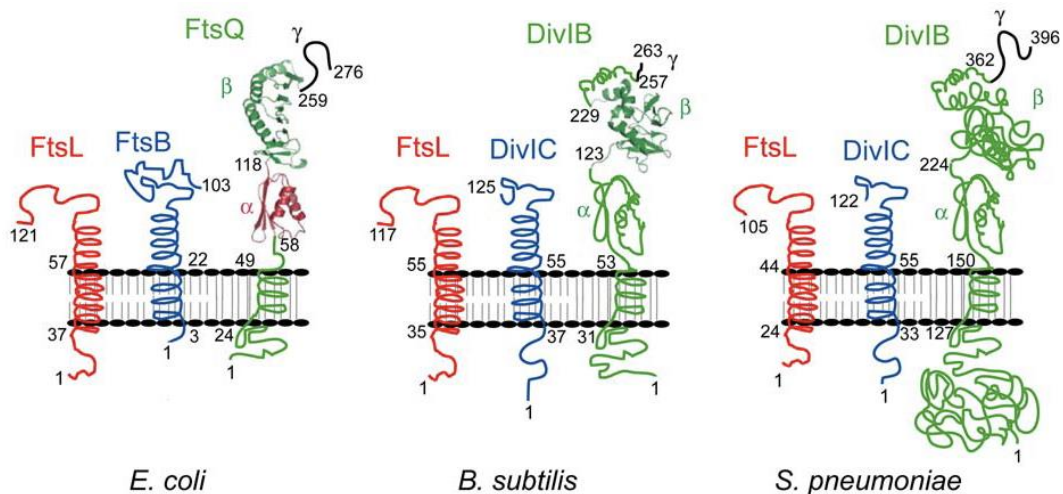


Figure 3 : Topologie des protéines DivIB/FtsQ, DivIC/FtsB et FtsL chez *E. coli*, *B. subtilis* et *S. pneumoniae*.

Chez *S. Pneumoniae*, j'ai démontré que la quantité de DivIC est 10 fois supérieure à la quantité de DivIB et FtsL, qui sont présents en quantités similaires (Noirclerc *et al.* <sup>18</sup>) (Table 1). DivIB et FtsL sont présentes en quantité du même ordre de grandeur que celui des deux PBPs. Il est intéressant de noter que PBP2b est deux fois plus abondant que PBP2x (Table 1)<sup>18</sup>. Le plus

grand nombre de molécules PBP2b peut être lié à la synthèse de la paroi cellulaire se produisant au niveau de deux anneaux de division périphérique, alors qu'un seul anneau apparent de PBP2x participe à la synthèse de la paroi septale.

Protéine	DivIC	DivIB	FtsL	PBP2x	PBP2b
Nb de molécules/CFU <sup>a</sup>	1800 ± 200	200 ± 40	150 ± 60	260 ± 60	720 ± 180

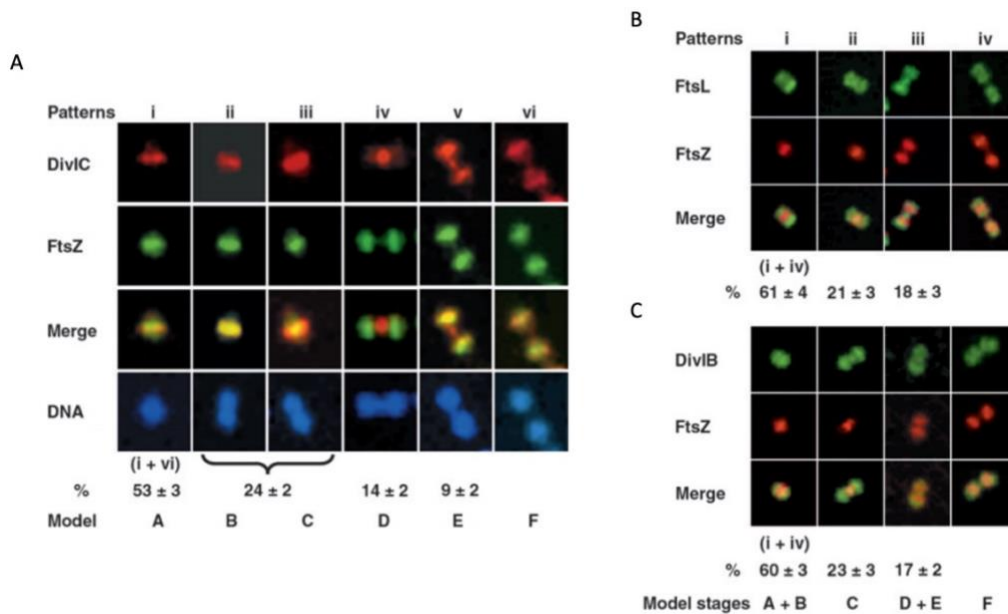
a. Le nombre de CFU par ml de culture par unité de densité optique a été déterminé  $(1,6 \pm 0,1) \times 10^8$

**Table 1 :** Quantification du nombre de protéines DivIC, DivIB, FtsL, PBP2x et PBP2b par Colonie formant unité (CFU) chez *S. pneumoniae*.

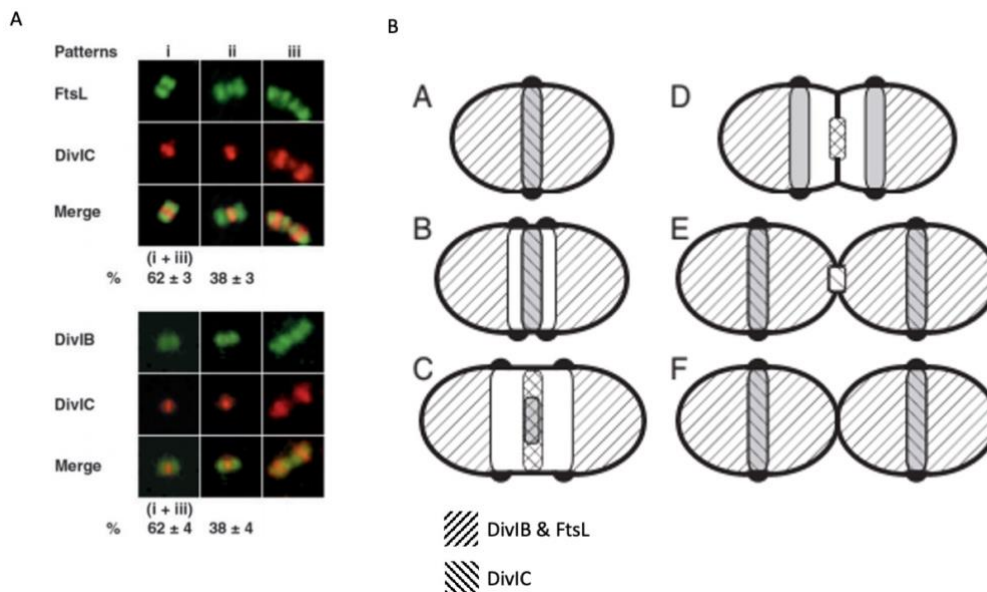
L'abondance de DivIB chez *S. pneumoniae*, estimé à 200 molécules/cellule est bien inférieure à la quantité mesurée chez *B. subtilis*, estimée à 5000 molécules/cellule<sup>19</sup>. Bien qu'il ait été suggéré que la différence d'abondance entre FtsQ d'*E. coli* (25-50 copies par cellule)<sup>20</sup> et DivIB de *B. subtilis* soit reliée à la nécessité de fabriquer une paroi plus épaisse chez les bactéries à Gram positif, j'ai démontré que la bactérie à Gram positif, *S. pneumoniae*, est capable de synthétiser cette paroi avec moins de molécules. Or, chez *B. subtilis*, 2% des molécules (soit environ 100 molécules) suffisent à maintenir le processus de division végétative<sup>19</sup> alors que plus de 70% sont nécessaires à la sporulation<sup>21</sup>. L'excès d'abondance de DivIB chez *B. subtilis* est donc probablement consacré à la sporulation. Et en ce qui concerne l'abondance de PBP2b, deux fois supérieure à celle de PBP2x, il est fortement probable, vu ses données de localisation, que cette enzyme soit nécessaire à la synthèse du peptidoglycane des sites de division périphérique en plus de sa présence au site principale de division (Figure 5 et 6).

#### **6.2.2.1. Localisation des protéines DivIB, DivIC et FtsL**

DivIB, DivIC et FtsL sont des protéines bactériennes essentielles à la division cellulaire, qui présentent des interdépendances entre leurs stabilités et leur localisation. Nous avons démontré par des expériences d'immunofluorescence que DivIC était toujours localisée au milieu de la cellule, contrairement à DivIB et FtsL, qui sont co-localisés avec DivIC uniquement pendant la période de mise en place du septum de division (Figure 4 et 5). Ces données suggèrent que l'assemblage du complexe trimérique DivIB / DivIC / FtsL est régulé au cours du cycle cellulaire (Figure 5B).



**Figure 4** : Localisation par immunofluorescence de DivIC, FtsL, et DivIB chez *S. pneumoniae*. **A**. DivIC se localise principalement au site de division septal. Les cellules ont été colorées pour l'ADN (en bleu), DivIC ( en rouge) et FtsZ (en vert). **B**. Localisation de DivIB ou FtsL. Les cellules ont été colorées pour DivIB ou FtsL (vert) et FtsZ (rouge). Les images (i à vi) ont été disposées de manière à représenter la progression dans le cycle cellulaire. La proportion, et l'erreur standard, de cellules affectées à chaque motif d'immunofluorescence est indiquée ci-dessous. Le nombre de cellules présentant un motif reconnaissable (N) était de 355 pour DivIC/FtsZ, 227 pour DivIB/FtsZ et de 188 pour FtsL/FtsZ. Le nombre de cellules présentant des motifs mal définis qui ne pouvaient être attribués à aucune classe était de 18 pour DivIC/FtsZ, 121 pour DivIB/FtsZ et de 25 pour FtsL/FtsZ. Les nomenclatures A à F font référence au modèle proposé dans la figure 5B.

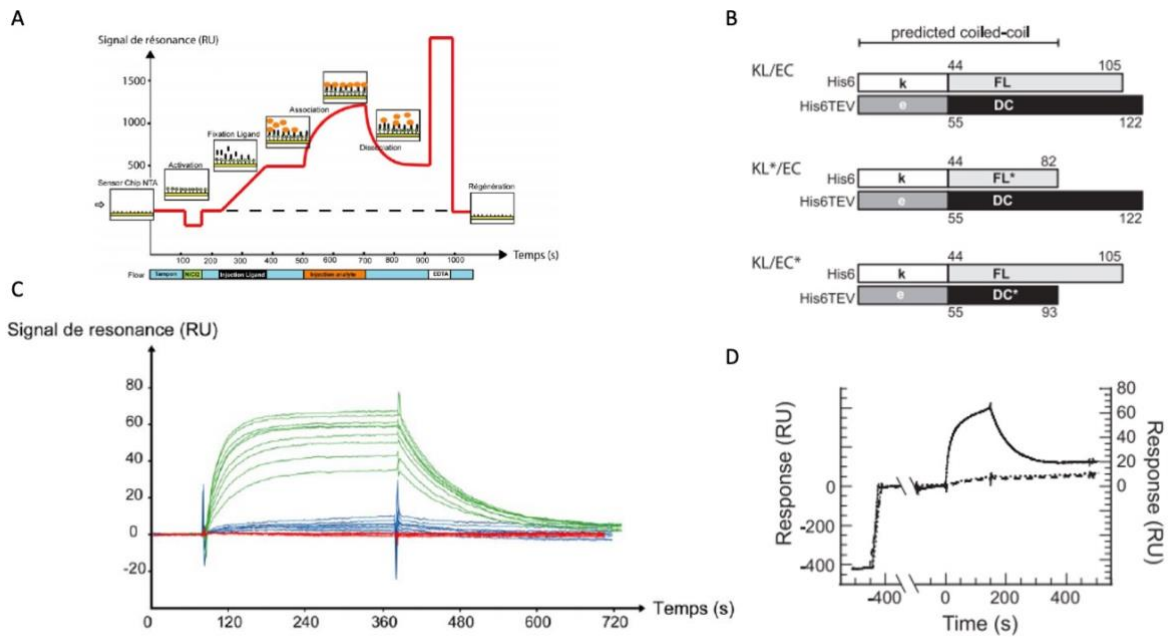


**Figure 5** : **A**. Immunolocalisation de DivIB ou FtsL avec DivIC. Les cellules ont été colorées pour DivIB ou FtsL (vert) et DivIC (rouge). La proportion de cellules affectées à chaque motif est indiquée ci-dessous. L'erreur est l'erreur standard sur la proportion. Le nombre de cellules avec un modèle reconnaissable (N) était de 125 pour DivIB/DivIC et de 263 pour FtsL/DivIC. Le nombre de cellules présentant des motifs mal définis et ne pouvant être attribués à aucune classe était de 52 pour DivIB/DivIC et de 130 pour FtsL/DivIC. **B**. Proposition du modèle de localisation spatio-temporelle de DivIB, DivIC et FtsL pendant la division cellulaire de *S. pneumoniae*. Les hachures de droite indiquent la présence de DivIB et FtsL, celles de gauche celle de DivIC, FtsW et des PBPs septales. Les PBPs non septales suivent la localisation des anneaux équatoriaux dupliqués représentés par des bosses noires de peptidoglycane. La localisation de FtsZ est en gris.

### 6.2.2.2. *DivIB, DivIC et FtsL forment un complexe ternaire in vitro*

Pour étudier la formation d'un complexe trimérique, j'ai produit les protéines recombinantes DivIB, DivIC et FtsL. Comme décrit dans [Noirclerc-Savoie et al. 2005](#), DivIB s'associe à un complexe hétérodimérique FtsL / DivIC contraint par des hélices artificielles (coiled coil K et E). J'ai mis au point le test de dosage de l'interaction par la technologie par résonance plasmonique de surface BIACORE® (avec des puces spéciales de type NiNTA, principe Figure 6A) et déterminé les paramètres cinétiques de l'association de DivIB sur l'hétérodimère DivIC et FtsL (Figure 6C). Le niveau de fixation de DivIB sur l'hétérodimère varie de 20 à 80 RU. L'analyse des données expérimentales globale de toutes les concentrations de DivIB simultanément à l'aide du modèle d'interaction 1:1 (modèle de Langmuir) nous a permis de déterminer la constante de vitesse d'association  $k_a$  du complexe ternaire qui est de  $3,95 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et sa constante de vitesse de dissociation  $k_d$  qui est de  $1,13 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Ces valeurs indiquent une association et une dissociation rapide du complexe ternaire DivIB/K-FtsL/E-DivIC. La constante apparente d'affinité  $K_d$  du complexe ternaire résultante ( $k_d/k_a$ ) est de 300nM. Le complexe bien que peu stable possède une affinité raisonnable. La valeur du  $\chi^2$ , qui est de 0,3, montre un bon ajustement des courbes théoriques aux données expérimentales.

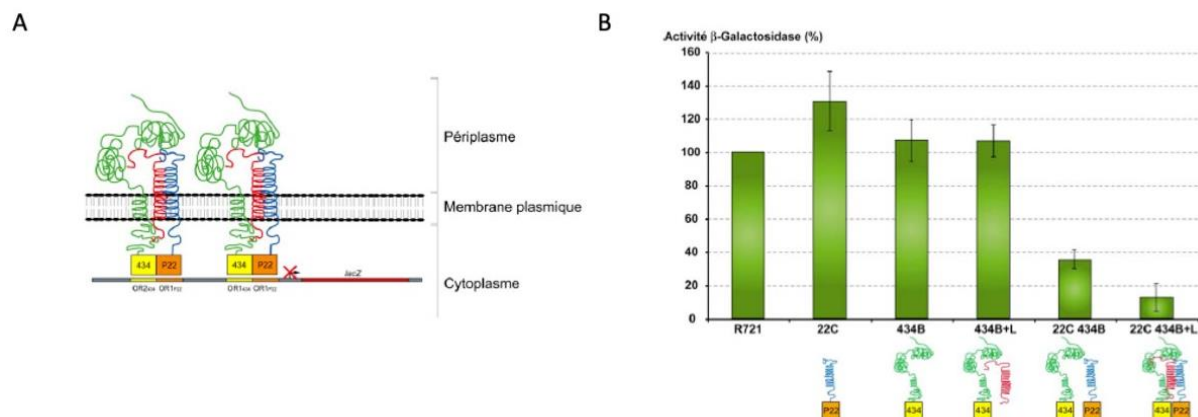
Le modèle *ab initio* du complexe (K-FtsL/E-DivIC ou KL/EC) basé sur l'analyse des données de diffraction des neutrons aux petits angles (ou Small angle Neutron Scattering ou SANS), corroboré aux données de modélisation, indique que le domaine  $\beta$  de DivIB est positionné près de l'extrémité C-terminales de l'hétérodimère (KL/EC) ([Masson et al.](#)<sup>22</sup>). Des contrôles précédents avaient montré que le domaine extracytoplasmique de DivIB n'interagit pas avec la partie artificielle K/E<sup>18</sup>. Il était donc raisonnable de supposer que le domaine  $\beta$  se lie aux régions C-terminales de FtsL et DivIC. Ce résultat a été confirmé par la perte complète de l'interaction mesurée par résonance plasmonique de surface lorsque les parties C-terminales de FtsL ou DivIC étaient tronquées (Figure 6D). En conclusion, nous avons proposé que le domaine  $\beta$  de la protéine DivIB interagit avec les parties C-terminales de DivIC et FtsL qui sont nécessaires à cette interaction et à la stabilité du complexe<sup>22</sup>.



**Figure 6** : Interaction entre le dimère (KL/EC), ou les formes tronquées (KL\*/EC) et (KL/EC\*), et la protéine DivIB mesurée par résonance plasmonique de surface. **A**. Sensorgramme type obtenu avec les surfaces NTA. Phase 1 : activation de la surface NTA par addition de 10  $\mu$ L de NiCl<sub>2</sub> 500  $\mu$ M. Phase 2 : Injection du ligand. Phase 3 : Injection de l'analyte. Phase 4 : Injection de l'EDTA 350 mM afin de régénérer la surface réutilisable pour d'autres fixations. **B**. Représentation graphique des trois complexes dimériques étudiés, comprenant les étiquettes de purification, les hélices artificielles E et K, et la région extracellulaire complète ou tronquée de FtsL (FL ou FL\*) et DivIC (DC et DC\*). **C**. Sensorgramme des cinétiques de fixation de l'analyte DivIB sur l'hétérodimère H6K5FtsL/H6E5DivIC (courbes verte), ou sur les ligands contrôles négatifs : H6E5DivIC seule (courbes bleues) et H6K5FtsL seule (courbes rouge). Les concentrations de DivIB testées vont de 200 nM à 900 nM par incrément de 100 nM. **D**. Sensorgramme montrant la fixation de quantités équivalentes de (KL/EC) (ligne pleine), (KL\*/EC) (ligne pointillés long), ou (KL/EC\*) (ligne pointillés court) sur l'échelle de gauche, et l'association et la dissociation du fragment - sur les dimères respectifs sur l'échelle de droite.

### 6.2.2.3. DivIC, FtsL et DivIB forment un complexe ternaire *in vivo*

La reconstitution du complexe ternaire *in vitro* a été réalisée avec les protéines recombinantes solubles de *S. pneumoniae*. Les protéines DivIB, DivIC et FtsL de *S. pneumoniae* ayant une faible identité de séquence avec leurs orthologues chez *E. coli* et *B. subtilis*, l'existence du complexe ternaire avec les protéines membranaires entières du pneumocoque devait être validé. Un système triple hybride bactérien membranaire a été utilisé.



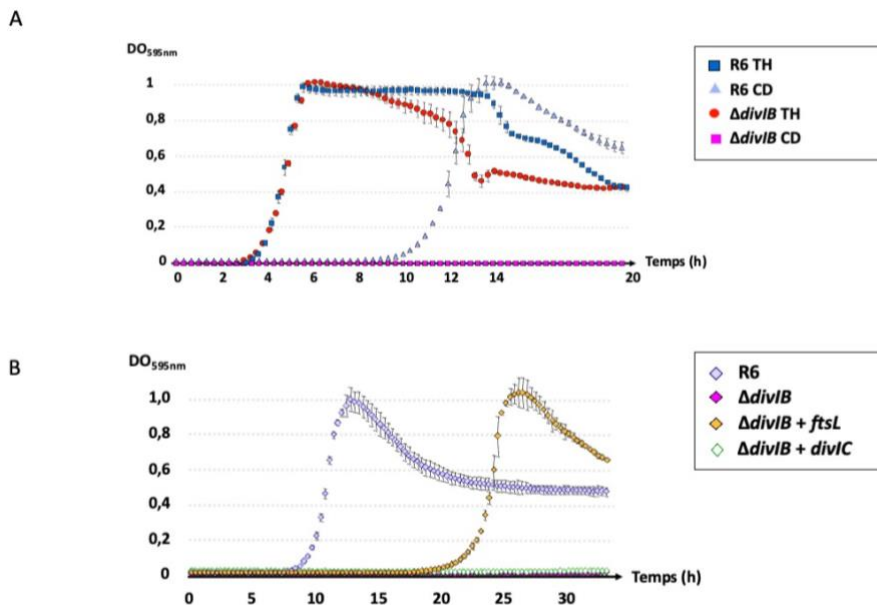
**Figure 7 :** DivIB, DivIC et FtsL de *S. pneumoniae* forment un complexe ternaire *in vivo*. **A.** Principe du triple hybride bactérien membranaire utilisé. 2 protéines sont fusionnées au domaine 434 et P22 respectivement, la troisième est non marquée. En cas d'interaction, le répresseur hybride 434 et P22 reconstitué permet la répression du gène codant pour la β-galactosidase présent sur le chromosome de la souche *E. coli* R721. **B.** 700 μL de tampon Z ont été ajoutés à 300 μL de culture à DO600 = 0,3. Puis 25 μL de toluène ont été additionnés avant de vortexer pendant 30 secondes. Après 30 minutes, 700 μL du fond du tube ont été transférés dans des barrettes de 2ml. 140μL d'ONPG (4 mg.ml<sup>-1</sup>) préparé extemporanément ont été ajoutés et la réaction a été incubée à 37°C. Après 1 minute environ, la réaction a été arrêtée par addition de 300 μL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M et le temps de réaction a été mesuré. Les tubes sont alors centrifugés à 16.000 g pendant 2 minutes et l'absorbance à 420 nm du surnageant a été lue. L'activité β-galactosidase est exprimée en pourcentage par rapport à celle de la souche de référence R721. C=DivIC, B=DivIB, L=FtsL Les barres d'erreurs représentent l'écart type pour 3 expériences.

Les résultats du test de triple hybride montrent que les protéines membranaires DivIB, DivIC et FtsL de *S. pneumoniae* forment un complexe ternaire puisque l'activité bêta-galactosidase diminue en présence des 3 partenaires (Figure 7). Les protéines DivIC et DivIB semblent interagir légèrement. Ces résultats corroborent ceux obtenus par BIACORE® qui montrent une légère interaction entre les domaines extracellulaires des protéines DivIB et DivIC. Au cours de la réalisation de ces travaux, l'équipe de Karimova *et al.* a publié l'existence de ce complexe pour les protéines FtsQ (homologue de DivIB), FtsB (homologue de DivIC) et FtsL d'*E. coli* par un autre système triple hybride bactérien<sup>23</sup>. L'équipe de Daniel *et al.* a démontré l'existence de ce complexe ternaire pour les protéines membranaires DivIB, DivIC et FtsL de *B. subtilis* par des systèmes triple hybride bactérien et de levure<sup>24</sup>. Toutes ces expériences sur le complexe ternaire, isolé par immunoprecipitation<sup>25</sup>, démontré par des approches triples hybrides, bactérien et de levure, et reconstitué *in vitro* par une technique de co-purification<sup>18</sup>, valident donc l'existence du complexe trimérique chez *S. pneumoniae*.

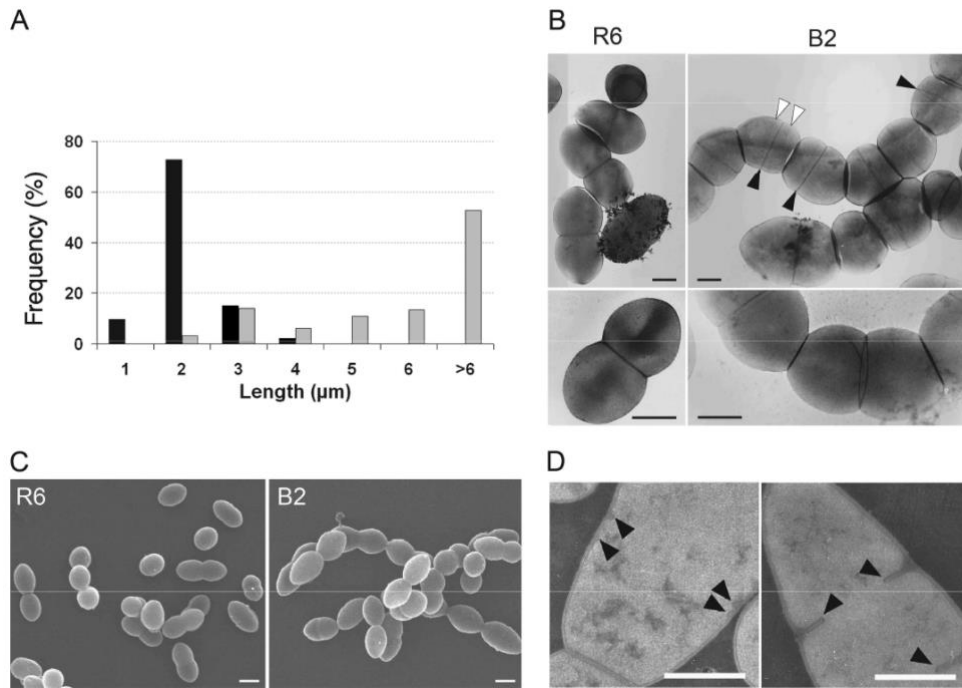
#### 6.2.2.4. Rôle de DivIB dans la division cellulaire

Nous venons de voir que DivIB est localisée au site de division et interagit *in vitro* et *in vivo* avec deux autres protéines de division, FtsL et DivIC. La fonction précise de ces trois protéines membranaires bitopiques, qui sont centrales au processus de division, restait inconnue. Nous

avons décidé de caractériser le rôle de ces 3 protéines *in vivo*. Malheureusement en raison de l'essentialité des protéines DivIC et FtsL, nous n'avons pas pu obtenir de mutant de délétion pour ces 2 gènes chez *S. pneumoniae*, tout comme leur homologue chez *B. subtilis* et *E. coli*. Mais nous avons pu poursuivre la caractérisation phénotypique du mutant de délétion de *divIB* chez *S. pneumoniae* ([Le Gouellec et al.](#)). Contrairement à son homologue FtsQ chez *E. coli*, DivIB n'est pas essentielle pour la croissance et donc la division en milieu riche. Mais elle semble bien impliquée dans la division cellulaire car d'une part le mutant deleté de *divIB* (B2) ne croît pas dans un milieu chimiquement défini (Figure 8A). D'autre part, l'observation au microscope à contraste de phase et par microscopie électronique, nous ont permis d'observer de multiples défauts dans la division, des longues chaînes de diplocoques et environ 5% de cellules plus grosses avec des septa défectueux (Figure 9). L'ajout de sels, d'agents osmolarisant, d'acides aminés manquant dans la composition du milieu défini ne restore pas la croissance du mutant de délétion B2. En revanche, l'ajout d'une copie du gène *ftsL*, et non de *divIC*, sous le contrôle d'un promoteur inductible au maltose restore la croissance du mutant B2 en milieu défini (Figure 8B).

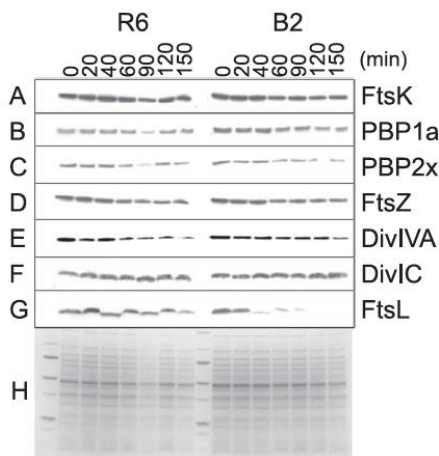


**Figure 8 :** Courbe de croissance des souches de *S. pneumoniae* A. Les souches sauvage (R6) et délétée de *divIB* (B2) ont été inoculées en milieu riche TH ou en milieu chimiquement défini (CD) et la croissance suivie par mesure de la DO<sub>595nm</sub> dans un lecteur de plaque avec lecture toutes les 20 minutes B. Les souches ont été cultivées dans le milieu chimiquement défini. B2 a été modifié génétiquement pour avoir une copie supplémentaire des gènes *ftsL* et *divIC* au locus ami sous le contrôle d'un promoteur inductible. La croissance est suivie par mesure de la DO<sub>595nm</sub> toutes les 20 minutes. Écarts types données pour 3 expériences indépendantes.



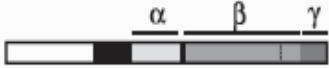





**Figure 9 :** Phénotypes du mutant *divIB* (B2). Les bactéries ont été cultivées dans un milieu TH à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,45 et préparées pour la microscopie. (A) Distribution de la longueur des chaînes des souches R6 (noir) et B2 (gris) (165 mesures chacune). (B) Images de microscopie électronique à transmission de *S. pneumoniae* colorés négativement (les images ont été prises à des grossissements nominaux de 10 000 ou 22 000 [en haut et en bas, respectivement]). Les pointes de flèche blanches indiquent les anneaux équatoriaux, et les pointes de flèche noires les septa. (C) Images de microscopie électronique à balayage. (D) Micrographies électroniques à transmission de coupe de cellules B2 colorées négativement. Les pointes de flèches indiquent les septa naissants. Barres, 0,5 µm.

Par ailleurs, en l'absence de DivIB et de synthèse protéique, le partenaire FtsL est rapidement dégradé, alors que les autres protéines de division ne sont pas affectées, ce qui indique un rôle de DivIB dans la stabilisation de FtsL (Figure 10).



**Figure 10 :** Stabilité *in vivo* de protéines de la division en l'absence de DivIB. Les souches R6 et B2 ont été cultivées dans du milieu TH jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,3 avant l'ajout d'érythromycine (40 µg/ml) pour inhiber la synthèse des protéines. Des aliquots prélevés après les intervalles de temps indiqués ont été analysés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE et immunoblots avec des sérums spécifiques des protéines indiquées à droite (A à G). (H) Gel correspondant, coloré au bleu de Coomassie, de lysats cellulaires totaux.

Des expériences de complémentation avec des allèles variants de DivIB (plus ou moins long et mutés) ont été réalisées (Figure 11). La cartographie fonctionnelle des trois domaines distincts  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de la région extracellulaire (Figure 11) a révélé qu'un domaine  $\beta$  complet est nécessaire pour restaurer complètement le phénotype du mutant de délétion. En effet, un domaine  $\beta$  tronqué ne reverse que le phénotype de formation des chaînes (séparation des cellules filles correcte mais pas de croissance en milieu CD). Le domaine  $\gamma$  ne semble pas essentiel à l'activité de DivIB dans la division. Et enfin, le remplacement du glutamate, un acide aminé très conservé en position 222, par une alanine ne permet pas de restaurer la croissance du mutant B2 en milieu CD mais réduit un peu la longueur des chaînes en milieu riche.

Allele	Description of gene product	Average chain length ( $\mu\text{m}$ )	Growth CD
Vector	None	4.7	-
<i>divIB</i>		1.9	+
<i>divIBE222 A</i>		2.8	+
<i>divIB<math>\Delta\gamma</math></i>		2.1	+
<i>divIBS337*</i>		2.1	-
<i>divIB<math>\Delta\beta\gamma</math></i>		4.0	-
<i>divIB<math>\Delta ec</math></i>		4.0	-

**Figure 11** : Caractérisation fonctionnelle des différents domaines de DivIB. Le domaine cytoplasmique N-terminal est en blanc. La partie transmembranaire est en noir. Les trois différents domaines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , sont en nuance de gris. Les différents allèles de DivIB sont introduits au locus *bgaA* de la souche B2 (délétée de *divIB*). Une analyse des phénotypes des cultures en phase exponentielle de croissance a été réalisée par microscopie à contraste de phase. Pour chaque souche, 200 particules ont été analysées et la longueur des particules mesurée. La croissance a été réalisée dans un milieu chimiquement défini (CD) dans une plaque 12 puits à 37°C, + Temps de génération de 45 min environ, - Absence de croissance 35h après inoculation.

#### 6.2.2.5. Rôle de DivIB dans la synthèse de la paroi septale

Pour vérifier le rôle de DivIB dans la synthèse de la paroi cellulaire, nous avons mesuré l'impact de l'inactivation de la protéine DivIB sur la sensibilité aux antibiotiques de type  $\beta$ -lactamines. Ce sont des antibiotiques qui ciblent les protéines de liaison à la pénicilline (PBP) qui synthétisent un élément de la paroi, le peptidoglycane. Les mutants délétés en *divIB* (B2 et B22X5204) sont plus sensibles aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines (pénicilline G

et au cefotaxime) que les souches possédant une copie du gène *divIB*, respectivement d'un facteur 2 et 4 (Table 2). Aucune modification de la résistance à l'ofloxacine, une fluoroquinolone bloquant la réplication et la transcription de l'ADN, et à la gentamicine, un aminoglycoside inhibant la synthèse protéique, n'ont été observées.

Strain	MIC (mg liter <sup>-1</sup> )			
	Cefotaxime	Penicillin G	Ofloxacin	Gentamicin
R6	0.032	0.032	1.5	24
B2	0.015	0.015	1.5	24
R62X5204	0.38	0.094	1.5	24
B22X5204	0.094	0.023	1.5	24

Table 2 : Effet de de la délétion de *divIB* sur la résistance aux antibiotiques

Dans la souche résistante aux  $\beta$ -lactamines (R62X5204), dans laquelle PBP2x a une affinité diminuée pour ces antibiotiques, l'absence de DivIB restaure la sensibilité au  $\beta$ -lactamines, ce qui fait de DivIB une cible de choix pour rétablir l'efficacité des antibactériens les plus testés et les plus utilisés au monde, les  $\beta$ -lactamines. Tout comme l'augmentin, alliant amoxicilline et acide clavulanique, ce dernier ciblant l'activité D,D-carboxypeptidase de PBP3 et restaurant la sensibilité des souches à l'amoxicilline.

**Bilan :** Ces travaux m'ont permis d'être autrice de 3 publications (P2 : [Noirclerc et al.](#), P4 : [Le Gouellec et al.](#) et P5 : [Masson et al.](#)).

### 6.3. Travaux de recherche actuels

#### Partie 1. Étude de l'interaction de *Pseudomonas aeruginosa* avec son hôte

**Encadrant :** Pr B. Toussaint

**Laboratoire d'accueil :** équipe de recherche TrEE (Resp : Pr B. Toussaint/D. Schneider)

**Mots clés :** *P. aeruginosa*, virulence, métabolisme, évolution

Le laboratoire TIMC ("Translational Innovation in Medicine and Complexity" ou « Recherche Translationnelle et Innovation en Médecine et Complexité ») est une unité mixte UMR 5525 placée sous tutelle du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), de l'Université Grenoble Alpes, de l'école vétérinaire de Lyon (VetAgroSup), et de Grenoble INP. Il est dirigé par le Pr A. Moreau-Gaudry, et accueille plus de 160 permanents répartis en 12 équipes et 10 plateformes. J'appartiens à l'équipe TrEE, (Translational microbiology, Evolution and Engineering), qui résulte de la fusion des deux anciennes équipes du laboratoire TIMC, GEM (Génomique et Évolution Microbienne) et TheREx (Thérapeutique Recombinante Expérimentale) du précédent contrat quinquennal. L'équipe GEM étudie depuis plusieurs années, les bases génomiques et écologiques de l'évolution des bactéries, et l'équipe TheREx, les interactions entre les microorganismes et leur hôte dans différentes situations pathologiques. L'équipe est répartie sur 2 étages différents du bâtiment Jean Roget du site santé et est co-dirigée par le Pr Dominique Schneider et le Pr Bertrand Toussaint.

Les domaines scientifiques couverts par l'équipe sont la microbiologie et les biotechnologies pour la santé en proposant un continuum entre recherche fondamentale et translationnelle dans un objectif d'innovation diagnostique et/ou thérapeutique. Ces travaux sont regroupés autour de 5 grands axes :

- **Axe 1 : Évolution et ingénierie du métabolisme (Resp. Dr. Audrey Le Gouellec & Dr. Fabien Pierrel)**

Je co-dirige l'axe « évolution et ingénierie du métabolisme » qui rassemble cliniciens et chercheurs qui étudient l'évolution du métabolisme des micro-organismes en lien avec son environnement et conçoivent des microbes ingénierés intelligents répondant à des problématiques de santé. Nous concentrons nos recherches sur l'étude des évolutions métaboliques à différentes échelles de temps et d'espèces en combinant des approches expérimentales et bio-informatiques. Entre autres projets de recherche, nous étudions notamment l'évolution du métabolisme de souches de *Pseudomonas aeruginosa* chez des patients atteints de mucoviscidose sur plusieurs années en lien avec leur virulence, résistance

aux antibiotiques. Nous nous intéressons également aux quinones isoprénoides qui jouent un rôle central dans le métabolisme énergétique des bactéries. Nous étudions la biochimie des voies de biosynthèse des quinones, leurs contributions physiologiques dans des bactéries modèles dont certaines pathogènes, et leur évolution dans les phyla bactériens au cours des 2 derniers milliards d'années. Fort de ces connaissances, nous réalisons de l'ingénierie ciblée par biologie de synthèse pour obtenir des biomédicaments vivants recombinants (ou « Live biotherapeutic product ») que nous testons dans des modèles animaux de maladies inflammatoires ou des modèles infectieux.

- **Axe 2 : Évolution et ingénierie du microbiote (Resp. Prof. Antonia Suau-Pernet & Dr. Dalil Hannani)**

Dans cet axe, les chercheurs de l'équipe étudient l'impact du microbiote intestinal sur l'hôte, en particulier sur son système immunitaire, en situation normale et pathologique (réponse à la vaccination, cancer, auto-immunité, infections aiguës ou chroniques). Pour cela, nous étudions la composition du microbiote (séquençage 16S ou métagénome) et sa fonction (analyses métabolomiques) en parallèle du statut immunitaire de l'hôte (immunité intestinale et systémique). En particulier la mise en place du microbiote chez les enfants nés prématurément, en termes de dynamique d'implantation des espèces et d'évolution des génomes des souches implantées afin de comprendre les déterminants de cette interaction tant du côté bactérien que du côté de l'hôte. Mais développent également de nombreuses stratégies de manipulation et d'optimisation contrôlées du microbiote intestinal, notamment par prébiotique, probiotique et bactéries ingénierées sur des voies métaboliques d'intérêt. Ces stratégies visent à augmenter l'immunosurveillance anti-tumorale, la réponse aux immunothérapies des cancers, la tolérance immunitaire en contexte de pathologie inflammatoire de l'intestin etc...

- **Axe 3 : Évolution de la structure et de l'expression des (méta)-génomomes (Resp. : Dr. Ivan Junier & Dr. Thomas Hindré)**

L'axe "Évolution de la structure et de l'expression des (méta)-génomomes" s'intéresse aux déterminants génomiques responsables des propriétés remarquables d'adaptation des microorganismes (archées, bactéries). Il rassemble des chercheurs et enseignants chercheurs dans les domaines de la génétique moléculaire, de l'évolution expérimentale, de la biologie computationnelle, de la bioinformatique et de la biophysique. La composition et l'organisation des génomes sont fortement contraintes par la sélection naturelle, mais également par des effets de dérive neutre, qui opèrent à de multiples échelles de temps, allant de quelques générations à des milliards de générations. En résulte, des génomes mosaïques complexes, mêlant aussi bien

structures stables que dynamiques, qui sont responsables de l'extraordinaire capacité adaptative des microorganismes. Dans cet axe, nous étudions les mécanismes de cette plasticité afin de mieux prédire les réponses adaptatives de ces microorganismes en lien avec la santé, comme par exemple dans le cas de l'émergence de pathogènes ou de la résistance aux antibiotiques. Pour cela, nous combinons trois types d'approches évolutives :

- i) des expériences d'évolution *in vitro*, et en particulier l'expérience d'évolution au long terme (LTEE) chez *Escherichia coli*, pour caractériser les mécanismes moléculaires et écologiques qui sous-tendent les processus adaptatifs, et appréhender l'impact des taux de mutation et des éléments génétiques mobiles sur ces processus ;
- ii) des analyses de génomique comparative et de reconstruction phylogénomique des (méta)-génomés *in natura* permettant d'exploiter les propriétés de conservation des génomes et de leur dynamique sur des longues échelles de temps ;
- iii) des expériences d'évolution *in silico* permettant de tester, à grande échelle et à long terme, l'impact de différents paramètres sur les parcours évolutifs.

Nous développons également des modèles biophysiques et des outils statistiques pour l'étude des chromosomes afin de comprendre l'impact de la structure tridimensionnelle des génomes sur le fonctionnement des microorganismes.

- **Axe 4 : Évolution vers la résistance aux antimicrobiens (Resp. : Prof. Muriel Cornet & Pr. Corinne Mercier)**

Les objectifs de cet axe de recherche incluent l'analyse des trajectoires évolutives qui conduisent à la mise en place de mécanismes de résistances (résistances intrinsèques, résistances aux faibles doses et aux fortes doses) et de tolérance aux agents anti-microbiens (antibiotiques et antifongiques). Ces études sont menées *in vitro* (induction des résistances sous pression antibiotique ou antifongique), *in natura* (patients, environnement) et *in silico*. Elles font appel à des technologies variées (microbiologie, métagénomique, génétique, biologie cellulaire, biochimie, métabolomique, lipidomique, immunologie, épidémiologie, analyses statistiques multivariées, ...). Les données fondamentales permettent le développement de tests diagnostiques et de nouveaux moyens de lutte contre les agents infectieux ciblés (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces spp*, *Candida spp*, et agents de zoonoses...).

- **Axe 5 : Vectorisation et membranes (Resp. : Dr. Béatrice Schaack & Prof. Jean-Luc Lenormand)**

L'axe "Vectorisation et Membranes" s'intéresse à l'étude des membranes et des protéines membranaires dans les problématiques d'interactions hôte-pathogène, de détermination de cibles antigéniques membranaires et de l'influence de l'environnement lipidique sur la structure et la fonction des protéines membranaires. Ces études font appel à plusieurs approches expérimentales incluant la production et la caractérisation au niveau biochimique et biophysique des vésicules extracellulaires issues de différents organismes procaryotes et eucaryotes, la production de protéines membranaires sous forme de protéoliposomes grâce à des systèmes d'expression acellulaire en présence de lipides synthétiques de différentes compositions, l'utilisation des techniques de microscopie (AFM, électronique, fluorescence), la DLS, la spectroscopie d'impédance (Tethapod) et le dichroïsme circulaire pour n'en citer que quelques-unes. Afin de permettre une meilleure internalisation de certaines macromolécules, des systèmes de vectorisation sont utilisés tels que des peptides de pénétration cellulaire et des liposomes synthétiques. Ces approches biotechnologiques permettent de mieux comprendre au niveau des membranes des pathogènes et des cellules hôtes, certains mécanismes moléculaires responsables de la pathogénèse et d'apporter des solutions thérapeutiques ou vaccinales innovantes. Ces approches sont utilisées pour traiter certaines bactéries multi-résistantes aux antibiotiques mais aussi des infections fongiques ou certains types de cancers.

### **6.3.1. Contexte de mes travaux**

#### **6.3.1.1. *Mise en contexte et définition de la virulence***

Au-delà des aspects de division bactérienne, une bactérie peut être plus ou moins virulente vis-à-vis de son hôte. Or, revenons un moment sur la définition de ce qu'est la virulence. En effet, la précision des noms donnés aux concepts et phénomènes est indispensable à la communication en science. Bien que notre compréhension de la "pathogénicité" et de la "virulence" se soit améliorée au cours des 50 dernières années, l'utilisation de ces termes reste confuse et largement débattue dans de nombreux ouvrages de pathologie infectieuse. Plusieurs raisons expliquent cette confusion : les listes de définitions sont difficiles à trouver, certaines définitions ne sont pas clairement énoncées, des divergences d'opinion valables existent quant à l'utilisation de certains termes, de nombreux biologistes ne connaissent pas l'existence de telles listes et certains auteurs manquent de précision dans la communication<sup>26</sup>.

La virulence a été décrite historiquement comme la capacité d'un organisme à infecter l'hôte et à provoquer une maladie<sup>27</sup>. Elle a traditionnellement été utilisée pour décrire une caractéristique

microbienne. Les mots "virulence" et "virulent" dérivent du mot latin "virulentus", qui signifie "plein de poison". "Virulentus" dérive des mots latins "virus" ("poison") et "lentus" ("plénitude"), et, à son tour, le terme "virus" peut être lié au mot sanskrit "visham", qui signifie "poison". Cette utilisation est cohérente avec la signification ancienne de la virulence comme une caractéristique microbienne qui implique une capacité à délivrer un poison et donc à provoquer une maladie. Ce concept a été étendu pour impliquer que c'est la caractéristique de virulence qui distingue les pathogènes, considérés comme virulents, des non-pathogènes, considérés comme non virulents. Mais selon les définitions modernes, la virulence est la capacité d'un agent pathogène **à se multiplier et à nuire à son hôte**<sup>28</sup>. La majorité des microbiologistes qui étudient les microbes (bactéries, virus, champignons, ou parasites) semblent utiliser la virulence selon cette définition. Les écologistes et les biologistes de l'évolution appliquent parfois une définition plus stricte de la virulence, dans laquelle les dommages causés à l'hôte revêtent une plus grande importance que la croissance ou le « fitness » du microbe lui-même. Il ne s'agit toutefois pas d'une simple question de sémantique : nombre des problèmes plus profonds que pose la notion de virulence peuvent provenir de cette définition plus étroite. Les définitions opérationnelles de la virulence utilisées dans les récentes études théoriques ou empiriques de l'évolution des microbes se sont concentrées sur les effets induits par le pathogène sur la santé de l'hôte. Dans les modèles, la virulence est toujours définie avec précision et considérée comme la principale composante quantitative de la valeur adaptative du microbe. Celles-ci varient d'une étude à l'autre, mais consistent généralement soit en l'étude du taux de mortalité ou de succès de survie des hôtes infectés par rapport aux hôtes non infectés. Toutes ces définitions sont centrées sur l'hôte, et sont à peu près synonymes des effets pathogènes ultimes des microbes sur la santé de l'hôte. L'un des principaux problèmes que pose le concept de virulence vient de la mesure de la pathogénicité comme substituts de la virulence. Or, la pathogénicité est une propriété de l'association hôte-microbe<sup>29</sup>. La réduction de la survie induite par le microbe est le produit non seulement des actions du microbe, mais aussi des réponses de l'hôte (immunité innée, adaptative, etc...). De nombreuses études sur la virulence supposent tacitement que les hôtes sont des entités monolithiques, mais oublient qu'ils évoluent également (bien qu'à un rythme plus lent que les microbes). Il existe une variabilité intra- et interspécifique considérable entre les hôtes dans leur capacité à faire face aux infections comme en témoigne récemment les effets du virus SARS-CoV2 sur l'Homme (50% des personnes infectées sont asymptomatiques). Les effets pathogènes d'un microbe dépendent donc non seulement de l'espèce hôte, mais aussi de l'individu qu'il infecte. Les effets dépendent

également de l'état nutritionnel de l'hôte ou, en raison de la synergie possible entre les microbes, de la présence d'autres espèces de microbes (au sein de son microbiote par exemple).

Nous pourrions obtenir des estimations sensiblement différentes de la virulence d'un microbe individuel en utilisant différents hôtes, même si l'expression des gènes du microbe au sein de ces hôtes était la même. La plasticité phénotypique dans l'exploitation des ressources de l'hôte par le microbe, en réponse à la variation de l'environnement de l'hôte, est bien présente et module la virulence du microbe. Ainsi, les mesures actuelles de la virulence peuvent être de mauvais reflets des actions réelles du microbe. La virulence n'est souvent qu'une des nombreuses composantes de la capacité de croissance et d'adaptation du microbe, mais elle n'est pas forcément la plus importante. Il ne fait aucun doute que les effets pathogènes des microbes sur les hôtes, qui sont au cœur de nombreux travaux récents sur la virulence, sont importants pour la médecine.

Le concept de virulence, quelle que soit sa définition, est une propriété de l'interaction hôte-microbe, souvent traitée comme une propriété du microbe. Pourtant, elle est mesurée indirectement par ses effets sur l'état de santé de l'hôte : la caractéristique présumée d'un organisme est mesurée par son effet sur un autre organisme. Il semble préférable de reformuler notre définition de la virulence comme une expression directe des gènes du microbe afin d'étudier son évolution. Ce que les chercheurs recherchent, c'est la stratégie génétique réelle d'un microbe qui spécifie la vitesse à laquelle les ressources de l'hôte sont exploitées, comment cette stratégie se comporterait par rapport à d'autres stratégies possibles en termes de nombre de descendants qu'elle peut produire, et comment divers agents de sélection déterminent quelle stratégie est actuellement optimale. L'exploitation des ressources de l'hôte a des conséquences néfastes pour celui-ci, mais comme la génétique de l'hôte et de nombreuses variables environnementales modulent également l'expression des effets pathogènes, la pathogénicité est un mauvais substitut à une mesure plus directe de la virulence. L'idéal serait d'essayer de mesurer directement le taux d'exploitation des tissus de l'hôte par les microbes, c'est-à-dire de quantifier ce que fait réellement le microbe plutôt que ses conséquences (nous reverrons cela dans la partie de mon travail sur le modèle d'infection aiguë pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*). Dans la plupart des systèmes hôte-microbe, cela est très difficile à mesurer. Une alternative, également préférable à l'étude de la pathogénicité, serait de combiner une étude des effets induits par le microbe sur les hôtes avec une certaine mesure de l'aptitude du microbe, comme le succès de la transmission ou les taux de reproduction dans l'hôte. Si nous voulons comprendre plus clairement l'évolution des microbes, nous devons nous concentrer sur les mesures du succès du microbe à coloniser en plus de ses effets sur l'hôte.

L'utilisation du terme "virulence" et l'absence d'un autre terme, plus approprié, pour désigner la stratégie d'exploitation réelle du microbe ont orienté l'étude et la compréhension de l'évolution des microbes dans une direction, empêchant l'exploration des autres. Il sera impossible, et inutile, d'abandonner le mot "virulence" et de le remplacer par un autre ; il vient avec beaucoup de bagages et est là pour rester.

Ce qui est nécessaire, cependant, c'est de reconnaître que : (1) la virulence est utilisée comme une mesure centrée sur l'hôte d'un phénomène qui n'est une caractéristique ni de l'hôte ni du microbe mais du complexe hôte-microbe ; et (2) qu'elle n'est pas une expression directe des gènes du microbe (ou de l'hôte) et, bien qu'elle soit le résultat de processus sélectifs, elle n'est pas une cible de sélection facilement traçable. Le génotype du microbe s'exprime dans les actions du microbe au sein de l'hôte, alors que la virulence est une conséquence du phénotype du microbe. Un autre axe d'étude serait une mesure centrée sur le microbe de l'agressivité avec laquelle il exploite les ressources de l'hôte, en tant qu'expression d'une stratégie génétique qui maximise l'aptitude du microbe. Poulin et Combes ne proposent pas d'abandonner le terme de virulence. Ils aimeraient plutôt que l'on mette davantage l'accent sur la partie oubliée de la définition originale du mot, c'est-à-dire la capacité du microbe à se multiplier<sup>27</sup>. La pathogénicité et l'aptitude du microbe à se diviser ne sont pas indépendantes, mais la première n'est pas un reflet parfait de la seconde. Les interprétations de l'évolution des microbes basées uniquement sur les observations de la réduction de l'aptitude de l'hôte induite par le microbe sont sujettes à erreur.

Dans une expérience d'infection utilisant 55 isolats de *Mycoplasma gallisepticum*, qui ont été collectés pendant une épidémie sur une durée de 20 ans frappant l'espèce d'oiseau chanteur nord-américain, le roselin familier (*Haemorrhous mexicanus*), les auteurs ont démontré que la virulence a augmenté linéairement depuis l'épidémie jusqu'à aujourd'hui, ce qui représente plus de 150 000 générations bactériennes. Malgré cela, le taux de réplication bactérienne n'a augmenté que pendant la propagation initiale de la résistance de l'hôte, mais pas par la suite. Ainsi, contrairement aux hypothèses courantes, les taux de virulence et de réplication peuvent évoluer indépendamment, en particulier après la propagation initiale de la résistance de l'hôte<sup>30</sup>.

Les facteurs de virulence sont les molécules qui aident la bactérie à coloniser l'hôte au niveau cellulaire et à rendre la bactérie virulente. Ces facteurs sont soit de nature sécrétoire, soit associés à la membrane, soit cytosoliques. Les facteurs cytosoliques permettent à la bactérie de subir rapidement des changements adaptatifs, métaboliques, physiologiques et

morphologiques. Les facteurs de virulence associés à la membrane aident la bactérie à adhérer et à échapper à la cellule hôte. Les facteurs de virulence sécrétés sont des composants importants de l'arsenal bactérien qui aident la bactérie à passer au travers de la réponse immunitaire innée et adaptative mise en place chez l'hôte.

#### **6.3.1.2. Cas de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa***

À la lumière des nouveaux concepts importants du microbiote pulmonaire, de la dysbiose et de la dysimmunité, il est important de comprendre les mécanismes moléculaires qui se produisent pendant l'infection par *P. aeruginosa*. C'est un pathogène opportuniste responsable d'infections aiguës sévères, d'infections nosocomiales et d'infections chroniques, comme dans le cas de la mucoviscidose où il est la bactérie pathogène la plus fréquente à l'origine d'une infection pulmonaire. Bien que les stratégies d'éradication des agents pathogènes se soient avérées efficaces pour améliorer la survie des patients atteints de mucoviscidose, elles ne sont pas sans limites. L'éradication à long terme n'est pas possible car, entre autres, la bactérie devient progressivement multi-résistante aux antibiotiques. C'est pourquoi de nouvelles stratégies de lutte contre *P. aeruginosa* sont en cours de développement dans le but d'affaiblir ses nombreuses capacités d'adaptation. L'adaptabilité de cette bactérie est renforcée par la mise en œuvre de programmes complexes basés sur l'expression de réseaux de régulation génique dont les produits sont conçus pour atténuer les réponses anti-infectieuses de l'hôte.

*P. aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif de la famille des *Pseudomonadaceae*. Cette famille comprenant 10 genres dont le genre *Pseudomonas* qui comprends 7 espèces dont *P. aeruginosa*. C'est en 1862 que Luke a mis en évidence pour la première fois une infection chez l'Homme à *P. aeruginosa*. Ce bacille pyocyanique, appelé autrefois ainsi, à cause de la couleur bleu-vert qu'il produit, mesure entre 1 et 5 µm de long et 0,5 et 1 µm de large. Il possède un flagelle monotriche polaire, lui conférant des propriétés de motilité et d'invasion des tissus. C'est une bactérie ubiquitaire colonisant différentes niches écologiques, en lien avec la présence humaine. Elle peut vivre à l'état saprophyte dans l'eau, le sol, les surfaces, ce qui en fait un pathogène nosocomiale majoritaire, responsable de nombreuses infections contractées dans le milieu hospitalier (3<sup>ème</sup> agent bactérien responsable d'infections nosocomiales). Elle est la cause de plus de 4000 décès par an en France. Grâce, d'une part à sa capacité d'adaptation métabolique (elle est capable de métaboliser 50 composés organiques et inorganiques) et d'autre part, à ses capacités de régulation d'expression des gènes (8,4% des gènes sont impliqués dans la régulation d'autres gènes <sup>31</sup>), elle peut coloniser différents habitats et s'adapter facilement à son environnement.

Parmi les nombreux **facteurs de virulence** chez *P. aeruginosa*, on retrouve les pili de type IV, le flagelle et les lectines, qui sont impliqués dans l'adhésion et la mobilité pour le flagelle, et plusieurs systèmes de sécrétion de protéines tels que le système de sécrétion de type 1 (sécrétion d'AprA, etc.), le système de sécrétion de type 2 (ToxA, PrpL, LasA et B, etc. ), le système de sécrétion de type 3 ou SST3 (exotoxines S, T, Y et U), le système de sécrétion de type VI, et les sidérophores (pyocheline, pyoverdine, pyocyanine, etc.), qui sont connus pour être des mécanismes importants dans la virulence de *P. aeruginosa* en modèle d'infection aiguë <sup>32,33</sup>.

### **6.3.1.3. Le SST3 et sa régulation chez *P. aeruginosa***

Je développerai ici particulièrement le SST3, sa composition, sa structure et régulation qui sont nécessaires à la compréhension des travaux que j'ai réalisés pour optimiser le vecteur vaccinal BacVac (voir Partie 2. Paragraphe 2). Le SST3 ou injectisome est un complexe macromoléculaire d'une vingtaine de protéines<sup>34</sup>, permettant l'injection des exotoxines (ExoS, T, Y et U) directement dans le cytoplasme des cellules de l'hôte infecté. L'expression des gènes du SST3, entre autre ExoS<sup>35</sup>, est hautement régulée par l'activateur transcriptionnelle ExsA, régulateur de la famille AraC/XylS<sup>36,37</sup>. Des signaux d'activation, tels que la croissance dans des conditions limitant le calcium (agent de chélation de type EGTA) ou le contact de *P. aeruginosa* avec des cellules eucaryotes, font passer la machinerie de sécrétion de type 3 à un état actif <sup>38-40</sup>. Le SST3 se compose d'un corps basal, de l'aiguille, des exotoxines et du translocon. Le corps basal est constitué de protéines présentes dans la membrane interne (PscD, PscR, PscS, PscT, PscT, PscU et PscV) et dans la membrane externe (un oligomère de PscC). L'aiguille se compose d'un polymère de PscF se terminant au bout par la protéine PcrV. Lors du contact avec la cellule, un pore de translocation formé par les protéines PopB et PopD, permet l'injection des exotoxines (ExoS, T, Y et U) directement dans la cellule eucaryote.

Dans ce chapitre d'ouvrage, [Le Gouellec et al. 2013](#), nous avons décrit et mis en évidence les principaux facteurs régissant la régulation du SST3 chez *P. aeruginosa*. Malgré le grand nombre de gènes qui influencent la régulation de l'expression des gènes SST3 chez *P. aeruginosa*, seul une minorité a été montré comme ayant un rôle précis (Figure 12). C'est le cas du régulateur global Vfr, de la protéine de liaison à l'ARN, RsmA, de la protéine de liaison au promoteur *exsCEBA*, dénommée PsrA, et de la cascade de couplage sécrétion/régulation ExsADCE. Il reste encore beaucoup à étudier en ce qui concerne les autres composants majeurs des voies de régulation pour avoir une vision totalement intégrée de la base physiologique de

cette régulation. Mais principalement voici en résumé les principaux facteurs influençant l'expression du SST3 : (i) Tout d'abord, la bactérie doit induire l'expression du SST3 via l'expression du facteur de transcription ExsA et activer le système ExsADCE, qui est basé principalement sur un système d'inhibition protéine/protéine. Cette cascade est activée *in vivo* par le contact avec la cellule hôte, ce qui n'est que partiellement mimé par la déplétion calcique *in vitro*. De manière intrigante, lorsque le niveau intracellulaire de la protéine ExsA est trop bas, la déplétion calcique n'est pas capable d'activer le SST3, ce qui a été attribué à une bistabilité du système par Filopon *et al.* <sup>41</sup>. Cette bistabilité pourrait expliquer l'apparition d'un clone SST3 négatif à partir d'une souche SST3 positive après de nombreuses générations sans induction du SST3. (ii) Un réseau très complexe de gènes, impliqués dans la détection du stress et du stress métabolique, contrôle la capacité de la cellule à activer ce facteur de virulence à forte consommation d'énergie. Un couplage de contrôle énergétique a également été observé pour d'autres pathogènes Gram négatifs, comme *Shigella*, qui active le SST3 en fonction du niveau d'oxygénation de la zone d'infection<sup>42</sup>. La détection du stress et/ou stress métabolique implique les acides aminés, les acides gras à longues chaînes, l'AMPc, l'acteyl-CoA et d'autres métabolites. (iii) Les bactéries utilisent également un ensemble complet de systèmes de détection de l'hôte ou de l'environnement, principalement pour coordonner l'expression des différents facteurs de virulence en fonction du type, du moment ou du site de l'infection. Des complexes spéciaux de détection/régulation peuvent exister pour détecter la réponse immunitaire de l'hôte, comme cela a été suggéré dans des études différentes par le rôle, bien que non complètement élucidé, de la protéine OprF<sup>43</sup>. OprF pourrait être un détecteur de l'activation immunitaire de l'hôte (par l'intermédiaire de l'IFN- $\gamma$ ) et semble jouer un rôle central dans l'activation de différents facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. (iv) *P. aeruginosa* possède également un système de communication intercellulaire très efficace, qui utilise non seulement les signaux du Quorum Sensing classiques mais probablement aussi des signaux moins bien caractérisés, des métabolites dont certains appartiennent au catabolisme du tryptophane et pourraient constituer une signature spécifique de la cellule hôte entre autres des cellules immunitaires (voir parties résultats Rôle des catabolites du tryptophane). (v) Enfin, une adaptation à plus long terme pourrait se produire par la sélection de mutations perte de fonction dans des régulateurs clés. Il est maintenant bien connu que l'adaptation à long terme de *P. aeruginosa* au cours de l'infection chez les patients atteints de mucoviscidose est due à la sélection de divers génotypes et phénotypes à partir d'un clone infectant, un processus appelé radiation adaptative<sup>44</sup>. Au cours de ses évolutions dans les poumons des patients, les bactéries *P. aeruginosa* présentent une virulence modifiée mais non réduite, et cette virulence adaptée

joue un rôle essentiel dans la pathogenèse des infections chroniques<sup>45</sup>. Cette diversité acquise est due à des mutations « perte de fonction » dans certains gènes de *P. aeruginosa*. Les mutations « perte de fonction » dans *mucA* et *lasR* déterminent l'évolution vers un phénotype de type mucoïde et une perte du système de Quorum Sensing<sup>46,47</sup>. Cette adaptation génétique au cours des infections chroniques implique également les capacités d'hypermutation des souches hypermutantes (ou mutatrices), déficientes en système de réparation des mésappariements de l'ADN. Le pourcentage d'isolats extraits de patients CF, positifs pour le SST3 diminue drastiquement avec la durée de l'infection, passant de 45 % lors des premières infections chez les enfants à 11 % chez les adultes<sup>48</sup>. Dans une étude plus ancienne, il a été démontré que 12 isolats de *P. aeruginosa* issus de patients CF, incapables d'effectuer une sécrétion de type III, possédaient des gènes du SST3 et l'activateur transcriptionnel *exsA*, mais ne présentaient aucune activation transcriptionnelle de l'opéron régulateur *exsCBA*<sup>49</sup>. L'expression d' *ExsA* en trans a restauré la sécrétion *in vitro* des protéines du SST3, première indication que l'adaptation pourrait agir sur les circuits de régulation SST3.

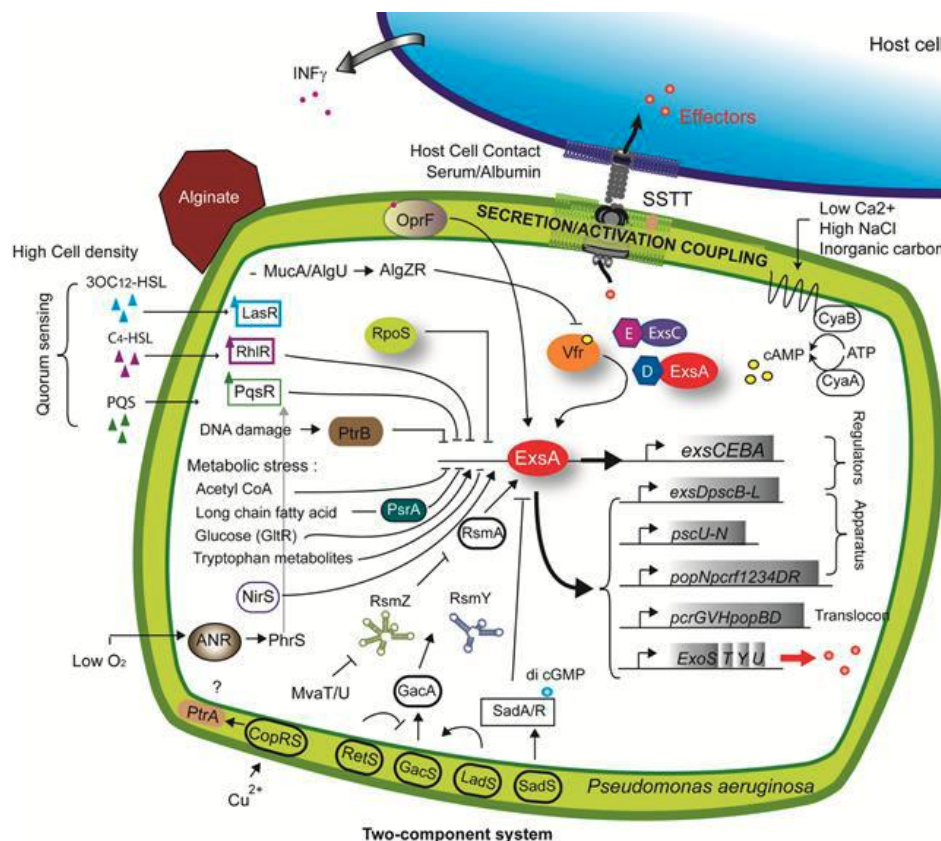


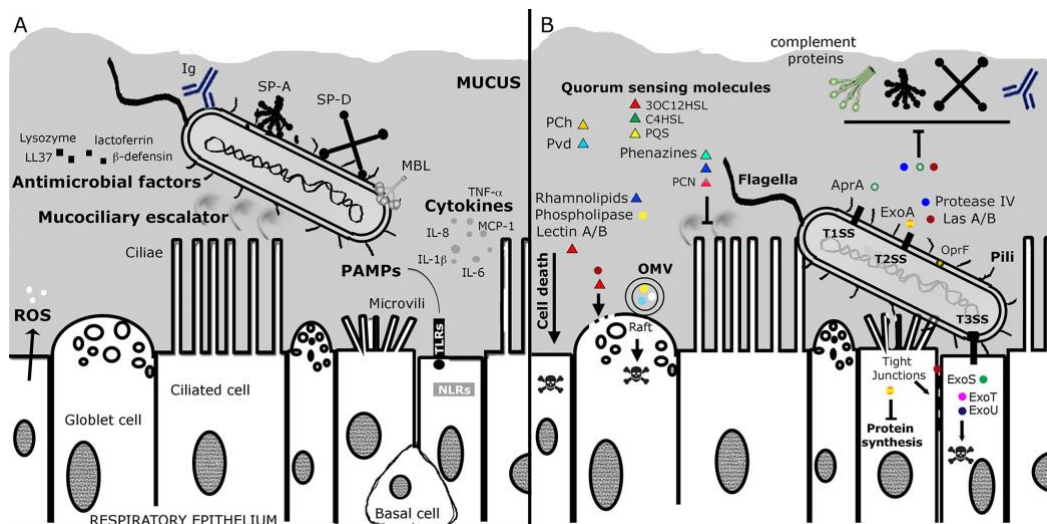
Figure 12 : Schéma de la régulation du système de sécrétion de type 3 de *P. aeruginosa*. D'après notre chapitre de livre [Le Gouellec et al. 2013](#)<sup>50</sup>

### 6.3.1.4. Interaction entre *P. aeruginosa* et les cellules de l'immunité dans le poumon

Différents effecteurs moléculaires produits et/ou sécrétés par la bactérie sont en effet capables d'interagir avec pratiquement tous les composants de la réponse de l'hôte, notamment les barrières muqueuses et épithéliales ainsi que les cellules ou effecteurs du système immunitaire inné et adaptatif. Je reviens ici sur **1.** les différents moyens de défense de l'Homme contre les infections à *P. aeruginosa*, en mettant l'accent sur les infections pulmonaires, et **2.** Décris à chaque fois les divers effecteurs moléculaires que *P. aeruginosa* utilise pour affaiblir les défenses de l'hôte en fournissant des détails sur leur mode d'action (Figure 13).

Trois mécanismes principaux sont impliqués dans la réponse immunitaire de l'hôte à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* :

- **Des mécanismes de défense mécaniques**, qui permettent de piéger les agents pathogènes dans le mucus et de les rejeter via " l'ascenseur mucociliaire ", grâce à l'action des cellules épithéliales.
- **Des mécanismes de défense moléculaires par les cellules épithéliales**, par la sécrétion de cytokines, de chémokines et de peptides antimicrobiens permettant la mise en place de la réponse immunitaire cellulaire <sup>51,52</sup>.
- **Des mécanismes de défense cellulaire**, qui comprennent la réponse immunitaire innée via les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques et la réponse immunitaire adaptative via les lymphocytes.



**Figure 13 :** Mécanismes de défense mécanique et épithéliale et réponses de *P. aeruginosa* au cours de la première étape de l'infection. A : Les défenses de l'hôte à la surface de l'épithélium respiratoire pulmonaire B : Réponses moléculaires de *P. aeruginosa*. PCN : Pyocyanine, Pch : Pyocheline, Pvd : Pyoverdine, OMV : Vésicules de la membrane externe, Ig : Immunoglobuline, SP-A et SP-D : Surfactant A et D, PAMPs : Pathogen associated molecular patterns. Les ronds représentent les protéines et les triangles les métabolites.

#### 6.3.1.4.1. *P. aeruginosa* et les cellules épithéliales

##### *Première paroi : la défense mécanique*

1. L'épithélium forme une barrière naturelle contre les pathogènes avec des cellules reliées entre elles par des jonctions serrées. Les cellules épithéliales sécrètent du mucus et de l'eau, formant un liquide de surface des voies respiratoires, qui peut piéger les micro-organismes, les polluants, etc. Ce liquide joue un rôle important dans la clairance bactérienne grâce aux molécules microbicides qu'il contient, qui détectent, marquent et détruisent l'agent pathogène. Les molécules du complément, telles que le fragment C3, les protéines du surfactant (SP-A et SP-D), et les lectines liant le mannose (MBL), permettent l'activation du système du complément (Figure 13A). Ainsi, ces molécules sont responsables de l'opsonisation des bactéries et de la formation du complexe d'attaque membranaire, deux processus qui ont un rôle important dans l'élimination de *P. aeruginosa* par les cellules de l'immunité innée<sup>53,54</sup>. Ce liquide contient également des défensines et des peptides cationiques courts, qui ont une activité antimicrobienne grâce à leur action de perméabilisation de la membrane. Pour n'en citer que quelques-uns, les défensines humaines, le lysozyme, la lactoferrine, la cathélicidine LL37, les protéines SP-A et le SP-D sont exprimés par les cellules épithéliales des voies respiratoires, régulés par l'exposition aux agents pathogènes, aux substances toxiques et aux cytokines<sup>55,56</sup>, et peuvent être inactivés en cas de modification du pH, comme dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose<sup>57</sup>. Enfin, le battement ciliaire élimine les micro-organismes par l'intermédiaire de l'ascenseur mucociliaire.

2. En réponse, *P. aeruginosa* dispose d'un arsenal de facteurs de virulence, des protéines ou des métabolites qui causent des dommages aux cellules épithéliales, altèrent la réparation des tissus et favorisent sa dissémination (Figure 13B)<sup>58,59</sup>. Les phénazines et les rhamnolipides sécrétés par la bactérie peuvent provoquer un dysfonctionnement du battement ciliaire des cellules épithéliales<sup>60-62</sup>. Via le SST3, *P. aeruginosa* peut injecter des exotoxines, entraînant l'apoptose des cellules cibles, perturbant les jonctions serrées entre les cellules épithéliales et inhibant la division cellulaire<sup>63</sup>. Après sa translocation dans la cellule, l'Exotoxine A entrave la production des protéines en inhibant la protéine Elongation Factor 2 (EF-2)<sup>58</sup>. Les phospholipases agissent en synergie avec les rhamnolipides pour induire la mort des cellules épithéliales<sup>64</sup>. Les lectines solubles sécrétées par *P. aeruginosa* ont également un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales<sup>65</sup>. Une molécule du QS, de type acyl-homosérine lactone, le 3-oxo-C12-HSL, a la capacité d'altérer l'intégrité de la barrière épithéliale, la migration des cellules épithéliales et la cicatrisation<sup>66</sup>. La sécrétion de protéases, comme l'élastase bactérienne, permet le clivage de

l'élastine et du collagène, détruit les jonctions serrées entre les cellules épithéliales et peut conduire à une septicémie<sup>67,68</sup>. En outre, les protéases peuvent également inactiver les molécules antimicrobiennes du liquide de surface, réduisant ainsi la réponse de l'hôte. L'élastase et les sérine-protéases bactériennes (telles que la protéase IV) permettent l'inactivation des immunoglobulines, telles que les IgA et les IgG, ainsi que des composés du complément, et clivent les protéines SP-A et SP-D<sup>69-74</sup>. *P. aeruginosa* produit également une protéase alcaline empêchant l'activation de la voie classique du complément et de la voie des lectines<sup>75</sup>. La O-glycosylation des pili de type IV confère également une résistance à l'opsonisation par les protéines SP-A, SP-D et la protéine liant le mannose (MBP)<sup>76</sup>. Toutes ces stratégies développées par cette bactérie inhibent l'opsonisation et l'activation du système du complément, participant ainsi au contournement du système immunitaire.

#### *Détection par les cellules épithéliales, signalisation et réponse de P. aeruginosa*

1. Les cellules épithéliales sont également capables de détecter les micro-organismes et de contribuer à l'établissement de la réponse de l'hôte. Des récepteurs appelés PRR (pattern recognition receptors), tels que les TLR (Toll-like receptors) et les NLR (NOD-like receptors) situés à la surface ou dans la membrane endosomale des cellules épithéliales et immunitaires, sont impliqués dans la reconnaissance de structures microbiennes conservées appelées PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Quatre TLRs sont impliqués dans la reconnaissance de *P. aeruginosa* : TLR2, TLR4, TLR5 et TLR9, qui reconnaissent respectivement les pili, le lipopolysaccharide (LPS), le flagelle et l'ADN CpG des bactéries internalisées. Cette reconnaissance conduit à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) de manière MyD88-dépendante<sup>77</sup>. Les cellules épithéliales activées sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'IL-6, le GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor), et des molécules, comme l'IL-8 et la MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), permettant le recrutement et l'activation des cellules immunitaires<sup>78,79</sup>. De façon surprenante, les souris déficientes en TLR2 ou TLR4 ont une réponse réduite en cytokines et/ou une réponse inflammatoire réduite mais peuvent éliminer *P. aeruginosa*. De plus, les souris déficientes pour ces deux récepteurs sont hypersensibles à un mutant de *P. aeruginosa* dépourvu de flagelline (ligand de TLR5), alors que les souris de type sauvage (WT) ne sont pas sensibles à cette souche bactérienne<sup>80,81</sup>. Un mécanisme de redondance existe entre les TLR2, -4 et -5. Il a également été démontré que la déficience en TLR9 protège les souris contre les infections pulmonaires à *P. aeruginosa*. TLR9 joue un rôle

néfastes dans la défense de l'hôte, en réduisant l'activité des macrophages alvéolaires et la production d'IL-1 $\beta$  et de monoxyde d'azote (NO), nécessaires à l'élimination des bactéries<sup>82</sup>.

Concernant les NLRs, le récepteur NLRC4 est impliqué dans la reconnaissance de *P. aeruginosa*. L'activation de l'inflammasome via NLRC4 conduit à l'assemblage d'une plateforme de haut poids moléculaire permettant l'activation de la caspase 1. La caspase 1 déclenche le traitement protéolytique de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 impliqués dans la réponse inflammatoire<sup>83,84</sup>. Au cours de l'infection par *P. aeruginosa*, il y a un dommage mitochondrial dépendant du SST3 avec une production accrue et une libération d'ADN mitochondrial, permettant l'activation de l'inflammasome NLRC4<sup>85</sup>. Les motifs reconnus par NLRC4 sont encore débattus. Ce récepteur reconnaît le SST3 de *P. aeruginosa*<sup>84</sup> et plus spécifiquement une protéine du corps basal, PscI. Cette protéine possède un motif de séquence qui semble être reconnu par NLRC4<sup>86</sup>. Il a également été suggéré que NLRC4 reconnaît le flagelle de *P. aeruginosa*, mettant en évidence la similarité des motifs de séquence entre PscI et la flagelline<sup>86,87</sup>. Par ailleurs, ExoU, une toxine sécrétée par SST3, peut inhiber la production de cytokines associées à la caspase 1<sup>84</sup>. Cependant, les souris déficientes en IL-1 $\beta$  ne sont pas plus sensibles aux souches produisant de l'ExoU que les souris WT, alors que les souris déficientes en IL-1 $\alpha$  ont une sensibilité accrue à cette souche. Au contraire, si *P. aeruginosa* ne produit pas d'ExoU (c'est le cas de plus de 70% des isolats), IL-1 $\alpha$  n'est pas nécessaire pour générer un recrutement efficace des neutrophiles, alors que IL-1 $\beta$  est nécessaire. La redondance de ces deux cytokines permettrait donc à l'hôte de répondre à des isolats ExoU-positifs ou -négatifs<sup>88</sup>. L'activation de l'inflammasome produit un signal pro-inflammatoire fort qui peut être délétère pour l'hôte<sup>89</sup>. En effet, les souris NLRC4<sup>-/-</sup> éliminent plus facilement *P. aeruginosa* et les dommages tissulaires causés par une infection aiguë sont réduits. De plus, l'IL-18 induit par le SST3 de *P. aeruginosa* agit négativement sur l'immunité, supprimant l'IL-17 et l'expression des peptides antimicrobiens associés à l'IL-17<sup>83</sup>. Cependant, il est risqué de cibler l'inflammasome pour limiter l'inflammation dans un modèle d'infection chronique. En effet, dans ce modèle, la délétion du récepteur de l'IL-1 entraîne une diminution de la clairance de *P. aeruginosa* et une absence d'activation de la voie NF- $\kappa$ B<sup>90</sup>. En outre, le récepteur cytosolique NLRC4 joue un rôle essentiel dans la clairance de *P. aeruginosa* lors d'une infection intracellulaire par l'agent pathogène<sup>83</sup>.

Il a été suggéré que les bactéries peuvent également être détectées par CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), responsable du flux d'ions chlorure des cellules épithéliales. Au contact du LPS, CFTR agit comme un PRR et provoque l'internalisation de *P.*

*aeruginosa* ainsi que la translocation et l'activation de la voie NF- $\kappa$ B<sup>91</sup>. De même, le récepteur MUC1 des cellules épithéliales peut détecter la flagelline de *P. aeruginosa*, ce qui entraîne l'activation des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPK), induisant ainsi une réponse pro-inflammatoire<sup>67,92</sup>. Enfin, l'apoptose des cellules épithéliales a été envisagée comme un mécanisme de défense pour éliminer les cellules infectées par *P. aeruginosa*. Ce mécanisme d'apoptose induit par l'interaction entre le CD95 et son ligand spécifique s'est avéré critique dans l'élimination de *P. aeruginosa*<sup>93</sup>.

2. Pendant la phase de transition entre une infection aiguë et une infection chronique, *P. aeruginosa* s'adapte pour échapper au système immunitaire<sup>94,95</sup>. Cela implique la perte de la motilité des bactéries via la perte des pili et des flagelles (ligands TLR2, TLR5 et MUC1), ce qui entraîne une diminution de la réponse de l'hôte et un risque accru d'infection chronique chez les patients atteints de mucoviscidose<sup>45,96</sup>. La modification du LPS (ligand TLR4), le rendant moins immunogène, permet également de contourner le système immunitaire<sup>97</sup>. Le SST3 (ligand NLRC4) qui est impliquée dans l'activation des TLR2 et -4<sup>98</sup>, est régulé négativement au cours de l'infection chronique. De plus, les bactéries produisent une matrice extracellulaire composée de polysaccharides (alginate et exopolysaccharides Pel et Psl), de protéines et d'ADN qui facilite la résistance au système immunitaire<sup>99-102</sup>. Enfin, pour contrer le développement de la réponse immunitaire des cellules épithéliales, *P. aeruginosa* sécrète des phénazines, modulant la réponse inflammatoire par l'inhibition de la production de CCL5 [chemokine (CC motif) ligand 5] et de MCP-1<sup>103</sup>. *P. aeruginosa* produit la protéine Cif (CFTR inhibitory factor), qui empêche la dé-ubiquitination de la protéine CFTR qui est ensuite dégradée par le lysosome<sup>104</sup>. En outre, *P. aeruginosa* sécrète des vésicules de la membrane externe (OMV), qui peuvent délivrer différents facteurs de virulence tels que la phosphatase alcaline, la phospholipase C hémolytique et la protéine Cif dans les cellules hôtes via la fusion des OMV avec les radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Cela affecte la biologie des cellules épithéliales avec, entre autres, une diminution de l'expression du canal CFTR dans la membrane<sup>105,106</sup>.

#### 6.3.1.4.2. *P. aeruginosa* et les polynucléaires neutrophiles

##### Le chimiotactisme

1. Lors d'une infection à *P. aeruginosa*, les neutrophiles sont des acteurs clés des cellules immunitaires recrutées massivement par chimiotactisme dès les premières heures de l'infection (Figure 14). En effet, chez les souris neutropéniques, 10 à 100 bactéries sont suffisantes pour générer une infection pulmonaire mortelle, alors que chez les souris normales, 10<sup>7</sup> à 10<sup>8</sup>

bactéries sont nécessaires<sup>107</sup>. De plus, les neutrophiles s'accumulent dans les fluides respiratoires des patients atteints de mucoviscidose<sup>108</sup> et il existe une corrélation inverse entre la croissance de *P. aeruginosa* dans le poumon et la concentration de neutrophiles<sup>109</sup>. En effet, lorsque le récepteur CXCR2 de l'IL-8 (un puissant facteur chimiotactique des neutrophiles) est neutralisé, on observe une augmentation de la mortalité chez les souris<sup>110</sup>. Les neutrophiles détectent certaines molécules du QS produites par *P. aeruginosa* comme le 3-oxo-C12-HSL et le PQS (Pseudomonas quinolone signal)<sup>111,112</sup>.

2. En réponse, *P. aeruginosa* produit la protéase IMPa (immunomodulating metalloprotease of *P. aeruginosa*) capable de cliver PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), limitant ainsi l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium et donc leur migration vers le site inflammatoire (Figure 14)<sup>113</sup>.

### Phagocytose

1. Une fois que les neutrophiles sont en contact avec *P. aeruginosa*, ils reconnaissent et phagocytent les bactéries opsonisées (par les protéines du complément, les lectines liant le mannose, les immunoglobulines, etc.) ainsi que les bactéries non opsonisées par l'intermédiaire des Pattern Recognition Receptors (TLR et NLR)<sup>114</sup>.

2. Pour se protéger de la phagocytose, *P. aeruginosa* modifie certains de ses déterminants de surface normalement impliqués dans la liaison avec les TLRs et produit des enzymes (comme l'élastase, les sérines et les protéases alcalines) pour cliver ou inactiver les opsonines des bactéries. En outre, *P. aeruginosa* synthétise et exprime des exopolysaccharides, tels que des alginates conférant un phénotype mucoïde à la souche, ou encore Pel et Psl connus pour limiter l'opsonisation par les fragments C3, C5 et C7<sup>114,115</sup>. De plus, *P. aeruginosa* produit des rhamnolipides par deux réactions séquentielles de transfert de groupement Glycosyl, chacune d'entre elles étant catalysée par une rhamnosyltransférase spécifique. Ces mécanismes permettent à *P. aeruginosa* d'échapper au contact avec le phagocyte, empêchant sa phagocytose<sup>116</sup>. De plus, l'injection de toxines dans les cellules cibles via le SST3 peut inhiber la phagocytose<sup>63,112</sup>. La phagocytose des bactéries non-opsonisées est fortement liée à la présence du flagelle et donc à la motilité flagellaire<sup>117</sup>. En effet, la perte de motilité des bactéries, comme cela est souvent observé dans les isolats cliniques de patients atteints de mucoviscidose, est donc un mécanisme important dans la persistance de *P. aeruginosa*<sup>96</sup>. Enfin, l'élastase LasB de *P. aeruginosa* peut cliver le récepteur PAR2 (protease-activated receptors)<sup>118</sup>, qui joue un rôle important dans la phagocytose par les neutrophiles, ce qui constitue un autre mécanisme d'échappement potentiel.

## Dégranulation

1. L'étape suivante de la destruction des bactéries est la formation du phagolysosome par la fusion des granules cytoplasmiques des neutrophiles avec la membrane phagosomale contenant les bactéries phagocytées. Les neutrophiles possèdent de nombreuses protéines de granules, dont certaines sont connues pour jouer un rôle clé dans la clairance de *P. aeruginosa*. La myéloperoxydase (MPO) est impliquée dans la clairance des bactéries en se liant à l'agent pathogène et en ayant une action microbicide par le biais de l'acide hypochloreux ou HOCl<sup>119</sup>. La MPO peut également participer à l'inhibition du mécanisme de virulence de *P. aeruginosa*. En effet, l'exposition de la pyocyanine de *P. aeruginosa* à la peroxydase, à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et à NaNO<sub>2</sub> génère de la pyocyanine mono-nitrée. La pyocyanine possède des propriétés antibiotiques impliquées dans les interactions pathogène-pathogène et induit également une forte réponse inflammatoire chez l'hôte. Sous une forme mononitrée, cette molécule perd son pouvoir antibiotique et n'induit pas de réaction inflammatoire significative<sup>120</sup>. Comme indiqué précédemment, *P. aeruginosa* produit la protéine Cif, qui favorise la dégradation de la protéine CFTR par les lysosomes. Ce mécanisme, en plus d'affecter les cellules épithéliales, peut également diminuer l'activité de la MPO dans les neutrophiles en limitant l'accès à son substrat, le chlore<sup>121-123</sup>. L'élastase des neutrophiles (NE) est une sérine protéase qui cible la porine OprF de *P. aeruginosa*. Cela génère une augmentation de la perméabilité membranaire, diminuant ainsi la croissance et la viabilité de ces bactéries. Les souris NE<sup>-/-</sup> sont plus sensibles aux infections à *P. aeruginosa*, montrant une déficience de la clairance des bactéries<sup>124</sup>. La lactoferrine, une protéine liant le fer, a une action à la fois bactéricide et bactériostatique ; le fer est un élément important pour la croissance de *P. aeruginosa*<sup>125</sup>. De plus, cette protéine empêche la formation de biofilms par les bactéries, en stimulant une motilité de type "twitching". Cela empêche l'agrégation des bactéries et, par conséquent, la formation de biofilms<sup>126</sup>. Là encore, lors d'une inflammation chronique, des mécanismes délétères pour l'hôte apparaissent. L'élastase et la cathepsine des neutrophiles peuvent cliver la lactoferrine, diminuant son activité antimicrobienne et favorisant la formation de biofilms<sup>127,128</sup>. Enfin, le lysozyme, un peptide cationique présent dans les granules des neutrophiles comme dans la salive et dans le liquide de surface, perturbe la membrane bactérienne par hydrolyse du peptidoglycane. Des expériences sur des souris déficientes en lysozyme ont montré que cette enzyme est nécessaire pour une clairance optimale de *P. aeruginosa*<sup>129</sup>. En outre, l'administration de lysozyme humain recombinant par aérosol dans un modèle d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* chez le hamster a amélioré les symptômes de la pneumonie<sup>130</sup>.

La production d'espèces réactives de l'azote (ERA) par l'intermédiaire de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par l'action de la NADPH oxydase sont également des mécanismes microbicides qui jouent un rôle important dans la clairance de *P. aeruginosa*. Chez les patients atteints de mucoviscidose, les phagocytes consomment activement de l'oxygène pour produire des ERO (par les neutrophiles) et des ERA (par les monocytes)<sup>131,132</sup>. Cette consommation élevée d'oxygène entraîne un ralentissement de la croissance de *P. aeruginosa* dans les poumons<sup>109</sup>. L'importance des ERA dans la réponse contre *P. aeruginosa* a été démontrée à la fois dans des modèles d'infection aiguë et chronique. Dans un modèle murin d'infection aiguë, l'inhibition de l'iNOS génère une augmentation de la mortalité des souris<sup>133</sup>. Cependant, la production excessive des ERA peut également provoquer des lésions tissulaires lors d'une infection aiguë<sup>134</sup>. Dans un modèle d'infection chronique, l'inhibition de l'iNOS entraîne une diminution de la survie concomitante à une augmentation des lésions pulmonaires. Dans ce contexte, les ERA semblent avoir un effet anti-inflammatoire<sup>134</sup>. De même, il existe une corrélation positive entre le NO exhalé et la fonction pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose<sup>135</sup>. Cependant, chez l'homme, les cellules productrices d'ERA les plus abondantes sont les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Par exemple, les ERA produites par les cellules épithéliales inhibent l'adhésion de *P. aeruginosa* aux cellules<sup>136</sup>. D'autre part, les ERA produites par les cellules endothéliales via la eNOS (endothelial nitric oxide synthase), qui est exprimée de manière constitutive, ont un rôle majeur dans la migration transendothéliale des leucocytes et la régulation de la perméabilité vasculaire<sup>137</sup>.

La production des ERO par les phagocytes joue également un rôle clé dans l'élimination de *P. aeruginosa*. Des expériences réalisées avec des neutrophiles purifiés ne produisant pas ou surproduisant des ERO ont montré que la survie de *P. aeruginosa* est inversement proportionnelle à la quantité d'ERO produite<sup>138</sup>. Les souris P47phox<sup>-/-</sup> (déficientes pour une sous-unité du complexe NADPH oxydase, p47phox, caractérisées par des phagocytes ayant une activité NADPH oxydase défectueuse) ont une clairance altérée de *P. aeruginosa*. De plus, les souris déficientes en p47phox ne sont pas capables d'activer la voie NF-κB aussi bien que les souris WT, ce qui indique que les ERO sont nécessaires pour une activation optimale de cette voie de signalisation<sup>139</sup>.

**2.** En réponse au stress oxydant, des modifications géniques de *P. aeruginosa* permettent de s'adapter et résister. Une étude de protéomique a révélé que l'expression de 60 protéines était significativement modifiée après le traitement de *P. aeruginosa* par le peroxyde d'hydrogène ou le Paraquat (un agent générateur de superoxyde)<sup>140</sup>. Le régulateur transcriptionnel OxyR de

*P. aeruginosa* joue un rôle clé dans la régulation positive des mécanismes de défense contre le stress oxydatif car le contact avec des agents générant un stress oxydatif stimule l'expression de gènes tels que *katB* (catalase), *ahpB*, et *ahpCF* (alkyl-hydroxy-peroxydases)<sup>141</sup>. *P. aeruginosa* produit également des quinone oxydoréductases (MdaB et WrbA) et une peroxiredoxine (LsfA), et elle possède deux gènes codant pour des méthionine sulfoxyde réductases (*msrA* et *msrB*), ce qui lui confère une meilleure résistance au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, au Paraquat ou à l'hypochlorite de sodium<sup>142-144</sup>. De plus, *P. aeruginosa* inhibe la production d'anions superoxydes par les neutrophiles humains via la phospholipase C hémolytique<sup>145</sup>. Certaines souches expriment une flavodoxine à longue chaîne qui protège contre le stress oxydatif, contribuant, par exemple, à une meilleure survie lors du contact avec les phagocytes<sup>146</sup>. En revanche, *P. aeruginosa* peut également inhiber les mécanismes de régulation du stress oxydatif sur l'hôte. La pyocyanine inhibe l'activité de la catalase chez l'hôte et oxyde le glutathion réduit, contribuant ainsi à la persistance du stress oxydatif dans les tissus<sup>147,148</sup>.

### NETose

1. Par ailleurs, la formation de NETs (neutrophil extracellular traps) ou NETose est un mécanisme microbicide extracellulaire des neutrophiles, dépendant de la NADPH oxydase<sup>149,150</sup>. L'ADN libéré dans le milieu extracellulaire sert de filet pour piéger les micro-organismes qui sont tués par les protéines granulaires (élastase, MPO, lactoferrine, etc.) et la chélation des cations exercée par l'ADN<sup>151,152</sup>.

2. Malgré les mécanismes encore en cours d'investigation, plusieurs facteurs indiquent que *P. aeruginosa* a la capacité de s'adapter et de résister à la NETose. La majorité des isolats cliniques de patients (8 sur 9) ont un phénotype résistant à la NETose<sup>153</sup>. Par ailleurs, les isolats tardifs de *P. aeruginosa* provenant de patients atteints de mucoviscidose génèrent une NETose plus faible dans les neutrophiles que les isolats précoces. Il y a donc une adaptation de *P. aeruginosa* à ce mécanisme microbicide de NETose, qui permet aux bactéries de persister<sup>154</sup>. Différents mécanismes ont été proposés : *P. aeruginosa* pourrait cliver le SP-D, un acteur important de la NETose puisqu'il favorise le piégeage bactérien en se liant à la fois à l'agent pathogène et à l'ADN des NET<sup>155</sup>. De plus, *P. aeruginosa* peut libérer des vésicules de la membrane externe (ou OMV), qui entrent en compétition avec la bactérie pour se lier aux NET, inhibant ainsi le piégeage de *P. aeruginosa*<sup>156</sup>. En même temps, il y a une modification de la surface bactérienne induite par le contact avec l'ADN extracellulaire qui favorise la tolérance de *P. aeruginosa* à l'activité antimicrobienne des NETs<sup>152</sup>. Par exemple, les streptocoques du groupe A produisent

la DNase Sda1, qui contribue à la destruction des NET<sup>157</sup>. Il est donc probable que la DNase de *P. aeruginosa* puisse avoir le même effet pour résister à la NETose<sup>158</sup>.

Enfin, *P. aeruginosa* a développé plusieurs mécanismes provoquant la mort des neutrophiles afin d'échapper à leur activité bactéricide. Cet agent pathogène peut induire l'oncose des neutrophiles et des macrophages par le biais d'exotoxines injectées par SST3, l'apoptose de ces cellules par le 3-oxo-C12-HSL et la pyocyanine, et la nécrose des neutrophiles par les rhamnolipides<sup>159-164</sup>. De plus, la formation de biofilms par *P. aeruginosa* permet à l'agent pathogène de se protéger contre l'activité bactéricide des neutrophiles. Ces deux derniers mécanismes agissent de manière synergique. En effet, l'exposition des neutrophiles au biofilm de *P. aeruginosa* *in vitro* entraîne une augmentation significative de la production de rhamnolipides par ces bactéries<sup>165</sup>. Les rhamnolipides forment un " bouclier " protégeant les bactéries et induisent la nécrose des neutrophiles. Les différents mécanismes de nécrose des neutrophiles décrits ici favorisent la libération d'ADN extracellulaire utilisé par les bactéries pour renforcer le biofilm<sup>166</sup>, renforçant ainsi leur résistance au système immunitaire et aux antibiotiques. Ceci crée un cercle vicieux expliquant la persistance de *P. aeruginosa*<sup>101</sup>.

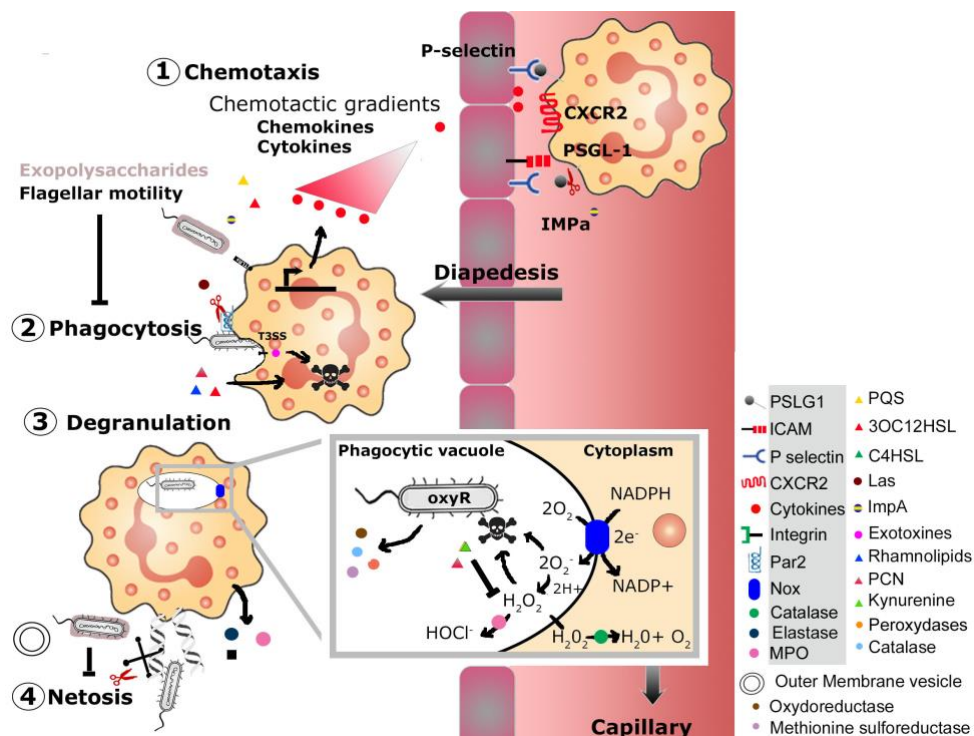


Figure 14 : Dialogue moléculaire entre les neutrophiles et *P. aeruginosa* pendant le recrutement et l'action des neutrophiles au cours des étapes 1. De chimiotactisme des neutrophiles au site inflammatoire, 2. De la phagocytose, 3. De la dégranulation et 4. De la NETose.

#### 6.3.1.4.3. *P. aeruginosa* et les macrophages

Contrairement aux neutrophiles, dont la durée de vie est courte et qui représentent la première ligne de défense de l'immunité innée, les macrophages sont des cellules résidentes à longue durée de vie qui jouent le rôle de sentinelles pour l'orientation de la réponse immunitaire. À l'état stable, ils se consacrent principalement à l'élimination des particules étrangères et des cellules endommagées ou anormales. Les monocytes/macrophages sont activement engagés dans les premiers jours de l'infection à *P. aeruginosa*<sup>167,168</sup>. En plus de leurs fonctions phagocytaires, les macrophages jouent un rôle clé dans la modulation de l'immunité via la sécrétion de cytokines et de chémokines ainsi que via leur implication dans le processus de présentation des antigènes aux lymphocytes T. L'efferocytose par les macrophages, mais aussi par les cellules dendritiques immatures et les cellules épithéliales, peut limiter l'inflammation en englobant les cellules apoptotiques favorisant ainsi la résolution de l'inflammation par la libération de médiateurs anti-inflammatoires<sup>169</sup>. Or, *P. aeruginosa* peut inhiber la résolution de l'inflammation et l'efferocytose en produisant de l'alginate<sup>170</sup>.

La déplétion des macrophages alvéolaires chez les souris et les rats traités par du clodronate de sodium encapsulé dans des liposomes entraîne une diminution du recrutement des neutrophiles, une baisse des niveaux de MIP-2 (protéine inflammatoire des macrophages) et de la production de l'homologue IL-8, ainsi qu'une augmentation de la charge bactérienne pulmonaire<sup>171,172</sup>. L'inhibition de MCP-1, une chémokine responsable du recrutement des macrophages, génère une diminution de la réponse oxydative et de la phagocytose, entraînant une augmentation de la charge bactérienne pulmonaire après une infection par *P. aeruginosa*<sup>173</sup>. De plus, une autre étude a mis en évidence que l'inhibition de MCP-1 entraîne une réduction du nombre de neutrophiles ingérés par les macrophages, une diminution du HGF-1 (facteur de croissance des hépatocytes, favorisant la régénération des cellules épithéliales), et une augmentation des dommages tissulaires<sup>167</sup>. Les macrophages et leur processus de recrutement semblent avoir une place importante dans la réponse immunitaire et sa régulation. Cependant, il est difficile de déterminer si leur rôle dans la clairance de *P. aeruginosa* est principalement dû à leurs fonctions de phagocytes ou à leur rôle de modulateurs immunitaires par le recrutement d'autres types de cellules et la sécrétion de cytokines. Comme indiqué précédemment pour les neutrophiles, *P. aeruginosa* peut induire l'apoptose des macrophages par le 3-oxo-C12-HSL ou l'oncose par la destruction du cytosquelette via les exotoxines sécrétées par SST3.

#### 6.3.1.4.4. *P. aeruginosa* et les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CDs) sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles qui assurent le lien entre l'immunité innée et adaptative. La polarisation des cellules T-helper ou auxiliaire se fait en fonction des cytokines présentes dans le milieu lors de la présentation de l'antigène. Des expériences de vaccination ont montré la capacité des CDs à induire une réponse contre *P. aeruginosa*. Des CDs provenant de la moelle osseuse incubées avec *P. aeruginosa* puis injectées à des souris avant un challenge infectieux létal, a permis d'augmenter le taux de survie des souris<sup>174</sup>. Une expérience similaire a été réalisée en utilisant des CDs "pulsées" avec la porine OprF de *P. aeruginosa*. Les CDs ont été injectées à des souris avant l'infection par cette bactérie, montrant une résistance à l'infection par un déplacement vers une réponse de type Th1<sup>175</sup>.

Après une infection chronique par *P. aeruginosa*, les CDs stimulées *ex vivo* avec du LPS montrent une diminution de l'expression des facteurs de co-stimulation (CD80, CD86, et CD40) mais pas de la production de cytokines<sup>176</sup>. Via le SST3, *P. aeruginosa* peut injecter des exotoxines empêchant leur internalisation et, dans ce cas, il peut avoir un impact sur la modulation de la réponse adaptative<sup>177</sup>. De même, certaines des molécules du QS peuvent moduler la réponse des CDs et induire l'apoptose<sup>178</sup>. Le 3-Oxo-C12-HSL et le PQS inhibent la production d'IL-12 par les CDs après stimulation par le LPS et diminuent leur capacité à induire la prolifération des cellules T *in vitro*. Par conséquent, les molécules QS peuvent avoir un impact sur la maturation des CD en diminuant le profil pro-inflammatoire associé à Th1 et l'activité antibactérienne de l'immunité adaptative<sup>179</sup>. En plus de cette inhibition de la maturation des CD par le 3-oxo-C12-HSL, il y a un changement vers un phénotype IL-10<sup>haut</sup>, IL-12<sup>bas</sup> et donc une évolution vers un phénotype de type T régulateur (Treg)<sup>180</sup>.

#### 6.3.1.4.5. *P. aeruginosa* et les lymphocytes

L'activation de l'immunité adaptative est initiée simultanément ou peu après l'activation de la réponse immunitaire innée<sup>181</sup>. Comme indiqué précédemment, les cytokines produites lors de la présentation de l'antigène permettent la polarisation des lymphocytes T en différents types: Th1, Th2, ou Th17. Des études sur des patients atteints de mucoviscidose ont mis en évidence une corrélation entre les fonctions pulmonaires des patients et l'orientation Th1/Th2, étant entendu que la prédominance d'une réponse Th2 est associée à un mauvais pronostic dans le cadre d'infections chroniques à *P. aeruginosa*<sup>182</sup>. D'autres études confirment cette observation en montrant que la prédominance d'une réponse Th2 lors d'une infection chronique à *P. aeruginosa* est corrélée à la sévérité des symptômes<sup>183-186</sup>.

Plusieurs études ont démontré l'effet protecteur de la réponse Th17, et des cytokines IL-17 et IL-22, lors d'une infection aiguë à *P. aeruginosa* et du développement extracellulaire de ce pathogène<sup>83,187-191</sup>. Un vaccin stimulant une réponse Th17 contre *P. aeruginosa* a un effet protecteur pendant l'infection<sup>189</sup>. Il a également été démontré que la production d'IL-17, entre autres par les Th17, protège les souris lors d'une infection aiguë par *P. aeruginosa*. Ceci est dû à des effecteurs en amont, tels que IL-1 $\beta$ , MIP-2, et G-CSF, accompagnés d'un recrutement accru de neutrophiles, qui conduisent à une meilleure clairance bactérienne et à la survie des souris<sup>188,190</sup>. D'autres types de cellules produisent de l'IL-17 et de l'IL-22, comme les cellules lymphoïdes innées (Innate lymphoid cell ou ILC). Une infection par *Candida albicans* induit l'amorçage de la réponse immunitaire et, entre autres, la production d'IL-22 par les ILC. Cet amorçage facilite la survie améliorée des souris grâce à l'IL-22 lorsqu'elles sont ensuite infectées par *P. aeruginosa*<sup>192</sup>. Cependant, un effet délétère des Th17 a été observé dans les infections chroniques<sup>186,193-196</sup>. Chez des patients atteints de mucoviscidose et souffrant d'une infection chronique à *P. aeruginosa*, on a mesuré des niveaux élevés d'IL-17 et d'IL-23 par rapport aux patients qui n'étaient pas infectés de façon chronique. Cela a conduit à une persistance de l'infiltration des neutrophiles dans les poumons, ce qui peut provoquer des lésions tissulaires<sup>193</sup>. Une corrélation entre la sévérité des symptômes et la présence de cytokines liées au profil Th17 ou Th2 a également été mise en évidence. De plus, la présence de concentrations élevées de ces cytokines avant l'infection par *P. aeruginosa* a engendré un terrain favorable à l'infection<sup>186</sup>.

En plus d'interférer avec la différenciation des CD<sub>s</sub>, *P. aeruginosa* peut également agir directement sur les cellules T-helper. Là encore, les molécules du QS jouent un rôle majeur. Lors d'une co-culture de lymphocytes avec des DCs, le 3-oxo-C12-HSL induit une augmentation de la production d'IL-4 et d'IL-10 et une diminution de la production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-6 et d'IL-2, ainsi que l'apoptose des cellules T CD4<sup>+</sup> mais pas des CD8<sup>+</sup><sup>178</sup>. Cette molécule peut également inhiber la différenciation Th1 et Th2 et donc la production de cytokines par ces cellules<sup>197</sup>. Le 3-Oxo-C12-HSL et le C4-HSL, un autre type d'acyl-homosérine lactone, inhibe la prolifération des cellules T et provoque un déplacement de la réponse Th1 protectrice vers la réponse Th2 délétère via une forte inhibition de l'IFN- $\gamma$ <sup>198</sup>. La pyocyanine peut également avoir un effet délétère sur la réponse cellulaire<sup>199</sup>. Les métabolites sécrétées par *P. aeruginosa* semblent donc induire un changement d'environnement qui diminue la réponse Th1 et favorise la réponse de type Th2<sup>200</sup>.

### 6.3.2. Présentation de mes travaux

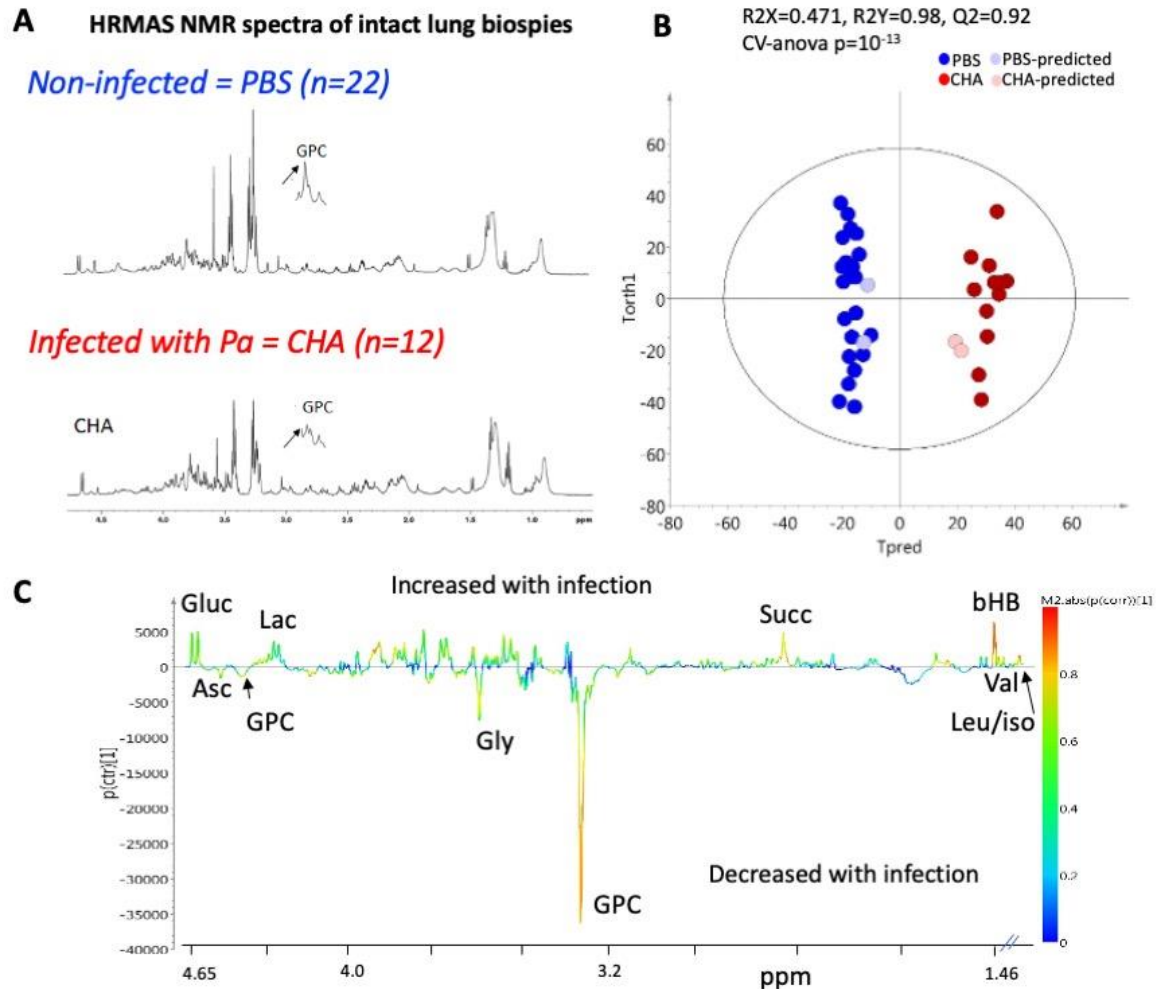
#### 6.3.2.1. **Modèle d'infection à *P. aeruginosa* et empreinte métabolique de poumon infecté avec des souches de différents degrés de virulence**

Pour pouvoir étudier la virulence de *P. aeruginosa* comme celle d'autres pathogènes, nous disposons de modèles murins d'infection aiguë. Le gold standard comme indiqué en introduction depuis de nombreuses années est de mesurer le taux de survie des animaux infectés suite à une infection avec une dose létale du pathogène. Le degré de virulence des souches est évalué en comparant les taux de survie en point final ou en mesurant le % de survie au cours du temps (courbe de Kaplan Meier). Au laboratoire TIMC, dans l'équipe de recherche, j'ai mis au point un modèle d'infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa* et développé une méthode pour suivre le degré de sévérité de l'atteinte pulmonaire après infection en réalisant une empreinte métabolique par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire à angle magique à haute résolution (ou HR-MAS RMN) après 18h d'infection en collaboration avec le Dr F. Fauvelle ([Le Gouellec et al. 2018](#))<sup>201</sup>.

En effet, il existe un besoin important d'outils permettant de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux processus pathologiques et d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques avec des modèles animaux. Ici, nous avons utilisé une nouvelle approche d'HRMAS RMN, directement sur des biopsies de poumons de souris pour mieux comprendre l'impact de l'infection sur le tissu au niveau moléculaire. Les souris ont été infectées par deux souches de *P. aeruginosa* de différents niveaux de virulence (une souche sauvage ou une souche moins virulente délétée des gènes codant pour le translocon du SST3, *popB* et *popD*). L'analyse statistique multivariée des spectres bruts (Figure 15A), nous a permis de construire un modèle discriminant permettant de distinguer les profils métaboliques des poumons des souris, infectées ou non (Figure 15B). De plus, un second modèle a été construit pour apprécier le degré de sévérité de l'infection, démontrant une sensibilité suffisante de la métabolomique pour étudier la sévérité de l'atteinte pulmonaire et donc de la virulence des souches.

Les caractéristiques métaboliques qui discriminent le statut d'infection sont dominées par certains métabolites clés, exprimés de manière différentielle et liés au métabolisme du carbone et des lipides (comme la glycérophosphocholine) et à la réponse au stress hypoxique septique de l'hôte (par exemple le succinate). Enfin, pour se rapprocher des questions cliniques et diagnostiques, nous avons proposé de construire des modèles de régression logistique simples pour prédire le statut de l'infection sur la base de l'intensité d'un seul métabolite. Ainsi, nous avons démontré que la mesure de l'intensité du succinate permet de discriminer le statut

infecté/non infecté d'un hôte avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 95%, et que l'intensité de la leucine/isoleucine pouvait prédire le statut sévère/non sévère de l'infection avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 95%.



**Figure 15 :** **A.** Exemple de 2 spectres brut d'HRMAS RMN réalisés à partir de biopsies de poumon intacts chez des souris infectées par la souche de *P. aeruginosa* CHA ou non (contrôle PBS). **B.** Score plot du modèle OPLS-DA CHA-PBS construit avec les spectres bruts HRMAS RMN des poumons de souris. Les souris infectées par la souche CHA (en rouge) sont clairement séparées de celles non infectées, groupe contrôle PBS (en bleu). Le modèle est bien ajusté ( $R2Y = 0,98$ ) et prédictif ( $Q2 = 0,92$ ). **C.** Loading plot 1D du modèle, montrant les métabolites qui sont augmentés (pics positifs) ou diminués (pics négatifs) dans le poumon infecté par la souche CHA par rapport au PBS. Les métabolites les plus discriminants, qui expliquent le regroupement dans le modèle présenté dans le panel B, ont un coefficient de corrélation élevé (en orange). Ces métabolites sont indiqués sur le graphique. Pour l'affectation, voir les données des informations complémentaires du papier. L'axe x représente les valeurs RMN en ppm et n'est pas linéaire car des régions (représentées par une double barre oblique) ont été exclues de l'analyse : éthanol : (1,20- 1,15) ppm, (3,69-3,63) ppm ; PEG : (3,73-3,69) ppm ; lipides : (1,40-1,23) ppm, (0,98-0,8) ppm. Gluc, glucose ; Asc, ascorbate ; GPC, glycérophosphocholine ; Gly, glycine ; Succ, succinate ; bHB, bêta-hydroxybutyrate ; Val, valine ; Leu/iso, leucine/isoleucine ; Lac, lactate ; Gsh, glutathion.

Nous avons également recherché l'intérêt de cette méthode et de ce modèle pour prédire l'efficacité d'un traitement anti-*P. aeruginosa*. Par une analyse métabolomique HRMAS RMN de poumons infectés par *P. aeruginosa* après vaccination (Voir Partie 2. Applications médicales

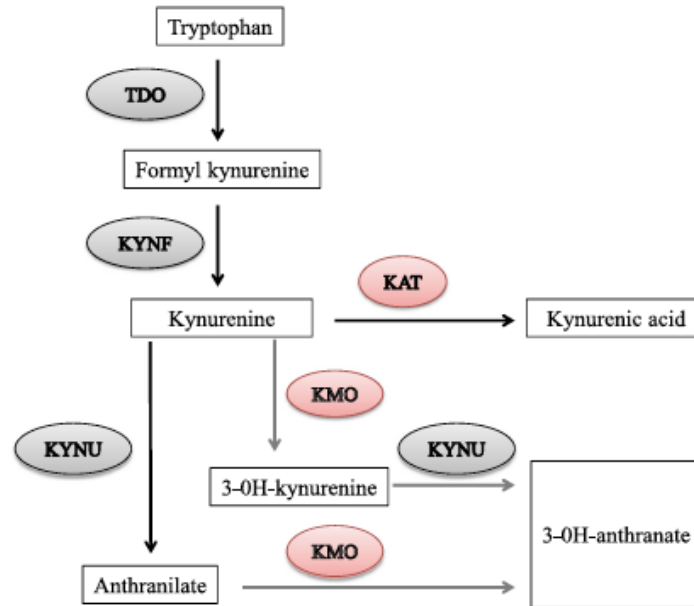
Vaccin anti-*P. aeruginosa*), nous avons démontré que ce modèle pouvait être un outil utile pour prédire l'efficacité de nouveaux traitements anti-*P. aeruginosa*. Cette approche métabolomique pourrait donc être utile à la fois pour la définition de biomarqueurs de sévérité de l'infection et pour une caractérisation plus précoce de l'efficacité thérapeutique. Mais elle permet aussi d'étudier plus largement l'impact de l'infection pulmonaire par d'autres pathogènes comme nous l'avons fait pour les infections à *H. influenzae* en collaboration avec le Pr M. Si Tahar (Papier en cours de publication).

**Bilan :** Ces travaux m'ont permis d'être autrice d'1 publication (P23 : [Le Gouellec et al. 2018](#)).

### **6.3.2.2. Rôle des métabolites du tryptophane dans l'interaction *P. aeruginosa* et l'immunité de l'hôte**

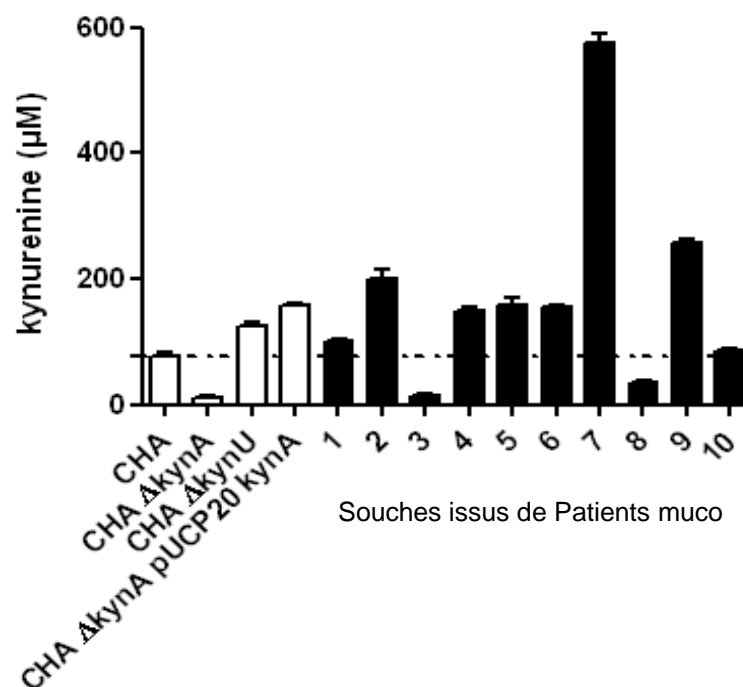
Au laboratoire, les chercheurs de mon équipe avaient mis en évidence avant mon arrivée, l'existence d'un signal diffusible impliqué dans la répression du SST3. Ce signal (nommé PARST pour « Pseudomonas autorepressor of secretion three ») est indépendant des molécules du QS connues à ce jour chez *P. aeruginosa*. Il dépendait en revanche de la synthèse du tryptophane (du gène *trpA*) mais ce n'était pas le tryptophane, connu par ailleurs pour être le précurseur de plusieurs molécules-signal dont l'indole-3-acide acétique (IAA) et la kynurénine<sup>202</sup>. A mon arrivée, nous avons démontré en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et différentes souches mutantes de *P. aeruginosa*, que *P. aeruginosa* produit *in vitro* dans le milieu de croissance, différents métabolites dérivés du tryptophane, et montré la pertinence de cette production *in vivo* dans un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë ([Bortolotti et al. 2016](#))<sup>203</sup> (Figure 16). Pour cela, j'ai construit des mutants de délétion des gènes de la voie de catabolisme du tryptophane selon la méthode suivante (Quenée *et al.* <sup>204</sup>). Le mutant CHA $\Delta$ *kynA*, déleté pour la kynurénine synthase, ne produit pas ou peu de kynurénine alors que le mutant  $\Delta$ *kynU*, déleté pour la kynureninase, accumule la kynurénine au cours du temps (Figure 17). Le mutant  $\Delta$ *kynA* complémenté avec le gène *kynA* produit une grande quantité de kynurénine. Par ailleurs, nous avons montré que *P. aeruginosa* produit de l'antranilate par la voie de la kynurenine dès 4h de culture et accumule l'antranilate à une concentration de 100uM après 24h de culture. *P. aeruginosa* produit de l'acide kynurénique grâce à une kynurenine aminotransferase et de l'OH-kynurenine par une kynurenine monooxygénase. Dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë, la souche de *P. aeruginosa* produit de l'hydroxyantranilate et de l'acide kynurénique que l'on peut détecter dans les lavages broncho-alvéolaires après 12 et 24h d'infection. En conclusion de nos travaux,

la voie de la kynurénine chez *P. aeruginosa* est donc essentielle pour produire l'anthranilate, un précurseur important de certains facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, comme la synthèse du PQS, molécule du QS spécifique de *P. aeruginosa*<sup>205</sup>. Les métabolites (anthranilate, kynurénine, acide kynurénique) sont produits à des niveaux élevés à la fois *ex vivo* et *in vivo*.



**Figure 16:** Vue d'ensemble des voies enzymatiques proposées pour le catabolisme du tryptophane chez *P. aeruginosa*. Résumé des réactions enzymatiques connues (flèches sombres) et prédites (flèches grises) qui composent la voie de la kynurénine de *P. aeruginosa*. Les enzymes hypothétiques sont surlignées en rouge. TDO : tryptophane-2,3-dioxygénase, KYNF : kynurénine formamidase, KYNU : kynuréninase, KAT : kynurénine aminotransférase, KMO : kynurénine monoxygénase.

Des études précédentes suggéraient que *P. aeruginosa* était capable de prendre le contrôle, à différents niveaux et par des moyens variés, de la réponse immune de l'hôte. Par exemple, les molécules du QS semblent capables de déréguler l'initiation de l'immunité adaptative<sup>178,179,197</sup>. Comme décrit précédemment, le laboratoire avait identifié une nouvelle famille de molécules dérivées du tryptophane comprenant des molécules proches de la kynurénine ; or, la kynurénine est connue pour jouer un rôle dans la modulation de l'immunité adaptative chez l'homme<sup>206,207</sup>. C'est un ligand AhR bien connu. Nous avons regardé l'influence exercée par cette nouvelle famille de molécules bactériennes sur l'interaction hôte-pathogène. Nous avons montré que la plupart des souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de mucoviscidose produisent un niveau élevé de kynurénine et possèdent le gène *kynA*, homologue de l'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO) chez l'homme (Figure 17).



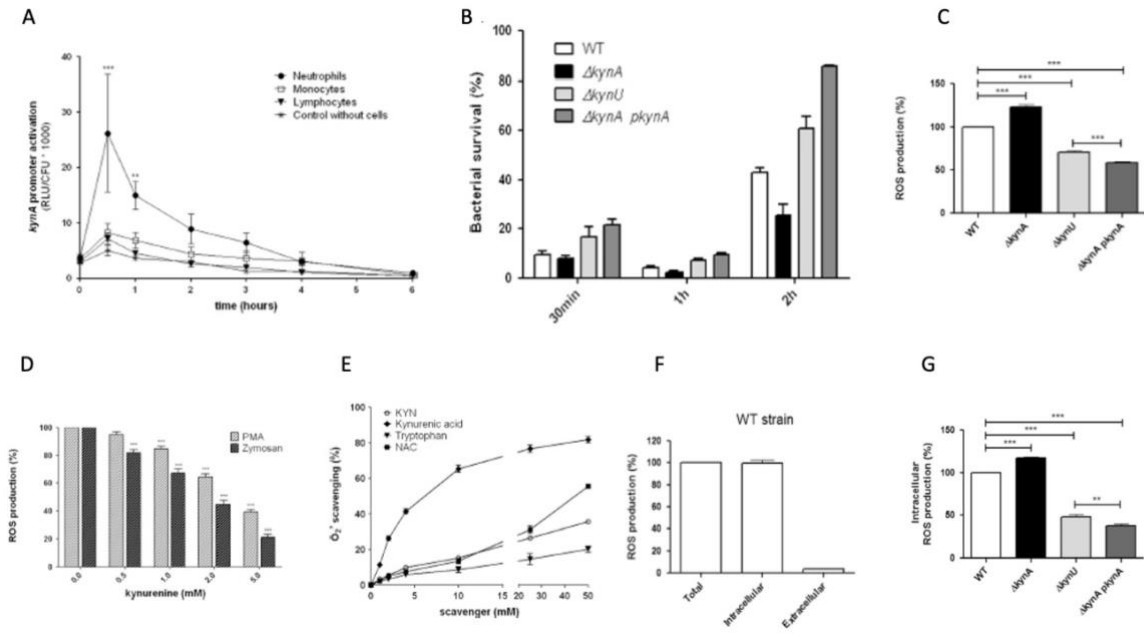
**Figure 17 :** *P. aeruginosa* produit la kynurénine à partir du tryptophane. La délétion du gène *kynA*, codant la kynurenine synthase, abolit la production de kynurénine alors que la délétion de la kynuréninase KynU, responsable du catabolisme de la kynurenine en anthranilate, permet l'accumulation de kynurénine mesurée par LC-MS. Les souches de *P. aeruginosa* issus de patients atteints de mucoviscidose produisent des niveaux variables de kynurénine pouvant atteindre une concentration de 600  $\mu$ M.

Au cours d'une infection pulmonaire dans le contexte de la mucoviscidose, on observe une accumulation de neutrophiles activés produisant des ERO afin d'éliminer des bactéries telles que *P. aeruginosa* (<sup>131,208,209</sup>). Dans ce travail, C. Genestet, doctorante du laboratoire a démontré qu'une forte activation transcriptionnelle de *kynA* (le premier gène impliqué dans la voie de la kynurénine) est observée au contact des cellules immunitaires et notamment des neutrophiles (Figure 18A) ([Genestet et al. 2014](#)). De plus, en utilisant la co-culture de neutrophiles humains avec différentes souches de *P. aeruginosa* ne produisant pas ( $\Delta$ *kynA*), ou produisant un niveau élevé de kynurénine ( $\Delta$ *kynU* ou  $\Delta$ *kynA* *p**kynA*), nous avons démontré le rôle de la kynurénine dans la survie bactérienne. En effet, les mutants surproduisant la kynurénine survivent mieux (60-80% de survie après 2h de contact avec des neutrophiles vs 30% de survie sans kynurénine) (Figure 18B).

Cette expérience de co-culture avec différentes souches produisant des niveaux variables de kynurénine nous a également permis de montrer que le neutrophile activé produit moins de luminescence (RLU) accumulé en 1h de contact et donc moins d'ERO totaux lorsque les souches produisent des niveaux élevés de kynurénine (Figure 18C).

La production d'ERO se fait principalement par l'action de l'enzyme NADPH oxydase. C'est le mécanisme principal de bactéricidie des neutrophiles. Nous avons validé que la kynurénine purifiée entraîne une inhibition de la production d'ERO par les neutrophiles activés (Figure 18D). Cette inhibition n'est due ni à un défaut de phagocytose ni à une inhibition directe de la NADPH oxydase (données non montrées mais présentes dans le papier <sup>210</sup>). En effet, la kynurénine n'a aucun effet sur la consommation d'oxygène par les neutrophiles activés par la PMA ou le zymosan. En utilisant des systèmes *in vitro* produisant des ERO, nous avons montré que la kynurénine piège le peroxyde d'hydrogène et, dans une moindre mesure, l'ion superoxyde. L'acide kynurénique est la molécule la plus efficace parmi celles testées (kynurénine, tryptophane et N-acetylcystéine) pour piéger l'ion superoxyde (Figure 18E). Nous avons ensuite montré que la kynurénine bactérienne est capable de piéger les ERO intra- et extra-cellulaires lors de l'activation des neutrophiles. Pour cela, nous avons stimulé la production d'ERO par les neutrophiles à l'aide de la souche de *P. aeruginosa* WT (CHA) en présence de luminol qui détecte à la fois les ERO intra et extracellulaires. De la catalase et de la superoxyde dismutase (SOD) ont été ajoutés pour la détection des ERO intracellulaires uniquement. Le luminol a été remplacé par l'isoluminol pour détecter les ERO extracellulaires. La production d'ERO lors de l'activation des neutrophiles par la souche WT sont principalement intracellulaire (seul 5% d'ERO extracellulaire) (Figure 18F). Lorsque les souches  $\Delta kynU$  et  $\Delta kynA pkynA$  (surproduisant la kynurénine) ont été utilisées, il y a 50 à 60% d'ERO intracellulaire en moins (Figure 18G). L'effet de piégeage d'ERO se produit donc principalement au niveau intracellulaire après stimulation bactérienne, probablement dans le phagosome. En conclusion, nous avons démontré que la voie de la kynurénine permet à *P. aeruginosa* de contourner la réponse immunitaire innée en piégeant la production d'ERO par les neutrophiles.

**Bilan :** Ces travaux m'ont permis d'être autrice d'2 publications (P14 : [Genestet et al. 2014](#) et P17 : [Bortolotti et al. 2016](#)).



**Figure 18 :** Effet de la kynurénine sur la production d’espèces réactives de l’oxygène (ERO) par le neutrophile humain activé. **A.** La souche de *P. aeruginosa* CHA*pkynA* ::*lux* est incubée en présence de neutrophiles, monocytes et lymphocytes humain purifiés à partir de sang total à une MOI 1 :1. L’intensité de luminescence est rapportée par le nombre de bactéries vivantes (RLU/CFU) au cours du temps **B.** Des neutrophiles sont incubés avec les souches CHA, CHAΔ*kynA*, CHAΔ*kynU* et CHAΔ*kynA pkynA* opsonisées par du sérum et la survie des souches est mesurées par étalement et comptage des CFU en comparaison au tps = 0 min. 4 expériences indépendantes **C.** Des neutrophiles sont incubés avec les souches CHA, CHAΔ*kynA*, CHAΔ*kynU* et CHAΔ*kynA pkynA* opsonisées par du sérum et la production de ERO est mesurée par chimioluminescence en présence de 20 μM de luminol. La présence de kynurénine bactérienne inhibe la production d’ERO produite en 60 min par le neutrophile. Le contrôle de 100% étant la production d’ ERO par le neutrophile en contact 1h avec la souche WT. **D.** Les neutrophiles ont été stimulés avec du zymosan opsonisé par du sérum et de la PMA, pendant 30 et 15 min respectivement. Des concentrations de kynurénine purifiée entre 0 et 5 mM ont été ajoutées et la mesure de RLU accumulée est mesurée par chimioluminescence. **E** Les ions superoxyde sont produits par un système non enzymatique PMS-NADH. Après ajout des molécules purifiées (kynurénine, acide kynurénique, tryptophane, N-acetylcystéine) à différentes concentrations (de 0 à 50 mM), les ions superoxydes produits sont mesurés par un test de réduction du NBT. **F.** Les neutrophiles humains ont été mis en contact de la souche de *P. aeruginosa* WT CHA opsonisée par du sérum. La production d’ERO a été mesuré par chimioluminescence 1h après. L’ajout de luminol permet de mesurer la production d’ ERO total, l’ajout de SOD et catalase, permet de mesurer la production des ERO intracellulaires, l’ajout d’isoluminol permet de mesurer la production des ERO extracellulaires. **G.** Selon la méthode décrite précédemment, nous avons utilisé différentes souches de *P. aeruginosa* (WT, Δ*kynA*, Δ*kynU* et Δ*kynA pkynA*). La kynurénine produite par *P. aeruginosa* inhibe la production des ERO intracellulaires. 6 expériences indépendantes.

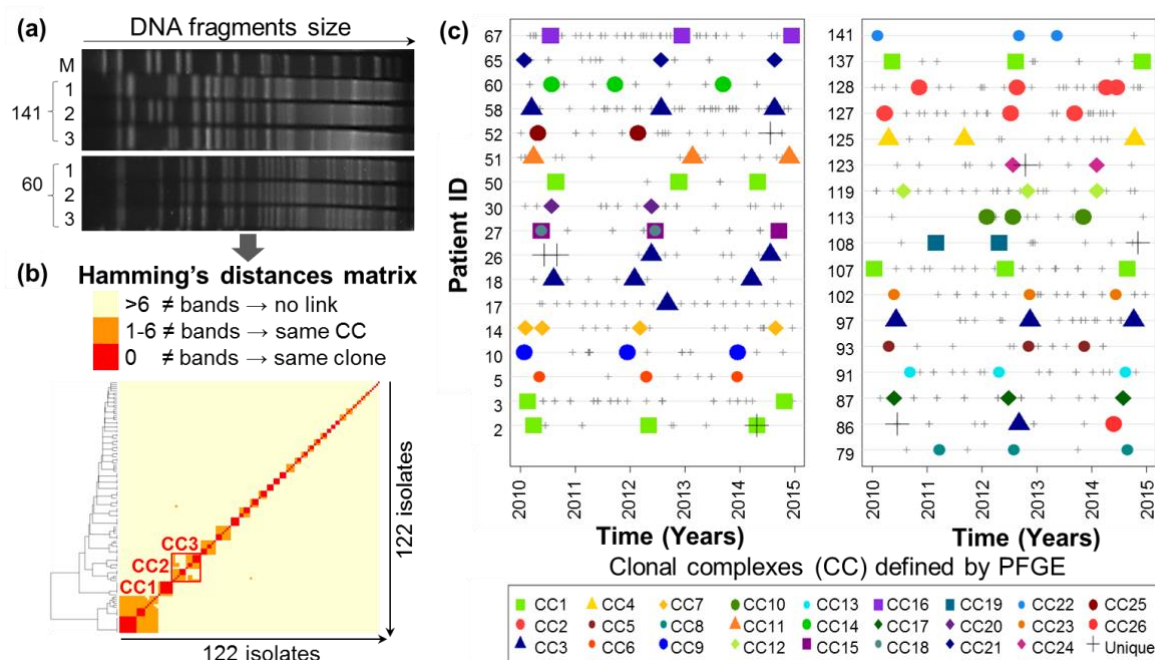
### **6.3.2.3. Rôle des polyamines dans la virulence et la sévérité de l'infection chronique à *P. aeruginosa***

La mucoviscidose (CF) est une maladie génétique grave causée par des mutations du gène codant pour un transporteur membranaire de transport des ions chlorures (CFTR). Dans les poumons, le dysfonctionnement du canal ionique CFTR entraîne une altération du processus de clairance mucociliaire, ce qui favorise les infections poly-microbiennes<sup>211,212</sup>. *P. aeruginosa* est l'agent pathogène le plus fréquemment isolé dans les expectorations des patients adultes atteints de mucoviscidose<sup>95,213-215</sup>. Hautement résistant aux antibiotiques, *P. aeruginosa* est souvent à l'origine d'infections chroniques de longue durée, responsables d'une inflammation chronique et d'un déclin ultérieur de la fonction pulmonaire, ainsi que d'épisodes d'exacerbations aiguës. *P. aeruginosa* est donc considéré comme une cause majeure de morbidité et de mortalité dans la mucoviscidose<sup>212,216-220</sup>. Au fil des années d'infection respiratoire chronique, *P. aeruginosa* s'adapte à cet environnement et évolue au sein de son hôte<sup>46,221</sup>. Les adaptations phénotypiques fréquentes comprennent l'acquisition de résistances aux antibiotiques, la diminution de l'expression des facteurs de virulence, la perte de motilité, le ralentissement de la croissance, le passage à un phénotype mucoïde dû à la surproduction d'alginate, et l'augmentation de la formation de biofilms et du développement de micro-colonies, qui réduisent tous la reconnaissance de l'agent pathogène par le système immunitaire<sup>95,214,222-224</sup>. Des changements métaboliques se produisent également en réponse aux conditions nutritionnelles prévalant dans le mucus des patients CF, comme l'émergence d'auxotrophie pour des acides aminés. Probablement en raison du coût élevé de la production métabolique de ces acides aminés et de leur disponibilité immédiate dans le mucus pulmonaire<sup>225,226</sup>. Travaillant depuis des années au laboratoire sur le métabolisme du tryptophane, nous avons décidé à l'arrivée d'Oriane Moyne, doctorante du laboratoire au 1/09/2016, de débiter l'étude globale de l'évolution du métabolisme de *P. aeruginosa* par une approche innovante de métabolomique non ciblée et de haute résolution. C'est en 2014, lors d'une formation à la colle sur Loup en « spectrométrie de masse et métabolomique », que je découvre l'intérêt de l'outil ainsi qu'une communauté de chercheurs qui deviendront des collaborateurs et que j'imagine le potentiel de cette approche pour résoudre des problématiques importantes de l'étude de l'interaction hôte-pathogène.

L'avènement de la génomique, a été utile pour identifier les adaptations génétiques de *P. aeruginosa* au poumon CF<sup>227-229</sup>. Cependant, étant donné la complexité des différents niveaux de régulation des organismes vivants (mutations dans des zones non codantes, des régulation post-transcriptionnelle, post-traductionnelle, cinétique enzymatique, etc.), les corrélations entre

les mutations du génome et leurs effets sur les phénotypes pertinents, tels que leur résistance aux antibiotiques ou leur profil de virulence, restent difficiles à trouver<sup>230</sup>. De plus, des études récentes ont montré que des adaptations métaboliques convergentes (en termes de phénotype) de souches infectant des patients indépendants pouvaient être obtenues par des voies distinctes<sup>231</sup>. Par ailleurs, des isolats avec des séquences génomiques presque identiques prélevés chez différents patients pouvaient exprimer des profils transcriptomiques, métaboliques et phénotypiques très divergents<sup>232</sup>. Ensemble, ces résultats ont mis en évidence la nécessité d'obtenir une vision plus fonctionnelle de l'évolution de *P. aeruginosa* au sein de l'hôte, afin d'établir des liens entre les adaptations bactériennes, l'expression de phénotypes cliniquement pertinents et l'impact final de l'infection sur l'état de santé du patient. Pour atteindre cet objectif, la métabolomique (qui fait référence à la mesure des petites molécules, ou métabolites, présentes dans un système biologique) constitue un outil prometteur<sup>233</sup> car elle permet d'obtenir à un temps donné le résultat de l'expression des activités métaboliques bactériennes<sup>234</sup>. La comparaison des profils métabolomiques de *P. aeruginosa* obtenus au cours d'une infection fournit donc une vision fonctionnelle de l'adaptation bactérienne à l'environnement pulmonaire du patient CF, au plus près du phénotype. Des études précédentes avaient montré le potentiel de la métabolomique pour étudier l'adaptation métabolique de *P. aeruginosa* pendant les infections chroniques<sup>225</sup> ainsi que le lien entre les profils métaboliques et les phénotypes bactériens<sup>235,236</sup>.

Dans ce travail ([Moyne et al. 2020](#)), nous avons récupéré entre 3 et 5 isolats de *P. aeruginosa* par patients CF adulte, sur la période 2010-2015. Le génotypage au PFGE, nous a permis de confirmer l'appartenance des isolats à même complexe clonal selon la définition de Römling *et al.*, c'est à dire entre 1 et 6 bandes de différences<sup>237</sup> (Figure 19). Des patients différents partagent des souches qui appartiennent à un même complexe clonal (par ex, 2 fratries différentes (patient 2 et 3, et 127 et 128) alors que d'autres n'ont aucun lien familial. Ces isolats précoces et tardifs sont donc des représentants d'une même lignée évolutive chez un patient donné. Nous avons alors sélectionné les isolats précoces et tardifs pour 32 patients.



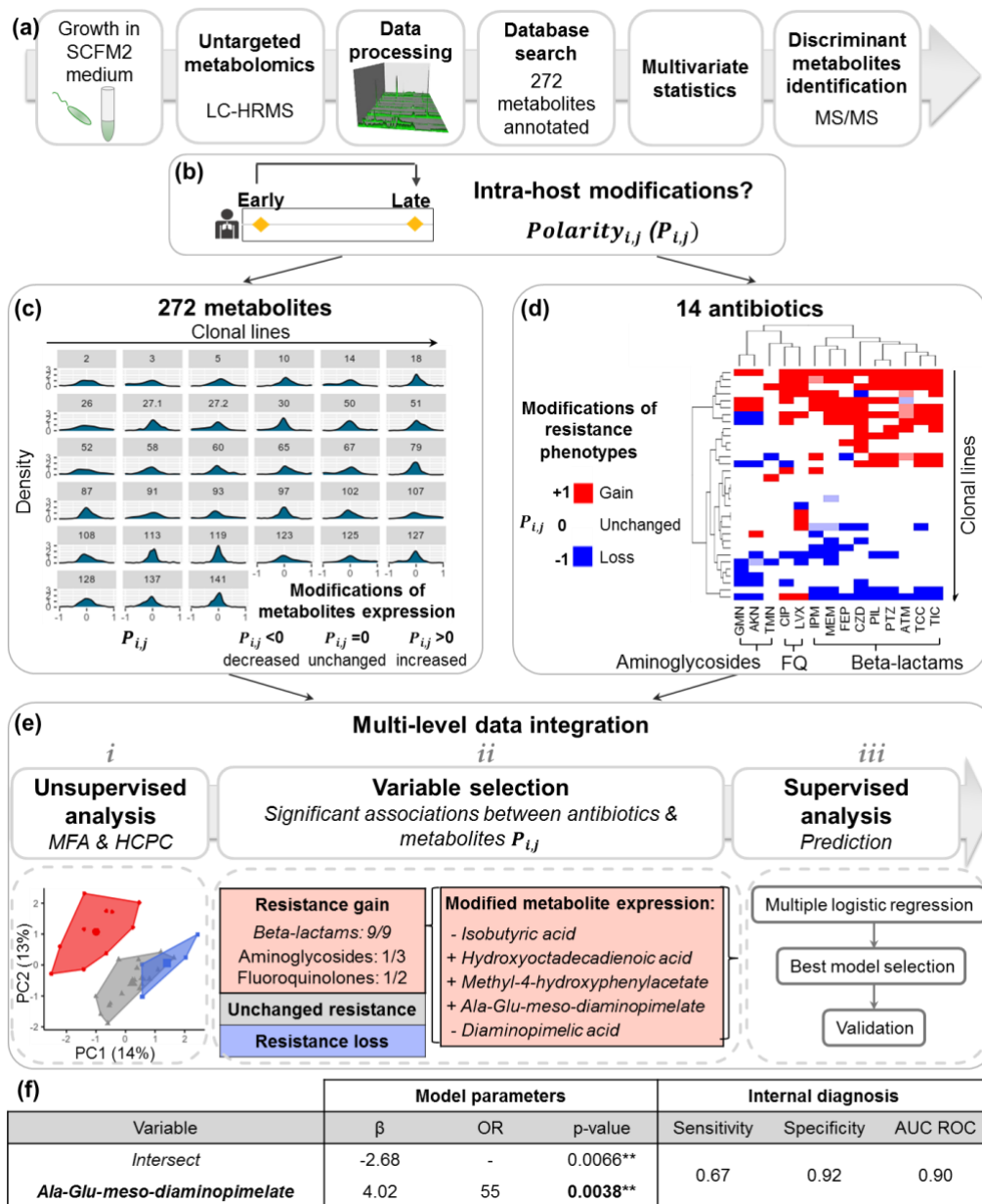
**Figure 19 :** Collecte temporelle et génotypage par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) des isolats cliniques de *P. aeruginosa* responsables de l'infection pulmonaire chronique chez les patients atteints de mucoviscidose. (a) Exemple représentatif de gels PFGE (pulsotypes) d'isolats cliniques de *P. aeruginosa* prélevés chez les patients 60 et 141 (1, 2 et 3 représentent le moment d'échantillonnage de chaque isolat : début, milieu ou fin de la période de suivi 2010-2015, respectivement ; M = taille du fragment marqueur). (b) Résultats du PFGE et comparaison par paires de 122 pulsotypes de *P. aeruginosa*. Les complexes clonaux (CC) et les clones ont été définis selon les critères de Römling *et al.*<sup>237</sup>: aucun lien clonal si les pulsotypes présentaient plus de 6 bandes différentes, complexe clonal (CC) si les pulsotypes présentaient moins de 6 bandes différentes, et clonal si les pulsotypes étaient identiques. (c) Série temporelle d'isolats génotypés par PFGE prélevés dans les expectorations des patients entre 2010 et 2015. Les petites croix grises représentent tous les points temporels d'isolement de *P. aeruginosa* entre 2010 et 2015 pour chaque patient. La forme des plus gros points représente le CC des isolats qui ont été analysés par PFGE (les clones uniques sont représentés par une croix noire). Pour 32/34 patients, les isolats les plus anciens et les plus récents appartenant à un même CC ont été sélectionnés pour la banque cellulaire finale.

#### 6.3.2.4. Corrélation entre adaptation métabolique intra-hôte et acquisition de résistance aux antibiotiques de type $\beta$ -lactamines

Nous avons utilisé la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC/HRMS), pour accéder à l'évolution adaptative du métabolisme de *P. aeruginosa* dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Nous avons fait l'acquisition des empreintes métaboliques avec deux colonnes de chromatographie différentes (C18 et HILIC) couplé à l'ionisation par électronébuliseur (ou ESI) en mode positive et négative de 64 isolats (32 lignées évolutives, isolats « précoce » et « tardif » des patients) afin d'augmenter la couverture chimique du métabolome de *P. aeruginosa*. Nous avons réussi à identifier 272 métabolites grâce d'une part aux bases de données spectrales (PAMDB, etc...) et à une base de données maison, puis nous les avons confirmé avec des standards purifiés. Afin de regarder l'évolution métabolique des souches au cours du temps, nous avons calculé le degré de polarité

métabolique ( $P_{i,j}$ ) comme indicateur de la modification de la signature métabolique entre l'isolat tardif et précoce. Le degré de polarité métabolique ( $P_{i,j}$ ) permet de distinguer le « core métabolome » de chaque lignée clonale c'est à dire qui ne change pas au cours du temps (elles ont un  $P_{i,j}$  proche de 0) du « métabolome variable » qui varie au cours de l'infection chronique ( $P_{i,j} \neq 0$ ) (Figure 20b).

En parallèle, nous avons mesuré les phénotypes de résistance à 14 antibiotiques de la famille des aminoglycosides, des fluoroquinolones, et des  $\beta$ -lactamines et calculé le degré de polarité pour le phénotype de résistance ( $P_{i,j}$ ) correspondant au statut « acquisition de la résistance » (+1), « diminution » (-1) ou « pas d'évolution » (0). Une classification hiérarchique ascendante des isolats montre une ségrégation clonale en fonction du statut d'évolution du phénotype de virulence pour les antibiotiques testés. Cette analyse a permis d'identifier 3 clusters (Figure 20). Ce statut d'évolution de la résistance aux antibiotiques  $P_{i,j}$  a ensuite été intégrée à la variation  $P_{i,j}$  métabolique décrite précédemment en suivant notre programme de travail d'analyse statistique multi-bloc (figure 20e). Brièvement, nous avons effectué un regroupement hiérarchique sur les composantes principales (HCPC) déduites d'une analyse factorielle multiple (AFM) pour extraire conjointement les informations des ensembles de données sur la métabolomique et la résistance aux antibiotiques. Cette analyse a conduit à l'identification de 3 clusters représentant des lignées clonales de *P. aeruginosa* présentant des modifications similaires du "métabo-résistome" entre les isolats précoces et tardifs. Le cluster 1 (Figure 20e, en rouge) était significativement associé à l'acquisition de la résistance pour 11/14 des antibiotiques testés (dont 9/9  $\beta$ -lactamines), et à des modifications intra-hôte de 5/272 métabolites annotés. Ces modifications comprenaient une augmentation des niveaux d'acide 13-hydroxyoctadéca-9,11-diénoïque, de méthyl-4-hydroxyphénylacétate, d'Ala-Glu-mésodiaminopimelate et une diminution des niveaux d'acides isobutyrique et l'acide diaminopimelique (Figure 20e). Les groupes 2 et 3 étaient associés à une résistance aux antibiotiques inchangée ou diminuée, respectivement (en blanc et bleu, Figure 20e). Les 5 métabolites associés au cluster 1 ont été sélectionnés pour construire un modèle logistique supervisé afin de prédire l'acquisition de la résistance aux  $\beta$ -lactamines à partir d'un nombre réduit de métabolites (Figure 20e).



**Figure 20.** L'analyse multi-bloc a permis l'identification des modifications métaboliques de *P. aeruginosa* au sein de l'hôte associées à l'acquisition de résistances aux bêta-lactamines. (a) Résumé de notre programme de travail d'analyse métabolomique LC-HRMS non ciblée pour l'acquisition des profils métaboliques des isolats de *P. a.* (b) Les modifications intra-hôte entre les isolats précoces et tardifs de 33 lignées évolutives ont été évaluées en calculant la valeur  $P_{i,j}$  pour chaque lignée *i*, métabolite ou phénotype de résistance *j*. (c) Distributions des métabolites  $P_{i,j}$  représentant les modifications intra-hôte de 272 intensités de métabolites annotés. (d) Analyse hiérarchique par grappes de la résistance aux antibiotiques  $P_{i,j}$  représentant les modifications intra-hôte de la résistance à 14 antibiotiques (\*). (e) Intégration de données multi-échelle pour l'identification des signatures métaboliques associées à l'acquisition de la résistance aux antibiotiques : (i) le HCPC non supervisé a identifié 3 clusters de lignées de *P. aeruginosa* avec des modifications similaires des résistances aux antibiotiques et des intensités des métabolites ; (ii) le cluster 1 (en rouge) est significativement associé à l'acquisition de résistances aux antibiotiques, en particulier contre les bêta-lactames ( $\chi^2$  p-value < 0.05), et à des modifications de l'abondance de 5 métabolites ; (iii) sélection des métabolites et des antibiotiques significativement associés pour construire un modèle logistique supervisé prédisant l'acquisition de résistances aux antibiotiques à partir de changements métaboliques ; (f) validation croisée du meilleur modèle de régression logistique, qui prédit l'acquisition de résistances aux bêta-lactamines à partir d'une production accrue d'*Ala-Glu-meso-diaminopimelate*. \*\* Valeurs  $p < 0,01$ . (\*) Abréviations : FQ: fluoroquinolones; AKN: amikacine, ATM: aztreonam, CIP: ciprofloxacine, CZD: ceftazidime, FEP: cefepime, GMN: gentamicine, IPM: imipenem, LVX: levofloxacine, MEM: meropenem, PIL: piperacilline, PTZ: piperacilline- tazobactam, TCC: ticarcillin-acide clavulanique, TIC: ticarcilline, TMN: tobramycine.

Nous avons montré que la seule augmentation de la production d'Ala-Glu-meso-diaminopimelate entre les isolats précoces et tardifs a permis de prédire l'acquisition de la résistance aux  $\beta$ -lactamines avec une sensibilité modérée (67 %) mais une excellente spécificité (92 %) (Figure 20f). Ce tripeptide de la muréine « Ala-Glu-meso-diaminopimelate » est connu pour être produit lors de la dégradation du peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne et directement réutilisé dans le processus de recyclage<sup>238</sup>. Ce qui n'est pas si étonnant puisque les  $\beta$ -lactamines sont des enzymes qui ciblent les PBPs, enzymes de synthèse et de recyclage du peptidoglycane. Nous avons vu lors de mes recherches en 2005, que PBP3 est une enzyme impliquée dans le recyclage du peptidoglycane. Nos résultats soutiennent clairement l'hypothèse que l'augmentation de la production d'Ala-Glu-meso-diaminopimelate révèle une activation du processus de recyclage du peptidoglycane, permettant ainsi aux bactéries d'échapper à l'effet du traitement aux  $\beta$ -lactamines. Récemment, il a été démontré que l'inactivation de la voie de recyclage du peptidoglycane était associée à la restauration de la sensibilité aux antibiotiques, à la diminution de la virulence bactérienne et à l'amélioration de la réponse du système immunitaire inné *in vitro*<sup>239,240</sup>. Nos observations confirment ces observations antérieures et soulignent l'importance de cette voie dans l'acquisition des résistances aux  $\beta$ -lactamines de *P. aeruginosa in vivo*. Les inhibiteurs des enzymes de recyclage du peptidoglycane représentent donc de potentiels futurs antibiotiques. Nos résultats suggèrent également que la concentration en Ala-Glu-meso-diaminopimelate peut être utilisée comme biomarqueur pour anticiper l'efficacité des traitements antibiotiques à base de  $\beta$ -lactamines. Une augmentation du taux d'Ala-Glu-meso-diaminopimelate peut en effet prédire l'acquisition d'une résistance aux  $\beta$ -lactamines avec une sensibilité modérée (67%) mais une excellente spécificité (92%). Nous pouvons donc anticiper que de tels biomarqueurs métaboliques puissent être mesurés directement à partir des expectorations des patients et fournir une information rapide et pertinente, qui pourrait avantageusement compléter les méthodes de culture bactérienne utilisées en routine (antibiogrammes), qui nécessitent 24 à 48 h de croissance dans des conditions éloignées des voies respiratoires des patients. Bien que les taux d'Ala-D-Glu-méso-diaminopimélate ne permettent pas de détecter 100 % des résistances aux  $\beta$ -lactamines, des taux élevés de ce métabolite indiqueraient clairement qu'un traitement aux  $\beta$ -lactamines échouerait très probablement à contrôler l'infection. Cela fournirait donc des informations rapides et très précieuses pour orienter les infectiologues vers le choix d'une autre antibiothérapie et éviter les cycles thérapeutiques inefficaces de type "essai-erreur". Par ailleurs, j'en profite pour faire une petite remarque concernant la stratégie actuelle des sociétés qui

commercialisent des kits CE-IVD pour le diagnostic des résistances aux antibiotiques. Ces kits reposent principalement sur l'utilisation de la PCR et de la détection de mutation ponctuelle sur tel ou tel gènes impliqués dans la résistance comme j'ai pu le constater lors de mon passage chez Biomérieux (ayant racheté BioFire). Or, les possibilités d'acquérir la résistance aux antibiotiques sont immenses. Donc c'est une course infinie vers la détection des mutations. En revanche, la mise en évidence du métabolite comme par exemple, le DAP, est conservée vis à vis de plusieurs antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines et concerne probablement des centaines de mutations différentes. Il est donc assez facile de comprendre que c'est un moyen de diagnostiquer l'apparition de souches résistantes de façon plus robuste et d'un grand intérêt pour le clinicien.

#### **6.3.2.5. Les différents métabotypes de *P. aeruginosa* révèlent des niveaux différentiels de production de polyamines et de leurs métabolites en lien avec la virulence**

Afin de mettre en évidence les signatures métaboliques potentielles ayant une pertinence clinique, nous avons également analysé les profils métaboliques de *P. aeruginosa*, sans intégrer la temporalité des échantillonnages (Figure 21a). Soixante-six isolats de *P. aeruginosa* ont été décrits à l'aide de 2 blocs de données : les intensités des métabolites obtenus par LC-HRMS (n=151 métabolites sélectionnés) (Figure 21b,c,f partie gauche), et la présence/absence des 6 phénotypes de virulence : la cytotoxicité sur les macrophages (J774) et les cellules épithéliales (A549), la réponse au stress des cellules épithéliales induite par l'infection par *P. aeruginosa*, la formation de colonies mucoïdes, la production de pigments et le taux de croissance bactérienne (Figure 21d,e,f partie droite).

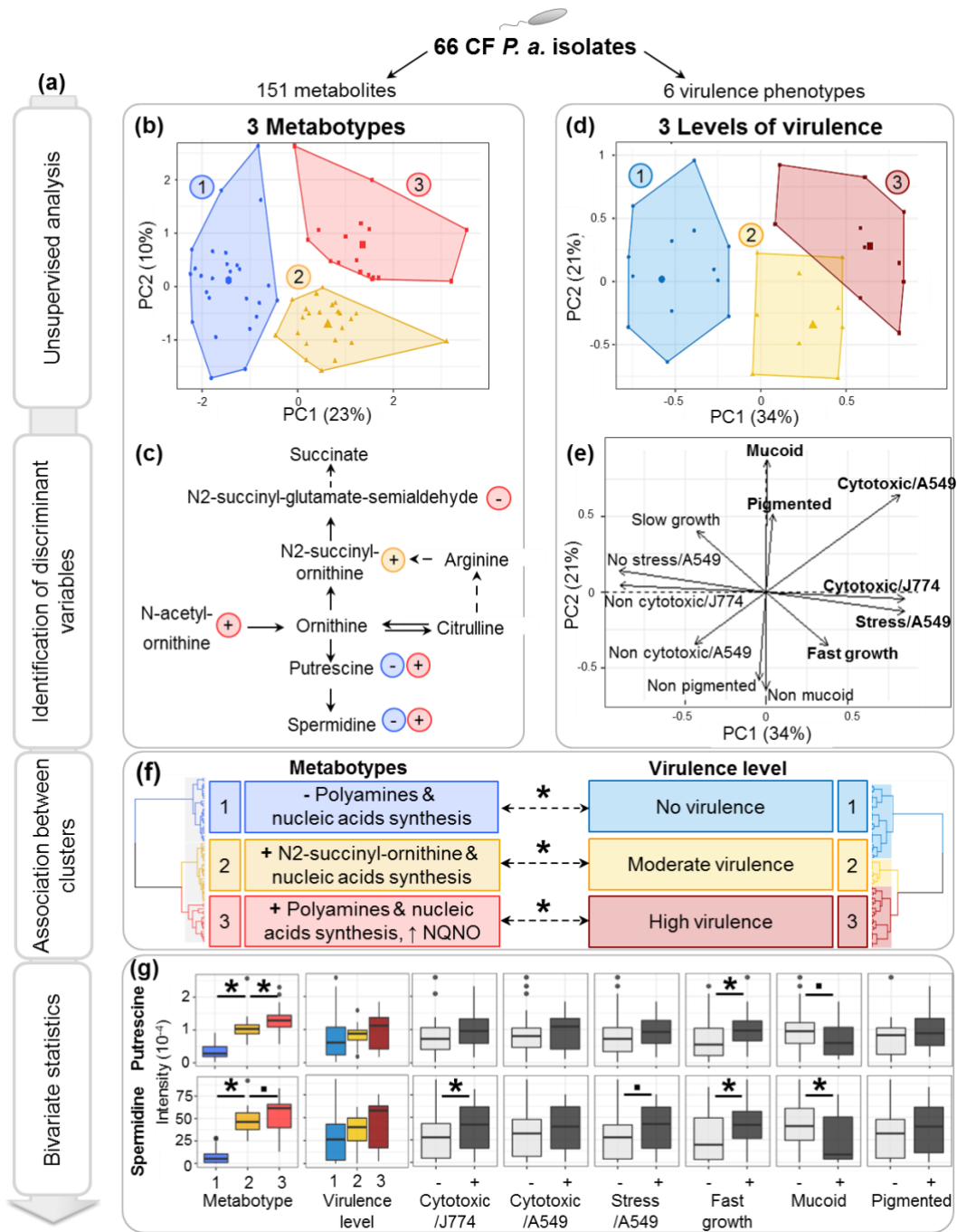
Concernant, les analyses métabolomiques, l'analyse HCPC des 151/272 métabolites sélectionnés a conduit à l'identification de 3 groupes d'isolats de *P. aeruginosa* présentant des profils métaboliques similaires, qui seront ci-après appelés métabotypes (Figure 21b). Les 10 métabolites les plus significatifs associés à ces 3 métabotypes sont listés dans le tableau 1 (analyse de variance à sens unique (ANOVA) test F valeur  $p < 0,05$ ). Afin de placer ces données dans une perspective biologique, les voies métaboliques associées à ces métabolites ont été déduites en utilisant la base de données *Pseudomonas aeruginosa* metabolome database ou PAMDB<sup>241</sup>.

Metabotype	Metabolite	Relative abundance	p-value (one-way ANOVA)	Identification status (*)
1	Spermidine	-	2.8e-11	a, c, d
	Cytosine	-	5.2e-10	a, b, d
	Putrescine	-	1.3e-09	a, c, d
	Adenosine monophosphate (AMP)	-	3.6e-09	a, b, d
	Uridine diphosphate (UDP)-Galactose (UDP-Glucose)	-	4.6e-09	a, b, d
	Cytidine diphosphate (CDP)	-	5.9e-09	a
	Adenosine diphosphate (ADP)	-	8.1e-09	a, b, d
	Guanosine	-	1.9e-08	a, c, d
	N2-Succinyl-L-ornithine	-	2.6e-08	a
	UDP-N-acetylgalactosamine (UDP-N-acetylglucosamine)	-	4.1e-08	a, b, d
2	Guanine	+	1.4e-06	a, b, d
	UDP-N-acetylgalactosamine (UDP-N-acetylglucosamine)	+	1.8e-06	a, b, d
	12-Hydroxydodecanoic acid	+	2.6e-06	a, b, d
	Guanosine monophosphate	+	4.5e-06	a, c, d
	Pentoses phosphate	+	1.7e-05	a, b, d
	N2-Succinyl-L-ornithine	+	2.3e-05	a
	Glucosamine 6-phosphate (Galactosamine 6-phosphate)	+	2.4e-05	a, b, d
	Cytosine	+	3.7e-05	a, b, d
	Guanosine	+	5.2e-05	a, c, d
	UDP-Galactose (UDP-Glucose)	+	1.5e-04	a, b, d
3	1-Hydroxy-2-nonyl-4(1H)-quinolinone	+	7.5e-08	a
	Palmitoleic acid	+	2.5e-07	a
	Glycerolphosphorylethanolamine/sn-glycero-3-phosphoethanolamine	+	3.0e-07	a, f
	AMP	+	2.2e-06	a, b, d
	N2-Succinyl-L-glutamic acid 5-semialdehyde	-	3.3e-06	a
	Heptadecenoic acid	+	3.6e-06	a
	N-Acetylornithine	+	5.4e-06	a, c, d
	Tetradecanoyl-phosphate (n-C14:0)	+	1.0e-05	a
	Indoleglycerol phosphate	+	1.2e-05	a
Glycerol	+	1.2e-05	a	

**Table 3 :** Liste des 10 métabolites les plus fortement associés à l'appartenance aux trois métabotypes d'isolats cliniques de *P. aeruginosa* issus de colonisation chronique de patients adultes atteints de mucoviscidose.

De manière intéressante, le métabotype 1 était caractérisé par des niveaux significativement plus faibles de spermidine et putrescine, de nucléotides, de nucléosides, d'hexosamines ou de précurseurs du glycosaminoglycane (AMP, ADP, CDP, GDP, cytosine, guanosine, UDP-galactose et UDP-N-acétylgalactosamine). Le métabotype 2 était caractérisé par des niveaux plus élevés du catabolite de l'ornithine, la N2-succinylornithine. Enfin, le métabotype 3 était caractérisé par des niveaux plus élevés du précurseur de l'ornithine, la N-acétyl-L-ornithine, et des niveaux plus faibles du catabolite de l'ornithine, le N2-succinylglutamate-semialdéhyde. Le métabotype 3 était également caractérisé par un niveau plus élevé de 1-hydroxy-2-nonyl-4(1H)-quinolinone (NQNO) (Table 3).

Ces résultats ont mis en évidence les métabolites impliqués dans le métabolisme des polyamines (par exemple, la putrescine, spermidine) comme étant fortement discriminants entre les différents métabotypes de *P. aeruginosa* (Figure 21c,g, test t de Student apparié, FDR ajusté < 0,05, sauf pour le niveau de spermidine entre le métabotype 2 et 3,  $p = 0.076$ ). Ces molécules sont présentes dans tous les organismes vivants et sont notamment impliquées dans la croissance cellulaire<sup>242,243</sup>. Ceci pourrait expliquer la concordance entre les niveaux de métabolites impliqués dans la synthèse des polyamines et des acides nucléiques. Les principales polyamines retrouvées chez les bactéries sont la putrescine, la spermidine et la cadavérine<sup>244,245</sup>. Afin d'accéder aux relations entre les métabotypes de *P. aeruginosa* et les propriétés de virulence de chaque isolat, nous avons étudié six phénotypes différents : la cytotoxicité sur les macrophages (J774) et les cellules épithéliales (A549), la réponse au stress des cellules épithéliales induite par l'infection par *P. aeruginosa*, la formation de colonies mucoïdes, la production de pigments et le taux de croissance bactérienne. Les résultats expérimentaux ont été convertis en une matrice binaire de présence/absence et analysés de manière multivariée par l'analyse HCPC. Le regroupement HCPC a révélé 3 groupes d'isolats qui peuvent être définis en fonction de leur niveau relatif de virulence (Figure 21d), comme suit (i) isolats avirulents ( $n = 30/66$ ), qui sont généralement non cytotoxiques sur les macrophages J774 et les cellules épithéliales A549, ne provoquent pas de stress sur A549, et ont un taux de croissance lent ; (ii) isolats modérément virulents ( $n = 17/66$ ), qui causent un stress sur A549, sont cytotoxiques sur J774 mais pas sur A549, et ont un taux de croissance rapide ; et (iii) isolats hautement virulents ( $n = 19/66$ ), qui sont cytotoxiques sur les deux types de cellules et causent un stress sur les cellules A549 ( $\chi^2$  p-values < 0. 05, figure 3e).



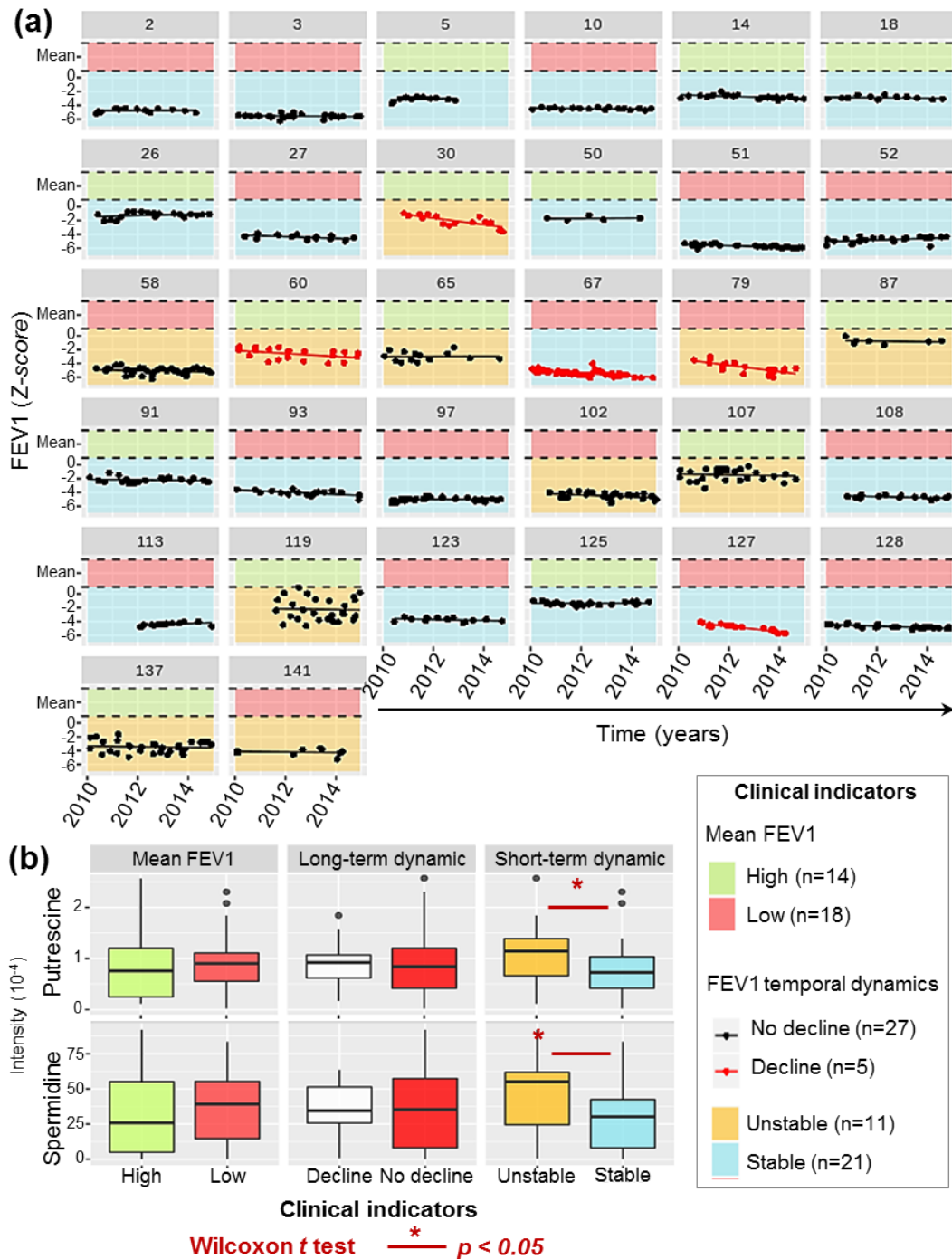
**Figure 21 :** L'analyse multi-bloc a permis d'identifier des associations entre les métabotypes de *P. aeruginosa* et l'expression des phénotypes de virulence. (a) Résumé du programme de travail d'analyse statistique multi-bloc. (b) Représentation de 3 clusters HCPC d'isolats exprimant des profils métaboliques similaires (ou métabotypes) dans les 2 premières composantes principales de l'analyse multi-factorielle (ou MFA). Les centroïdes des clusters sont représentés par des points plus grands. (c) Vue simplifiée de la voie de synthèse des polyamines (putrescine, spermidine) (adapté de Stalon *et al.* 246). Les métabolites significatifs sont mis en évidence par des flèches, indiquant si le métabolite se trouve en plus ou moins grande abondance dans le métabotype correspondant à la couleur. (d) Représentation de 3 clusters HCPC d'isolats exprimant des phénotypes de virulence similaires dans les 2 premières composantes principales de l'analyse des correspondances multiples (ACM). Les centroïdes des clusters sont représentés par des points plus grands. (e) Représentation des catégories de virulence dans les 2 premières composantes principales de l'ACM. (f) Dendrogrammes et résumé des principales caractéristiques des clusters HCPC identifiés sur chaque bloc de données et associations entre le niveau de virulence de *P. aeruginosa* et le métabotype (les valeurs p du test de Fisher <0,05 sont indiquées par \*). (g) Boxplots montrant les relations bivariées entre les niveaux de putrescine et de spermidine avec l'expression des facteurs de virulence individuels (les valeurs p du test t de Student <0,1 et <0,05 sont indiquées par ■ et (\*), respectivement).

Des associations significatives entre les niveaux de virulence établis et les métabotypes ont été observées : le métabotype 1 correspond aux isolats avirulents ; le métabotype 2, aux isolats modérément virulents ; et le métabotype 3, aux isolats hautement virulents (test exact de Fisher, valeur  $p = 0,01$ , Figure 21f). Considérant que la voie métabolique des polyamines était parmi les plus discriminantes entre les différents métabotypes, les relations entre les phénotypes de virulence et l'intensité de la putrescine et de la spermidine ont été étudiées plus en détail. L'analyse des relations entre le niveau de ces 2 métabolites et les propriétés de virulence a révélé que les niveaux de spermidine étaient significativement plus élevés dans les isolats qui étaient cytotoxiques sur les macrophages J774 et significativement plus bas dans les isolats formant des colonies mucoïdes. De plus, les niveaux de spermidine et de putrescine étaient plus élevés dans les isolats à croissance rapide (valeur  $p$  des tests  $t$  de Student  $<0,05$ ). En conclusion, la production de polyamines semble plus forte chez les isolats les plus virulents, incluant la capacité de croissance (Figure 21g).

#### **6.3.2.6. Polyamines et exacerbations cliniques fréquentes**

Les dossiers cliniques des patients CF ont été utilisés pour construire des indicateurs cliniques de la santé respiratoire afin d'explorer les relations entre les métabotypes de *P. aeruginosa* et mesure de la fonction pulmonaire des patients. Le suivi temporel du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) et les comparaisons avec une population de référence est considéré comme l'indicateur de pronostic le plus fiable chez les patients atteints de mucoviscidose<sup>216,247,248</sup>. Trois indicateurs décrivant le niveau moyen (élevé ou faible), la dynamique à long terme (déclin ou pas de déclin) et à court terme (stable ou instable) des fonctions pulmonaires des patients ont donc été construits sur la base de toutes les mesures du VEMS effectuées pendant la période 2010-2015 (5-45 mesures par patient). Aucune relation statistique n'a été observée entre ces 3 indicateurs, confirmant qu'ils étaient des descripteurs non redondants de l'état de santé respiratoire du patient. De manière remarquable, une association significative entre la production de putrescine et de spermidine par les isolats de *P. aeruginosa* cultivés, et la dynamique à court terme de la fonction respiratoire du patient (test de Wilcoxon,  $p$ -values = 0,030 et 0,041 pour les associations entre un VEMS instable et les niveaux de putrescine et de spermidine, respectivement, Figure 22b) a été observée. Ces relations significatives ont montré, pour la première fois, que les biomarqueurs métabolites spécifiquement produits par *P. aeruginosa* sont corrélés à la fréquence des exacerbations cliniques aiguës de la maladie respiratoire du patient. Compte tenu des inférences statistiques

des résultats décrits dans la Figure 21, cette relation pourrait être liée à l'expression de facteurs de virulence dans les isolats de *P. a.*



**Figure 22 :** Relations entre les fonctions respiratoires des patients et la production de polyamines par les isolats de *P. a.* (a) Série temporelle de toutes les mesures du VEMS réalisées sur les 32 patients de la cohorte pendant la période de suivi et construction des indicateurs cliniques. Le VEMS moyen de chaque patient a été défini comme élevé (fond vert) ou faible (fond rouge), par comparaison avec la moyenne de la cohorte. La dynamique temporelle du VEMS a été modélisée à l'aide d'une régression linéaire des mesures du VEMS sur la durée, comme suit : (i) la dynamique à long terme a été classée comme étant en déclin (lignes rouges) si la pente était significativement inférieure à 0, non déclinante (lignes noires) sinon ; (ii) la dynamique à court terme a été définie comme étant instable (fond jaune) si l'écart-type des résidus était supérieur à 40 % ou stable (fond bleu) si non. (b) Boxplots montrant la production de putrescine et de spermidine (intensité du pic LC- HRMS) par *P. aeruginosa* par catégorie « clinique » basées sur le VEMS.

En conclusion, nous avons trouvé une corrélation majeure et significative entre une production élevée de putrescine et de spermidine par les isolats de *P. aeruginosa*, et l'expression de plusieurs phénotypes de virulence, ainsi qu'une fonction pulmonaire instable. Il convient de noter que la fonction pulmonaire hautement instable se réfère le plus souvent à un phénotype clinique particulièrement grave d'"exacerbations fréquentes". Or, il est intéressant de noter qu'il a été démontré *in vitro* que *P. aeruginosa* possède les opérons *spuABCDEFGH-spuI* pour l'internalisation et l'utilisation des polyamines. Il a également été démontré que le système à deux composants CbrAB détecte les polyamines, régule les opérons *spu* et module 236 gènes qui ont un effet sur le métabolisme, la virulence et l'antibiorésistance de *P. aeruginosa*<sup>249,250</sup>. Dans une autre étude, Zhou et al. ont démontré que la spermidine a un effet positif sur l'activation du SST3 et ont trouvé une relation avec la cytotoxicité sur les cellules épithéliales des souches de laboratoire de *P. aeruginosa*<sup>251</sup>. En outre, Twomey et al. ont signalé une augmentation du niveau de putrescine dans les sécrétions bronchiques des patients atteints de mucoviscidose pendant les exacerbations pulmonaires. Cette augmentation était corrélée avec la présence et l'abondance de *P. aeruginosa* et de Chrysiogenales, mais les producteurs de ces molécules restaient à définir<sup>252</sup>. Nos résultats établissent donc un lien entre ces deux études, en démontrant pour la première fois le lien entre les niveaux élevés de putrescine et de spermidine spécifiquement produits par *P. aeruginosa*, une virulence élevée de *P. aeruginosa* et les exacerbations cliniques chez le patient CF chroniquement infecté.

En conclusion finale de ces travaux, la résistance aux antibiotiques et les phénotypes de virulence ainsi que l'état de santé des patients (à travers la mesure du VEMS au cours du temps) ont également été caractérisés chez des isolats issus de 32 patients atteints de mucoviscidose, et les résultats ont été intégrés aux empreintes métabolomiques dans une approche dite holistique avec des analyses statistiques multi-blocs. Cette stratégie nous a permis de définir des profils métaboliques bactériens que nous avons nommés "métabotypes" et qui sont significativement associés à des phénotypes bactériens cliniquement pertinents et à la maladie respiratoire des patients. Ainsi, nos résultats démontrent le potentiel de la métabolomique non ciblée pour obtenir des informations sur les processus d'adaptation bactérienne qui peuvent être liés à la virulence, l'antibiorésistance et au statut clinique du patient. Cette étude constitue donc une première étape importante dans l'identification de futurs métabolites qui pourraient être utilisés comme biomarqueurs et cibles métaboliques pour les thérapies de nouvelle génération afin de soutenir le traitement clinique de ces infections difficiles à traiter.

**Bilan :** Ces travaux ont fait l'objet d'1 publication (P32 : [Moyne et al. 2020](#)).

### **6.3.2.7. Rôle des métabolites en général dans l'altération de la réponse immune en situation physio et pathologique.**

Après plus de 10 ans de recherche et d'étude de l'interaction hôte-pathogène, j'ai pu constater à maintes reprises que des métabolites dérivés des microbes comme le tryptophane et ses dérivés, ou encore les polyamines, sont des métabolites d'intérêt dans le dialogue entre les microbes et leur hôte. Avec les étudiants en thèse actuellement au laboratoire, C. Plazy (sous la direction de D. Hannani) et C. Caffaratti (sous ma direction) nous venons de faire une revue exhaustive de toutes les voies connues de dialogue entre bactérie et cellules de d'immunité par le biais de métabolites dans l'intestin ([Caffaratti et al. 2021](#)). L'intestin est l'organe où se concentre la majorité des microbes en interaction avec l'homme et suscite un grand intérêt depuis une vingtaine d'années sur l'étude de ces molécules de dialogue. Le nombre de métabolites présents dans la lumière intestinale est actuellement inconnu et comprend des molécules d'origine alimentaire, de l'hôte et des microbes. Les métabolites dérivés du microbes qui stimulent ou suppriment la réponse immunitaire sont soit des molécules bioactives solubles, soit des composés liés à la membrane. Il est déjà bien connu que les "immunométabolites", tels que le succinate, l'itaconate, l'acétyl-CoA et le 2-hydroxyglutarate, pour n'en citer que quelques-uns, servent de transducteurs de signaux pour réguler la fonction des cellules immunitaires et sont impliqués dans des processus pathologiques. Récemment, le Pr. Si Tahar et ses collègues ont proposé le concept de metabokines pour des métabolites qui jouent un rôle crucial dans l'immunité anti-infectieuse, ayant des propriétés immunorégulatrices et de défenses anti-microbienne<sup>253</sup>. Nous discutons, dans ce travail bibliographique, du rôle des principaux immunométabolites intestinaux actuellement connus, et nous fournissons une brève description de leur classification, de leur fonction et du mécanisme par lequel ils sont impliqués dans leur effet sur les cellules immunitaires (voir la table 4 présente dans les données supplémentaires de l'article).

Metabolite :	Major Effects :	Ref :	
SCFAs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maintain intestinal barrier integrity</li> <li>• Induce of tolerogenic DC</li> <li>• Butyrate promotes regulatory T cells and IL22 production</li> </ul>	254-260	
Lactate	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suppresses the inflammation through the activation of GPR81 on DCs and macrophages</li> <li>• Promotes M2 polarization</li> <li>• Inhibits the activation of IECs</li> <li>• Decreases the proliferation of effector T cells and increases the conversion of naïve T cells to Tregs</li> </ul>	261-264	
Succinate	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activates the SUCNR1 receptor and enhances its synthesis on macrophages</li> <li>• Potent activator of tuft cells and leads to the activation of ILC2s</li> </ul>	265-269	
B Vitamins	Thiamine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Required in lymphocyte survival</li> </ul>	270
	Riboflavin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Decreases TNF-alpha production by macrophages</li> <li>• Enhances ROS production and phagocytic activity of macrophages.</li> <li>• Lessens clinical symptoms and systemic inflammation in patients with Crohn's disease</li> </ul>	271-274
	Niacin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulates ROS production by macrophages and neutrophils</li> <li>• Enhances neutrophils recruitment and activity</li> <li>• Promotes T-helper activation</li> </ul>	275-277
	Pantothenic acid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enhances cytokines production and bacterial clearance in <i>M. tuberculosis</i> infection</li> </ul>	278
	Pyridoxine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polarizes T-helpers towards a Th1 profile</li> </ul>	279-281
	Biotin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Correlates to histological gut inflammation in IBD-mice</li> <li>• Enhances IL-17 and INF-<math>\gamma</math> production in T lymphocytes</li> </ul>	282,283
	Folate	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blood levels correlate to asthma severity and circulating lymphocyte levels in allergic children</li> </ul>	284
	Cyanocobalamin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blood levels correlate to severity of infectious diseases in hospitalized patients</li> </ul>	285,286
Tryptophan-derived indoles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increase the expression of IL10R1 in epithelial cells</li> <li>• Increase the production of IL-22 in IELs</li> <li>• Increase the number of ILC3 producing IL-22</li> </ul>	287-289	
Taurine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increases the number of lymphocytes in Peyer's patches</li> <li>• Activator of the NLRP6 inflammasome and induces the production of AMPs</li> </ul>	290	
<i>p</i> -Cresol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibits the proliferation of CD43+ B-cell progenitor</li> <li>• Increases ROS and Phagocytosis in macrophages</li> <li>• Suppresses IFN-<math>\gamma</math>-producing Th1 cells and favors a Th2 response</li> </ul>	291-293	
Histidine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• It is a cytokine and inflammatory mediator in acute inflammation and hypersensitivity</li> <li>• Promotes Th1 response through H1R while H2R activation induces polarization into regulatory T cells</li> <li>• Diminution of IL-18 production through inhibition of NLRP6 inflammasome assembly</li> </ul>	294-298	
Spermine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduces the expression of pro-inflammatory cytokines produced by monocytes and macrophages</li> </ul>	299,300	
Spermidine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduces monocyte-derived pro-inflammatory cytokines production</li> <li>• Controls the differentiation of naïve T cell to FoxP3+ T cells.</li> </ul>	301,302	
D-amino acids	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metabolized by the epithelium to generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> </ul>	303	

GABA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increases the production of IL-17</li> <li>• Stimulates mucin-1 expression in epithelial cells</li> <li>• Decreases IL-1<math>\beta</math>, increases tight junction and TGF-<math>\beta</math> in epithelial cells</li> </ul>	304-306
QSMs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elicit proinflammatory effects and modulate the activities of gut-associated T lymphocytes, macrophages, DCs, and neutrophils</li> <li>• Induce Mast cells degranulation and release of ROS, TNF-<math>\alpha</math>, and Prostaglandin D2</li> </ul>	307,308
Catecholamines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Act as potential inter-kingdom signaling molecules in the gut</li> <li>• Exert autoregulatory functions on immune cells by means of intracellular oxidative mechanisms</li> </ul>	309,310
CDNs and CTNs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induce either STING or RECON and induces antibacterial activity</li> </ul>	311-313
Inosine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activates the adenosine 2A receptor and drive Th1 differentiation</li> </ul>	314
Secondary Bile acids	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negative regulator of macrophages, DC and NK</li> <li>• Maintain a tolerogenic environment in the liver and in the intestine</li> <li>• Promote generation of colonic ROR<math>\gamma</math>t-expressing FoxP3+ Tregs</li> </ul>	315-319
Sphingolipids	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preserve the integrity of the intestinal barrier</li> <li>• Bacteroides-derived sphingolipids have anti-inflammatory properties</li> <li>• Prevent accumulation of colonic iNKT</li> </ul>	320-322
Lipoteichoic acids	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protecting effect on intestinal mucosa</li> <li>• Immunostimulatory properties through TLR2 on monocytes and macrophages</li> <li>• Involve in the antibacterial immune response</li> </ul>	323-330

**Table 4 :** Tableau récapitulatif des métabolites dérivés du microbiote qui modulent l'immunité de l'hôte dans l'intestin.

**Bilan :** Ces travaux ont fait l'objet d'1 publication (P34 : [Caffaratti et al. 2021](#)).

## Partie 2. Applications médicales

### 6.3.3. BacVac : un vaccin thérapeutique anti-cancer

Comme nous l'avons décrit, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* possède un système de sécrétion de type 3, un complexe macromoléculaire permettant l'injection de ses toxines directement dans le cytoplasme des cellules de l'hôte qu'elle infecte. Au laboratoire, avant mon arrivée au laboratoire, il avait été envisagé de détourner ce SST3 pour faire de l'injection de protéine antigénique afin d'obtenir un vaccin bactérien dénommé « BacVac » capable de stimuler une immunité cellulaire<sup>331,332</sup>. Mon objectif a été de sécuriser l'utilisation de ce pathogène opportuniste, *P. aeruginosa*, pour en faire un bon vecteur bactérien pour l'immunothérapie active et spécifique des cancers mais également et ultérieurement un bon vaccin anti-*Pseudomonas aeruginosa*.

#### 6.3.3.1. Contexte

##### 6.3.3.1.1. Généralités sur les vaccins vivants atténués

Il existe essentiellement trois types de vaccins : les vaccins de **composants isolés**, les vaccins **inactivés** et les vaccins **vivants atténués**. Les vaccins de composants isolés (c'est-à-dire de protéines/peptides purifiés, des polysaccharides, etc.) sont généralement considérés comme les plus sûrs car ils sont utilisés en petites quantités, sont chimiquement bien définis et ne peuvent se propager dans l'environnement ou chez d'autres personnes non vaccinées. Malgré cela, les vaccins de composants isolés peuvent être coûteux à fabriquer et ont une immunogénicité plus faible nécessitant l'utilisation d'adjuvant et de rappels vaccinaux. Les agents infectieux inactivés (c'est-à-dire des bactéries/virus entiers tués par traitement thermique ou chimique), bien que considérés comme sûrs, présentent d'autres inconvénients, tels que des caractéristiques moléculaires mal définies et une faible immunogénicité (une grande quantité de vaccin est nécessaire pour stimuler une réponse immunitaire satisfaisante). Les vaccins inactivés sont relativement faciles à produire et possèdent une activité immunomodulatrice inhérente (par exemple, le composant coquelucheux à cellules entières du vaccin DTP), bien que le type et la variété des réponses immunitaires qu'ils induisent est généralement limitée aux réponses humorales.

En revanche, les vaccins vivants atténués (c'est-à-dire les virus/bactéries vivants qui portent des mutations les rendant avirulents ou dont la virulence est fortement réduite) offrent d'énormes avantages en termes de fabrication et d'immunogénicité. Par exemple, une inoculation unique de vaccin vivant à une dose modeste peut, dans le meilleur des cas, se répliquer jusqu'à une dose immunogène très importante et, au cours de cette réplication, exprimer la plupart des

antigènes observés au cours d'une maladie naturelle. En outre, le traitement et la présentation de ces antigènes sont plus "naturels" et devraient être similaires aux réponses immunitaires des convalescents. Par exemple, les vaccins vivants peuvent induire des réponses immunitaires muqueuses, qui ne sont pas provoquées par les vaccins administrés par voie systémique. Le mode d'administration des vaccins vivants peut également être assez simple (par exemple, par voie orale). Enfin, comme les vaccins vivants sont des organismes vivants, ils peuvent être génétiquement modifiés pour exprimer des antigènes hétérologues, offrant ainsi une protection contre différentes maladies cibles. Mais les vaccins vivants conservent une infectiosité comme en témoigne en ce moment l'utilisation du vaccin oral de la polio. A l'échelle mondiale, il y a d'un côté au moins 300 victimes de la souche vaccinale et de l'autre moins d'une cinquantaine de cas de polio dus au virus sauvage. Il est donc important de sécuriser l'utilisation de ces vaccins vivants.

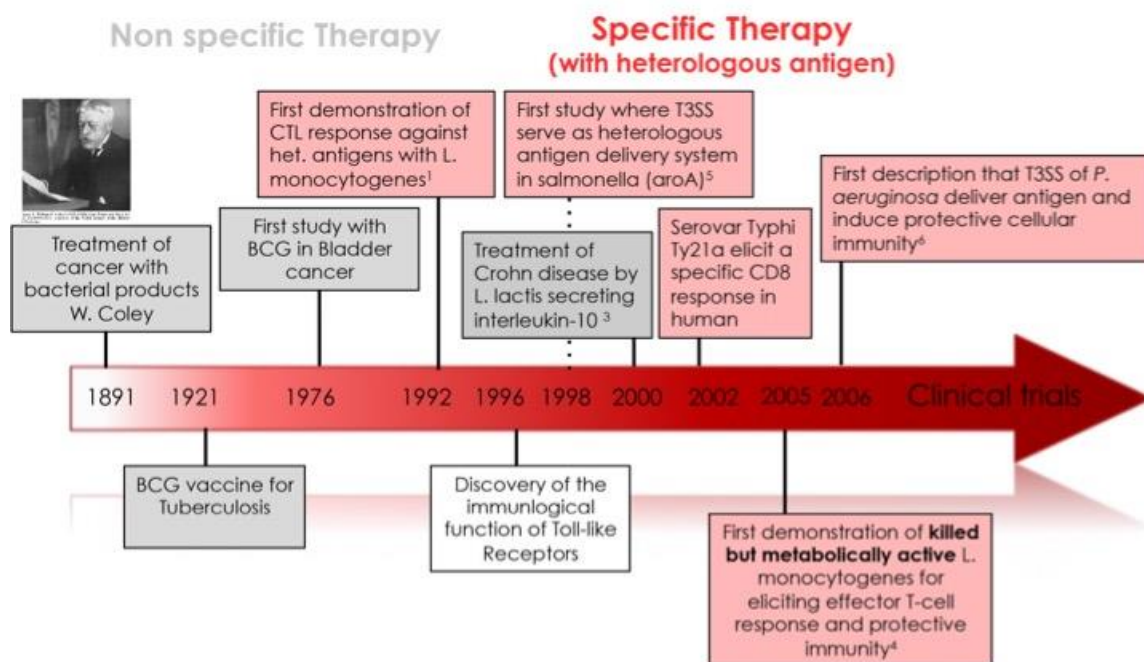


Figure 23 : Histoire de la thérapie bactérienne

L'utilisation de bactéries vivantes atténuées pour lutter contre les maladies infectieuses est, un vieux concept, qui existe depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle, lorsque les français Dr Calmette et Guérin donnent leur nom à la bactérie dont la virulence a été atténuée, en la faisant passer plusieurs fois (230 passages) pendant 13 ans (1909-1921) sur un milieu de culture à base de pomme de terre et de bile de bœuf. Ils vont donner naissance au premier vaccin bactérien vivant atténué, le vaccin BCG, (souche vaccinale *Mycobacterium bovis*, Bacille tuberculeux de la

vache) pour lutter contre le bacille de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*), agent infectieux responsable de la tuberculose. S'en suivra, l'apparition des vaccins anti-fièvre typhoïde (maladie comportant 16-33 millions de cas dans le monde et 500 000 à 600 000 décès par an selon l'OMS) (souche vaccinale *Salmonella typhi* Ty21a), et le vaccin anti-choléra (souche vaccinale *Vibrio Cholerae* CVD 103-HgR) (Table 5).

Vaccine strain	Disease prevented	Development time	Attenuation technique	Manufacturing process	Administration
M. bovis BCG	Tuberculosis	1908-1920	Serial passaging on bile salts	Flask cultures Ampoule filling Lyophilization	Parenteral
S. typhi Ty21a	Typhoid fever	1970s	Chemical mutagenesis	Bioreactor cultures Lyophilization Capsule/sachet filling	Oral
V. cholerae CVD 103-HgR	Cholera	1980s	Site-directed mutagenesis	Bioreactor cultures Lyophilization Sachet filling	Oral

Table 5: Vaccin bactérien vivant atténuée utilisée en clinique d'après référence suivante<sup>333</sup>

Concernant la tuberculose, il s'agit de l'une des 10 premières causes de mortalité dans le monde (3<sup>ème</sup> cause par mortalité infectieuse causé par un seul agent pathogène, récemment dépassé par le SARS-CoV2). En 2015, 10,4 millions de personnes ont contracté cette maladie et 1,8 million de personnes en sont mortes. Par comparaison, après 1 an et 5 mois, la covid-19 a fait 3,8 millions de décès dans le monde. Plus de 95% des décès dus à la tuberculose surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. Six pays totalisent 60% des cas, avec l'Inde en tête, suivie de l'Indonésie, de la Chine, du Nigéria, du Pakistan et de l'Afrique du Sud. En 1921, le premier essai avec le BCG est réalisé chez un enfant tuberculeux par Weill-Halle (Figure 23). En 1948, le vaccin BCG est obligatoire en France. En 1974, lors de la Conférence d'Alma-Ata, l'OMS élargit le programme de vaccination. Plus de 4 milliards de personnes ont été vaccinées dans le monde à ce jour avec 1 complication pour 100.000 vaccinations. L'incidence d'une dissémination mortelle du BCG est comprise entre 0,19 et 1,56 par million de personnes vaccinées et cette dernière s'est presque exclusivement produite chez des personnes présentant une immunité cellulaire gravement altérée vaccinées par erreur. Les problèmes majeurs du vaccin BCG, et des souches vivantes atténuées en générale, est d'une part qu'il présente un risque non nul de provoquer la maladie chez la personne vaccinée (même si c'est un événement rare, par exemple 1 personne sur 500 000 vaccinées pour le vaccin oral polio développe la poliomyélite) et qu'il peut présenter des difficultés de production industrielle et de dérive des souches. Pour lutter contre ces dérives, l'OMS stocke depuis 1956 les souches. Pour produire

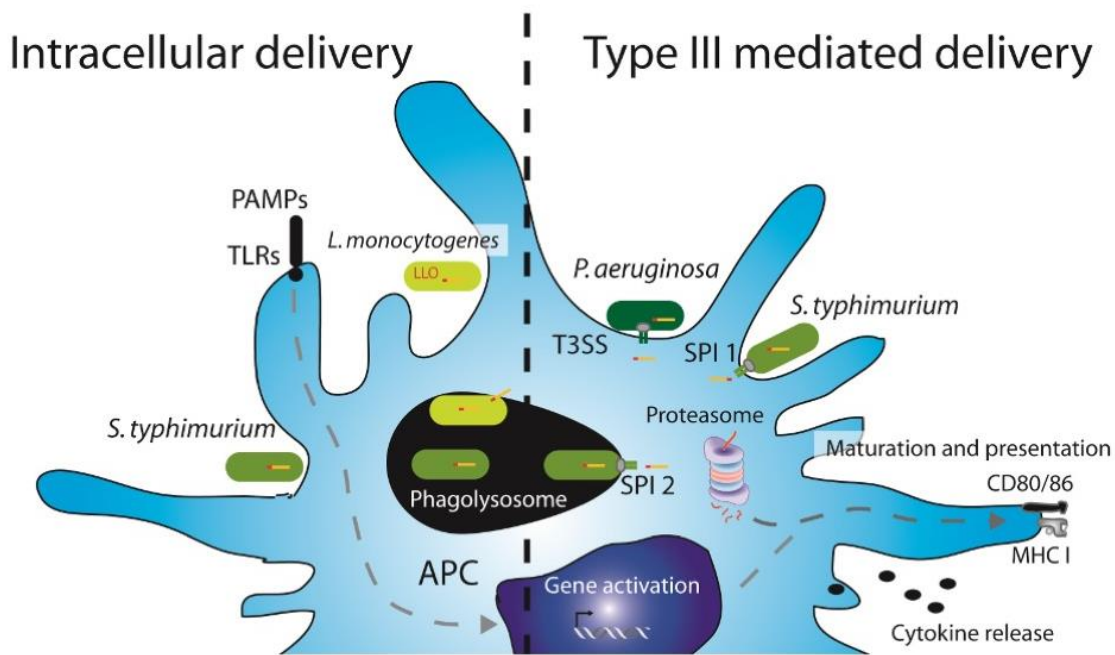
le vaccin il faut 6 à 9 jours de culture à partir de ces stocks congelés, avant filtration, lyophilisation et conditionnement. Le nombre de bacilles cultivables par dose et la composition biochimique du vaccin varient considérablement en fonction de la souche et de la méthode de production du vaccin. Aujourd'hui, on recense un certain nombre de souches vaccinales de BCG, comme la souche française Pasteur 1173 P2, la souche danoise 1331, la souche Glaxo 1077 et la souche Tokyo 172. Ces souches représentent près de 90% des vaccinations dans le monde. Sur le plan de l'efficacité, aucune souche de BCG n'est manifestement meilleure qu'une autre, et il n'y a aucun consensus global concernant la souche optimale pour l'usage général.

Historiquement, l'atténuation des vecteurs vaccinaux bactériens était obtenue, « au petit bonheur la chance », par mutagenèse chimique ou par des passages en série dans des conditions de laboratoire, comme nous venons de le voir pour *Mycobacterium bovis* BCG<sup>334</sup> et comme ça été le cas pour *Salmonella enterica serovar Typhi Ty21a*<sup>335</sup> (Table 5). Dans la deuxième moitié du XXème siècle, l'amélioration des connaissances de la physiopathologie de ces microbes, ainsi que l'avènement d'outils d'ingénierie génétique a permis d'obtenir des souches atténuées de manière rationnelle et « ciblées », avec des délétions des gènes essentiels impliqués dans la régulation de la virulence (par exemple, *phoP* et/ou *phoQ* chez *Salmonella spp.*<sup>336</sup>) ou dans la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques, également appelés mutants auxotrophes (par exemple, *aroA* chez *Salmonella enteric serovar Typhimurium*<sup>337</sup>) (revue sur les bactéries vivantes atténuées et les aspects environnementaux<sup>338</sup>). La plupart des souches atténuées de *Salmonella enterica* utilisées actuellement pour des études expérimentales ou en cliniques sont auxotrophes, c'est à dire qu'elles sont générées via la délétion ou la mutation de gènes essentiels nécessaires à la biosynthèse d'éléments métaboliquement essentiels tels que les acides aminés aromatiques (*aro*), la guanidine (*gua*) ou la purine (*pur*)<sup>339</sup>.

#### 6.3.3.1.2. Les vaccins bactériens vivants atténués en immunothérapie des cancers

En 1890, le chirurgien newyorkais William B. Coley décrivait pour la première fois le bénéfice d'utiliser les bactéries vivantes pour traiter le cancer (Figure 23). Il avait observé que certains patients montraient une régression tumorale suite à une infection bactérienne et avait décidé d'expérimenter l'injection intra-tumorale d'un mélange de bactéries pathogènes mortes Gram positif et Gram négatif. Dès les années 1990, le développement des outils de biologie moléculaire, la compréhension fine du mode de vie des bactéries et le développement de la

biologie de synthèse ont permis de réaliser les mutations génétiques nécessaires à l'élaboration de souches modifiées présentant les caractéristiques requises pour le développement de thérapies ciblées (Figure 23). Par exemple, dans les années 2010, l'ingénierie de souches « adaptées » pour traiter le cancer est en plein essor (Forbes, 2010). La manipulation génétique des souches bactériennes est très simple et permet donc de concevoir de petits « robots » comportant six fonctions importantes : ciblage des tumeurs, production de molécules cytotoxiques, déplacement autonome, réponse à des signaux d'induction, détection de molécules de l'environnement et production de signaux externes détectables. On assiste donc à une nouvelle ère pour ce vieux vecteur qui présente de multiples avantages. En effet, de par la présence des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), elles sont de puissants stimulateurs de l'immunité innée et adaptative. Plusieurs mutations ou stratégies d'atténuation de la virulence des pathogènes sont connues et disponibles (délétion de *phoP/phoQ*, *aroA*, ou encore *purD*). L'expression d'antigènes « hétérologues » d'intérêt (provenant de bactéries, virus, champignons, parasites ou même de l'homme) peut être contrôlée en termes de quantité et de localisation spatio-temporelle. De multiples voies d'injection parentérale ou autres sont envisageables. Enfin, les bactéries sont très bien adaptées pour une production à grande échelle, stables même sans réfrigération (lyophilisation). À l'heure actuelle, de nombreux scientifiques imaginent, construisent et modifient à façon des bactéries comme *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Listeria* et *Pseudomonas spp.* dans le but d'obtenir une thérapie bactérienne la plus parfaite qu'il soit possible d'inventer. Ces bactéries montrent des résultats très prometteurs dans plusieurs pathologies, une des applications les plus mises en avant étant l'utilisation des bactéries dans le cadre d'immunothérapie anti-cancer (voir nos revues [Toussaint et al. 2013](#) et [Wang et al. 2014](#)<sup>340,341</sup>). La délivrance d'antigènes tumoraux en intracellulaire est un pré-requis pour activer des lymphocytes CD8<sup>+</sup> cytotoxique et obtenir une bonne immunité cellulaire. En effet, les cellules présentatrices d'antigènes présentent à leur surface des peptides issus du protéasome via les molécules du CMH-I et peuvent activer des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques exprimant le récepteur T (TCR) spécifique de l'association CMH-I-peptide. Pour cela, les chercheurs ont imaginé différentes voies de délivrance de l'antigène soit par détournement du SST3 et injection directe dans le cytoplasme (*Salmonella spp.* et *Pseudomonas aeruginosa*, soit par libération intracellulaire du contenu phagosomal (listeriolysine de *Listeria monocytogenes*)<sup>342</sup> (Figure 24). *L. monocytogenes* et *S. enterica serovar typhimurium* sont actuellement les vecteurs bactériens les plus avancés dans ce domaine et font l'objet de plusieurs études cliniques<sup>343</sup>.



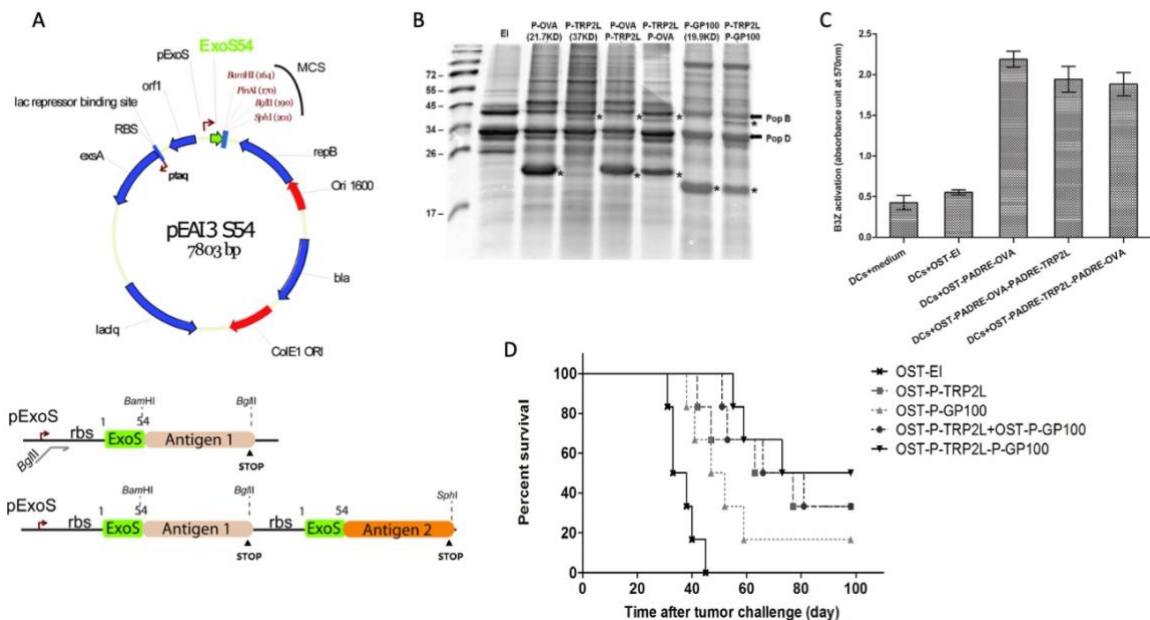
**Figure 24** : Mode de délivrance de l'antigène pour obtenir une immunité cellulaire. *Listeria monocytogenes* est un pathogène intracellulaire. La protéine de fusion entre la listeriolysine (LLO) et la protéine d'intérêt permet de sortir du phagolysosome et d'être libérée dans le cytoplasme des cellules. *Salmonella typhimurium* est également un pathogène qui peut délivrer par son système de sécrétion porté par Spi2 depuis le phagolysosome à l'intérieur des cellules. Mais elle peut aussi injecter depuis l'extérieur des cellules par son SST3 (sur Spi1) des protéines d'intérêt dans le cytoplasme de la cellule. Tout comme *P. aeruginosa*. Les protéines d'intérêt vont être prises en charge par le protéasome et présentées par les molécules du CMHI au lymphocyte CD8<sup>+</sup>. La présence de motifs moléculaires associés au pathogène (PAMPs) permet l'activation et l'expression des molécules de co-stimulation CD80/86 nécessaire à l'activation et à la stimulation de la réponse CD8<sup>+</sup> cytotoxique.

### 6.3.3.2. Présentation de mes travaux

#### 6.3.3.2.1. Atténuation par Auxotrophie et adaptation en milieu chimiquement défini

A mon arrivée, nous avons amélioré les performances du vecteur bactérien BacVac par plusieurs approches dans différents modèles murins de cancer<sup>344</sup>. Yan Wang, doctorante de l'équipe, a d'abord optimisé le schéma de vaccination en modulant la fréquence et l'intervalle des injections, et a ainsi pu renforcer la réponse immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques et l'efficacité thérapeutique *in vivo* ([Wang et al. 2012](#)). J'ai contribué à la construction du plasmide permettant l'expression de plusieurs antigènes (Figure 25A). Chaque antigène est cloné indépendamment dans le pEAI3S54 (GenBank accession number JQ733380) grâce au site de restriction *Bam*HI et *Bgl*III. Ainsi, ces constructions servent à créer la fusion entre les 54 premiers acides aminés d'ExoS (nécessaire à la sécrétion) et l'antigène, mais également servent de contrôle de l'efficacité thérapeutique de l'antigène seul. Une étape de PCR permet ensuite de récupérer la séquence hybride comprenant le site de liaison du ribosome (RBS), *exo*S54 et l'antigène 2 (c'est-à-dire qui sera placé en

deuxième position). Les oligos utilisés pour la PCR sont d'une part, un oligo universel nommé *BglIII-Antigène2-F* et un oligo spécifique de l'antigène 2 (antigène 2 Cter-R). Ce produit PCR est cloné par restriction dans le plasmide pEAI3S54-Antigène 1 grâce aux sites de restriction *BglIII* et *SphI*. Nous avons démontré la faisabilité de production et sécrétion des 2 antigènes Trp2L et GP100 (Figure 25B) et validé la délivrance la translocation de l'antigène quelque soit sa position dans un modèle B3Z (Figure 25C). Par rapport à un vecteur à antigène unique, le vecteur à deux antigènes a démontré plusieurs avantages, notamment une meilleure efficacité de rejet de la tumeur, une simplicité d'utilisation et une sécurité accrue (Figure 25D). Au laboratoire, nous avons également montré (et j'ai participé à sa mise en œuvre) qu'on peut utiliser ce système BacVac pour faire du criblage de séquence protéique optimale pour obtenir une réponse immune cellulaire spécifique (Derouazi *et al.* 2010).



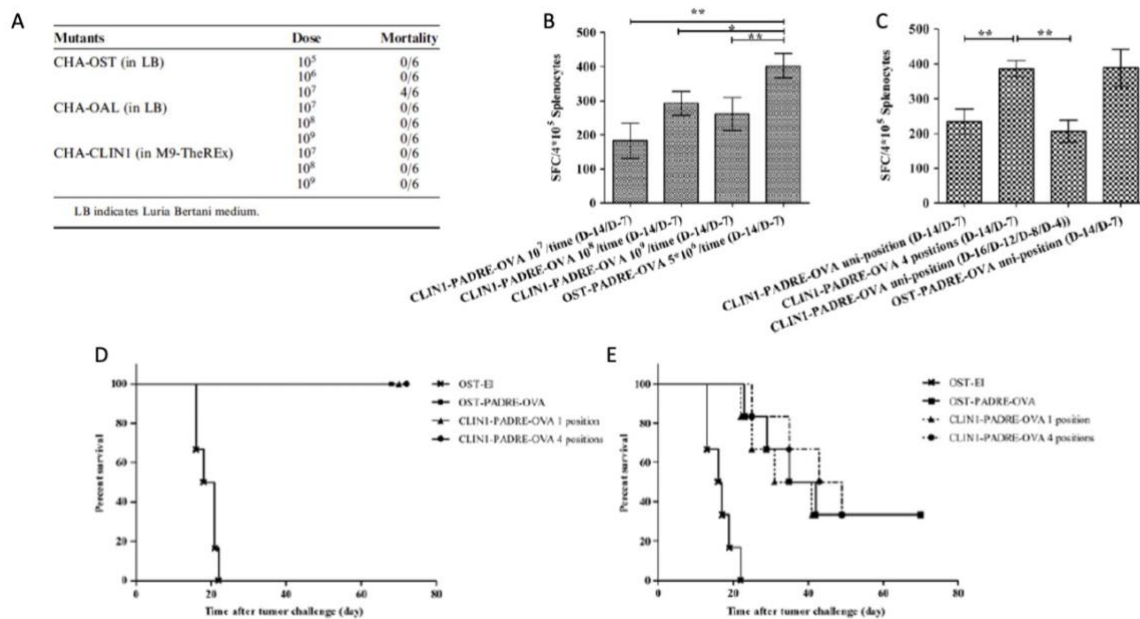
**Figure 25 : Construction et validation du vecteur d'expression « bi-antigénique ».** A. Carte du vecteur bi-antigénique. Le vecteur a été construit à partir du vecteur d'expression d'un seul antigène (pEAI3 S54 GenBank accession number JQ733380) dans lequel le premier antigène a été cloné sur les sites *BamHI/BglIII*, la seconde cassette d'expression de la protéine de fusion S54-PADRE-antigène contenant le site RBS, la protéine de fusion et le codon STOP a été ajoutée au plasmide d'expression d'un seul antigène sur les sites *BglIII/SphI* situés en aval du premier antigène. Ori1600 : origine de répllication pour *P. aeruginosa*. *lacI* code le répresseur du *ptaq*, promoteur inducible à l'IPTG permettant l'expression de gène *exsA*, activateur de l'expression du pExoS. ExoS54 est la séquence suffisante et nécessaire pour la sécrétion de l'antigène cloné en fusion au site multiple de clonage (MCS). B. Test de sécrétion des antigènes Trp2L et GP100. Contrôle le vecteur vide et les vecteur mono antigénique (Ova, Trp2L, et Gp100 avec une taille attendue théorique 21,7kDa, 37kDa, et 19,9 kDa, respectivement). C. L'activation de B3Z a été évaluée par un test enzymatique à la  $\beta$ -galactosidase (absorbance à 570 nm). Les vecteurs vaccinaux bi-antigènes contenant la protéine de fusion S54-PADRE-OVA à différentes positions dans le plasmide d'expression bi-antigénique (OST-PADRE-OVA-PADRE-TRP2L et OST-PADRE-TRP2L-PADRE-OVA) ont délivré le fragment d'ovalbumine par T3SS et ont été comparés à trois vecteurs témoins : OST-EI (contrôle négatif) et deux vecteurs à antigène unique (OST-PADRE-OVA et OST-PADRE-TRP2L). Les données représentent la moyenne +/- l'écart-type de six animaux par groupe en triplicata (résultats cumulés de deux expériences indépendantes menées avec la même méthodologie). D. Efficacité de protection in vivo lors d'un challenge tumoral dans un modèle murin de gliome (lignée GL261). Les souris ont reçu une injection s.c. de différentes souches de CHA-OST comportant les différents vecteurs, 14 jours et 7 jours avant xénogreffe des cellules tumorales GL261. Les courbes de Kaplan-Meier présentent les données de survie de groupes de 6 souris. Analyse statistique :  $p < 0.01$  pour les groupes immunisés *versus* EI ;  $p = 0.044$  pour PADRE-TRP2L-PADRE-GP100 *versus* PADRE-GP100 ;  $p = 0.63$  pour PADRE-TRP2L-PADRE-GP100 *versus* PADRE-TRP2L ; et  $p = 0.51$  pour PADRE-TRP2L-PADRE-GP100 *versus* souches combinées.

Par ailleurs, les chercheurs du laboratoire avaient créé la souche vaccinale atténuée auxotrophe, dénommée CHA OAL (délétée d'*aroA* et de *lasI*)<sup>332</sup>. J'ai optimisé la composition du milieu de culture de la souche CHA-OAL et adapté génétiquement cette souche par des passages successifs dans ce milieu pour obtenir la souche CLIN1 (archivée et stockée à Pasteur et j'ai déposé un brevet international n° WO 2013/087667) afin qu'on puisse envisager une utilisation en clinique et être conforme aux bons procédés de fabrication des médicaments de thérapie innovante. Le milieu de culture est un milieu M9 modifié (M9-TheREx) dont la composition apparaît dans la table 6. Le milieu M9 est un milieu chimiquement défini simple bien connu mais qui n'était pas suffisant pour permettre une croissance optimale de la souche OAL. Des études précédentes avaient démontré l'intérêt d'ajouter du Mg<sup>2+</sup> et du Ca<sup>2+</sup> pour aider à la croissance et à la production de protéines recombinantes chez *P. aeruginosa*<sup>345</sup>. Après plusieurs passages dans ce milieu M9 modifié, nous avons réussi à obtenir CLIN1, la souche vaccinale atténuée, qui a un temps de doublement stabilisé et supérieur à la souche originale OAL dans le LB (43min vs 88 min dans le LB).

Extract of synthetic yeast	4 g/L
Tryptophan	1 mmol/L (0.2 g/L)
Glucose	14 mmol/L (2.5 g/L)
Glycerol	1%
FeSO <sub>4</sub>	0.4 g/L
Citric acid	2 mmol/L (0.36 g/L)
M9 salts medium 5 × (Sigma) approximate composition per liter	
Na <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> anhydre	33.9 g
KPO <sub>3</sub>	15.0 g
NaCl	2.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	5.0 g
MgSO <sub>4</sub>	1 mmol/L (50 mg/L)
CaSO <sub>4</sub>	1 mmol/L (50 mg/L)
H <sub>2</sub> O	qsp 1 L

**Table 6 :** Composition du milieu de culture M9 modifiée pour une croissance optimale de la souche CLIN1.

La virulence de cette souche a été appréciée en mesurant le taux de mortalité des souris après injection sous cutané (*s.c.*) de 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> bactéries chez des souris C57BL/6j. La souche CLIN1 ayant été cultivé dans le milieu M9-TheRex, tout comme OAL, a une virulence réduite voire inexistante aux doses injectées chez son hôte contrairement à la souche CHA-OST (délétée des exotoxines ExoS et ExoT) (Figure 26A). En revanche, l'absence de dissémination ou de multiplication chez l'hôte qui apporte une grande sécurité d'utilisation entraîne une diminution de l'efficacité de stimulation de l'immunité cellulaire.



**Figure 26 :** Évaluation de la virulence, de l'efficacité de stimulation de l'immunité cellulaire et de l'efficacité vaccinale de la souche CLIN1 dans un modèle tumoral de mélanome B16-OVA. **A.** Taux de mortalité après injection *s.c* de  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  bactéries chez des souris C57BL/6j femelles de 6 semaines. **B.** Les souris ont été vaccinées par voie *s.c* par la souche CLIN1 pEAI3S54 PADRE OVA avec  $10^7$ ,  $10^8$ , et  $10^9$  bactéries et par la souche OST PADRE OVA à  $5.10^6$  bactéries à J-14 et à J-7. Les rates ont été prélevées à J0 et un ELISpot INF- $\gamma$  a été réalisé. Le nombre de splénocytes INF- $\gamma$  positif (ou SCF) pour  $4.10^6$  cellules a été mesuré. **C.** ELISpot après vaccination avec CLIN1 pEAI3S54-PADRE-OVA soit en *s.c* en une seule position ou en 4 positions ou après 4 vaccinations à J-16, J-12, J-8 et J-4 en comparaison à la souche OST pEAI3S54-PADRE OVA classiquement utilisé dans l'équipe (vaccination à  $5.10^6$  à J-14 et J-7). **D.** Challenge tumoral prophylactique à J0. Vaccination à J-14 et J-7 avec les souches OST Ei (contrôle négatif), OST pEAI3S54 PADRE OVA(contrôle positif), CLIN1 pEAI3S54 PADRE OVA 1 ou 4 positions. **E.** Challenge tumoral thérapeutique à J0. Vaccination à J+1, J+5, J+9, J+13, J+17 et J+21 avec les souches OST Ei (contrôle négatif), OST pEAI3S54 PADRE OVA(contrôle positif), CLIN1 pEAI3S54 PADRE OVA 1 ou 4 positions. Courbe de survie Kaplan Meier des groupes de 6 souris.  $P < 0.01$  pour les groupes immunisés avec OVA versus Ei ; pas de différences significatives entre les groupes.

Nous avons transformé la souche CLIN1 avec le plasmide pEAI3S54 PADRE-OVA, permettant l'injection de l'ovalbumine dans les cellules de l'hôte vacciné. Après vaccination à J-14 et J-7 avec différentes doses ( $10^7$ ,  $10^8$  ou  $10^9$  bactéries) en *s.c.*, nous avons récupérés les cellules de la rate et réalisé un ELISPOT, c'est à dire brièvement, restimulé les splénocytes avec le peptide OVA (SIINFEKL) et mesuré le nombre de cellules positives produisant de l'INF- $\gamma$ . Ceci permettant d'obtenir le nombre de cellules formant des spots pour  $4.10^6$  cellules (SFC/ $4.10^6$  cellules). La vaccination avec la souche CLIN1 quelque soit la dose est moins efficace en termes de nombre de SFC/ $4.10^6$  splénocytes que la souche OST (Figure 26B). Le manque d'efficacité de cette nouvelle souche a pu être surmontée par des vaccinations à plusieurs loci (4 sites d'injection en *s.c.*), ce qui a permis d'améliorer efficacement les performances de la stimulation de la réponse immunitaire cellulaire (Figure 26C). En termes d'évaluation de l'efficacité de cette nouvelle souche vaccinale atténuée, nous avons utilisé un modèle de challenge tumoral (mélanome B16-OVA) prophylactique (vaccination J-14 et J-7

avant challenge avec la lignée cellulaire B16-OVA) et thérapeutique (implantation des cellules tumorales en *s.c* à J0 puis vaccination à J+1, J+5, J+9, J+13, J+17 et J+21). Le suivi de la taille des tumeurs a été réalisé jusqu'à euthanasie des animaux (si taille >100mm<sup>3</sup>). La vaccination avec la souche atténuée CLIN1 selon le schéma optimisé donne d'aussi bons résultats que la souche OST dans le modèle tumoral B16-OVA prophylactique et thérapeutique (Figure 26D et E).

**Bilan :** Ces travaux ont fait l'objet de 3 publications (P6 : [Derouazi et al. 2010](#) et P8 : [Wang et al. 2012](#) et P13 : [Wang et al. 2014](#)).

#### 6.3.3.2.2. Bactérie « Morte mais Métaboliquement Active » ou MMA

Fort de mes compétences et de mes connaissances sur la division de *S. pneumoniae*, nous avons décidé d'utiliser une nouvelle méthode d'atténuation de la souche BacVac afin de consolider encore la sécurité d'utilisation de la souche vaccinale surtout en tant que vecteur vaccinal chez des personnes fragiles atteintes de cancers. Le principe repose sur l'utilisation d'un traitement photochimique à base d'un psoralen (amotosalem), intercalant de l'ADN, qui après exposition aux UVA, fait des ponts irréversibles dans l'ADN et bloque ainsi la décaténation des chromosomes bactériens dans les deux cellules filles. La cellule est bloquée dans sa division, incapable de se répliquer. En revanche, si le traitement n'entraîne pas la formation d'un trop grand nombre de pont, la transcription et la traduction des protéines sont maintenues. La bactérie, obtenue après traitement photochimique, est « Morte mais Métaboliquement Active » (MMA), conserve donc ses propriétés intrinsèques d'expression et de bonne conformation de ces protéines à sa surface, tout en étant d'un niveau de sécurité d'utilisation proche d'une souche inactivée. Nous avons démontré que la bactérie *P. aeruginosa* MMA a le potentiel de délivrer des antigènes aux cellules présentatrices d'antigènes humaines *in vitro* via le SST3 avec une cytotoxicité considérablement atténuée par rapport à la bactérie non traitée ([Le Gouellec et al. 2013](#)). Comme cela avait été démontré auparavant chez *L. monocytogenes*<sup>346</sup>, la délétion des gènes *uvrA* et *uvrB*, codant pour les sous unités A et B de l'Exonucléotidase, rend la souche sensible au traitement photochimique induit à l'amotosalem. Nous avons donc invalidé ces 2 gènes par échange allélique chez *P. aeruginosa*, mis au point le traitement photochimique (ajusté l'exposition aux UVA à une dose 7,2 J/cm<sup>2</sup> et la concentration d'amotosalem à 10 µM) pour la souche OSTAB (OSTΔ*uvrAB*). À 10 µM d'amotosalem, la répllication de la souche est pratiquement nulle (1 bactérie répllicative pour 125 millions de bactéries) mais la sécrétion

d'OVA est encore visible par western blot lors d'un test de sécrétion. Nous avons utilisé comme contrôle d'absence de lyse par le traitement photochimique, une souche OSTAB transformée par un plasmide pEAI S0-OVA exprimant une forme non sécrétable d'OVA mais exprimée à une concentration comparable. On ne retrouve pas d'OVA dans le surnageant de culture *in vitro* (en présence d'IPTG et d'EGTA pour activer la sécrétion) chez la souche S0-OVA après traitement, démontrant l'absence de lyse (Figure 27A). Nous avons également confirmé que la souche MMA est bien capable d'injecter la protéine S54-Bla (fusion traductionnelle de la  $\beta$ -lactamase avec les 54 premiers acides aminés d'ExoS) directement dans des cellules HL60. Ces cellules sont incubées avec le substrat CCF2-AM (Invitrogen) qui colore les cellules en vert. Quand la protéine Bla est présente dans le cytoplasme de la cellule, elle clive ce substrat et les cellules deviennent bleues. Nous avons pu observer la présence de cellules bleues de manière comparable entre MMA pEi3S54 S54Bla à la souche OSTAB pEi3S54 Bla non traitée (Figure 27B). Tous les contrôles attestent de la validité de ce résultat, notamment grâce à l'utilisation du mutant  $\Delta popBD$ , démontrant que l'injection de S54-Bla passe bien par le SST3.

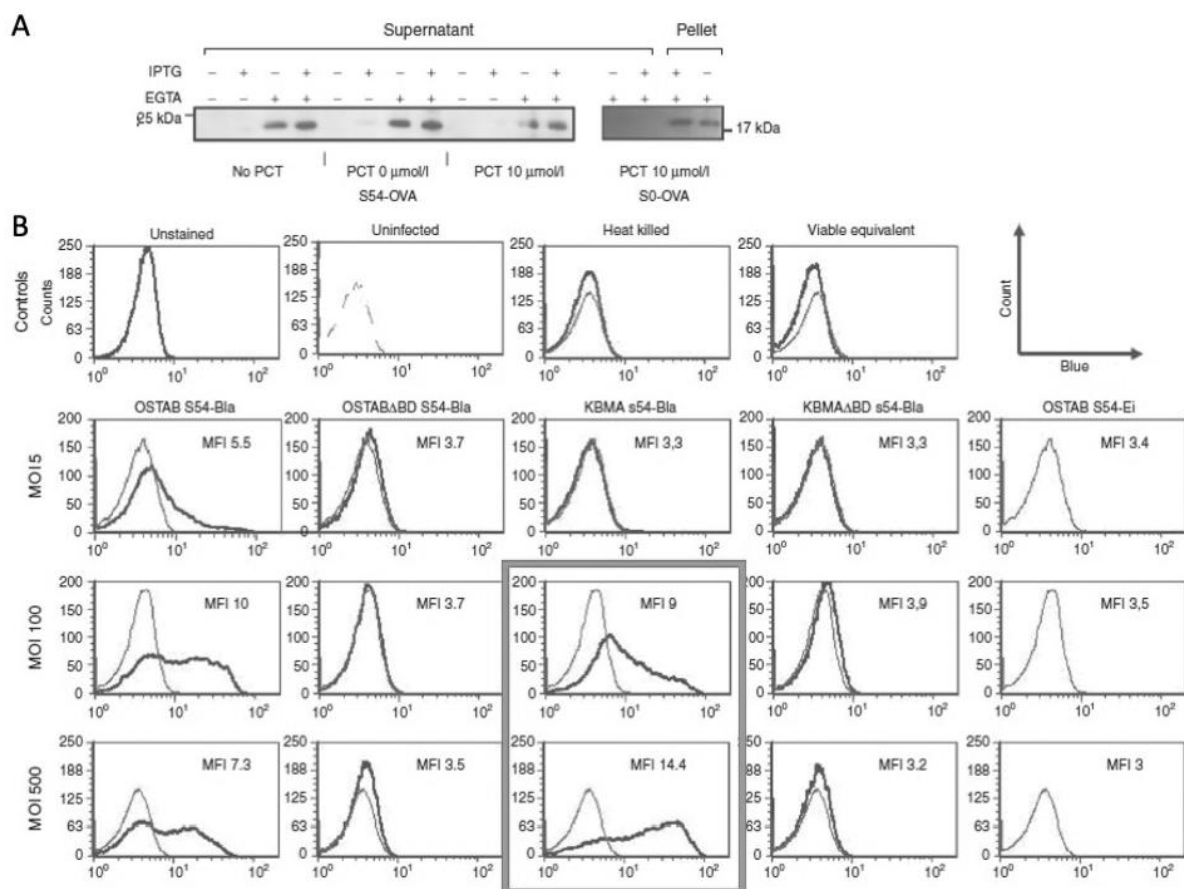
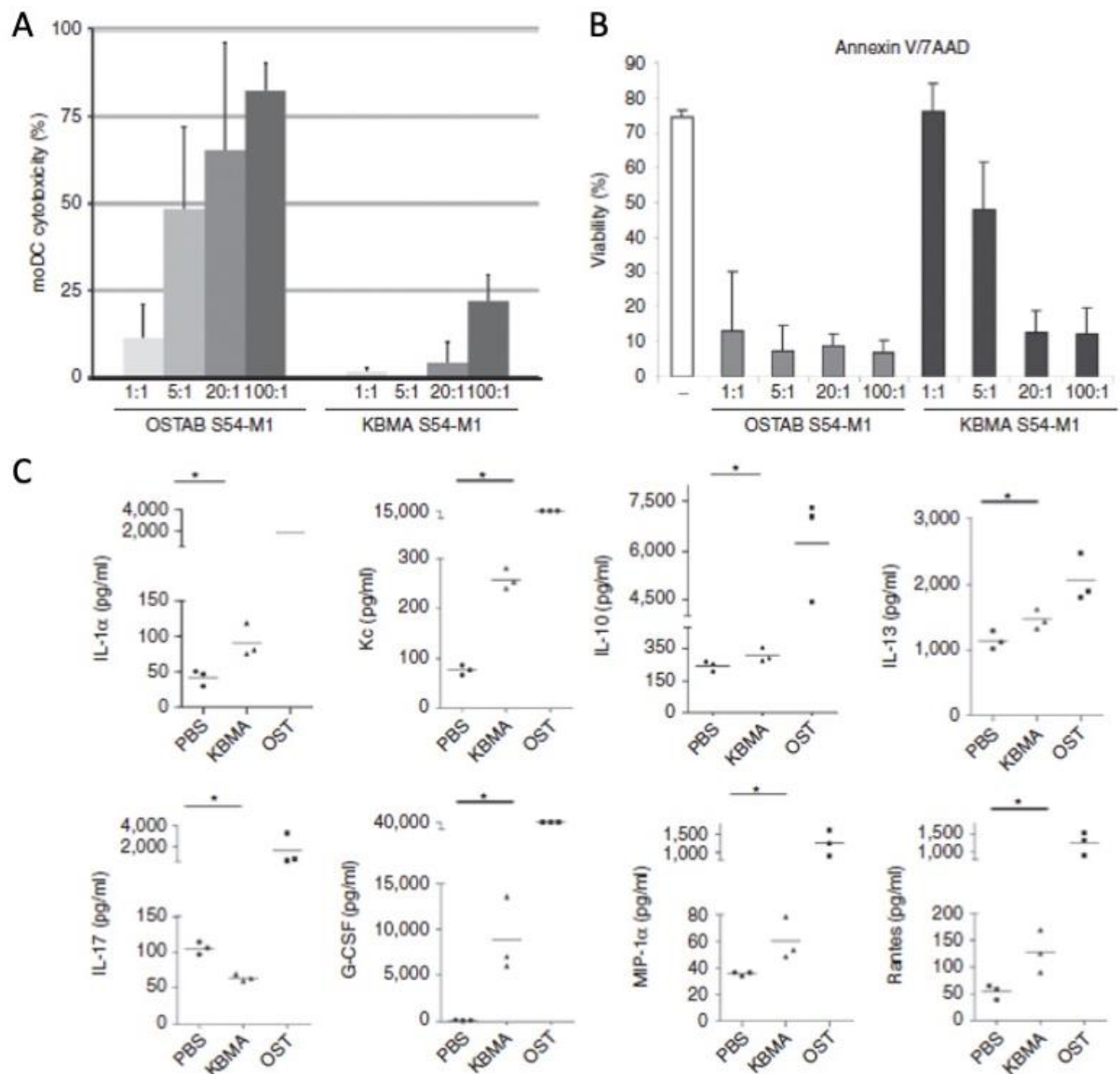


Figure 27 : La souche de *P. aeruginosa* Morte mais Métaboliquement Active MMA (Killed but metabolically active ou KBMA) produit, secrète et injecte l'antigène Bla dans les cellules HL60.

Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules présentatrices d'antigènes dite professionnelles. Elles jouent un rôle crucial dans l'initiation et la modulation des réponses immunitaires spécifiques. De plus, ces cellules sont particulièrement sensibles à *P. aeruginosa*<sup>347</sup>. Nous avons donc examiné la cytotoxicité de *P. aeruginosa* MMA sur les CD. En utilisant des CD dérivées de monocytes humains (moDCs), nous avons observé que la présence de la souche OSTAB entraîne la mort des moDCs de façon concentration-dépendante après 3 heures d'incubation. La souche MMA est moins cytotoxique que la souche vivante, entraînant la mort de seulement 17% des cellules à la MOI la plus élevée (100:1) (Figure 28A). En outre, en utilisant la cytométrie de flux et le marquage Annexin V / 7AAD, nous avons observé que la souche OSTAB induit 90 % de la mort des moDC (Annexin V+ et/ou 7AAD+) 24 heures après l'infection à toutes les MOI étudiées (Figure 28B). La bactérie MMA est moins toxique que les bactéries vivantes à des MOI inférieures à 5 : 1, mais conserve une cytotoxicité résiduelle à des MOI supérieures à 20:1 (Figure 28).

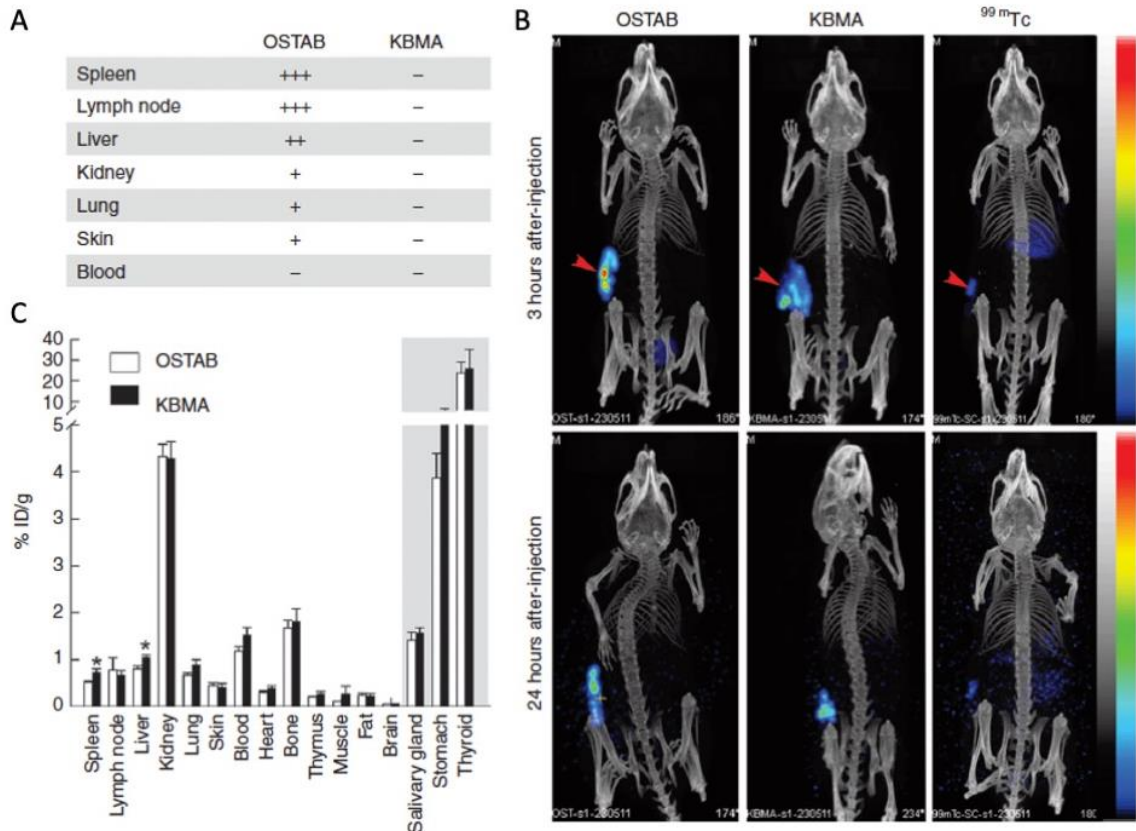
Un test immunologique multiplex de dosage des cytokines et des chémokines a été utilisé pour mesurer l'effet pro-inflammatoire du vaccin MMA *P. aeruginosa*. La technologie xMAP multiplex a été réalisée sur des plasma de souris vaccinées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), OSTAB S54-OVA et MMA S54-OVA ( $5.10^7$  bactéries). Parmi les molécules analysées, les taux d'IL-1 $\alpha$ , de Kc (analogue de l'IL-8 chez la souris), d'IL-13, de G-CSF, de MIP-1 $\alpha$  et de RANTES étaient significativement plus élevés ( $p = 0,00495$ ) chez les souris vaccinées par MMA que chez les animaux contrôles (PBS) (Figure 28C). À cette dose, toutes les cytokines et chémokines analysées étaient significativement plus élevées dans les souris du groupe vaccin OSTAB S54-OVA comparé à ceux avec PBS ( $p < 0,005$ ) et dans les groupe vaccin OSTAB S54-OVA comparé à ceux avec MMA S54-OVA (Figure 28C). Il est intéressant de noter que les taux d'IL-17 étaient significativement plus faibles chez les souris vaccinées par MMA que chez les souris vaccinées par du PBS ( $p = 0,00495$ ). Sur la base des réponses systémiques induites décrites, ces expériences démontrent que les bactéries atténuées avec le traitement photochimique (MMA S54-OVA) sont moins toxiques et moins immunogènes *in vivo* que la souche OSTAB S54-OVA.



**Figure 28** : *P. aeruginosa* MMA est faiblement cytotoxique et entraîne une moindre réponse inflammatoire *in vivo* que la bactérie OSTAB. **A.** La cytotoxicité de *P. aeruginosa* MMA a été évaluée par mesure la quantité de lactate deshydrogénase libérée par des cellules moDCs mortes après 3 heures d'infection avec différentes MOI (1:1 ; 5:1 ; 20:1 ; 100:1) (Moyenne et écart type de 5 expériences). **B.** La viabilité a été analysée par le test de cytométrie de flux et marquage des cellules moDC au 7AAD / Annexine V, 24 heures après l'infection avec divers MOI (Ecart type de trois donneurs différents). Le symbole "-" représente les cellules non traitées. **C.** Un immunodosage en multiplex a été utilisé pour déterminer les niveaux d'expression de 23 cytokines différentes dans des échantillons de plasma de souris obtenus 24 heures après la vaccination (n = 3) avec MMA S54-OVA (triangles) ou OSTAB S54-OVA (carrés) ( $5.10^7$  bactéries *s.c.*) par rapport au contrôle avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (cercles). « Seules les cytokines qui étaient significativement différentes du contrôle (\*P < 0,05) sont indiquées chez les souris vaccinées avec la souche MMA. La barre représente la moyenne des données. KBMA<sup>4</sup>, "Killed but metabolically active ou morte mais métaboliquement active »; MFI, intensité de fluorescence moyenne ; MOI, multiplicité d'infection.

<sup>4</sup> KBMA : en anglais Killed but metabolically Active est identique à MMA en français Morte mais Métaboliquement Active.

Lors de l'atténuation par auxotrophie, on a vu que la plus faible dissémination de la souche vaccinale pouvait atténuer l'efficacité de stimulation de la réponse immune cellulaire. Nous avons souhaité connaître le devenir du vaccin MMA une fois injecté en *s.c* chez l'animal. Nous avons démontré que la souche MMA, marquée au Technétium ( $^{99m}\text{Tc}$ ), qui ne peut se répliquer dans son hôte (Figure 29A), se dissémine efficacement dans les organes lymphoïdes, comme la rate et les ganglions lymphatiques, lieux où l'injection de l'antigène dans les CD est important pour obtenir une bonne immunisation (Figure 29B et C).

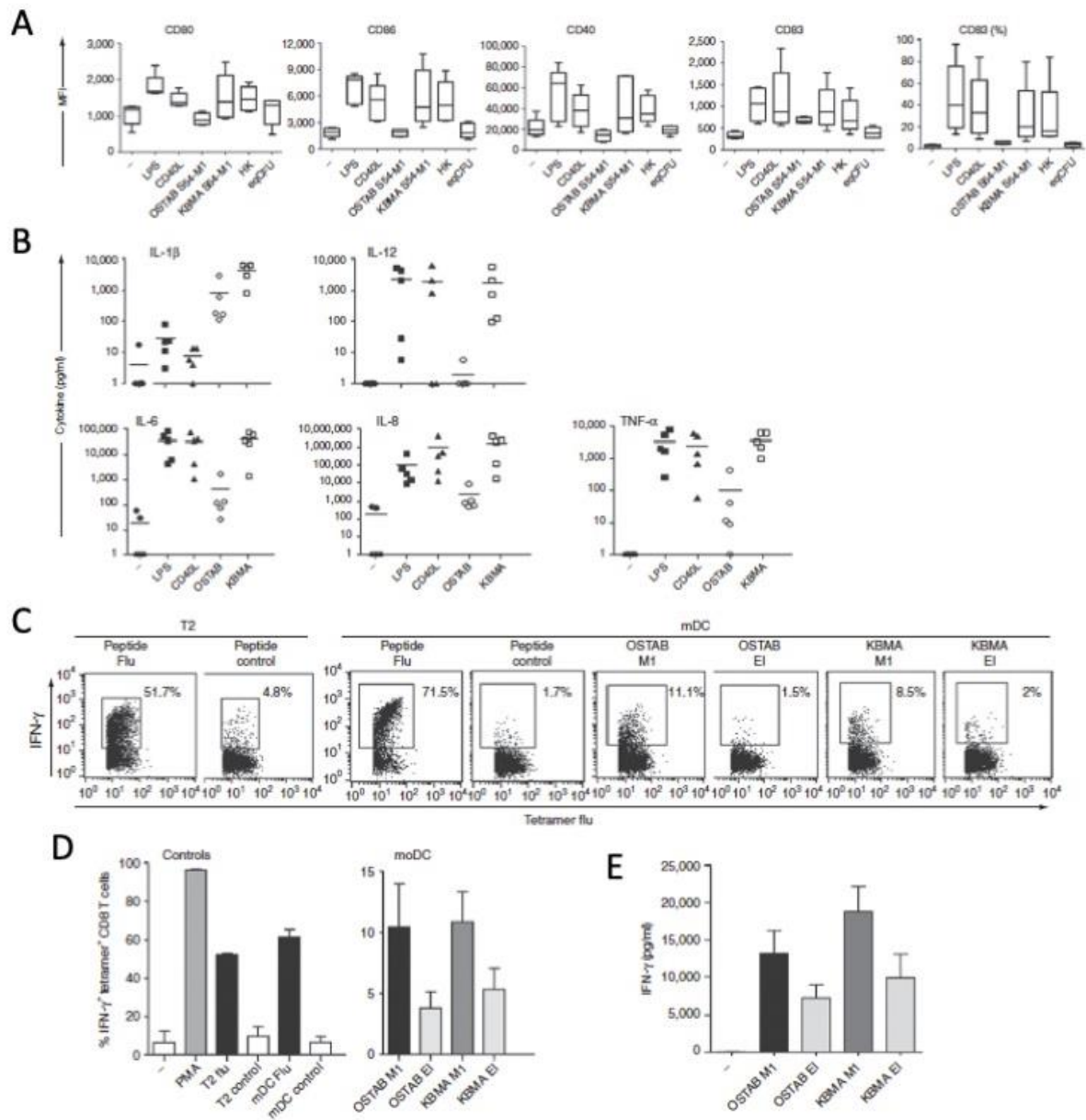


**Figure 29 :** Dissémination de la souche MMA vaccinale *in vivo*. **A.** L'effet du traitement photochimique sur le nombre d'unités formant des colonies 24 heures après l'injection sous-cutanée (*s.c.*) de  $5.10^7$  bactéries. (-) Absence de CFU/ml, (+)  $\sim 10^1$  CFU/ml, (++)  $\sim 10^2$  CFU/ml, (+++)  $> 5.10^2$  CFU/ml. (n = 3 par groupe) **B.** Images SPECT/CT représentatives de  $5.10^7$  bactéries radiomarquées au  $^{99m}\text{Tc}$ , 3 heures et 24 heures après injection *s.c.* dans le flanc (tête de flèche rouge). Le  $^{99m}\text{Tc}$  libre est montré comme contrôle. **C.** Comparaison des quantités de radioactivité/g de tissus correspondant à la quantité de bactéries OSTAB et MMA marquées au  $^{99m}\text{Tc}$  récupérées dans différents organes 24 heures après l'injection *s.c.* (n = 6 souris par groupe). ID, dose injectée ; KBMA, "Killed but Metabolically active".

Le processus de maturation des CD coordonne la régulation de l'apprêtement et de la présentation des antigènes, l'expression des molécules co-stimulatrices et la sécrétion de cytokines qui amorcent les réponses des cellules lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  et  $\text{CD4}^+$ . Nous avons évalué si la maturation des CD se produisait lorsque les cellules étaient exposées à la souche de *P. aeruginosa* MMA délivrant l'antigène M1 de la grippe. Les moDC immatures ont été

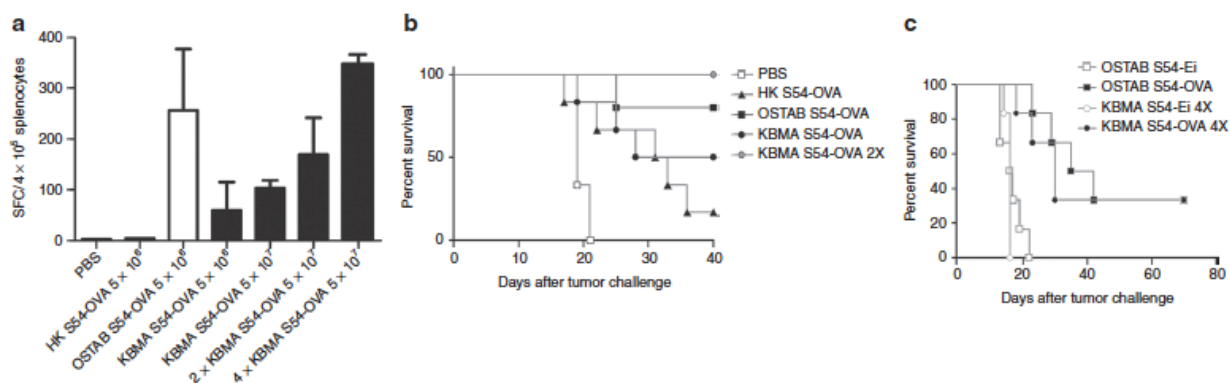
incubées pendant 3 heures avec l'une des trois souches : vivante (MOI 5:1), MMA (MOI 100:1) ou dénaturée à la chaleur (Heat killed ou HK) (MOI 100:1). Les caractéristiques fonctionnelles ont été évaluées 24 heures plus tard. L'analyse phénotypique a révélé que la stimulation avec les souches MMA S54-M1 et HK S54-M1 a entraîné une augmentation des niveaux d'expression des molécules co-stimulatrices (CD80, CD86, CD40) et des molécules associées à la maturation (CD83) (Figure 30A) avec des niveaux comparables aux contrôles (lipopolysaccharide et CD40L). Nous n'avons pas observé de régulation positive de CD80, CD86, CD40 et CD83 avec la souche vivante (OSTAB S54-M1) ou encore avec l'équivalent du nombre de bactéries vivantes présentes au sein de la souche MMA (eqCFU), probablement dû à un effet de cytotoxicité au stade précoce de l'injection. Nous avons analysé la sécrétion de cytokines par les moDC. La souche MMA *P. aeruginosa* et les contrôles positifs (lipopolysaccharide et CD40L) ont induit la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, et IL-12 à des niveaux comparables. La souche vaccinale MMA a induit des niveaux de sécrétion de cytokines plus élevés que la souche OSTAB (Figure 30B). Elle a induit des niveaux plus élevés d'IL-1 $\beta$  que le contrôle positif ou la souche OSTAB. Comme l'ont montré précédemment Epaulard *et al.*<sup>331</sup>, la protéine recombinante injectée via le SST3 de *P. aeruginosa* est efficacement prise en charge par la voie du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI). Ici, nous avons utilisé des cellules d'hybridome T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'OVA (nommé B3Z)<sup>348</sup> pour déterminer la capacité des DC primaires dérivées de la moelle osseuse (BMDC) des souris C57BL/6J infectées par *P. aeruginosa* MMA S54-OVA, à présenter l'épitope OVA via leur CMHI (en l'occurrence le peptide SIINFEKL) à l'hybridome T CD8<sup>+</sup> spécifique ou B3Z. Nous avons incubé les BMDC pendant 3 heures avec chaque souche (vivante ou MMA). La souche MMA S54-OVA incubée avec les BMDCs induit l'activation de B3Z. En revanche, nous n'avons observé aucune activation avec des BMDC infectés par la souche HK OSTAB S54-OVA et des bactéries vivantes équivalentes, c'est-à-dire 10 bactéries par ml. Par conséquent, le signal obtenu pour la souche MMA S54-OVA ne pouvait pas être dû à cet équivalent viable. Dans des expériences complémentaires, nous avons évalué la présentation d'un antigène de la grippe (M1) par des moCDs humains (actuellement utilisés pour l'immunothérapie cellulaire<sup>349,350</sup>) à des lymphocytes T spécifiques de patients connu pour avoir des niveaux de T spécifiques anti-grippe (T2 Flu). Des CD infectés par OSTAB S54-M1 ou MMA S54-M1 ont été utilisés pour activer les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la grippe M1<sub>58-66</sub> HLA-A\*0201. L'activation a été évaluée en mesurant la production d'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) par marquage des cellules T CD8<sup>+</sup> par des tétramères spécifiques (Figure 30D).

La sécrétion d'IFN- $\gamma$  a été observée quand des moDCs chargé en peptide purifié ont été mis en présence de cellules T2 (contrôle positif), et en présence de moDCs qui ont incubé avec la souche vaccinale contenant l'épitope M1<sub>58-66</sub> de la grippe (OSTAB et MMA). Comme prévu, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  n'a pas été observée dans les plasmides pEAI3 S54 vides (contrôle négatif pEi). Les résultats indiquent que les souches OSTAB et MMA S54-M1 ont correctement injecté M1 et que le peptide de la grippe a été efficacement présenté par les mDCs infectés au lymphocytes T2. La Figure 30C est une donnée représentative de la ligne de marquage de l'IFN- $\gamma$  intracellulaire dans les cellules T CD8<sup>+</sup> positives au tétramère tandis que la Figure 30D représente le regroupement de plusieurs expériences. La Figure 30C montre clairement que les niveaux d'IFN- $\gamma$  obtenus dans les T2 Flu co-cultivés avec les mDCs qui ont été incubées au préalable avec les souches OSTAB M1 et MMA M1 (11.1 et 8.5% respectivement) sont plus élevés comparés au niveau obtenu dans les conditions de contrôle (mDCs chargés avec le peptide de contrôle, 1.7%). La Figure 30D est un regroupement de six expériences avec des disparités de niveaux de réponses (à cause des différences inter-patient). Par conséquent, la moyenne finale annule la différence intra-expérimentale entre les conditions. Pour être plus cohérent sur ce point important, nous avons réalisé des expériences supplémentaires en évaluant la libération d'IFN- $\gamma$  dans les surnageants des co-cultures (Figure 30E). Cette figure montre clairement une différence entre la condition de contrôle (-) et les conditions OSTAB M1 et MMA M1. En bref, MMA *P. aeruginosa* est capable d'activer les CD8 et de les charger avec des antigènes qui seront pris en charge par le protéasome, apprêtés et présentés via les molécules du CMHI aux cellules T CD8<sup>+</sup>.



**Figure 30** : Le vaccin *P. aeruginosa* MMA active les moDC humaines et induit des réponses cellulaires T CD8 $^+$  spécifiques de l'antigène *in vitro*. **A**. Expression des marqueurs de maturation (CD80, CD86, CD83 et CD40) à la surface des moDC humaines infectés par des souches vivantes ou bactéries MMA, à une MOI de 100:1. Le lipopolysaccharide (LPS) et le CD40L ont été utilisés comme témoins. **B**. Sécrétion de cytokines par des CDs après stimulation par des souches vivantes et MMA (n = 5) ; **C et D**. Co-cultures de T2 flu avec des mDCs, incubés au préalable avec différentes souches OSTAB pEAi (plasmide vide) ou plasmide M1, MMA pEAi ou M1. Les T2 et les mDC chargés de l'épitope ont été utilisés comme témoins. Marquage intracellulaire de l'IFN- $\gamma$  exprimé dans des cellules T2 (cellules CD8 $^+$  tétramères spécifiques du peptide M1 de la grippe) et mesuré par cytométrie en flux **C**. Une expérience représentative, **D**. moyenne de quatre expériences. **E**. Présentation croisée de l'épitope M1 de la grippe par les CDs incubées avec les souches OSTAB ou MMA, évaluée par la mesure de l'IFN- $\gamma$  dans les surnageants des cultures (n = 5-8 expériences). HK, tué par la chaleur ; KBMA, "Killed but Metabolically active" ou MMA « Morte mais métaboliquement active » ; MOI, multiplicity of infection.

Pour évaluer la capacité du vaccin MMA à générer des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques *in vivo*, des souris C57BL/6J ont été injectées par voie s.c. avec  $5 \times 10^6$  ou  $5 \times 10^7$  bactéries ou avec des bactéries à plusieurs endroit (soit 2 sites 2X, soit 4 sites 4X), 2X  $5 \times 10^7$  ou 4X  $5 \times 10^7$  à J+1 et J+8. Les rates ont été récoltées au jour J+14. Des tests ELISpot (Enzyme-linked immunosorbent spot) ont été réalisés à partir des splénocytes, stimulés avec l'épitope peptidique OVA, SIINFEKL. Les rates des souris vaccinées avec une souche sécrétant de l'OVA présentaient une fréquence plus élevée de cellules sécrétant de l'IFN- $\gamma$  que les souris témoins immunisées avec du PBS (Figure 31A). Le nombre de cellules positives à l'IFN- $\gamma$  pour  $4 \times 10^5$  splénocytes était significativement plus élevé dans le groupe vacciné avec la souche MMA que dans la souche tuée à la chaleur, HK S54-OVA de *P. aeruginosa*. Par conséquent, la souche MMA a induit une réponse cellulaire T spécifique du peptide SIINFEKL *in vivo*, comme cela a été évalué chez les souris vaccinées. La vaccination MMA dans une procédure d'injection multisite 4X soit au total un dose de  $2 \times 10^8$  bactéries atteint le même taux de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques du peptide que la vaccination avec la souche OSTAB ( $5 \times 10^6$  bactéries). Nous avons ensuite évalué le potentiel de la vaccination avec *P. aeruginosa* MMA pour l'immunothérapie anti-cancer. Cette évaluation a été réalisée en utilisant un modèle murin de cellules syngéniques de mélanome B16 qui expriment l'antigène OVA (lignée cellulaire B16-OVA). L'injection de cellules B16- OVA à des souris C57BL/6J a entraîné un développement tumoral rapide. La capacité de stimuler l'immunité contre les cellules B16-OVA avec un vaccin *P. aeruginosa* MMA a d'abord été évaluée dans un schéma de vaccination prophylactique. Un schéma conventionnel d'immunisation primaire (jour J-14) et de rappel (jour J-7) et un challenge tumoral au jour J0 ont été réalisés. Nous avons observé une survie significativement meilleure chez les souris vaccinées avec deux injections de MMA S54-OVA (2X  $5 \times 10^7$  bactéries) par rapport à HK S54-OVA ou PBS ( $P = 0,0006$ ) (Figure 31B). En revanche, il n'y avait pas de différence significative entre OST S54-OVA et MMA S54-OVA (2X  $5 \times 10^7$  bactéries). Pour confirmer l'efficacité curative du vaccin, nous avons étudié la survie des souris vaccinées selon le schéma de vaccination thérapeutique que nous avons établi précédemment. Des cellules B16-OVA ont été implantées au jour J0, puis les souris ont été vaccinées six fois avec *P. aeruginosa* MMA ou des souches vivantes (1 jour après et tous les 4 jours). Nous avons observé que, contrairement au groupe non immunisé (OST-EI), toutes les souches exprimant l'OVA présentaient une protection efficace contre les tumeurs. La meilleure efficacité de rejet des tumeurs s'est produite avec les injections 4X de MMA et OSTAB S54-OVA (Figure 31C) ( $P = 0,0012$ ).



**Figure 31** : L'immunothérapie par *P. aeruginosa* MMA stimule la production de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques *in vivo* et prolonge la survie des souris porteuses de la tumeur B16-OVA. (a) Le nombre moyen de cellules positive à l'IFN- $\gamma$  (ou SFC) par  $4 \times 10^5$  splénocytes de souris vaccinées par voie *s.c.* avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), ou la souche S54-OVA tuée par la chaleur (HK), ou la souche OSTAB S54-OVA ou KBMA S54-OVA à  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$ , 2X  $5 \times 10^7$  ou 4X  $5 \times 10^7$  bactéries. La technique ELISpot a été utilisée comme indiqué par le fabricant. Les résultats présentés sont les moyennes de trois expériences indépendantes. (b-c) Les souris C57BL/6J ont reçu par voie *s.c.* des cellules tumorales B16-OVA ( $2 \times 10^5$  cellules) au jour J0. (b) Courbes de survie des souris témoins traitées au PBS et des souris ayant reçu une vaccination prophylactique à J-14 et à J-7 dans le flanc droit avec OST S54-OVA ( $5 \times 10^6$ ), KBMA S54-OVA ( $5 \times 10^7$  dans un ou deux sites d'injection) et HK OSTAB S54-OVA ( $5 \times 10^7$ ).  $P = 0,0006$ . (c) Courbes de survie des souris stimulées avec B16-OVA et vaccinées six fois (j+1 et tous les 4 jours) avec *P. aeruginosa* KBMA ou des souches vivantes. Les animaux ont été euthanasiés lorsque le diamètre de la tumeur dépassait 10 mm dans toutes les dimensions pour les deux schémas de vaccination.  $n = 6$  par groupe.  $p = 0,0012$ . KBMA, "tué mais métaboliquement actif".

La souche MMA induit efficacement une réponse immunitaire cellulaire de type CD8<sup>+</sup> cytotoxique contre les cellules cancéreuses tout en diminuant la réponse inflammatoire systémique. Par conséquent, la bactérie MMA *P. aeruginosa* est un outil efficace et sûr pour l'administration d'antigènes *in vivo* dans le cadre d'immunothérapie innovante.

Par ailleurs, le fait de disposer d'une souche bactérienne atténuée permet d'envisager d'autres applications potentielles. Par exemple, nous avons démontré que la bactérie MMA peut être utilisée pour délivrer des protéines dans le cytoplasme des cellules et faire de la reprogrammation cellulaire de cellules CD34<sup>+</sup> de manière à obtenir des cellules souches pluripotentes ([Berthoin et al. 2016](#) et [Polack et al. 2013](#))<sup>351</sup>.

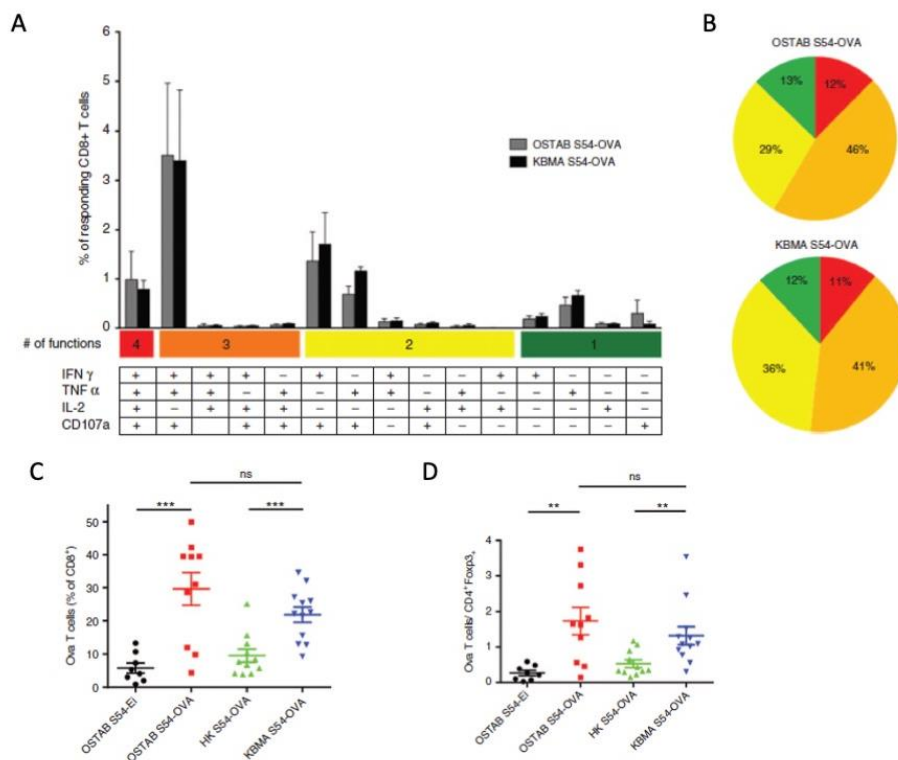
**Bilan** : Ces travaux ont fait l'objet de 5 publications (P7 : [Le Gouellec et al. 2012](#), P10 : [Le Gouellec et al. 2013](#), P11 : [Polack et al. 2013](#), P12 : [Toussaint et al. 2012](#) et P18 : [Berthoin et al. 2016](#)) et le dépôt d'un brevet **B1**.

#### 6.3.3.2.3. Étude la réponse immune à long terme induite par le vaccin BacVac de type MMA

Nous avons démontré que le vecteur BacVac permettait de stimuler la réponse immune de type CD8<sup>+</sup> cytotoxique spécifique de l'antigène sélectionné et injecté. Un des avantages d'utiliser ces vaccins thérapeutiques chez les patients atteints de cancer serait de les utiliser pour renforcer l'efficacité des traitements actuels comme la résection de la tumeur ou la chimiothérapie, afin d'éliminer de manière spécifique toutes cellules cancéreuses qui entraîneraient à terme une rechute. Nous avons donc souhaité évaluer la présence d'une réponse « mémoire » spécifique suite à la vaccination avec la souche MMA ([Chauchet et al.](#) 2016). Chez la souris, le nombre de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs spécifiques d'un quelconque antigène (répertoire TCD8) est estimé entre 50 et 200. En contact de l'épitope de l'antigène, ces précurseurs naïfs subissent entre 15 et 20 divisions et génèrent des millions de Lymphocytes T cytotoxiques effecteurs (T<sub>EFF</sub>) en 7 ou 8 jours post-infection. Ensuite, la majorité des T<sub>EFF</sub> meurent, laissant place à un pool de cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques mémoires (T<sub>EM</sub>)<sup>352</sup>.

Nous avons étudié plus en détail la réponse des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène, en termes d'aspects phénotypiques et fonctionnels, obtenue après des immunisations avec le vaccin atténué *P. aeruginosa* MMA. Nous avons démontré que le vaccin induit un pool hautement fonctionnel de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène, capables d'infiltrer la tumeur. Dans un premier temps, nous avons évalué la fréquence et la fonctionnalité des cellules T CD8<sup>+</sup> spléniques spécifiques de la tumeur OVA, 10 jours après la dernière immunisation avec le vaccin atténué OSTAB S54-OVA ou MMA S54-OVA. Les deux vaccins (OSTAB S54-OVA et MMA S54-OVA) ont été capables d'induire l'activation des cellules T spécifiques d'OVA à des fréquences similaires, respectivement 11,9 et 12,1%. Pour évaluer leur fonctionnalité, la sécrétion de cytokines et l'expression du marqueur de dégranulation (CD107a) ont été étudiées après la stimulation des splénocytes avec le peptide OVA (épitope SIINFEKL). Des profils de cytokines similaires ont été observés sur les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques après stimulation par le peptide dans les deux groupes vaccinés (Figure 32A). La réponse des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur induite par les vaccins OSTAB S54-OVA et MMA S54-OVA présente un degré élevé de polyfonctionnalité, avec respectivement 12 % et 11 % des cellules T CD8<sup>+</sup> répondantes produisant en même temps de l'interféron (IFN)- $\gamma$ , du facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$  et de l'IL-2 en association avec la dégranulation et 58 et 52 % respectivement, produisant au moins deux cytokines avec la dégranulation (Figure 32B). Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré qu'un niveau élevé de lymphocytes CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur

(ou TIL) prédit fortement la survie globale du patient atteint de cancer, ce qui sous-tend le rôle critique des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur<sup>353-355</sup>. Surmonter l'environnement immuno-suppressif en modifiant l'équilibre entre les cellules effectrices (T<sub>EFF</sub>) et les cellules T régulatrices (T<sub>reg</sub>) est un défi important dans le développement d'un vaccin anti-cancer. L'analyse des TILs, 21 jours après l'implantation dans la tumeur, a révélé que les vecteurs BacVac vivant et MMA induisent une augmentation significative des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'OVA infiltrant la tumeur, alors que les groupes « plasmide contrôle vide » ou « HK » n'y parviennent pas (Figure 32C). Il est important de noter que les deux vecteurs bactériens induisent une forte augmentation du ratio cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur/T-regs, modifiant ainsi positivement l'équilibre entre les cellules T<sub>EFF</sub> et immunosuppressives T<sub>reg</sub> (Figure 32D).

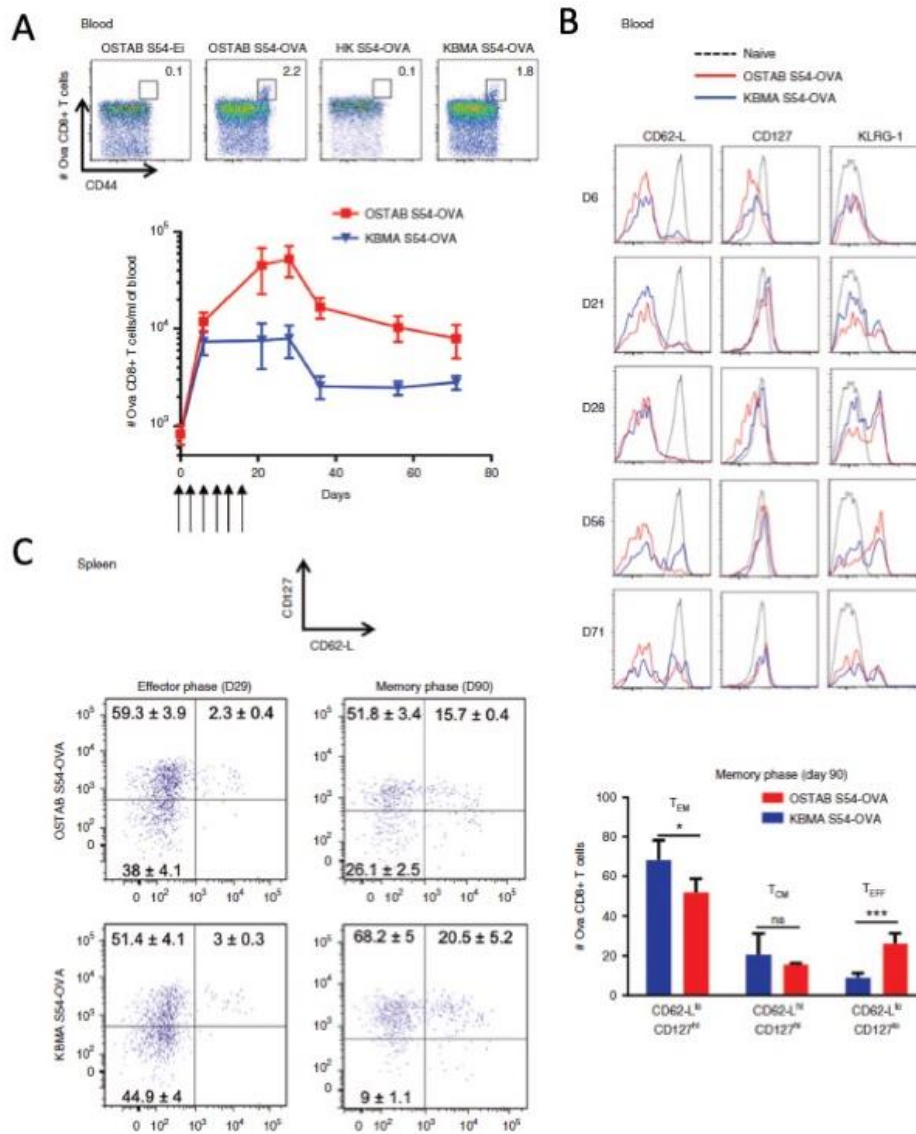


**Figure 32 :** Caractérisation fonctionnelle de la réponse cellulaire spécifique d'OVA de type T CD8<sup>+</sup> au niveau spléniques 10 jours après la dernière immunisation et au niveau intra-tumoral. **A.** Fréquence des cellules T CD8<sup>+</sup> totales attribuées à chacune des 15 combinaisons analysées (positif ou négatif pour l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-2 et le marqueur CD107a) selon le diagramme présenté sous les graphiques à barres. **B.** Les diagrammes circulaires représentent les différentes fonctions parmi les cellules T CD8<sup>+</sup> répondant à la stimulation du peptide OVA, dans les groupes vaccinés avec MMA et OSTAB. Chaque part représente le pourcentage de cellules exprimant entre 1 et 4 fonctions effectrices. **C et D.** Les souris ont été immunisées. Les tumeurs ont été récoltées au jour J21. Quantification par cytométrie en flux dans des tumeurs dissociées des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'OVA infiltrant la tumeur. **C.** Pourcentage de cellules T CD8<sup>+</sup> Ova parmi les TIL CD8<sup>+</sup> totaux **D.** Rapport entre les cellules T CD8<sup>+</sup> Ova (sélectionnées sur les TIL CD8<sup>+</sup>) et les cellules T<sub>reg</sub> (% de cellules FoxP3<sup>+</sup> sélectionnées sur les cellules CD4<sup>+</sup> de la tumeur). n = 4-6 souris/groupe. Les données sont représentatives de deux expériences groupées. Moyenne  $\pm$  SEM. \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 déterminés par le test t de Student non apparié. TILs, lymphocytes infiltrant la tumeur ; SEM, erreur standard de la moyenne. IFN- $\gamma$ , interféron- $\gamma$  ; IL-2, interleukine-2; TNF- $\alpha$ , facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  ; KBMA, tué mais métaboliquement actif.

Une caractéristique clé de l'efficacité d'un vaccin contre le cancer réside dans sa capacité à induire une réponse durable des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur et une protection subséquente contre les rechutes et/ou les métastases. Nous avons donc analysé le potentiel de la vaccination par BacVac en évaluant le développement de la réponse mémoire CD8<sup>+</sup> spécifique de la tumeur au cours du temps après six immunisations consécutives (2×/semaine). Dès 6 jours après la première immunisation, des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur ont été détectées dans le sang dans les groupes vaccinés avec OSTAB S54-OVA et MMA S54-OVA, atteignant respectivement 2,2 et 1,8% parmi les cellules T CD8<sup>+</sup> mesurées par tétramères (Figure 36A). Le nombre maximal de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur a été atteint environ 1 semaine après la dernière vaccination. Cette phase a été suivie d'une période de contraction, où le nombre de cellules T<sub>EFF</sub> CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur a diminué dans les deux groupes pendant 2 semaines après la dernière vaccination, puis s'est stabilisé pendant le mois suivant (Figure 33A). Après 70 jours, on observait toujours un pool important de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur dans les deux groupes vaccinés.

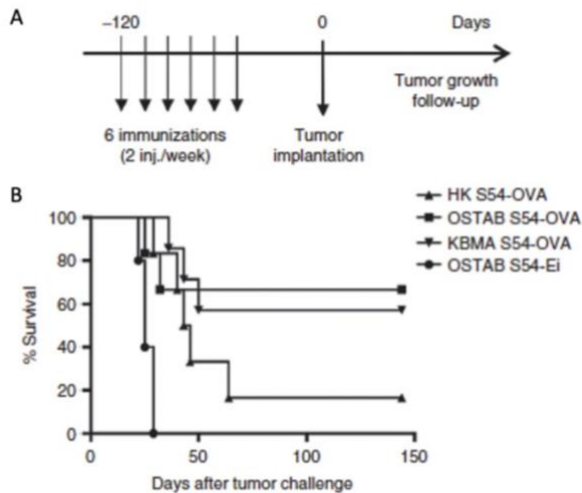
Pour étudier les changements phénotypiques des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur circulant dans le sang au fil du temps, nous avons suivi l'expression du marqueur de mémoire CD127 (IL-7R $\alpha$ )<sup>356</sup>, du récepteur de CD62-L et du récepteur inhibiteur des cellules NK (KLRG-1) (Figure 33B). Après les premières immunisations (au jour 6), les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur du groupe OSTAB S54-OVA et MMA S54-OVA présentaient un phénotype effecteur typique CD127<sup>bas</sup> CD62-L<sup>bas</sup> KLRG-1<sup>bas</sup> (T<sub>EFF</sub>). Ensuite, les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques ont augmenté l'expression du marqueur mémoire CD127 (à partir du 21<sup>ème</sup> jour) mais ont conservé un phénotype effecteur prédominant (CD62-L<sup>bas</sup>), avec une augmentation progressive de l'expression de KLRG-1 (jour 21, 28 et 56). De façon remarquable, l'expression de ce marqueur de sénescence des cellules T est corroborée par la chute du nombre de cellules T CD8<sup>+</sup> sanguines spécifiques de la tumeur à partir du 28<sup>ème</sup> jour (Figure 33A). 71 jours après la première immunisation, un pool circulant persiste comprenant à la fois des cellules effectrices (CD62-L<sup>bas</sup>CD127<sup>haut</sup>) et des cellules à mémoire centrale (T<sub>CM</sub>) (CD62-L<sup>haut</sup> CD127<sup>haut</sup>) dans le groupe OSTAB S54-OVA et MMA S54-OVA avec des cellules KLRG1<sup>haut</sup> et KLRG-1<sup>bas</sup>. Enfin, nous avons également étudié la réponse des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur dans les splénocytes en phase effectrice (jour 29) et pendant la phase mémoire bien après la dernière vaccination (jour 90). Après la période d'immunisation, une majorité de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur ont semblé prendre le phénotype mémoire CD127<sup>haut</sup> avec ~61%

dans le groupe OSTAB S54-OVA et 54% dans le groupe MMA S54-OVA (jour 29, Figure 33C addition des 2 gates du haut).



**Figure 33** : Cinétique de réponse des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifique d'OVA et d'expression des marqueurs de mémoire induits par les vaccins *P. aeruginosa*-OVA, analysés par cytométrie en flux dans la rate et le sang des souris vaccinées. Les souris ont reçu 6 immunisations avec des vaccins *P. aeruginosa*-OVA ou des contrôles (première immunisation à J0) et le sang ou la rate ont été prélevés à différents moments. **A**. Profils représentatifs par cytométrie en flux des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'OVA dans le sang pour les groupes vaccinés et témoins au jour 6 (en haut). Profil cinétique des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'OVA (nombre absolu) dans le sang (en bas). n = 5 ou 6 souris par groupe par point de temps. Moyenne ± SEM. **B**. Expression des marqueurs CD62-L, CD127, et KLRG-1 évaluée au fil du temps par gating sur les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'OVA dans le sang. **C**. Profil représentatif de la co-expression des marqueurs CD62-L et CD127 par marquage sur les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'OVA dans les splénocytes en phase effectrice (jour 29) et en phase mémoire (jour 90). Les chiffres indiquent le pourcentage dans chaque quadrant (moyenne ± SEM). n = 5 ou 6 souris (gauche). Pourcentage moyen des sous-populations de cellules T CD8<sup>+</sup> mémoire spécifiques d'OVA (CD62-L<sup>low</sup>CD127<sup>hi</sup> ou CD62-L<sup>hi</sup>CD127<sup>hi</sup>) et effectrices (CD62-L<sup>low</sup>CD127<sup>low</sup>) à 90 jours dans les splénocytes lors de l'immunisation avec les vaccins *P. aeruginosa*-OVA. TEM : cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'OVA à mémoire effectrice ; TCM : cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'OVA à mémoire centrale ; T<sub>EFF</sub> : cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices spécifiques d'OVA. Moyenne ± SEM. \*P < 0,05, \*\*\*P < 0,001 déterminé par le test t de Student non apparié ; SEM, erreur standard de la moyenne.

Au cours de la phase de mémoire, ces cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'OVA ont évolué vers un phénotype CD127<sup>haut</sup> CD62-L<sup>bas</sup> prédominant dans les groupes traités par OSTAB S54-OVA ou MMA S54-OVA, atteignant 51,8 et 68,2 %, ce qui évoque le développement d'une réponse effectrice-mémoire majeure (jour 90, Figure 33C, Gate en haut à gauche). De manière surprenante, dans le groupe OSTAB S54-OVA, une proportion significativement plus élevée de cellules T<sub>EFF</sub> spécifiques de la tumeur a encore été mesurée (26,1% T<sub>EFF</sub>, CD62-L<sup>bas</sup> CD127<sup>bas</sup>) par rapport au groupe MMA S54-OVA (9%, P < 0,001). En conséquence, un pourcentage plus faible de cellules T effectrices mémoire (T<sub>EM</sub>) a été mesuré avec le groupe OSTAB S54-OVA par rapport au groupe MMA S54-OVA (51,8 % contre 68,2 %, P < 0,05). Cela signifie que même 70 jours après la dernière immunisation, une réponse mémoire des cellules T est présente avec une signature légèrement différente pour les deux groupes. Cependant, la présence d'un pool de lymphocytes T<sub>CM</sub> à mémoire centrale a été observée à 15,7 et 20,5% de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur dans le groupe OSTAB S54-OVA et MMA S54-OVA respectivement. Les cellules CD8<sup>+</sup> T mémoires, spécifiques de la tumeur, induites par les vaccins favorisent une réponse anti-tumorale protectrice à long terme. Comme une réponse mémoire a été atteinte ~50 jours après la dernière immunisation chez les souris, nous avons challengé les souris immunisées par l'implantation de cellules tumorales B16-OVA, 100 jours après la dernière immunisation avec les vaccins (Figure 34A). Les souris immunisées par les vecteurs OSTAB S54-OVA et MMA S54-OVA sont restées exemptes de tumeurs au-delà de 150 jours après la provocation tumorale chez 67% et 57% des individus respectivement. A l'opposé, les souris des groupes témoins HK S54-OVA et OSTAB S54-Ei ont développé des tumeurs et ont eu une survie médiane de 29 et 22 jours, respectivement (Figure 34B). Nous avons observé une survie significativement meilleure chez les souris vaccinées avec OSTABS54-OVA et MMA S54-OVA par rapport aux souris témoins (souche OSTAB S54-Ei) (Les valeurs p pour le test log-rank sont respectivement de 0,0096 et 0,0005) alors qu'il n'y a pas de différence statistique entre OSTAB S54-OVA et MMA S54-OVA (p = 0,9375).



**Figure 34 :** Protection à long terme induite par les vaccins *P. aeruginosa*-OVA contre le mélanome B16-OVA. A. Protocole expérimental. Les souris ont reçu 6 injections (2×/semaine) et ont été challengées avec à  $2 \times 10^5$  cellules B16-OVA en s.c, 100 jours après la dernière immunisation. La croissance tumorale a été surveillée tous les 2 jours et les souris ont été tuées lorsque la tumeur atteignait 150mm<sup>2</sup>. B. Pourcentage de survie des souris exposées à des tumeurs 100 jours après la dernière immunisation. n = 5-7 souris par groupe. Test log-rank OSTAB S54-OVA et KBMA S54-OVA par rapport à OSTAB S54-Ei p = 0,0096 et p = 0,0005 respectivement).

En conclusion, le vaccin BacVac induit une protection efficace à long terme lors d'un challenge tumoral, lié à la présence d'un pool majoritaire de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques effecteurs mémoires (CD62L<sup>bas</sup>, CD127<sup>haut</sup>, KLRG1<sup>int</sup>) polyfonctionnels (production d'INF- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 et capable de dégranulation). Le pool de cellules T CD8<sup>+</sup> mémoire, identifié par sa réexpression de CD127 (IL-7R $\alpha$ ) après la phase effectrice<sup>356</sup>, contient deux sous-ensembles distincts majeurs, appelés T à mémoire effectrice (TEM) et T à mémoire centrale (TCM), qui diffèrent par leur phénotype, leurs schémas de circulation, leur tissu de résidence et leurs caractéristiques fonctionnelles<sup>357</sup>. Cette division est basée sur l'expression de CD62-L (récepteur de homing dans les tissus lymphoïdes) ou du récepteur de chémokine C-C de type 7 (CCR7). En général, les cellules T<sub>CM</sub> expriment CD62-L et CCR7 et se localisent principalement dans les tissus lymphoïdes, tandis que les cellules T<sub>EM</sub> sont négatives pour CD62-L et CCR7 et prédominent également dans les sites périphériques. Les T<sub>CM</sub> ont également été décrits comme étant plus aptes à proliférer après un rappel antigénique alors que les T<sub>EM</sub> sont hautement cytolytiques et prolifèrent peu<sup>358-360</sup>.

Nous avons observé une différence dans le phénotype mémoire des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur, induit par les deux vecteurs. Il semble que la bactérie MMA confère une forte réponse mémoire (T<sub>CM</sub> et T<sub>EM</sub>) alors que la souche OSTAB-S54 OVA suscite un phénotype effecteur (~26% des cellules contre 9% pour la bactérie MMA), même en phase mémoire. Cela pourrait s'expliquer par la présence de bactéries OSTAB S54-OVA vivantes restantes dans l'organisme qui pourraient maintenir un pool de cellules effectrices CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène OVA. Il est intéressant de noter qu'une étude préclinique précédente avait décrit une protection tumorale distincte et durable corrélée à une réponse mémoire CD8<sup>+</sup> différentes après

vaccination avec des vecteurs recombinants à base de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* et *Listeria monocytogenes(Lm)* exprimant l'OVA. Bien que les deux vecteurs recombinants aient induit des cellules T CD8<sup>+</sup> mémoire spécifique de l'OVA avec des fonctions cytolytiques comparables, *Lm* a conduit principalement à des cellules T<sub>CM</sub> (CD62-L<sup>haut</sup> CD127<sup>haut</sup>) avec de fortes capacités de prolifération et d'auto-renouvellement, qui ont conféré une meilleure protection à long terme contre les tumeurs que les cellules T CD8<sup>+</sup> à mémoire effectrice induites par *Salmonella typhi* (CD62-L<sup>bas</sup> CD127<sup>haut</sup>) qui étaient incapables de se développer et ont conduit à une protection contre les tumeurs plus faible. Stark *et al.* ont conclu au rôle bénéfique de la mémoire centrale<sup>361</sup>.

En conclusion, nous avons démontré que le vaccin BacVac induit un pool hautement fonctionnel de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène tumoral, et capables d'infiltrer la tumeur. De plus, un schéma d'immunisations multiples (6 injections à 2-3 jours d'intervalle) a permis le développement d'une réponse immunitaire durable, représentée par un pool de cellules mémoires qui ont protégé les souris contre un challenge tumoral tardif, laissant présager de l'intérêt d'un tel vaccin thérapeutique dans le cadre de traitement du cancer (limitant la rechute). Globalement, le vecteur *P. aeruginosa* MMA, mort mais métaboliquement actif est une approche sûre et prometteuse pour une immunothérapie anti-tumorale active et spécifique.

**Bilan :** Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (P16 : [Chauchet et al.](#) 2016).

#### **6.3.4. BacVac : un vaccin anti-Pseudomonas aeruginosa**

##### **6.3.4.1. Contexte sur les vaccins anti-Pseudomonas aeruginosa**

Pour cette partie, j'ai décidé de vous retracer plus de 50 ans de recherche scientifique et médicale qui vont me permettre d'introduire des concepts importants de la virulence bactérienne et de la réponse immune associée aux infections par *P. aeruginosa*. Malgré toutes ces années de recherche et développement et de nombreux essais cliniques, aucun vaccin n'est à ce jour validé pour une utilisation chez l'Homme. Trois vaccins ont réussi à atteindre la phase 3, et ce sont tous des vaccins de composants isolés à base de protéines OprF-OprI, un vaccin bivalent à base de flagelline, et un vaccin octavalent à base d'O-polysaccharide-Exotoxin A (Aerugen<sup>®</sup>). Dès 1970 pourtant, on pensait avoir tous les ingrédients pour pouvoir concevoir un vaccin sûr et efficace contre *P. aeruginosa*. Cette année-là, Alexander et Fisher publiaient dans l'« American Journal of Surgery » le succès d'un vaccin basé sur le lipopolysaccharide (ou

LPS) pour traiter des patients brûlés infectés à *P. aeruginosa*<sup>362</sup>. Lanyi publiait la première description d'une différence de réaction immunitaire contre des protéines du flagelle<sup>363</sup>. Et, Bartell et ses collègues publiaient la composition chimique d'un antigène protecteur de nature gluante (plus tard nommé alginate)<sup>364</sup>. Une revue récente de la littérature retrace précisément tout ce qui a été testé en modèle préclinique et clinique<sup>365</sup>, j'ai choisi pour ne pas alourdir le manuscrit de ne développer que ce qui a été testé en phase clinique ou de pertinents pour mes travaux de recherche (Figure 35).

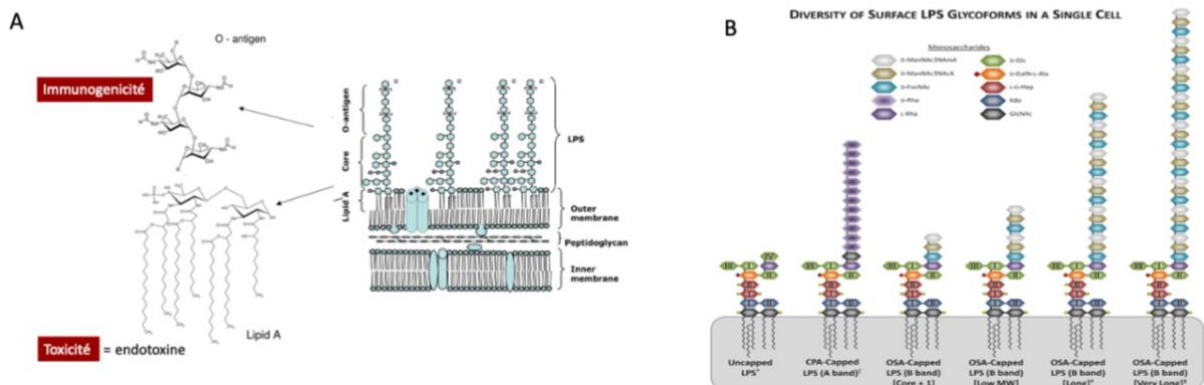
Vaccine candidate		Pre-clinical studies	Clinical trials			Vaccine candidate		Pre-clinical studies	Clinical trials		
Antigen	Composition		Phase I	Phase II	Phase III	Antigen	Composition		Phase I	Phase II	Phase III
Lipopolysaccharide	Heptavalent LPS extracts (Pseudogen <sup>®</sup> )					Type III secretion system	r-PcrV				
	Polyvalent LPS extracts (PEV-01)						PcrV immunogenic epitopes				
	Octavalent OPS-ETA conjugate (Aerugen <sup>®</sup> )						PcrV-HSL conjugate				
	Liposomes-core LPS						r-PcrV-OprI-Hcp1 chimeric protein				
							r-PopB-PcrH				
Alginate	Purified MEP					PGLA encapsulated PopB-PcrH					
	MEP-ETA/KLH conjugates										
Flagellum	Monovalent FlIC					Exotoxin A	r-ETA toxoid				
	Bivalent FlIC						PGLA encapsulated ETA				
	Whole purified flagella					Elastase	LasB toxoid				
	r-flagellins						LasB peptides-KLH conjugate				
	FlIC-MEP conjugate						LasB peptides-TT conjugate				
	r-FlIC-ETA chimeric protein										
	r-FlIC-OMP chimeric protein						Catalases	Purified KatA and KatE			
Type 4 pili	PilA C-terminus					Auto-inducers	Hapten C12HSL-BSA conjugate				
	Whole PilA						Iron uptake proteins	r-FpvA, FoxA and HasR			
	PilA-ETA chimeric protein					FpvA peptide-KHL conjugate					
	r-PilA and b-FlIC					r-HitA					
	PilA-PilQ chimeric protein					Whole-cell killed		Killed PA (Pseudostat <sup>®</sup> )			
	PilA-OPS conjugate							H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> deactivated PA			
	Consensus peptide immunogen						KBMA4PTG, OSTAB pEI strain				
Low mw fimbrial pili					Live-attenuated bacteria	PAO1ΔaroA and PA14ΔaroA					
Outer membrane proteins	OMP extractions (CFC 101)						O2/O5, O6, O10, and O11 serogroups				
	r-OprI						aroA mutants				
	r-OprF						PAO1Δmuri				
	His-OprF-OprI protein (IC43)					DNA vaccines	Type-a/-b flagellin				
	His-OprF-OprI protein (SDS-emugel)						OMPs				
	OprF N-terminus						OprF2-VP22				
	OprF-OprI-ETA chimeric protein										
	OprF, ETA and LasB										
	OprF-OprI-PcrV chimeric protein										
	OprI-OprF-AlgE PHA nanovaccine										
	r-OMPs (OprL, OprH, PA5340, PA3526 and MotY)										

Figure 35 : Progrès dans le développement d'un vaccin contre les infections à *P. aeruginosa*. Plus la couleur de la barre est foncée, plus le candidat vaccin a progressé dans les phases cliniques. D'après Sainz-Mejias et al. 2020<sup>365</sup>

#### 6.3.4.1.1. Les lipopolysaccharides (LPS)

Les lipopolysaccharides sont des molécules composées d'un core O-saccharidique spécifique de chaque espèce, de chaînes latérales appelées O-antigènes, conférant l'immunogénicité à la souche et une base lipidique, le lipide A, enchâssée dans la membrane externe conférant ses propriétés d'endotoxine au LPS (Figure 36). Une étroite relation existe entre les structures chimiques et les gènes

codant pour les enzymes de biosynthèse du LPS a été établie, avec 11 groupes majeurs de O-antigènes identifiés permettant d'établir des sérotypes chez *P. aeruginosa*. Le lipide A peut être variablement penta-, hexa- ou hepta-acylé, et ces isoformes activent différemment l'immunité innée de l'hôte via leur liaison au récepteur TLR4<sup>366</sup>.



**Figure 36 :** Les lipopolysaccharides A. Structure du Lipopolysaccharide : Partie O-polysaccharidique conférant l'immunogénicité et partie lipidique endotoxine conférant la toxicité. B. Diversité des structures O-saccharidiques du LPS non capé à l'existence de formes variées des sérotypes.

En 1970, le premier vaccin heptavalent à base de LPS issus de 7 souches différentes (Pseudogen<sup>®</sup>, Parke-Davis, Detroit, MI, USA) est testé chez des patients brûlés, des enfants atteints de leucémie ou encore chez des patients atteints de mucoviscidose. Il induit une réponse anticorps spécifique mais conserve une trop grande toxicité. En 1980, malgré un travail d'extraction et de purification des LPS provenant de 16 souches différentes (vaccin PEV-01, Burroughs-Wellcome, Londres, Angleterre), le vaccin PEV-01 montre des résultats aussi décevants en termes de toxicité. Un travail conséquent est alors réalisé afin d'obtenir des vaccins LPS-dépourvu de lipide A, monovalent, heptavalent, ou encore combiné avec l'Exotoxine A (ou ETA) (Aerugen<sup>®</sup>, Crucell, Leiden, Pays-Bas) avec une bonne tolérance mais une efficacité variable parmi les 59 personnes vaccinées en phase II<sup>367</sup> avec des résultats prometteurs. Plus de 10 ans après leur immunisation et des rappels annuels, seuls 32% des personnes du groupe vacciné par Aerugen<sup>®</sup> avaient été infectées par la suite par *P. aeruginosa* contre 72% dans le groupe contrôle<sup>368</sup>. Cette efficacité était d'une part due à une forte réponse humorale (Anticorps IgG anti-LPS et anti-Exotoxine A)<sup>369</sup> et d'autre part à une réponse immune cellulaire majoritairement de type Th1 (forte production d'INF- $\gamma$  et faible production d'IL-4 et 10 en présence d'antigènes de *P. aeruginosa*)<sup>370</sup>. Dans cet essai clinique, aucune réponse mémoire n'avait pu être obtenue. La fraction de lymphocytes B mémoire exprimant CD27 n'avait pas progressé après la vaccination. Malgré des résultats encourageants, l'essai clinique de phase III, conduit sur 476 patients atteints de mucoviscidose dans 46 centres en double-aveugle, n'a pas démontré de bénéfice et a été stoppé en 2006. Avec un peu de recul, il est à

noter que les LPS issus des souches de *P. aeruginosa* isolées chez des patients atteints de mucoviscidose sont dépourvus de la partie O-antigène<sup>371,372</sup> et donc ces patients ne sont peut-être pas les bons pour ce vaccin en particulier.

#### 6.3.4.1.2. Les exopolysaccharides

La matrice extracellulaire que constitue le biofilm se compose essentiellement d'exopolysaccharides (EPS) (constituant 50 à 90 % du biofilm), de protéines et de sels. Les EPS ont une haute masse molaire et sont très hétérogènes. Ils forment des chaînes saccharidiques, plus ou moins longues, pouvant posséder des ramifications, des fonctions alcool, amine, acide, ainsi que des groupements sulfate et phosphate. La forte implication de *P. aeruginosa* dans les maladies nosocomiales fait que son biofilm est aujourd'hui l'un des plus étudiés. Historiquement, l'alginate (ou exopolysaccharides mucoïde ou MEP) a été considéré comme l'exopolysaccharide majeur de *P. aeruginosa* bien qu'il ne soit pas impliqué dans l'initiation de la formation de biofilm chez les souches PAO1 et PA14 de *P. aeruginosa*. Les exopolysaccharides produits à partir des gènes *psl* (locus de synthèse de polysaccharides) et des gènes *pel* (pellicule) sont impliqués majoritairement dans la formation de biofilm<sup>373</sup>. Mais l'alginate est naturellement immunogène, des anticorps opsonisants anti-MEP ont été détectés chez les patients muco, et une cross réactivité croisée contre des épitopes conservés chez les souches en font un antigène de choix pour la vaccination. L'alginate a un rôle naturel de protection contre l'inflammation, contre les ERO et la phagocytose. Dans une première étude, il a été démontré que 80-90% des 50 volontaires vaccinés avec des MEP présentent un taux élevé d'anticorps anti-MEP à long terme<sup>374</sup>. Bien que sûr et bien toléré (non toxique, non pyrogénique), l'immunogénicité chez l'Homme est modérée car seul 35% des personnes présentaient un titre d'anticorps mesurable<sup>374</sup>. Ceci a poussé les chercheurs à associer les MEP à d'autres protéines comme l'exotoxine A ou la flagelline de type a ou b. Des forts taux d'anticorps de type IgG opsonisants et neutralisants ont été retrouvés contre les MEP mais les titres des anticorps anti flagelline étaient très faibles<sup>375</sup>.

#### 6.3.4.1.3. Le flagelle

Étant donné que les antigènes protéiques fournissent en général une réponse anticorps spécifique plus robuste et plus durable que les antigènes polysaccharidiques, les antigènes du flagelle (la flagelline ou FliC) de *P. aeruginosa* ont été étudiés comme candidats vaccins. *P. aeruginosa* est une bactérie monotriche, possédant un seul flagelle, lui assurant sa mobilité et

son caractère invasif mais est également impliqué dans l'adhésion aux cellules (liaison aux mucines, au glycolipide asialoGM1) et dans la reconnaissance par le récepteur TLR5 de l'hôte<sup>376-378</sup>. C'est un polymère de protéine qui peut être divisé en deux groupes, l'un correspondant à une protéine de 53 kDa appelée le type b et un groupe correspondant à une structure hétérogène de 45-52kDa appelée le type a. En 1991, un essai clinique de phase I sur 220 patients vaccinés en intramusculaire avec une préparation vaccinale de flagelle de 6 souches différentes a montré que le vaccin était bien toléré et qu'il induisait la présence d'un titre élevé et durable d'anticorps spécifiques chez tous les individus vaccinés<sup>379</sup>. L'essai multicentrique randomisée et en double aveugle, de phase III utilisant les sous unités a et b de la flagelline (IMMUNO, Vienne, Autriche) a enrôlé 483 patients atteints de mucoviscidose sans infection pulmonaire à *P. aeruginosa* au démarrage de l'étude, dans 16 centres en Allemagne, en France et en Italie<sup>380</sup>. Les patients ont reçu quatre injections intramusculaires du vaccin ou d'un placebo sur une période de 14 mois et ont été évalués tous les trimestres pour détecter les cultures de gorge positives à *P. aeruginosa* et le développement de titres d'anticorps sériques contre la protéinase alcaline, l'élastase et l'exotoxine A, révélant la présence d'une infection à *P. aeruginosa* au cours de l'étude. Le vaccin a été bien toléré et les patients ont développé des titres élevés d'IgG sériques dirigés contre les sous-types de flagelline inclus dans le vaccin. En revanche, la différence statistique entre les patients vaccinés et les patients placebo n'était pas significative en ce qui concerne le critère principal. Dans le groupe vacciné, 37 des 189 patients ont eu une infection documentée, contre 59 des 192 patients du groupe placebo. Le degré de protection contre l'infection à *P. aeruginosa*, calculé à partir du risque relatif, était de 34 %. 73% des isolats retrouvés chez les patients présentent un sous type de flagelle non présent dans le vaccin. Par ailleurs, il est connu aujourd'hui qu'en raison des conditions environnementales hypoxiques, le facteur sigma alternatif AlgT, induit le phénotype mucoïde et réprime également le régulateur de l'expression du flagelle, FleQ, au cours de l'infection chronique chez les patients atteints de mucoviscidose<sup>381</sup>. Par conséquent, pour les patients atteints de mucoviscidose, les vaccins contre le flagelle doivent être administrés avant l'émergence des variants non flagellés de *P. aeruginosa*.

#### 6.3.4.1.4. Le Système de sécrétion de type 3

PcrV a été la première protéine du SST3 (PcrV) utilisée comme antigène vaccinal, qui a permis d'obtenir une immunité protectrice et d'améliorer le taux de survie des souris, à la fois dans un modèle d'infection pulmonaire et de brûlure<sup>382,383</sup>. L'immunisation de souris immunodéprimées avec la protéine entière ou avec des formes tronquées a permis de mettre en évidence les régions

les plus immunogènes comme l'épitope Mab166 (PcrV<sub>144-257</sub>). En effet, l'immunisation avec des antigènes contenant cette région a donné des taux de survie comparables à ceux de l'immunisation avec PcrV complète (65%), avec une augmentation significative des titres d'IgG1 et d'IgG2<sup>384</sup>. Un dérivé soluble optimisé du PcrV (PcrVNH) combinant deux domaines immunodominants du PcrV a déclenché une réponse immunitaire à médiation Th2, et alors qu'aucune souris du groupe non immunisé n'a survécu, 50 à 60 % des souris immunisées ont été protégées<sup>385</sup>. Cependant, les taux de survie étaient encore faibles, probablement parce qu'il ne déclenchait pas efficacement les réponses Th1 et Th17, mais cette limitation pourrait être corrigée par l'optimisation des adjuvants ou la combinaison avec d'autres antigènes<sup>385</sup>. Dans l'ensemble, des taux de survie variables pour le PcrV seul ont été rapportés, allant de 20 % à 75 %<sup>386-389</sup>. En combinaison avec d'autres antigènes (PcrV et AHLs ; OprF-OprI-PcrV ; PcrV, OprI, T6SS Hcp1), les taux de survie dans différents modèles précliniques ont été améliorés jusqu'à 90% de survie<sup>386,389,390</sup>.

D'autres protéines de l'appareil de translocation T3SS ont également été évaluées. Une approche de vaccinologie inversée a permis d'identifier que PopB possède des épitopes forts pour les cellules T et des épitopes non protecteurs pour les cellules B<sup>189</sup>. L'immunisation intranasale de souris avec la protéine PopB mélangée à l'adjuvant curdlan (proTh1/Th17) a induit une réponse Th17 systémique et mucoale et a été partiellement protectrice, bien qu'aucun anticorps opsonisant n'ait été induit<sup>189</sup>. Des réponses Th17 comparables et une protection des souris ont été obtenues avec un vaccin à base de protéine recombinante PopB et PcrH encapsulée dans des nanoparticules d'acide poly-lactique-co-glycolique ou PLGA<sup>391</sup>. Les seuls essais cliniques concernant les antigènes du SST3, sont basés sur l'utilisation d'anticorps humanisés anti-PcrV (KB001-A) développé par Kalobios (accord bref avec Sanofi Pasteur) mais le critère principal dans un essai clinique réalisé chez des patients mucoviscidose n'a pas été atteint et le développement abandonné. Quand on connaît la capacité qu'a la souche de réguler l'expression de son SST3 (voir partie contexte Figure 12), il est fort probable qu'il ne soit pas possible d'obtenir un vaccin efficace en termes de clairance de la bactérie avec comme cible unique PcrV. En revanche, pourquoi ne pas envisager d'utiliser ce type de stratégie d'immunothérapie passive chez des patients intubés et ventilés mécaniquement en soins intensifs à risque de faire une infection sévère, et qui limiterait les lésions causées par *P. aeruginosa* et son SST3.

#### 6.3.4.1.5. Les protéines de la membrane externes : OprF et OprI

OprF est une porine majoritaire, présente dans la membrane externe. Elle est immunogène et bien conservée parmi les différents sérotypes de *P. aeruginosa*, tout comme la lipoprotéine OprI. Dans un essai clinique de phase I, 32 volontaires ont été vaccinés et ont bien toléré le vaccin à base de protéine de fusion OprF-OprI injectées par voie intramusculaire. En outre, une augmentation significative des titres d'anticorps opsonisants contre l'OprF et l'OprI était détectable jusqu'à six mois<sup>392</sup>. Cette protéine hybride OprF-OprI a été initialement développée par Intercell AG (Vienne, Autriche) et nommée IC43<sup>5</sup>. Dans un essai de phase I, randomisé, contrôlé par placebo et en aveugle, mené chez des volontaires adultes sains, il a été conclu qu'un schéma de deux vaccinations à sept jours d'intervalle était nécessaire pour induire une réponse IgG<sup>393</sup>. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude de phase II chez des patients sous ventilation mécanique en unité de soins intensifs<sup>394</sup>. Malgré le taux de mortalité significativement plus faible chez les patients vaccinés (35,6-37,6 % contre 42,9 %), il n'y avait aucune corrélation entre le bénéfice observé en termes de mortalité et les infections confirmées à *P. aeruginosa*. De plus, bien que les différences ne soient pas statistiquement significatives, un taux d'infection plus élevé a été observé dans le groupe traité (11,2-14%) que dans le groupe placebo (6,1%), ce qui suggère que le vaccin IC43 pourrait mieux protéger des variants virulents de *P. aeruginosa* plutôt que d'améliorer sa clairance<sup>394</sup>. Une étude de confirmation de phase II-III, randomisée, multicentrique (n=52), contrôlée par placebo et en double aveugle, portant sur 799 patients en soins intensifs, a montré que, bien que l'IC43 soit à la fois bien toléré et immunogène, il n'y avait aucun avantage clinique en termes de mortalité par rapport au groupe placebo<sup>395</sup>. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de cet échec : (i) l'hétérogénéité intrinsèque des patients des unités de soins intensifs, (ii) une variabilité supplémentaire due à l'introduction de patients provenant de différents pays européens, et (iii) une infection par *P. aeruginosa* avant le développement d'une réponse immunitaire IgG efficace<sup>394</sup>. Récemment, un heptamère de l'IC43 a été évalué. Il a entraîné une augmentation des taux d'IgG spécifiques, une réduction des lésions pulmonaires et un taux de survie plus élevé que l'IC43 seul (80 % contre 30 %). Ces améliorations peuvent être dues à l'exposition d'un plus grand nombre d'épitopes immunogènes<sup>396</sup>. En conclusion, une réponse à médiation humorale est apportée par le vaccin OprF-OprI mais une réponse à médiation cellulaire est nécessaire pour obtenir une bonne protection contre *P. aeruginosa*. En effet des souris Lymphocytes B(-) vaccinées montrent clairement une nette diminution des lésions 8 jours après un challenge infectieux<sup>397</sup>.

---

<sup>5</sup> récemment renommé VLA43 lors d'une alliance Valneva et GSK

#### 6.3.4.1.6. Les vaccins inactivés et vivants atténués

Les vaccins vivants-atténués ont été les premiers à être envisagés comme vaccin anti *P. aeruginosa*. Un des avantages de ce type de vaccin, est de reproduire fidèlement sa grande variabilité antigénique. Ils étaient particulièrement prometteurs en raison de la forte et large gamme de réponses immunitaires qu'ils suscitent, y compris une immunité mucoale, ainsi qu'une immunité systémique à médiation humorale et/ou cellulaire<sup>189,398-400</sup>.

Le vaccin inactivé à base de la souche PAO1 fixée au paraformaldéhyde (Pseudostat®, Cortecs) permet d'obtenir une immunité mucoale et systémique et induit une réponse immunitaire protectrice, une clairance bactérienne (>90%, 4 h après le challenge) et une diminution de la mortalité<sup>401-403</sup>. L'immunisation orale avec Pseudostat® de neuf patients atteints de bronchiectasie a montré des réponses lymphocytaires spécifiques et une réduction significative de la charge bactérienne dans les expectorats. Dans une étude de phase I avec 30 volontaires sains, elle a induit une réponse IgA sérique significative et augmenté l'opsonisation et la phagocytose par les macrophages<sup>404</sup>. Néanmoins, des troubles neurologiques, gastro-intestinaux et respiratoires ont été détectés chez 20 individus<sup>404</sup>. Récemment, l'utilisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour inactiver les souches de *P. aeruginosa* a montré son potentiel, entraînant une toxicité réduite et l'expression d'épitopes plus « intacts » par rapport à la fixation au formaldéhyde. En effet, elle a stimulé la production d'anticorps opsonisant (IgG1 et IgG2a) et induit des IgG3 à des stades plus tardifs et des IgM à des stades plus précoces chez la souris<sup>405</sup>. Dans une étude récente, Sen-Kilic *et al.* ont examiné les corrélats mécanistes de la protection d'un vaccin dénaturé à la chaleur, avec ajout de curdlan comme adjuvant stimulant la voie Th1/Th17, et administré par voie intranasale<sup>406</sup>. Le vaccin a réduit de manière significative les charges bactériennes dans les voies respiratoires après challenge intranasale à *P. aeruginosa* et a augmenté les titres d'anticorps spécifiques. Pour étudier le rôle des cellules B et T au cours de la vaccination (avant le prime et le boost), des déplétions anti-CD4, -CD8 et -CD20 ont été réalisées. La déplétion des cellules B CD20<sup>+</sup>, mais pas des cellules T CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>, a entraîné une perte de la clairance bactérienne médiée par le vaccin. De même, l'immunisation passive avec du sérum de souris du groupe vacciné a protégé à elle seule des souris naïves contre un challenge à *P. aeruginosa* LPS-homologue, confirmant le rôle des anticorps dans l'élimination de *P. aeruginosa*. Ils ont observé qu'en l'absence de production d'anticorps dépendant des cellules T, les souris vaccinées étaient toujours capables de réduire les charges bactériennes. L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de la réponse immunitaire humorale pour la protection contre *P. aeruginosa* et suggère que la production d'anticorps indépendants des

lymphocytes T peut être suffisante pour la clairance bactérienne induite par la vaccination contre *P. aeruginosa*. En même temps, dans cette étude, ils n'ont pas pu observer de réponse cellulaire puisqu'ils utilisent un vaccin dénaturé à la chaleur. Il serait très intéressant de refaire l'expérience avec la bactérie Morte mais métaboliquement active *P. aeruginosa*.

Des vaccins vivants-atténués ont également été développés. Un mutant de délétion *aroA* de *P. aeruginosa* (PAO1 $\Delta$ *aroA*), qui est déficient dans la synthèse des acides aminés aromatiques, était plus sûr et a augmenté les titres d'anticorps opsonisants, principalement dirigés contre l'antigène O<sup>407</sup>, et cinq des sept protocoles testés ont engendré une protection de 100 % contre les souches homologues de LPS dans un modèle de pneumonie létale aiguë chez la souris<sup>400</sup>. La souche PAO1 $\Delta$ *aroA* immunise de manière passive et active vis-à-vis des protéines de la membrane externe et est efficace dans un modèle d'infection murin de la cornée<sup>408</sup>. Un autre vaccin vivant-atténué construit avec la souche PA14 (PA14 $\Delta$ *aroA*) a protégé des souris et des lapins contre une pneumonie létale causée par des souches hétérologues de LPS<sup>409</sup>. La vaccination mucosale avec un vaccin multivalent composé de souches de *P. aeruginosa* vivantes-atténuées, dont PAO1 $\Delta$ *aroA*, a stimulé une réponse multifactorielle, impliquant à la fois des éléments humoraux et cellulaires sans provoquer d'interférence immunologique<sup>410</sup>. Récemment, Cabral *et al.* ont utilisé une souche auxotrophe vivante (PAO1 $\Delta$ *murI*) dépourvue d'une enzyme impliquée dans la biosynthèse du D-glutamate, un composant essentiel du peptidoglycane. Des réponses à la fois humorales et cellulaires ont été déclenchées lorsqu'elles ont été administrées par voie intranasale dans un schéma de vaccination à deux doses, ce qui a conduit à un taux de survie de 86 à 88 % dans un modèle de pneumonie létale<sup>411</sup>.

La voie Th17 s'est avérée essentielle pour parvenir à l'éradication de *P. aeruginosa*<sup>409</sup> et certaines protéines telles que PopB, FpvA, FptA, OprL et PilQ ont été identifiées comme capables de provoquer une forte sécrétion d'IL-17<sup>189</sup>. De plus, la protéine PopB purifiée, appartenant au translocon de T3SS, a généré une forte réponse Th17 contribuant à une augmentation de la clairance de *P. aeruginosa* dans les poumons et la rate après un challenge infectieux. Ainsi, un nouveau candidat vaccin qui conduirait à une production humorale contre les LPS et d'autres antigènes, déclencherait l'opsonisation par des anticorps et en même temps stimulerait les effecteurs de l'immunité cellulaire, parmi lesquels les lymphocyte Th17, serait d'un intérêt majeur. Cependant, à l'heure actuelle, les bactéries vivantes-atténuées conservent une virulence suffisante pour les rendre inacceptables pour les vaccins humains.

En résumé, malgré de nombreux essais cliniques sur différentes cibles antigéniques (Figure 37), ces vaccins n'ont pas réussi à protéger les patients atteints de la mucoviscidose, principalement en raison de la plasticité phénotypique du *P. aeruginosa* et peut-être aussi à cause de défauts de conception des essais cliniques<sup>412</sup>.

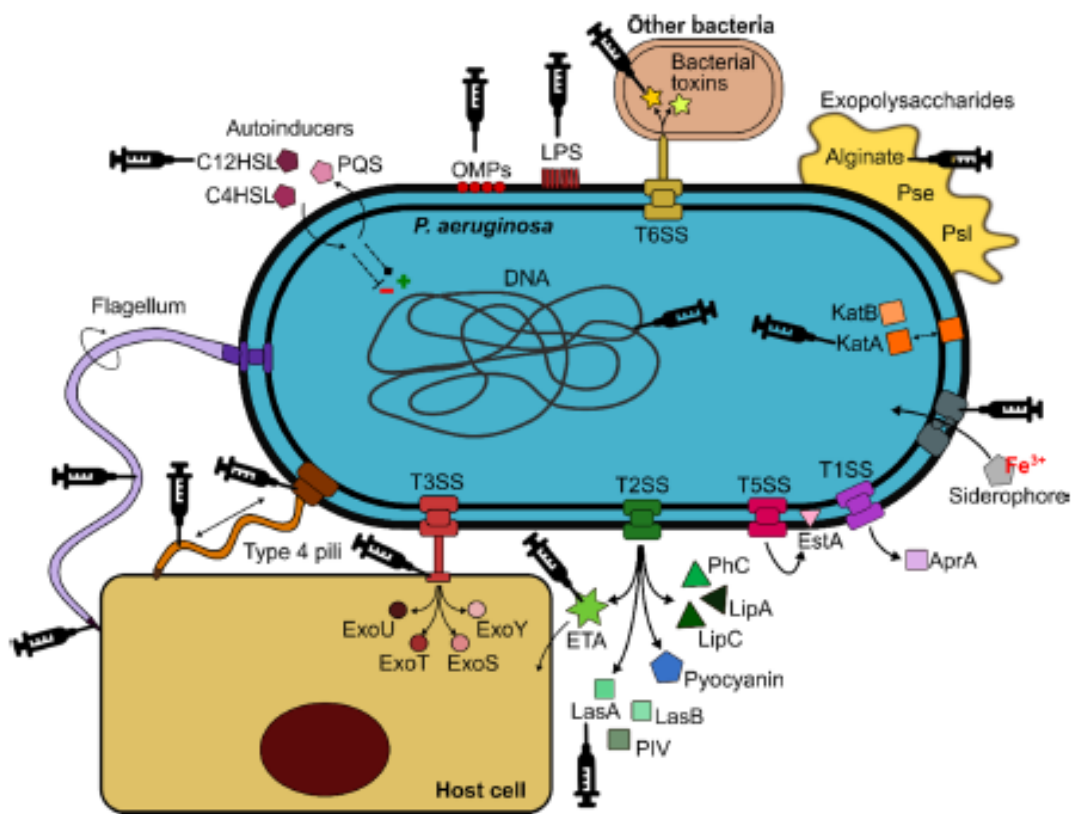


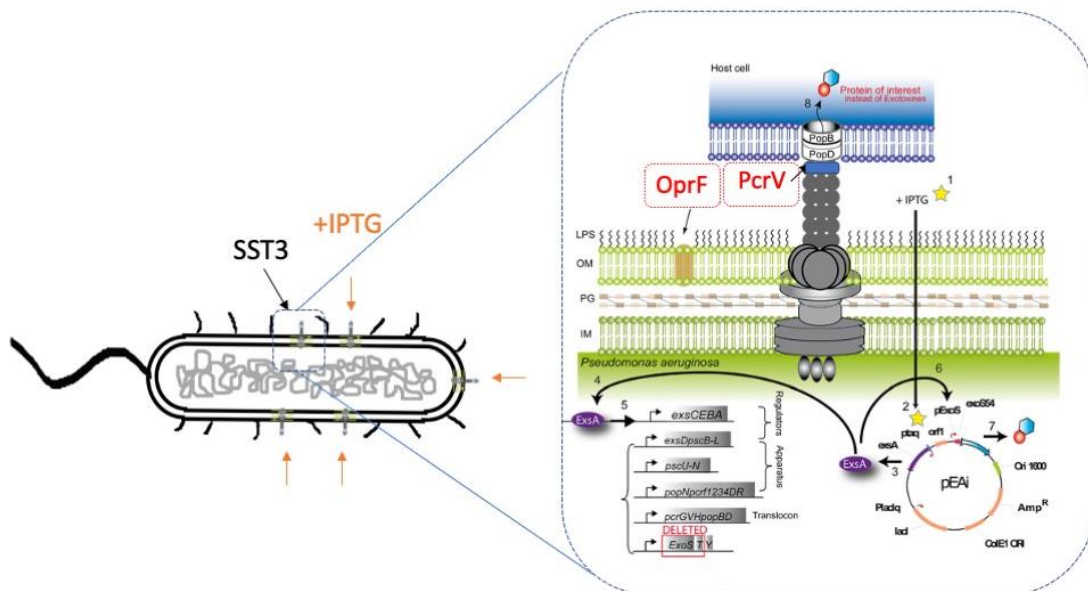
Figure 37: Présentation de l'ensemble des cibles antigéniques envisagées pour le développement d'un vaccin anti-*P. aeruginosa*. D'après la revue de Sainz-Mejías *et al.* 2020<sup>365</sup>

#### 6.3.4.2. Présentation de mes travaux sur BacVac en tant que vaccin anti-*P. aeruginosa*

Les travaux que nous avons menés sur la sécurisation de la souche vaccinale *P. aeruginosa* MMA, nous ont incité à la tester en tant que vaccin contre *P. aeruginosa* (Meynet *et al.* 2018). Comme nous venons de le voir, aucun vaccin n'a encore réussi à ce jour à passer la phase 3 et n'a ainsi pu obtenir l'autorisation des instances réglementaires. Il a été largement débattu que seul un vaccin qui provoquerait des réponses immunitaires à médiation humorale et cellulaire serait protecteur et pourrait aider à éliminer *P. aeruginosa*<sup>2,413-418</sup>.

Pour évaluer le potentiel vaccinal de *P. aeruginosa* MMA, nous avons vacciné les souris par voie *s.c.* 3 fois à 14 jours d'intervalle et les sérums ont été récoltés 3 semaines après la dernière

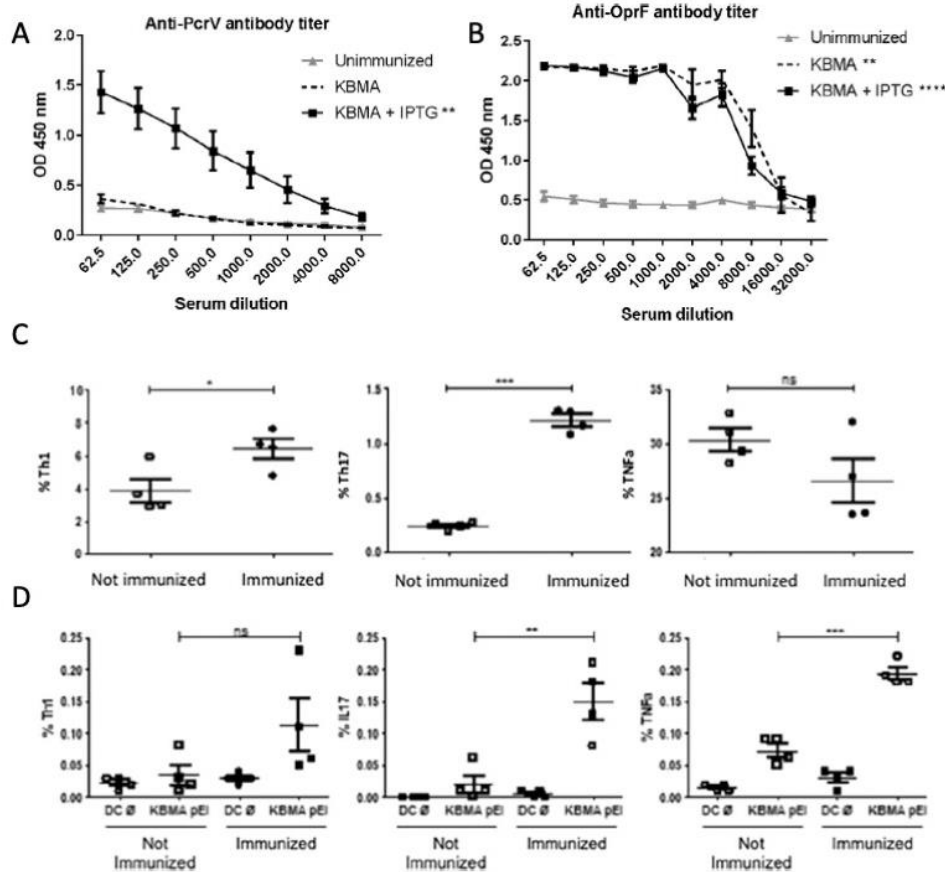
injection. Nous avons utilisé la souche de *P. aeruginosa* transformé avec le plasmide pEi contenant une copie épisomale du gène *exsA*, codant pour l'activateur majeur de SST3, sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'isopropyl β-D-1- thiogalactopyranoside (IPTG) (ptaq) (Figure 38). Lorsqu'il est cultivé en présence d'IPTG, ce plasmide garantit la formation contrôlée des complexes macromoléculaires SST3 préassemblés et donc de toutes les protéines du SST3, y compris PcrV, à la surface de la bactérie, avant l'injection dans l'hôte. Chez les souris immunisées, le vaccin *P. aeruginosa* MMA + IPTG a permis d'obtenir un titre d'anticorps anti-PcrV significatif (1/16 000) ( $p = 0,0011$ ) par rapport au contrôle PBS (Figure 39A), contrairement au vaccin *P. aeruginosa* MMA sans IPTG ( $p = 0,9591$ ). *P. aeruginosa* MMA et *P. aeruginosa* MMA + IPTG ont produit un titre significatif d'anticorps anti-OprF (1/4000) ( $p = 0,0015$  et  $p < 0,0001$  respectivement) par rapport au contrôle PBS (Figure 39B).



**Figure 38 :** Schéma de fonctionnement du vaccin *P. aeruginosa* (BacVac). Contrôle de l'expression du SST3 et de l'antigène d'intérêt de la souche vaccinale BacVac par l'ajout de l'inducteur, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), qui permet l'activation de l'expression d'ExsA, activateur transcriptionnelle principal du SST3 (gène présent sur le plasmide pEai354). Site multiple de clonage dans le plasmide pEai permettant la fusion transcriptionnelle de *exoS*<sub>1-54</sub> et un gène d'intérêt.

Ainsi, l'ajout d'IPTG pendant la préparation du vaccin a permis une immunisation efficace qui s'est traduite par un rendement significativement plus élevé d'anticorps spécifiques anti-PcrV et anti-OprF. Il a déjà été démontré que des titres élevés d'anti-PcrV peuvent aider à protéger contre les infections de *P. aeruginosa*<sup>419-421</sup>. OprF est également un facteur de virulence majeur de *P. aeruginosa* et, surtout, cette porine membranaire est conservée et donc présente quelque soit le sérotype<sup>422,423</sup>.

Pour savoir si le vaccin *P. aeruginosa* MMA induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire spécifique, les splénocytes des souris vaccinées avec *P. aeruginosa* MMA + IPTG ont été prélevés (n = 6) 5 jours après le dernier rappel. Les fréquences des cellules T auxiliaires, définies comme CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, ont été évaluées par cytométrie en flux et marquage intracellulaire des cytokines (Figure 39).



**Figure 39 :** Induction d'une réponse humorale polyvalente anti PcrV et anti-OprF et d'une immunité cellulaire spécifique de type Th1 et Th17. Des tests ELISA ont été effectués sur des sérums de souris immunisées avec *P. aeruginosa* MMA (n = 6) ou *P. aeruginosa* MMA + IPTG (n = 18) et de souris non immunisées (n = 18) collectés 3 semaines après la dernière immunisation. **A.** PcrV et **B.** OprF comme antigènes cibles. Des tests non paramétriques non appariés de Mann-Whitney ont été utilisés pour l'analyse statistique. Les barres d'erreur correspondent au SEM. DO450 nm seuil de positivité de 0,26 pour PcrV et 0,51 pour OprF. DO : densité optique. **C.** Une stimulation non spécifique à la PMA/ionomycine a permis de révéler la fréquence des T auxiliaire produisant de l'IL17 (Th17), produisant de IFN- $\gamma$  mais pas de l'IL17 (Th1) produisant du TNF- $\alpha$ . **D.** Réponse immune spécifique anti-*Pseudomonas aeruginosa*. Des CDs syngéniques, DC2.4, présentant les antigènes spécifiques de *P. aeruginosa* car pré-incubées ou non toute la nuit avec *P. aeruginosa* MMA + IPTG, ont été utilisés pour stimuler les rates de souris immunisées ou non. Les CDs non exposées aux bactéries (appelées DC Ø) ont été utilisées comme condition de stimulation négative pour déterminer le bruit de fond. La fréquence moyenne et erreurs standards des cellules T auxiliaires Th17, Th1 et TNF- $\alpha$  est représentée pour les souris non immunisées et les souris immunisées avec le vaccin *P. aeruginosa* MMA + IPTG. Les différences entre les deux groupes sont indiquées par un test t non apparié (\* p < 0,05, \*\*p < 0,005, \*\*\*p < 0,0005, \*\*\*\*p < 0,0001).

Tout d'abord, nous avons testé la présence de différents sous-types de cellules T auxiliaires chez les souris après la vaccination, indépendamment de leur reconnaissance immunitaire spécifique

par une stimulation globale au PMA. Nous avons observé une augmentation significative de la fréquence des cellules T auxiliaires de type Th1 ( $p < 0,05$ ) et Th17 ( $p < 0,0005$ ) chez les souris immunisées avec *P. aeruginosa* MMA par rapport aux souris non immunisées, mais aucune augmentation significative des cellules T auxiliaires productrices de TNF- $\alpha$  (Figure 39C). Nous avons ensuite procédé à une analyse spécifique de la reconnaissance d'un antigène spécifique de *P. aeruginosa* par les lymphocytes T auxiliaires des souris vaccinées. Nous avons pour cela utilisé des CDs incubées *in vitro* avec la bactérie *P. aeruginosa* MMA+IPTG, puis nous avons co-incubé ces cellules « activées » avec des splénocytes de rate des groupes de souris immunisées ou non. Ainsi, dans cette expérience, la production de cytokines par les cellules T auxiliaires permet d'analyser les réponses immunitaires spécifiques d'antigènes de *P. aeruginosa*. Comme prévu, les CD qui n'ont pas été exposés aux bactéries ont été incapables de stimuler les cellules T auxiliaires de souris non immunisées, ce qui prouve l'absence de cellules T auxiliaires spécifiques des antigènes *P. aeruginosa* en l'absence de vaccination (Figure 39D). Au contraire, les splénocytes de souris immunisées stimulées par des CDs présentant des antigènes de *P. aeruginosa* ont montré des fréquences élevées significatives de cellules T auxiliaires Th17 et TNF- $\alpha$  par rapport aux splénocytes de souris non immunisées ( $p < 0,005$  et  $p < 0,0005$  respectivement). Les cellules T de la rate des souris immunisées stimulées par des CD et non exposées aux bactéries n'ont pas induit de production de cytokines, prouvant une absence de stimulation non spécifique (Figure 39D). Nous avons donc observé une stimulation des lymphocytes T auxiliaires uniquement chez les souris immunisées et stimulées par les CDs. En résumé, ces données confirment que le vaccin *P. aeruginosa* MMA suscite une réponse immunitaire spécifique des cellules T avec de multiples voies, y compris les sous-types Th17 et Th1 et les cellules T CD4<sup>+</sup> productrices de TNF- $\alpha$ . Dans l'ensemble, la présence de cytokines et de chémokines associées à une stimulation spécifique des cellules T chez les souris immunisées, en particulier la présence d'IL-17, ainsi que de cellules T de type Th17, est très encourageante pour l'utilisation du vaccin *P. aeruginosa* MMA comme vaccin efficace pour protéger contre *P. aeruginosa*.

En conclusion de ces travaux, nous avons utilisé la bactérie *P. aeruginosa* entière comme vecteur vaccinal, car elle permet la présentation de l'ensemble du répertoire antigénique aux cellules immunitaires de l'hôte, imitant ainsi ce qui se passe lors des infections à *P. aeruginosa*. Le traitement photochimique MMA, atténuant la toxicité de la souche, permet d'envisager une utilisation chez l'homme puisque le vaccin *P. aeruginosa* MMA induit une réponse immunitaire

humorale contre plusieurs antigènes pertinents de *P. aeruginosa* et cellulaire de type Th1 et Th17.

**Bilan :** Ces travaux ont fait l'objet d'1 publication (P21 : [Meynet et al. 2018](#)).

### 6.3.5. Stratégies de modulation du microbiote

Nous avons vu dans la partie 1 de nos travaux de recherche, que les métabolites et donc l'environnement chimique dans l'intestin est crucial pour le maintien de l'homéostasie immunitaire. En cas de dysbiose, l'abondance relative de certaines espèces bactériennes peut altérer les concentrations de tels ou tels métabolites et entraîner un dérèglement de l'immunité. Au laboratoire TIMC, et dans notre équipe en collaboration avec d'autres équipes du TIMC (Équipe SYNABI par exemple), nous avons envisagé restaurer cet équilibre par différents moyens.

- **Projet SentinHealth (Resp. Pr P. Cinquin):** Le principe de ce projet repose sur le développement d'un taenia artificiel, un dispositif médicale posé lors d'un acte chirurgical (par exemple lors de la pose d'un anneau gastrique chez la personne obèse) sur lequel on cultive en amont un microbiote issu d'un individu sain. L'idée étant de réaliser une greffe de microbiote en offrant le support (comme une ancre ou éponge marine) facilitant la croissance et surtout facilitant la persistance des microorganismes.

**Bilan :** Nous avons déposé un brevet sur le dispositif médical et son application potentiel en clinique (Brevet [B2 WO2016156612](#)).

- **Prébiotiques (Wood for Health and Nutrition) :** Les hémicellulose du bois sont des déchets non utilisés dans l'industrie papetière. La filière du bois sur le bassin grenoblois est historique et a besoin d'aide pour subsister. Fournir des produits à haute valeur ajoutée dans la chaîne de valeur de la papeterie permettrait de sauver des emplois du secteur. Nous avons travaillé en collaboration avec le laboratoire LGP2 (Pr C. Chirat) et démontré le potentiel de l'extraction de certaines molécules qui peuvent être d'excellents prébiotiques dans un modèle préclinique murin ([Deloule et al. 2020](#)). Les fractions contenant les glycanes précipités à l'éthanol à partir de l'autohydrolysats d'hémicellulose de résineux ont été capables de stimuler *in vitro* la croissance de *d'E*.

*coli* et *Bifidobacterium adolescentis*. *B. adolescentis* était le meilleur producteur d'acides gras à chaînes courtes (AGCs). Lorsque les souris ont été nourries avec la fraction prébiotique, l'abondance relative des *Bacteroidetes* a augmenté tandis que celle des *Proteobacteria* a diminué, suggérant un changement vers un microbiome moins obésogène. Après le traitement, l'analyse des lipides a montré une diminution du cholestérol, des acides biliaires et des acides gras libres, indiquant un rôle potentiel de cardio-protection. De plus, l'analyse des métabolites de fermentation, et de la voie du tryptophane (kynurénine, acide kynurénique, etc...) a révélé une augmentation des métabolites importants pour une bonne « santé immunitaire ». Nos résultats mettent en évidence la valeur des hémicelluloses comme source potentielle de prébiotiques favorisant à la fois la santé du tube digestif et du système immunitaire.

Nous avons montré dans cette étude que l'administration d'un prébiotique par voie orale à des souris dans l'eau de boisson modifie la flore ([Deloule et al. 2020](#)). Il serait intéressant de pousser les investigations dans des modèles pathologiques. Une startup dénommée « Wood for Health and Nutrition » a pour ambition de produire ces hémicelluloses fractionnées et purifiées extraits à des fins de prébiotiques.

**Bilan :** Ces travaux m'ont permis d'être autrice d'1 publication (P27 : [Deloule et al. 2020](#)).

- Probiotiques et biomédicaments vivants :

Enfin, récemment nous avons élargi notre arsenal de modulation du microbiote à l'utilisation de probiotiques. L'utilisation de bactéries en tant que « biomédicaments vivants » comme nous l'avons vu pour l'immunothérapie active représente une voie de recherche vers des solutions thérapeutiques extrêmement prometteuses. En effet, le « biomédicament vivant » est défini comme issu de source naturelle, et vivant, et constitue une nouvelle génération de médicaments à fort potentiel thérapeutique <sup>424</sup>. Les biomédicaments vivants sont des probiotiques avec des allégations de santé, validés dans un protocole de recherche clinique. Leur développement est devenu possible grâce aux dernières avancées scientifiques et technologiques et notamment à l'avancée des connaissances dans le domaine des interactions des micro-organismes constituant un microbiote mais aussi dans les interactions entre les micro-organismes et l'hôte, notamment via leurs métabolites <sup>425</sup>. Par exemple, l'explosion de la commercialisation des probiotiques illustre en partie le besoin des patients et le bénéfice qu'ils éprouvent à consommer ces bactéries. Leur développement pour des applications en santé en tant que des « pharmabiotiques

médicaux” ne sera possible que par une meilleure connaissance de leur effet positif sur le microbiote intestinal et *in fine* sur l’organisme (au niveau digestif, métabolique et immunitaire). Voir nos travaux en cours avec la thèse de C. Caffaratti depuis Septembre 2019 dans la partie VII. Perspectives

## 7. Projet de recherche (perspectives)

Dans la continuité de mes travaux précédents, je souhaite dans un premier temps, continuer l'étude du dialogue entre l'hôte et ses pathogènes, médié par les métabolites, en m'appuyant sur mes connaissances de la physiopathologie des infections chroniques à *P. aeruginosa* et de la métabolomique. Mais également continuer à concevoir des applications médicales pertinentes pour les patients.

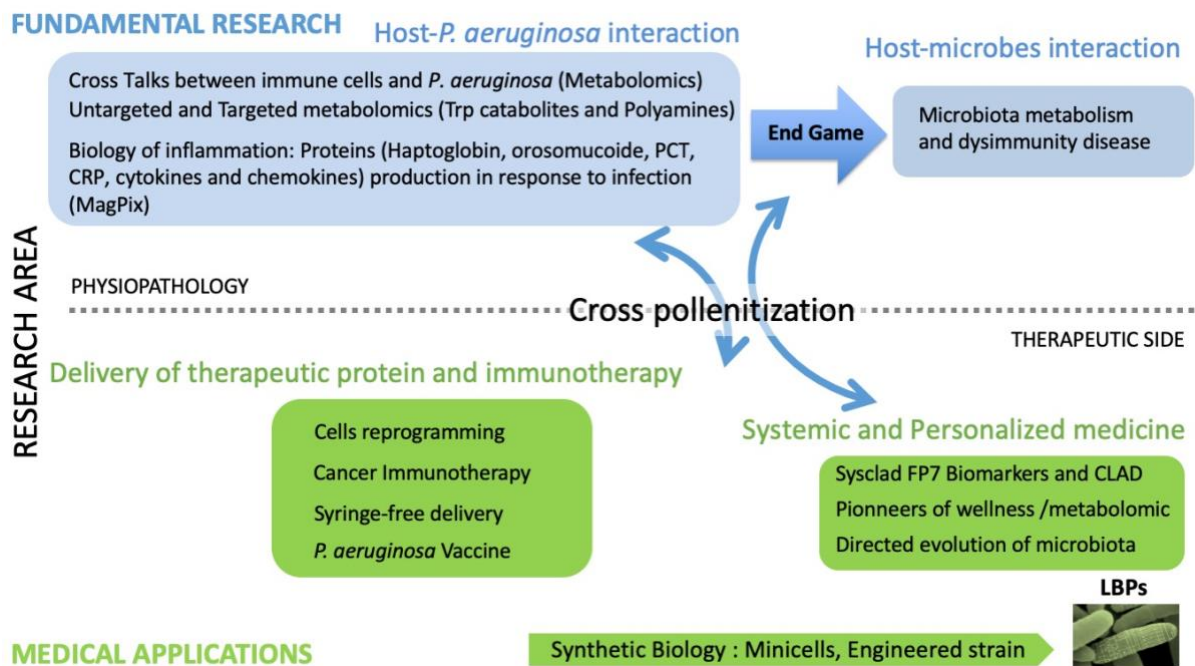


Figure 40 : Mon plan de recherche pour les 5-10 ans à venir. Comme illustré dans ce mémoire, je pars de l'étude fondamentale du dialogue moléculaire entre l'hôte et un pathogène *P. aeruginosa*, pour *in fine* essayer de mieux comprendre l'impact du métabolisme des microbes et son implication dans la dysimmunité chez l'Hôte. J'envisagerai toujours la possibilité de développer des applications médicales avec une volonté forte de développer un vaccin anti-*P. aeruginosa* parmi d'autres applications médicales.

## 7.1. Physiopathologie des infections à *P. aeruginosa*

### **Approche métabolomique pour l'étude de l'évolution adaptative de *P. aeruginosa* au cours des infections pulmonaires chroniques chez le patient atteint de mucoviscidose - Équipe TrEE, TIMC**

*Collab Internationales (Dr Rob Quinn, université Michigan ; Pr P. Dorrestein, Université de Californie de San Diego) et nationale (Pr Fenaille et Dr Castelli, LEMM CEA Saclay, Pr I. Attree et Dr E. Faudry laboratoire BBSI CEA Grenoble) et locale avec les cliniciens du CRCM (Pneumologie CHUGA).*

Les avancées thérapeutiques et l'organisation de la prise en charge au sein des CRCM ont permis une amélioration globale de la prise en charge de la mucoviscidose. L'espérance de vie des patients est passée de 36 ans en 2006 à plus de 50 ans aujourd'hui. Les thérapies protéiques qui ont marqué cette progression ne ciblent que certaines mutations et ne concernent pas tous les patients. La morbidité, la mortalité et le coût social de la mucoviscidose restent encore considérables. En particulier, les exacerbations d'infection modulent le pronostic de la maladie. Nous nous intéressons à la dysbiose, qui est l'association d'un déséquilibre de la composition et des fonctions des communautés microbiennes commensales complexes, et d'une altération de la réponse immunitaire de l'hôte. Elle est impliquée dans le développement de pathologies chroniques pulmonaires comme la mucoviscidose. Le microbiote pulmonaire et les réponses de l'hôte s'influencent mutuellement, et des données suggèrent que les modifications des interactions microbiote-hôte jouent un rôle majeur dans l'évolution des maladies respiratoires chroniques. La réponse de l'hôte peut être mesurée partiellement par des marqueurs protéiques de l'inflammation ou de métabolites régulateurs de l'inflammation (métabolites du tryptophane par exemple).

Comme nous l'avons vu, nous avons utilisé la métabolomique non ciblée pour étudier les molécules de dialogue entre *P. aeruginosa* et son hôte, dans un modèle d'infection chronique chez les patients atteints de mucoviscidose (financements par Vaincre la mucoviscidose RF20180502189 et RF20190502416 pour un montant total de 90.000 €). Oriane Moyne, a participé à la rédaction de 3 articles sur cette thématique sous ma supervision et soutenu sa thèse publiquement le 29 mars 2019. Nous allons poursuivre ces travaux et étudier l'importance des polyamines dans la virulence de *P. aeruginosa*. Nous venons d'obtenir un nouveau financement de VLM 2021 Grant# RF20210502854. Razak Tidjani, Post doctorant dans l'équipe depuis Février 2021 (sous ma direction), identifie les déterminants de l'évolution

de la production des polyamines chez *P. aeruginosa* en utilisant une approche holistique de biologie des systèmes : génomique comparative, transcriptomique en complément des données de métabolomique obtenues sur les 64 isolats de *P. aeruginosa*. Il complètera par des analyses *in vitro* de l'étude de l'impact de la production des polyamines sur la virulence de *P. aeruginosa* par construction de mutants de délétion, complémentation, mesure de la concentration des différentes molécules des voies de polyamines par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse et test de cytotoxicité *in vitro*, mesure de la croissance (en présence d'inhibiteur spécifique des voies métaboliques), etc....

La plupart des études sur le microbiote se focalisent sur le microbiome (ensemble des génomes bactériens, fongiques et des virus) qui représente un cofacteur important dans la dégradation de la fonction respiratoire chez le patient CF. Nous pensons qu'au-delà des aspects génétiques, il est nécessaire d'étudier l'expression des protéines et donc des enzymes, et qu'*in fine* l'étude du métabolome permettra d'identifier des métabolites « bioactifs » qui contribue plus que d'autres à la virulence d'un pathogène. Nous avons un projet de recherche clinique « Dysbiose » qui consiste à suivre prospectivement une cohorte de patients mucoviscidoseux en colligeant les données cliniques, microbiologiques et métabolomique de façon trimestrielle et à l'occasion des épisodes d'exacerbations (CPP accepté et recrutement en cours). Enfin, nous sommes en train d'étudier à travers la thèse de C. Plazy, les métabolites produits et sécrétés par *P. aeruginosa* qui ont un impact sur la maturation des CD, la synapse immunologique entre les CD et les LT, que l'on mesure par l'étude de la polarisation des T. Et nous sommes en train d'écrire une revue de la littérature sur les métabolites de dialogue entre *P. aeruginosa* et les cellules de l'immunité du poumon.

- **Nature du projet** : Nous essayons de mieux comprendre les liens entre dysbiose, métabolites, inflammation et exacerbations chez les patients muco afin d'améliorer leur prise en charge thérapeutique.

- **Résultats attendus** : Mise en évidence de métabolites du cross-talk entre microbiote et immunité en lien avec la dysbiose et la dégradation de la fonction respiratoire des patients.

## 7.2. Ingénierie microbienne à visée thérapeutique

La biologie de synthèse ou comment réinventer le vivant pour différentes finalités est un domaine en pleine effervescence. L'avènement récent d'outils performants de biologie moléculaire permettant notamment l'édition des génomes à façon ouvre de nouvelles perspectives. Il est désormais tout à fait envisageable de modifier le vivant, par exemple en réduisant le génome bactérien à son strict minimum ou encore en lui donnant de nouveaux attributs pour des applications thérapeutiques<sup>426</sup>. Le biomédicament vivant (ou « Life Biological Product » ou LBP), médicament issu de source naturelle, et vivant, constitue une nouvelle génération de biomédicaments issus de ces avancées technologiques. Il est urgent d'étudier l'impact de la conception de telles innovations tout en continuant d'en maîtriser la conception. Certains ont bien compris que la maîtrise de la propagation de ces organismes génétiquement modifiés dans l'environnement est en enjeu majeur notamment pour le développement futur de bactéries à des fins de bioremédiation des sols ou bien encore en thérapeutique humaine soit en tant que probiotiques ou de vaccins innovants chez l'homme. Sont ainsi développées des stratégies de dépendance des souches aux acides aminés synthétiques<sup>427,428</sup>. L'équipe TrEE fait partie des premières équipes française à avoir développé des bactéries ingénierées pour des applications dans le domaine médical, que ce soit en immunothérapie des cancers<sup>331,340,343,429</sup>, pour des vaccins innovants, pour la reprogrammation cellulaire<sup>351</sup> ou encore plus récemment comme modulateurs du microbiote intestinale (brevet B2 WO2016156612). Nous avons modifié génétiquement, en plusieurs étapes, une souche de *P. aeruginosa* pour la rendre sensible à un traitement photochimique afin qu'elle soit incapable de se diviser et donc de se propager dans l'environnement. Grâce à ce traitement nous obtenons une souche atténuée dite « morte mais métaboliquement active » (B1 : brevet international WO2013087667)<sup>429</sup>. Nous avons également conçu un système de régulation génétique de son SST3, outil naturel assimilable à une micro-seringue, de manière à piloter l'injection de protéines d'intérêts thérapeutiques et ce à des fins d'immunothérapies des cancers (2 brevets B1 et B3). Conscients de l'importance que vont prendre ce type de biomédicaments vivants (probiotiques, vaccins et autres...) à l'avenir, nous souhaitons, afin de mieux diriger rationnellement leur conception, étudier les relations inter-règne de ces biomédicaments vivants avec l'homme. Nous visons plus particulièrement les applications à visée d'immunothérapie grâce à des approches intégratives d'étude et de modélisation (métabolomique ciblée et non ciblée, etc...) des influences d'un microorganisme sur l'immunité de l'hôte receveur.

### **7.2.1. Développement d'un vaccin anti-*P. aeruginosa***

*Projet conduit par Sarah Thiroux, post doctorante de l'équipe TrEE.*

Nous avons envisagé l'utilisation de la bactérie *P. aeruginosa* MMA comme solution vaccinale innovante contre *P. aeruginosa*. J'ai encadré une étudiante médecin pneumologue, Elodie Meynet. Nous avons breveté (B3) et publié un article dans « Vaccine » durant son année recherche. Ce projet vient d'être accepté pour un soutien par la SATT Linksium pour une maturation du projet (221.025 €). Nous avons recruté Sarah Thiroux, post doctorante, pour un contrat de maturation du projet MMAVax pour 2 ans. Le projet consiste à démontrer la mise à l'échelle de production compatible avec l'industrie pharmaceutique. Nous optimisons également le procédé de manière à ne pas avoir à manipuler la culture lors de l'ajout du psoralen et de l'exposition aux UVA. Il faut poursuivre la démonstration de l'innocuité, de la non dissémination, de l'efficacité de la vaccination et ce même vis-à-vis de souche LPS hétérologue ou pertinentes d'un point de vue clinique. Nous pourrions utiliser les souches cliniques récemment collectées dans le projet de thèse d'Oriane Moyne.

### **7.2.2. Développement d'un probiotique ingénieur**

*Projet de thèse de Clément Caffaratti, doctorant en 2<sup>ème</sup> année en co-direction avec B. Toussaint*

Mon autre objectif sera aussi d'étudier d'un point de vue plus fondamental les molécules de dialogues entre ces LBP et l'immunité de l'hôte pour aider à la conception rationnelle de biomédicaments vivants de nouvelles générations moins immunogènes et plus efficaces pour l'immunothérapie. Des travaux récents montrent que l'on peut augmenter l'immunité des lymphocyte T V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 d'un vaccin basé sur l'utilisation de souche de Salmonelle vivante atténuée en pratiquant de l'ingénierie métaboliques des souches (augmentant par exemple la production de 4-hydroxy-3-méthyl-but-2-enyl pyrophosphate)<sup>430</sup>. Nous avons vu que nous sommes en capacité de modifier les voies métaboliques de production de métabolites des kynurénines, impliqués dans la tolérance immunitaire de l'hôte en situation pathologique (cancer et/ou infections chroniques). Nous continuerons d'étudier et de modéliser (en utilisant la métabolomique, et des outils de modélisation des réseaux métaboliques (projet ANR « Artificial Metabolic Networks », collaboration Jean Louis Faulon Budget 500 kEuros) à partir de nos données issues de nos expériences. Par ailleurs, pour identifier de nouvelles voies métaboliques importantes nous utiliserons également la métabolomique non ciblée par spectrométrie de masse haute résolution dans un modèle d'interaction *in vitro* entre ces LBPs et des cellules de l'immunité humaine et dans un modèle animal d'interaction LBP-hôte.

Nous utilisons la souche *E. Coli Nissle* 1917 (commercialisée sous le nom de Mutaflor chez ArdeyPharm). Nous réalisons de l'ingénierie métabolique de la souche pour potentialiser ses effets anti-inflammatoire intrinsèques par l'ajout ou la suppression de voies métaboliques d'intérêts. Avec l'arrivée de C. Caffaratti en thèse le 1/09/2019, nous avons modifié la souche *E. Nissle 1917* pour lui faire surproduire de la spermidine, molécule possédant entre autres des propriétés anti-immunosenescence et anti-inflammatoire. En effet, la spermidine possède des propriétés anti-inflammatoires sur des monocytes en jouant sur l'augmentation de la production et de l'activité de la Protein Tyrosine Phosphatase Non- Receptor Type 2 (PTPN2), enzyme impliquée dans l'inhibition de la voie de transduction de l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>301</sup>. Par ailleurs, la spermidine a la capacité d'induire la différenciation de lymphocyte T naïf (Th0) en T<sub>reg</sub> FOXP3<sup>+</sup>, mais également a la capacité d'augmenter la production d'IL-17A par les lymphocytes Th17 et d'augmenter la quantité de cellules T présentant la double signature ROR $\gamma$ t et FOXP3<sup>+</sup>. Les cellules T ROR $\gamma$ t FOXP3<sup>+</sup> ont été décrites pour leurs propriétés anti-inflammatoires puissantes<sup>431</sup>. La supplémentation orale en spermidine a diminué les signes de l'inflammation chez des souris présentant une colite induite dans deux modèles différents (colite induite par transfert de T ou dextran sodium sulfate).

En complément de ces activités, je vais être co-directrice de la thèse d'Alexandre Tronel dès septembre 2021. Thèse qui porte sur l'étude clinique d'une capsule de capture du liquide luminal pour l'analyse du microbiote intestinal. Analyse de l'environnement chimique par analyse métabolomique non ciblée en complément de l'analyse métagénomique. Thèse CIFRE avec la société Pélican Health et son directeur Thomas Soranzo.

### **7.3.Mise en œuvre du projet de recherche : renforcer le développement de la métabolomique**

Afin de pouvoir étudier les molécules de dialogue de l'interaction hôte pathogène, il est absolument indispensable de maîtriser les méthodes d'étude des métabolites. L'avènement récent de la métabolomique permet, comme cela a été le cas avec le microscope optique autrefois pour les bactéries, d'envisager l'étude la plus exhaustive possible des molécules de ce dialogue.

#### **7.3.1. Projet Grenoble Excellence in Metabolomics and Lipidomics (GEMELI)**

Le projet GEMELI est un projet scientifique structurant qui vise à doter le site Grenoblois d'une capacité de réalisation d'études de métabolomique dans le domaine de la santé et en recherche

clinique en intégrant l'équipement et l'expertise indispensable en analyse des données de métabolomique dans la perspective du développement de la biologie et médecine systémique. Le plateforme GExiM que nous dirigeons avec le Pr Toussaint, repose sur l'utilisation de la spectrométrie de masse pour réaliser des analyses de métabolomique. Il existe une plateforme reposant sur la résonance magnétique nucléaire portée par Mme B. Elena Herrmann et une plateforme de lipidomique dirigée par C. Botté.

**7.3.1.1. Contexte : La médecine du futur s'oriente vers une prise en charge prédictive, personnalisée et préventive.**

La médecine de précision (terme anglo-saxon) ou la médecine 4P (concept inventé par L. Hood, qui définit l'approche prédictive, préventive, personnalisée et participative) sont des visions très proches du futur de la pratique médicale qui se caractérise par une approche proactive et non plus réactive de la médecine. Nous avons en effet atteint les limites d'une pratique réactive de la médecine, intervenant le plus souvent une fois la maladie déclarée et proposant des solutions générales qui, si elles ont fait leurs preuves pour le traitement des pathologies aiguës et/ou dans les maladies transmissibles, ne sont pas adaptées à la prise en charge des maladies chroniques et des cancers responsables de l'immense majorité des décès et coûts de santé en France. Au contraire, la pratique proactive de la médecine nécessite la prise en compte de la complexité des systèmes biologiques, leurs évolutions pathologiques et leur environnement par des approches systémiques combinant expérimentation et modélisation. Il s'agit donc d'une approche émergente pour la prévention et le traitement des pathologies qui intègre la variabilité individuelle de chaque personne non seulement dans ses gènes, mais aussi dans son mode de vie, son environnement, sa nutrition ou dans les populations microbiennes qui l'habitent (microbiote). En particulier dans les maladies chroniques ou le cancer, la prédiction au niveau d'un patient de la trajectoire d'évolution de sa pathologie (ou de la transition vers un état pathologique) permettra d'adopter une stratégie préventive ou curative personnalisée bien mieux adaptée. La réussite de la médecine du futur réside donc dans la capacité à avoir une approche dite « systémique » dans laquelle on intégrera de manière non restrictive l'ensemble des données biologiques ou autres concernant le patient. En recherche plus amont, ces approches dites holistiques, c'est à dire qui intègre toute la complexité, sont également en plein développement dans le domaine de la compréhension des phénomènes physiopathologiques sur des modèles biologiques ou des modèles animaux de pathologies (biologie des systèmes) (Figure 41).

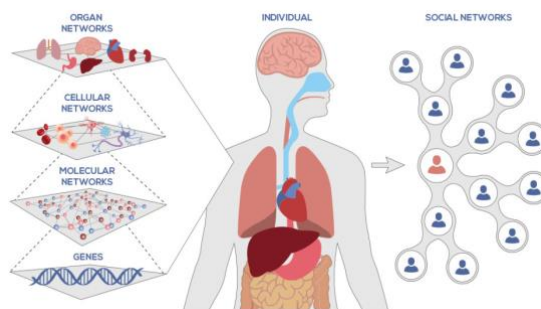


Figure 41 : Approche systémique en Biologie et Médecine. Site web: Institute for systems biology

### 7.3.1.2. **Importance de la métabolomique comme clé de voûte de l'approche systémique**

La métabolomique est la dernière-née des études moléculaires haut-débit (dites « omiques »). Elle permet une cartographie précise et pratiquement exhaustive des petites molécules (moins de 1,5 kDa : sucres, acides aminés, acides gras, nucléotides, composés aromatiques etc.) présentes dans une cellule, un organe, un organisme, et dans leurs fluides biologiques. Elle fait appel à deux technologies complémentaires, la spectrométrie de masse et la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire à haute résolution. Ces approches permettent d'appréhender de façon globale les caractéristiques physiologiques et biochimiques des systèmes vivants qui constituent son métabolisme, au carrefour des signaux chimiques générés par l'organisme lui-même et par son environnement. A ce titre, la métabolomique est la clé de voûte des approches « -omiques » visant à comprendre comment les génotypes se traduisent par l'émergence de phénotypes. En effet, elle permet de comprendre comment les programmes d'expression géniques sont contrôlés par des processus environnementaux à toutes les échelles du vivant (environnement intracellulaire, micro-environnement tissulaire et systémique, macro-environnement).

Au cours des deux dernières décennies, les progrès de la génomique ont permis d'identifier les bases génétiques de nombreuses pathologies. Il est aujourd'hui reconnu que dans la plupart des cas, la maladie résulte d'interactions entre ses gènes et les facteurs environnementaux, les choix de régime nutritionnel et de style de vie, l'activité métabolique du microbiote et les réponses métaboliques et immunitaires du patient lui-même. L'étude de l'épigénome a mis en évidence le rôle de la dynamique structurale du génome dans la régulation de l'expression des gènes et a identifié de nouveaux points de contrôles par lesquels le métabolisme peut réguler les programmes génétiques normaux et pathologiques. Par exemple, très récemment des chercheurs ont montré le rôle de la spermidine, une des molécules de la famille des polyamines, dans l'hypusination du facteur eIF5A, contrôlant l'expression de TFEB et jouant un rôle

important dans l'autophagie et l'immunosenescence<sup>432</sup>. De plus, une partie très importante de notre métabolisme est produite par les milliards d'organismes microbiens qui nous habitent et qui produisent un flux permanent de petites molécules dont beaucoup sont connues pour avoir des propriétés de signalisation, notamment dans l'axe intestin/cerveau. A cet empilement des systèmes biologiques il faut ajouter les effets chimiques de l'exposition à des métabolites exogènes (exposome) issus de notre alimentation, ou de l'environnement au sens large comme par exemple les perturbateurs endocriniens, les polluants atmosphériques, ou des médicaments. L'ensemble de ces effets ne peut réellement s'apprécier que par l'analyse systématique des petites molécules présentes dans une cellule, un tissu, un organe, ou dans les fluides biologiques (sang, salive, etc ...). Une estimation de l'ensemble des petites molécules susceptibles d'être présentes dans le corps humain dépasse les 19.000<sup>433</sup>.

Ainsi, alors que la génomique révèle souvent une prédisposition ou risque de maladie, la métabolomique est nécessaire pour entièrement comprendre les effets sur notre santé de l'alimentation, des traitements médicamenteux, des gènes humains, de l'épigénome et aussi de l'activité métabolique des microbes, comme en témoigne une revue récente de la littérature sur l'implication des métabolites du microbiote dans les maladies cardiovasculaires et les maladies métaboliques<sup>434</sup>. La plupart des auteurs s'accordent à suggérer que la combinaison des approches génomiques, transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques permettra dans un avenir proche d'avoir une meilleure prise de décision en termes de prédiction d'évolution, de prévention ou d'approche thérapeutique personnalisée.

### ***7.3.1.3. Importance de la métabolomique pour la compréhension du dialogue homme-microbe(s)***

La recherche sur le rôle des métabolites dans le dialogue hôte-microbe a évolué extrêmement rapidement ces dernières années et a permis de mieux comprendre l'interaction entre l'hôte et le microbiote par exemple en situation d'homéostasie et/ou de dysbiose. L'exploration de leur richesse et de leur diversité requiert des techniques d'étude et un design expérimental particuliers ; les cinq points suivants doivent être considérés avec attention :

**1. Améliorer les méthodes de dosage analytique** pour augmenter la couverture chimique et détecter le plus possible de métabolites (profondeur d'acquisition des données, détection de substances chimiques de nature chimique diverse, plage dynamique de détection avec un grand ordre de grandeur de détection). Actuellement, les différentes techniques de chromatographie liquide à ultra-haute performance (type de colonne (C18, HILIC, PFPP, etc...), couplés à la spectrométrie de masse haute résolution (UHPLC-HRMS), représentent les meilleures

méthodes pour relever ces défis et, en particulier, pour augmenter la couverture de détection des métabolites<sup>435</sup>. Les principales limites de la LC-HRMS sont les informations structurales limitées et la complexité de l'obtention d'une quantification absolue, notamment dans les approches non ciblées.

**2. Assigner correctement l'identité d'un métabolite.** En métabolomique nous arrivons à extraire l'information sous la forme de « feature », c'est-à-dire des signaux d'intensité obtenus à un temps de rétention (Rt) sur la colonne de chromatographie donné et un rapport  $m/z$  déterminé par le spectromètre de masse. A cette étape de l'analyse des données sous le nom de « feature », on sait que l'information est pertinente mais cette information pourrait être assimilée à de la "matière noire", c'est-à-dire des signatures chimiques qui restent non caractérisées. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles solutions informatiques pour élucider la structure des molécules mises en évidence<sup>436</sup>. Les méthodes d'alignements des spectres permettent (tout comme l'outil Blastp pour les protéines) de trouver dans les bases de données spectrales publiques, les molécules qui s'alignent le mieux sur le spectre obtenu. Des progrès significatifs ont été signalés dans l'exploration des bibliothèques de données spectrales publiques, la requête dans les bases de produits chimiques purs avec des métadonnées associées, et l'application de stratégies de visualisation des données en réseaux moléculaires par similarité spectrale pour accélérer l'annotation des métabolites, en particulier au cours des dernières années et dans lesquelles j'ai pu apporter ma contribution<sup>437-441</sup>. En outre, le développement et la maintenance des bases de données spectrales basées sur la spectrométrie de masse, ainsi que la pratique croissante du partage des données de métabolomique (comme MASSive, etc...), jouent un rôle clé dans la transformation de cette « matière noire » en connaissances biologiques<sup>442</sup>. Des normes doivent être utilisées pour acquérir des spectres MS/MS et MS<sup>n</sup> en mode ESI positif et négatif afin de compléter les bases de données spectrales telles que HMDB<sup>433</sup>, NIST20<sup>443</sup>, METLIN<sup>444</sup>, MZcloud [326], MassBank<sup>445</sup>, ReSpect<sup>446</sup> et GNPS<sup>447</sup>.

**3. Établir un vaste catalogue de référence des génomes microbiens** présents chez l'humain, comme le font déjà plusieurs grands projets, tels que le projet MetaHIT (« METAgonomics of the Human Intestinal Tract »), le « Human Microbiome Project », ou d'autres<sup>448,449</sup>. Il faut connaître les espèces microbiennes capables de vivre au sein de notre holobionte pour pouvoir recouper les informations entre génomique comparative et métabolomique comparative.

**4. Intégrer l'ensemble de données multi-omiques** pour retrouver les relations microbe-métabolite en utilisant l'analyse statistique. Il existe des méthodes linéaires ou de réseaux de neurones qui permettent d'estimer la probabilité conditionnelle de la présence de chaque molécule, compte tenu de la présence d'un microorganisme spécifique<sup>450-452</sup>. L'outil mmvec

(<https://github.com/biocore/mmvec> ; consulté le 15 janvier 2021), par exemple, permet d'identifier de manière fiable toutes les molécules d'intérêt produites par *P. aeruginosa*, déterminées expérimentalement, dans le poumon d'un patient atteint de mucoviscidose et chroniquement infecté par *P. aeruginosa*<sup>451</sup>.

**5. Utiliser des modèles expérimentaux pertinents** pour le concept de dialogue moléculaire afin de dévoiler le rôle respectif du microbiote et/ou des cellules immunitaires dans la production de métabolites spécifiques d'intérêt. Dans un contexte où la relation entre le microbiote et les métabolites de l'hôte n'est pas totalement maîtrisée, il est absolument essentiel dans un premier temps, de faire des expériences scientifiques et d'avoir un bon plan expérimental détaillé en utilisant des modèles pathologiques spécifiques (souris KO, mono-colonisation du microbiote avec certaines souches, stratégie de biologie de synthèse (par exemple dans notre équipe, nous allons étudier la bactérie Nissle seule ou surproduisant de la spermidine pour voir l'impact de cette molécule sur l'immunité de l'hôte ou sur le microbiote complexe ou encore défini), modèle animal sans microbiote (souris germ-free), souris sauvages (plus grande diversité génétique)<sup>453</sup>, modèle de culturomique, métabolomique avec microbiote minimal (excellente revue<sup>454</sup>) et modèles *in vitro*<sup>455,456</sup>. Les approches de métabolomique comparative non ciblée peuvent permettre de déterminer le métabolome et révéler des différences notables entre un métabolome "pathologique" et un métabolome "physiologique". La détection et l'identification de métabotypes associés au contexte souhaité, affinent ainsi la lecture du métabolome (identification de métabolites VIP) et incitent ensuite à associer ses connaissances à des mécanismes cellulaires et moléculaires précédemment observés ou à mettre en place des expériences pour les définir (comme nous l'avons vu avec la partie sur les polyamines produites par *P. aeruginosa*). Le concept d'exploitation de la métabolomique pour réaliser des cribles d'activité afin d'identifier des métabolites biologiquement actifs - dénommé « activity metabolomics » - a été proposé récemment par G. Siuzdak<sup>457</sup>, et a déjà un large impact sur la biologie. Pour conclure, la métabolomique s'est révélée être un outil prometteur pour le criblage et la compréhension du dialogue entre le microbiote et l'hôte ; toutefois, ce domaine n'en est qu'à ses débuts et des recherches supplémentaires et des outils d'intégration sont encore nécessaires. Et c'est ce que je vais continuer à faire en collaboration avec le laboratoire de P. Dorrestein, véritable pionnier du domaine.

#### **7.3.1.4. Importance de la métabolomique pour la découverte de biomarqueurs des pathologies**

Les métabolites ont été décrits comme des biomarqueurs d'intérêts de la maladie car leur abondance dans les matrices biologiques (urine, sang, LCR,...) est souvent directement liée aux mécanismes pathologiques<sup>458</sup> et ce concept est régulièrement démontré dans les résultats d'analyses issus des laboratoires de biologie médicale (par exemple, suivi de la glycémie pour le diabète, ou de la phénylalanine pour la phénylcétonurie, etc...). Historiquement, il s'écoule souvent une décennie ou plus entre la découverte initiale d'un marqueur de maladie, sa validation dans des essais sur l'homme et sa mise en œuvre de l'utilisation en routine comme examen de biologie médicale. Pour réaliser le potentiel de la médecine de précision, nous devons accélérer la découverte de biomarqueurs spécifiques de maladie, ainsi que des profils de métabolites associés à l'environnement externe et de leurs associations avec le risque de développer la maladie. Les technologies actuelles de métabolomique peuvent permettre de découvrir et de valider plus rapidement des biomarqueurs métaboliques de la maladie. Les techniques utilisées en métabolomique, telles que la LC-MS, peuvent mesurer de façon routinière des dizaines à des centaines de métabolites avec une excellente précision et sont adaptées aux études de découverte dans des cohortes humaines. La confiance en son potentiel vient de l'expérience acquise avec des applications récentes permettant de trouver des biomarqueurs métaboliques précoces de maladies dans des cohortes longitudinales, des années avant que les symptômes ne soient cliniquement apparus - par exemple, dans le cas du cancer du pancréas<sup>459</sup>, du diabète de type 2<sup>460-462</sup>, des troubles de la mémoire<sup>463</sup> et de nombreuses autres maladies. Les études métabolomiques ont également inspiré des travaux révélant de nouvelles perspectives sur les relations entre l'alimentation et les maladies, comme les observations liant une augmentation de la concentration en acides aminés branchés et l'insulino-résistance chez les personnes obèses<sup>464</sup>. En intégrant le microbiome, les études de profilage des métabolites menées par Koeth *et al.*<sup>465</sup> ont récemment montré que des taux plasmatiques élevés de triméthylamine-N-oxyde sont à l'origine d'une relation entre les régimes riches en viande rouge, la composition du microbiome intestinal et le risque d'événements cardio-vasculaires. Après la découverte de biomarqueurs métaboliques de la maladie, il est relativement simple de créer un examen de biologie médicale spécifique pour le(s) métabolite(s) d'intérêt. En effet, des analyses de biologie médicale de soin courant repose déjà sur l'utilisation de cette technique de spectrométrie de masse au CHUGA (comme par exemple le dosage de la vitamine D3, etc...). Par ailleurs, la transposition de ce dosage sur des appareils plus classiquement utilisés en pratique courante est tout à fait envisageable. C'est pourquoi le délai entre la découverte du

marqueur et le déploiement d'un dosage spécifique pour une utilisation clinique peut être bref. Enfin, en tant que biomarqueurs de la maladie, les métabolites sont des molécules bien adaptées également pour servir de biomarqueur thérapeutique c'est-à-dire du suivi de l'efficacité d'un traitement.

#### **7.3.1.5. Présentation des travaux et implications :**

Je suis responsable scientifique de la plateforme de spectrométrie de masse (plateau technique GExiM), un des trois piliers techniques du projet GEMELI. Depuis la création de la plateforme GExiM, j'ai participé activement au montage financier pour l'équipement de cette plateforme, acquisition d'un spectromètre de masse haute résolution QExactive plus (ThermoFisher) grâce à des fonds de l'IDEX équipement UGA et de la région Auvergne Rhône Alpes (pour un montant d'environ 500.000 euros). J'ai mis en place la structure et organiser le fonctionnement de la plateforme en quête d'une accréditation de la plateforme (Convention de fonctionnement CHU-UGA, Convention d'hébergement de l'équipement, Mise en place de la gestion documentaire dans le logiciel Qualnet (Fiche MOP, ...). Mon projet est de continuer le développement de la maîtrise technologique de pointe en spectrométrie de masse haute résolution ainsi que toutes les méthodes chimométriques servant à l'analyse des données générées. Nous avons déjà plusieurs projets de recherche clinique s'appuyant sur notre expertise en métabolomique en collaboration avec des cliniciens de notre CHU :

- Projet DYSBIOSE (PI : Dr B. Camara, Pr Pison)
- Projet Metabo-IPCI (le projet a été publié <sup>466</sup>) (PI : Dr A.C. Toffart)
- Projet BIOMARCOVID (PI : Pr Epaulard)
- Projet TRYALZ (PI : Dr M. Sauvée)

**Bilan :** Ces travaux ont fait l'objet de 4 publications acceptées (P29 : [Jarmusch et al. 2020](#), P30 : [Nothias et al. 2020](#), P33 : [Schmidt et al. 2021](#), P35 : [Sannicolo et al. 2021](#)) et 1 publication soumise (P36 : Vanhaverbeke *et al.*). Plusieurs autres papiers sont en préparation.

### **7.3.2. Un exemple : Projet de recherche clinique COVID-19**

#### **Contexte :**

Depuis un an, en tant qu'hospitalier, nous sommes confrontés à des vagues d'intensité variable d'arrivée de nouveaux patients COVID, qui mettent en péril notre système de santé (débordé si aucune mesure n'était prise). Nous, médecins infectiologues et biologistes hospitaliers, avons

un besoin urgent de biomarqueurs prédictifs du parcours de santé des patients arrivant aux urgences hospitalières pour mieux stratifier le risque et améliorer la prise en charge des patients. En particulier, nous devons identifier le plus tôt possible les patients hospitalisés qui risquent de développer une forme sévère de COVID-19 et de nécessiter des soins intensifs. À ce jour, aucun traitement antiviral efficace n'a été identifié, mais la prise en charge des patients a progressé, car les traitements immunomodulateurs fondés sur des données probantes, administrés au bon moment, diminuent le taux de mortalité des personnes atteintes d'une maladie grave. Pratiquement tous les cas graves sont dus à l'apparition d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë retardé (après 7 à 10 jours de symptômes bénins généralement) ; cette atteinte pulmonaire est corrélée à un état hyperinflammatoire secondaire à une hyperactivation du système immunitaire. Les marqueurs classiques de l'inflammation (protéine C-réactive [CRP], Interleukine-6 [IL6], par exemple avec une bonne sensibilité, de 73% et 79% respectivement mais une faible spécificité 60% et 62% respectivement) peuvent participer à l'identification, à l'admission à l'hôpital, des patients qui connaîtront une aggravation des fonctions pulmonaires ; de plus, il a été clairement démontré que les comorbidités liées aux troubles dysmétaboliques (diabète, obésité, hypertension, etc.) sont des facteurs de risque de formes graves. Cependant, une identification plus efficace des patients les plus à risque est nécessaire.

### **Objectifs :**

Bien que la physiopathologie de l'infection par le virus SARS-CoV-2 est été étayée progressivement, il reste des zones d'ombre ; la plus frappante est probablement la nature hétérogène de la maladie (c'est-à-dire pourquoi certains patients développent des formes sévères inattendues alors que d'autres sont peu affectés ou même asymptomatiques). Des facteurs génétiques sont probablement impliqués <sup>467</sup> ; de plus, des perturbations métaboliques importantes chez certains individus sont des facteurs aggravants qui devraient être mieux compris. Nous souhaitons explorer plus avant le lien entre la sévérité du COVID-19 et l'inactivation, induite par le virus, de l'ACE2 (enzyme de conversion de l'angiotensine 2), récepteur cellulaire de la protéine virale Spike. En effet, l'ACE2 est un élément clé dans la régulation du système rénine-angiotensine-aldostérone, lui-même important dans l'homéostasie métabolique. Nous avons émis l'hypothèse ([Mery et al. 2020](#)), ainsi que d'autres, que la liaison du SARS-CoV-2 sur l'ACE2 inhiberait ses différentes fonctions, notamment le clivage de l'angiotensine II en angiotensine 1,7, et participerait ainsi à l'apparition de la phase hyperinflammatoire en lien avec la sévérité de la COVID-19<sup>468,469</sup>. La métabolomique s'est

avérée être une méthode fiable et robuste pour le phénotypage profond et l'identification de biomarqueurs. À ce jour, elle a été principalement utilisée comme méthode pour étudier les perturbations métaboliques induites par l'infection par le SARS-CoV-2, avec des résultats prometteurs<sup>470,471</sup>. Mais également a permis de proposer que l'acide kynurénique pourrait être la clé des réponses immunitaires spécifiquement lié au sexe et à la sévérité de la COVID-19<sup>472</sup>. Ceci nous permet d'émettre l'hypothèse qu'une approche métabolomique non ciblée conduira à l'identification de biomarqueurs métaboliques qui pourront être utilisés comme signaux précoces d'une future aggravation, avec une meilleure spécificité par rapport à l'IL6 et la CRP. Une telle approche devrait d'abord être réalisée sur une cohorte clinique hautement caractérisée, avant d'être testée sur une cohorte de validation. Dans le projet de recherche clinique monocentrique rétrospectif (BIOMARCOVID), nous avons une banque d'échantillons plasmatiques provenant de plus de 800 patients hospitalisés au CHU Grenoble-Alpes. Lors de la " première vague " (printemps 2020), nous avons collecté des échantillons chez 123 patients dans les 48 heures suivant leur hospitalisation et avant leur admission en soins intensifs ; parmi eux, 55 ont ensuite été classés avec une forme modérée de COVID-19, tandis que 68 autres ont ensuite connu une forme sévère. Cette cohorte sert de cohorte d'entraînement pour l'identification de biomarqueurs métaboliques capables de prédire si le patient va s'aggraver immédiatement après son admission. Pour ce faire, nous utilisons différentes approches complémentaires de métabolomique par spectrométrie de masse en collaboration avec l'infrastructure nationale de métabolomique, MetaboHub.

Le projet réunit des équipes complémentaires et compétentes dans les domaines de l'infectiologie, de l'immunité virale, de la biochimie médicale, de la métabolomique et de la biostatistique. Nous avons récolté 164.000 euros avec l'aide de la fondation Université Grenoble Alpes et demandé 84.076 euros à FINOVI, budget qui sera donc utilisé pour le programme suivant. Nous terminerons le travail de collecte des échantillons et des données, notamment pour la cohorte de validation. Nous réalisons la métabolomique non ciblée en utilisant des méthodes basées sur la spectrométrie de masse à haute résolution. Nous effectuons des analyses statistiques et l'intégration des données pour développer des biomarqueurs prédictifs de la sévérité. Enfin, nous développerons et validerons dans le laboratoire d'analyses médicales du CHUGA, les méthodes ciblées pour confirmer le(s) biomarqueur(s) et valider leur valeur pronostique de la sévérité du COVID-19, sur une nouvelle cohorte de validation.

**Bilan :** Ces travaux ont fait l'objet d'1 publication (P31 : [Mery et al. 2020](#)) et 2 publications sont soumises (Clavarino *et al.* et Defendi *et al.*), plusieurs autres papiers sont en préparation.

## 8. Conclusion

L'approche réductionniste est prédominante depuis des décennies en Science et a permis de comprendre dans les moindres détails le fonctionnement de certaines parties du monde vivant qui nous entoure. J'ai moi-même expérimenté cette approche en étudiant la division bactérienne et la résistance aux antibiotiques et décrit des mutations ponctuelles importantes dans l'avènement d'un phénotype de résistance aux antibiotiques ou encore d'expression de toxine par exemple du SST3 chez *P. aeruginosa* avec un impact significatif pour la virulence de ce pathogène. Or, je suis convaincue depuis quelques années qu'à la manière des 6 aveugles de la légende hindoue, la méthode réductionniste nous limite à essayer de décrire un éléphant (un système complexe) en n'en abordant par le toucher qu'une partie (Figure 42). La coopération des aveugles permet toutefois de décrire les différentes parties de l'éléphant. Mais seule une vision du tout et non de la somme des parties permet de comprendre ce qu'est un éléphant.

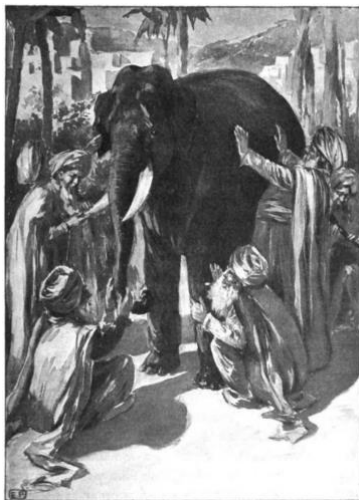


Figure 42 : La légende des 6 aveugles et de l'éléphant. D'après « The Heath readers by grades » D.C Heath and company (Boston)

La biologie systémique repose sur une approche dite holistique, visant à déchiffrer la complexité des systèmes biologiques, en partant du principe que les réseaux qui forment l'ensemble des organismes vivants sont plus que la somme de leurs parties. Il s'agit d'une approche collaborative, qui intègre de nombreuses disciplines scientifiques - biologie, informatique, ingénierie, bioinformatique, physique et autres - pour prédire comment ces systèmes évoluent dans le temps et dans des conditions variables, et pour élaborer des solutions aux problèmes de santé et d'environnement les plus urgents dans le monde. Je crois fondamentalement que développer une approche holistique permettra de mieux comprendre le monde vivant. J'essaie depuis quelques années de développer la métabolomique pour découvrir sans a priori les variables d'intérêt par exemple dans la virulence ou l'antibiorésistance. Je souhaite plus que tout continuer dans cette voie dans les prochaines années à venir pour développer une vision globale de l'interaction homme-microbe(s) physiologique ou pathologique.

## 9. Références

- Capital et idéologie, Thomas Piketty,... | Editions Seuil. Available at: <https://www.seuil.com/ouvrage/capital-et-ideologie-thomas-piketty/9782021338041>. (Accessed: 9th June 2021)
- Delany, I., Rappuoli, R. & De Gregorio, E. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol Med* **6**, 708–720 (2014).
- Byrd, A. L. & Segre, J. A. Infectious disease. Adapting Koch's postulates. *Science* (80-. ). **351**, 224–226 (2016).
- Margulis, L. & Fester, R. *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation*. (1991).
- Darwin, C. L'origine des espèces au moyen de la sélection naturelle, ou, La préservation des races favorisées dans la lutte pour la vie. (1859).
- Appelbaum, P. C. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for drug selection. *Clinical Infectious Diseases* **34**, 1613–1620 (2002).
- McCormick, A. W. *et al.* Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Nat. Med.* **9**, 424–430 (2003).
- Van Heijenoort, J. 'From Peptidoglycan Biosynthesis to Antibiotic Resistance: Present and Future', Liege, Belgium, August 1997: Assembly of the monomer unit of bacterial peptidoglycan. in *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**, 300–304 (Birkhauser Verlag AG, 1998).
- Ghuysen, J. M. Molecular structures of penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactamases. *Trends Microbiol.* **2**, 372–380 (1994).
- Di Guilmi, A. M., Dessen, A., Dideberg, O. & Vernet, T. The glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* catalyzes the polymerization of murein glycan chains. *J. Bacteriol.* **185**, 4418–4423 (2003).
- Ghuysen, J. M. Serine  $\beta$ -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annual Review of Microbiology* **45**, 37–67 (1991).
- Hakenbeck, R., Briese, T. & Ellerbrok, H. Antibodies against the benzylpenicilloyl moiety as a probe for penicillin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **157**, 101–106 (1986).
- HAKENBECK, R. & KOHIYAMA, M. Purification of Penicillin-Binding Protein 3 from *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.* **127**, 231–236 (1982).
- Raymond, J. *et al.* Sequential colonization by *Streptococcus pneumoniae* of healthy children living in an orphanage. *J. Infect. Dis.* **181**, 1983–1988 (2000).
- Levine, O. S. *et al.* Pneumococcal vaccination in developing countries. *Lancet* **367**, 1880–1882 (2006).
- Barák, I. & Wilkinson, A. J. Division site recognition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews* **31**, 311–326 (2007).
- Harry, E., Monahan, L. & Thompson, L. Bacterial Cell Division: The Mechanism and Its Precision. *International Review of Cytology* **253**, 27–94 (2006).
- Noirclerc-Savoye, M. *et al.* In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **55**, 413–424 (2005).
- Rowland, S. L., Katis, V. L., Partridge, S. R. & Wake, R. G. DivIB, FtsZ and cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **23**, 295–302 (1997).
- Carson, M. J., Barondess, J. & Beckwith, J. The FtsQ protein of *Escherichia coli*: Membrane topology, abundance, and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *J. Bacteriol.* **173**, 2187–2195 (1991).
- Real, G., Autret, S., Harry, E. J., Errington, J. & Henriques, A. O. Cell division protein DivIB influences the Spo0J/Soj system of chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **55**, 349–367 (2005).
- Masson, S. *et al.* Central domain of DivIB caps the C-terminal regions of the FtsL/DivIC coiled-coil rod. *J. Biol. Chem.* **284**, 27687–700 (2009).
- Karimova, G., Dautin, N. & Ladant, D. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J. Bacteriol.* **187**, 2233–2243 (2005).
- Daniel, R. A., Noirot-Gros, M. F., Noirot, P. & Errington, J. Multiple interactions between the transmembrane division proteins of *Bacillus subtilis* and the role of FtsL instability in divisome assembly. *J. Bacteriol.* **188**, 7396–7404 (2006).
- Buddelmeijer, N. & Beckwith, J. A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol. Microbiol.* **52**, 1315–1327 (2004).
- Shaner, G., Stromberg, E. L., Lacy, G. H., Barker, K. R. & Pirone, T. P. *NOMENCLATURE AND CONCEPTS OF PATHOGENICITY AND VIRULENCE*. *Annu. Rev. Phytopathol* **30**, (1992).
- Poulin, R. & Combes, C. The concept of virulence: Interpretations and implications. *Parasitology Today* **15**, 474–475 (1999).
- Ghiselin, M. Peter Calow (ed.), *The Encyclopedia of Ecology and Environmental Management*. *J. Bioeconomics* **2**, 87–88 (2000).
- Stearns, S. C. & Koella, J. C. *Evolution in Health and Disease*. *Evolution in Health and Disease* (Oxford University Press, 2010). doi:10.1093/acprof:oso/9780199207466.001.0001
- Tardy, L., Giraudeau, M., Hill, G. E., Mcgraw, K. J. & Bonneaud, C. Contrasting evolution of virulence and replication rate in an emerging bacterial pathogen. *PNAS* **116**, 16927–16932 (2019).
- Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–964 (2000).
- Bleves, S. *et al.* Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* **300**, 534–543 (2010).
- Hauser, A. R. *Pseudomonas aeruginosa*: So many virulence factors, so little time. *Critical Care Medicine* **39**, 2193–2194 (2011).
- Galle, M., Carpentier, I. & Beyaert, R. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci* **13**, 831–842 (2012).
- Frank, D. W. & Iglewski, B. H. Cloning and sequence analysis of a trans-regulatory locus required for exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **173**, 6460–6468 (1991).
- Brutinel, E. D., Vakulskas, C. a & Yahr, T. L. Functional domains of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J Bacteriol* **191**, 3811–3821 (2009).
- Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A., Brady, K. M. & Yahr, T. L. Characterization of ExsA and of ExsA-dependent promoters required for expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* **68**, 657–671 (2008).
- Iglewski, B. H., Sadoff, J., Bjorn, M. J. & Maxwell, E. S. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 3211–3215 (1978).
- McCaw, M. L., Lykken, G. L., Singh, P. K. & Yahr, T. L. ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol. Microbiol.* **46**, 1123–1133 (2002).
- Vallis, A. J., Yahr, T. L., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture

- conditions. *Infect. Immun.* **67**, 914–920 (1999).
41. Filopon, D. *et al.* Epigenetic acquisition of inducibility of type III cytotoxicity in *P. aeruginosa*. *BMC Bioinformatics* **7**, 272 (2006).
  42. Marteyn, B. *et al.* Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature* **465**, 355–358 (2010).
  43. Wu, L. *et al.* Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science (80-. )*. **309**, 774–777 (2005).
  44. Burns, J. L. *et al.* Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* **183**, 444–452 (2001).
  45. Bragonzi, A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 138–145 (2009).
  46. Hogardt, M. & Heesemann, J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* **300**, 557–562 (2010).
  47. Winstanley, C. & Fothergill, J. L. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol Lett* **290**, 1–9 (2009).
  48. Jain, M. *et al.* Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion in cystic fibrosis: a paradigm of chronic infection. *Transl Res* **152**, 257–264 (2008).
  49. Dacheux, D., Attree, I. & Toussaint, B. Expression of ExsA in trans confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Infect. Immun.* **69**, 538–542 (2001).
  50. Le Gouellec, A., Polack, B., Shen, D. & Toussaint, B. Regulation of the Expression of Type III Secretion Systems: an Example from *Pseudomonas aeruginosa*. in *Regulation of Bacterial Virulence* (ed. Darwin, M.L. V. and A. J.) 315–334 (2012). doi:10.1128/9781555818524.ch17
  51. Lavoie, E. G., Wangdi, T. & Kazmierczak, B. I. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect* **13**, 1133–45 (2011).
  52. Williams, B. J., Dehnhostel, J. & Blackwell, T. S. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. *Respirology* **15**, 1037–1056 (2010).
  53. Dorfman, R. *et al.* Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **118**, 1040–1049 (2008).
  54. Arika, S., Nishitani, C. & Kuroki, Y. Diverse functions of pulmonary collectins in host defense of the lung. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**, (2012).
  55. Huang, F. C. Differential regulation of interleukin-8 and human beta-defensin 2 in *Pseudomonas aeruginosa*-infected intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol.* **14**, 275 (2014).
  56. Whittsett, J. A. & Alenghat, T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* **16**, 27–35 (2014).
  57. Abou Alaiwa, M. H. *et al.* pH modulates the activity and synergism of the airway surface liquid antimicrobials beta-defensin-3 and LL-37. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 18703–18708 (2014).
  58. Kipnis, E., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* **36**, 78–91 (2006).
  59. Lau, G. W., Hassett, D. J. & Britigan, B. E. Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Microbiol.* **13**, 389–397 (2005).
  60. Lau, G. W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D. J. & Mavrodi, D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* **72**, 4275–4278 (2004).
  61. Read, R. C. *et al.* Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J. Appl. Physiol.* **72**, 2271–2277 (1992).
  62. Nair, C. *et al.* Cyanide levels found in infected cystic fibrosis sputum inhibit airway ciliary function. *Eur. Respir. J.* **44**, 1253–1261 (2014).
  63. Engel, J. & Balachandran, P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* **12**, 61–66 (2009).
  64. Boles, B. R., Thoendel, M. & Singh, P. K. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* **57**, 1210–1223 (2005).
  65. Chemani, C. *et al.* Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun* **77**, 2065–2075 (2009).
  66. Holm, A. & Vikström, E. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: Signals, targets, and functions. *Frontiers in Plant Science* **5**, (2014).
  67. Azghani, A. O., Miller, E. J. & Peterson, B. T. Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung* **178**, 261–269 (2000).
  68. Nomura, K. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respir. Res.* **15**, (2014).
  69. Engel, L. S., Hill, J. M., Caballero, A. R., Green, L. C. & O’Callaghan, R. J. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **273**, 16792–16797 (1998).
  70. Heck, L. W. *et al.* Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Immunol.* **144**, 2253–7 (1990).
  71. Hong, Y. Q. & Ghebrehiwet, B. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol* **62**, 133–138 (1992).
  72. Malloy, J. L., Veldhuizen, R. A. W., Thibodeaux, B. A., O’Callaghan, R. J. & Wright, J. R. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **288**, (2005).
  73. Mariencheck, W. I., Alcorn, J. F., Palmer, S. M. & Wright, J. R. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**, 528–537 (2003).
  74. Park, S. J. *et al.* Protease IV, a quorum sensing-dependent protease of *Pseudomonas aeruginosa* modulates insect innate immunity. *Mol Microbiol* **94**, 1298–1314 (2014).
  75. Laarman, A. J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *J. Immunol.* **188**, 386–393 (2012).
  76. Tan, R. M. *et al.* Type IV pilus glycosylation mediates resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic activities of the pulmonary surfactant protein A. *Infect. Immun.* **83**, 1339–1346 (2015).
  77. Takeda, K. & Akira, S. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* **16**, 3–9 (2004).
  78. Cheng, D. *et al.* Airway Epithelium Controls Lung Inflammation and Injury through the NF-κB Pathway. *J. Immunol.* **178**, 6504–6513 (2007).
  79. Häcker, H. *et al.* Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J. Exp. Med.* **192**, 595–600 (2000).
  80. Ramphal, R. *et al.* Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the Lung Requires the Recognition of Either Lipopolysaccharide or Flagellin. *J. Immunol.* **181**, 586–592 (2008).
  81. Skerrett, S. J., Wilson, C. B., Liggitt, H. D. & Hajjar, A. M. Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, (2007).

82. Benmohamed, F. *et al.* Toll-like receptor 9 deficiency protects mice against pseudomonas aeruginosa lung infection. *PLoS One* **9**, e90466 (2014).
83. Faure, E. *et al.* Pseudomonas aeruginosa type-3 secretion system dampens host defense by exploiting the NLR4-coupled inflammasome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 799–811 (2014).
84. Sutterwala, F. S. *et al.* Immune recognition of Pseudomonas aeruginosa mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med* **204**, 3235–3245 (2007).
85. Jabir, M. S. *et al.* Mitochondrial damage contributes to pseudomonas aeruginosa activation of the inflammasome and is downregulated by autophagy. *Autophagy* **11**, 166–182 (2015).
86. Miao, E. A. *et al.* Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3076–3080 (2010).
87. Monlezun, L. *et al.* PscI is a type III secretion needle anchoring protein with in vitro polymerization capacities. *Mol Microbiol* (2015). doi:10.1111/mmi.12947
88. Al Moussawi, K. & Kazmierczak, B. I. Distinct contributions of Interleukin (IL)-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  to innate immune recognition of Pseudomonas aeruginosa in the lung. *Infect. Immun.* (2014).
89. Cohen, T. S. & Prince, A. S. Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute P. aeruginosa pneumonia. *J Clin Invest* **123**, 1630–1637 (2013).
90. Reiniger, N. *et al.* Resistance to Pseudomonas aeruginosa chronic lung infection requires cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modulated interleukin-1 (IL-1) release and signaling through the IL-1 receptor. *Infect. Immun.* **75**, 1598–1608 (2007).
91. Schroeder, T. H. *et al.* CFTR is a pattern recognition molecule that extracts Pseudomonas aeruginosa LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6907–6912 (2002).
92. Lillehoj, E. P., Kim, H., Chun, E. Y. & Kim, K. C. Pseudomonas aeruginosa stimulates phosphorylation of the airway epithelial membrane glycoprotein Muc1 and activates MAP kinase. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**, (2004).
93. Grassme, H. *et al.* CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to Pseudomonas aeruginosa. *Science (80-. )*. **290**, 527–530 (2000).
94. Cigana, C. *et al.* Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in Pseudomonas aeruginosa Pneumonia. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 852513 (2011).
95. Folkesson, A. *et al.* Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **10**, 841–851 (2012).
96. Amiel, E., Lovewell, R. R., O'Toole, G. A., Hogan, D. A. & Berwin, B. Pseudomonas aeruginosa evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression. *Infect. Immun.* **78**, 2937–2945 (2010).
97. Cigana, C. *et al.* Pseudomonas aeruginosa exploits lipid A and mucopeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PLoS One* **4**, e8439 (2009).
98. Epelman, S. *et al.* Different domains of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S activate distinct TLRs. *J Immunol* **173**, 2031–2040 (2004).
99. Colvin, K. M. *et al.* The Pel and Psl polysaccharides provide Pseudomonas aeruginosa structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ. Microbiol.* **14**, 1913–1928 (2012).
100. Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 194–222 (2002).
101. Alhede, M. M., Bjarnsholt, T., Givskov, M. & Alhede, M. M. Pseudomonas aeruginosa biofilms: mechanisms of immune evasion. *Adv Appl Microbiol* **86**, 1–40 (2014).
102. Wang, S. *et al.* The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in Pseudomonas aeruginosa. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**, 330–340 (2015).
103. Denning, G. M. *et al.* Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of Pseudomonas aeruginosa, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L584-92 (2003).
104. Bomberger, J. M. *et al.* A Pseudomonas aeruginosa toxin that hijacks the host ubiquitin proteolytic system. *PLoS Pathog* **7**, e1001325 (2011).
105. Bomberger, J. M. *et al.* Long-distance delivery of bacterial virulence factors by Pseudomonas aeruginosa outer membrane vesicles. *PLoS Pathog* **5**, e1000382 (2009).
106. Trinh, N. T. N. *et al.* Deleterious impact of Pseudomonas aeruginosa on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and rescue in airway epithelial cells. *Eur. Respir. J.* **45**, 1590–1602 (2015).
107. Koh, A. Y., Priebe, G. P., Ray, C., Van Rooijen, N. & Pier, G. B. Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Infect. Immun.* **77**, 5300–5310 (2009).
108. Koller, B. *et al.* Innate immune receptors on neutrophils and their role in chronic lung disease. *European Journal of Clinical Investigation* **39**, 535–547 (2009).
109. Kragh, K. N. *et al.* Polymorphonuclear leukocytes restrict growth of Pseudomonas aeruginosa in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* **82**, 4477–4486 (2014).
110. Tsai, W. C. *et al.* CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective-innate host response in murine Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Infect. Immun.* **68**, 4289–4296 (2000).
111. Hänsch, G. M., Prior, B., Brenner-Weiss, G., Obst, U. & Overhage, J. The Pseudomonas quinolone signal (PQS) stimulates chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **12**, 21–26 (2014).
112. Zimmermann, S. *et al.* Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect. Immun.* **74**, 5687–5692 (2006).
113. Bardoel, B. W. *et al.* Identification of an immunomodulating metalloprotease of Pseudomonas aeruginosa (IMPa). *Cell. Microbiol.* **14**, 902–913 (2012).
114. Lovewell, R. R., Patankar, Y. R. & Berwin, B. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of Pseudomonas aeruginosa. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **306**, L591-603 (2014).
115. Eftekhari, F. & Speert, D. P. Alginase treatment of mucoid Pseudomonas aeruginosa enhances phagocytosis by human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* **56**, 2788–2793 (1988).
116. McClure, C. D. & Schiller, N. L. Inhibition of macrophage phagocytosis by Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids in vitro and in vivo. *Curr. Microbiol.* **33**, 109–117 (1996).
117. Lovewell, R. R., Hayes, S. M., O'Toole, G. A. & Berwin, B. Pseudomonas aeruginosa flagellar motility activates the phagocyte PI3K/Akt pathway to induce phagocytic engulfment. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **306**, (2014).
118. Dulon, S. *et al.* Pseudomonas aeruginosa elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**, 411–419 (2005).
119. Allen, R. C. & Stephens, J. T. Myeloperoxidase

- selectively binds and selectively kills microbes. *Infect. Immun.* **79**, 474–485 (2011).
120. Reszka, K. J. *et al.* Inactivation of the potent *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin pyocyanin by airway peroxidases and nitrite. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**, (2012).
  121. Ballok, A. E. & O'Toole, G. A. Pouring salt on a wound: *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors alter Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> flux in the lung. *Journal of Bacteriology* **195**, 4013–4019 (2013).
  122. Painter, R. G. *et al.* CFTR expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. *Biochemistry* **45**, 10260–10269 (2006).
  123. Painter, R. G. *et al.* The role of chloride anion and CFTR in killing of *Pseudomonas aeruginosa* by normal and CF neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 1345–1353 (2008).
  124. Hirche, T. O. *et al.* Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immunol. (Baltimore, Md. 1950)* **181**, 4945–4954 (2008).
  125. Valenti, P., Berlutti, F., Conte, M. P., Longhi, C. & Seganti, L. Lactoferrin functions: current status and perspectives. *Journal of clinical gastroenterology* **38**, (2004).
  126. Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. & Welsh, M. J. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* **417**, 552–555 (2002).
  127. Britigan, B. E., Hayek, M. B., Doebbeling, B. N. & Fick, R. B. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **61**, 5049–5055 (1993).
  128. Rogan, M. P. *et al.* Loss of microbial activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **190**, 1245–1253 (2004).
  129. Cole, A. M. *et al.* Decreased clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from airways of mice deficient in lysozyme M. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 1081–1085 (2005).
  130. Bhavsar, T., Liu, M., Hardej, D., Liu, X. & Cantor, J. Aerosolized recombinant human lysozyme ameliorates *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in hamsters. *Exp. Lung Res.* **36**, 94–100 (2010).
  131. Kolpen, M. *et al.* Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax* **65**, 57–62 (2010).
  132. Kolpen, M. *et al.* Nitric oxide production by polymorphonuclear leucocytes in infected cystic fibrosis sputum consumes oxygen. *Clin. Exp. Immunol.* **177**, 310–319 (2014).
  133. Satoh, S. *et al.* Dexamethasone impairs pulmonary defence against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS gene expression and peroxynitrite production in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **126**, 266–273 (2001).
  134. Hopkins, N., Gunning, Y., O'Croinin, D. F., Laffey, J. G. & McLoughlin, P. Anti-inflammatory effect of augmented nitric oxide production in chronic lung infection. *J Pathol* **209**, 198–205 (2006).
  135. Grasemann, H., Schwartz, R., Matthiesen, S., Racké, K. & Ratjen, F. Increased arginase activity in cystic fibrosis airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 1523–1528 (2005).
  136. Darling, K. E. A. & Evans, T. J. Effects of nitric oxide on *Pseudomonas aeruginosa* infection of epithelial cells from a human respiratory cell line derived from a patient with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **71**, 2341–2349 (2003).
  137. Kvietys, P. R. & Granger, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radical Biology and Medicine* **52**, 556–592 (2012).
  138. Carrichon, L. *et al.* Characterization of superoxide overproduction by the D-Loop Nox4-Nox2 cytochrome b558 in phagocytes-Differential sensitivity to calcium and phosphorylation events. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 78–90 (2011).
  139. Sadikot, R. T. *et al.* p47phox deficiency impairs NF-kappa B activation and host defense in *Pseudomonas pneumonia*. *J Immunol* **172**, 1801–1808 (2004).
  140. Hare, N. J. *et al.* Proteomics of the oxidative stress response induced by hydrogen peroxide and paraquat reveals a novel AhpC-like protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* **11**, 3056–3069 (2011).
  141. Vinckx, T., Matthijs, S. & Cornelis, P. Loss of the oxidative stress regulator OxyR in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 impairs growth under iron-limited conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **288**, 258–265 (2008).
  142. Green, L. K., La Flamme, A. C. & Ackerley, D. F. *Pseudomonas aeruginosa* MdaB and WrB are water-soluble two-electron quinone oxidoreductases with the potential to defend against oxidative stress. *J. Microbiol.* **52**, 771–777 (2014).
  143. Romsang, A., Atichartpongkul, S., Trinachartvanit, W., Vattanaviboon, P. & Mongkolsuk, S. Gene expression and physiological role of *Pseudomonas aeruginosa* methionine sulfoxide reductases during oxidative stress. *J. Bacteriol.* **195**, 3299–3308 (2013).
  144. Kaihama, G. H. *et al.* Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in Bacterial Virulence. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
  145. Terada, L. S., Johansen, K. A., Nowbar, S., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect. Immun.* **67**, 2371–2376 (1999).
  146. Moyano, A. J. *et al.* A long-chain flavodoxin protects *Pseudomonas aeruginosa* from oxidative stress and host bacterial clearance. *PLoS Genet.* **10**, e1004163 (2014).
  147. Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. & Kong, F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* **10**, 599–606 (2004).
  148. O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M. & Britigan, B. E. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**, (2004).
  149. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231–241 (2007).
  150. Parker, H., Dragunow, M., Hampton, M. B., Kettle, A. J. & Winterbourn, C. C. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 841–849 (2012).
  151. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80-. )*. **303**, 1532–1535 (2004).
  152. Halverson, T. W. R., Wilton, M., Poon, K. K. H., Petri, B. & Lewenza, S. DNA Is an Antimicrobial Component of Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS Pathog.* **11**, 1–23 (2015).
  153. Young, R. L. *et al.* Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS One* **6**, e23637 (2011).
  154. Yoo, D. goon, Floyd, M., Winn, M., Moskowitz, S. M. & Rada, B. NET formation induced by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes. *Immunol. Lett.* **160**, 186–194 (2014).
  155. Doua, D. N., Jackson, R., Grasemann, H. & Palaniyar, N. Innate Immune Collectin Surfactant Protein D Simultaneously Binds Both Neutrophil Extracellular Traps and Carbohydrate Ligands and Promotes Bacterial Trapping. *J. Immunol.* **187**, 1856–1865 (2011).
  156. Shan, Q., Dwyer, M., Rahman, S. & Gadjeva, M. Distinct susceptibilities of corneal *Pseudomonas*

- aeruginosa clinical isolates to neutrophil extracellular trap-mediated immunity. *Infect. Immun.* **82**, 4135–4143 (2014).
157. Buchanan, J. T. *et al.* DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* **16**, 396–400 (2006).
  158. Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. & Lewenza, S. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environ. Microbiol.* **12**, 1621–1629 (2010).
  159. Allen, L. *et al.* Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol* **174**, 3643–3649 (2005).
  160. Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C. & Toussaint, B. Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect. Immun.* **67**, 6164–6167 (1999).
  161. Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y. & Attree, I. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol* **40**, 76–85 (2001).
  162. Jensen, P. *et al.* Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **153**, 1329–1338 (2007).
  163. Tateda, K. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun* **71**, 5785–5793 (2003).
  164. Managò, A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Pyocyanin Induces Neutrophil Death via Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Acid Sphingomyelinase. *Antioxidants Redox Signal.* **22**, 1097–1110 (2015).
  165. Alhede, M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology* **155**, 3500–3508 (2009).
  166. Walker, T. S. *et al.* Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect. Immun.* **73**, 3693 (2005).
  167. Amano, H. *et al.* Essential Contribution of Monocyte Chemoattractant Protein-1/C-C Chemokine Ligand-2 to Resolution and Repair Processes in Acute Bacterial Pneumonia. *J. Immunol.* **172**, 398–409 (2003).
  168. Johnston, L. K., Rims, C. R., Gill, S. E., McGuire, J. K. & Manicone, A. M. Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **47**, 417–426 (2012).
  169. Ravichandran, K. S. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: Progress and conundrums. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 1807–1817 (2010).
  170. McCaslin, C. A. *et al.* Impact of alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* on alveolar macrophage apoptotic cell clearance. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **14**, 70–77 (2014).
  171. Hashimoto, S. *et al.* Depletion of alveolar macrophages decreases neutrophil chemotaxis to *Pseudomonas* airspace infections. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **270**, (1996).
  172. Kooguchi, K. *et al.* Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect. Immun.* **66**, 3164–3169 (1998).
  173. Kannan, S. *et al.* Alveolar epithelial type II cells activate alveolar macrophages and mitigate *P. aeruginosa* infection. *PLoS One* **4**, (2009).
  174. Worgall, S. *et al.* Protection against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* following immunization with *P. aeruginosa*-pulsed dendritic cells. *Infect Immun* **69**, 4521–4527 (2001).
  175. Peluso, L. *et al.* Protection against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice by recombinant OprF-pulsed dendritic cell immunization. *BMC Microbiol.* **10**, 9 (2010).
  176. Mukae, H. *et al.* Low expression of T-cell costimulatory molecules in bone marrow-derived dendritic cells in a mouse model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Tohoku J Exp Med* **220**, 59–65 (2010).
  177. Baldwin, M. R. & Barbieri, J. T. The type III cytotoxins of *Yersinia* and *Pseudomonas aeruginosa* that modulate the actin cytoskeleton. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **291**, 147–166 (2005).
  178. Boontham, P. *et al.* Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clin. Sci. (Lond).* **115**, 343–351 (2008).
  179. Skindersoe, M. E. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **55**, 335–345 (2009).
  180. Li, Y. *et al.* N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone promotes the induction of regulatory T-cells by preventing human dendritic cell maturation. *Exp. Biol. Med.* **240**, 896–903 (2015).
  181. Jensen, P. Ø., Givskov, M., Bjarnsholt, T. & Moser, C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: The immune system vs. biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* no-no %U <http://onlinelibrary.wiley.com/enhanced/d> (2010).
  182. Moser, C. *et al.* The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *APMIS acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **108**, 329–335 (2000).
  183. Brazova, J. *et al.* Differential cytokine profile in children with cystic fibrosis. *Clin. Immunol.* **115**, 210–215 (2005).
  184. Hartl, D. *et al.* Pulmonary T(H)2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 204–211 (2006).
  185. Moser, C. *et al.* Serum concentrations of GM-CSF and G-CSF correlate with the Th1/Th2 cytokine response in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **113**, 400–409 (2005).
  186. Tiringier, K. *et al.* A Th17- and Th2-skewed cytokine profile in cystic fibrosis lungs represents a potential risk factor for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 621–629 (2013).
  187. Dubin, P. J. *et al.* Interleukin-23-mediated inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* **80**, 398–409 (2012).
  188. Liu, Y. *et al.* IL-17A and TNF- $\alpha$  Exert Synergistic Effects on Expression of CXCL5 by Alveolar Type II Cells In Vivo and In Vitro. *J. Immunol.* **186**, 3197–3205 (2011).
  189. Wu, W. *et al.* Th17-stimulating protein vaccines confer protection against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 420–427 (2012).
  190. Xu, X. *et al.* Role of Interleukin-17 in defense against *Pseudomonas aeruginosa* infection in lungs. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **7**, 809–816 (2014).
  191. Ye, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* **194**, 519–527 (2001).
  192. Méar, J. B. *et al.* *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: More than an opportunistic criminal association? *Medecine et Maladies*

- Infectious* **43**, 146–151 (2013).
193. Decraene, A. *et al.* Elevated expression of both mRNA and protein levels of IL-17A in sputum of stable Cystic Fibrosis patients. *Respir. Res.* **11**, 177 (2010).
  194. Iannitti, R. G. *et al.* Th17/Treg Imbalance in Murine Cystic Fibrosis is Linked to IDO Deficiency but Corrected by Kynurenes. *Am J Respir Crit Care Med* (2013). doi:10.1164/rccm.201207-1346OC
  195. Tsai, H.-C. C., Velichko, S., Hung, L.-Y. Y. & Wu, R. IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, 267971 (2013).
  196. Singh, S. *et al.* Granulocyte-Macrophage Colony Stimulatory Factor Enhances the Pro-Inflammatory Response of Interferon- $\gamma$ -Treated Macrophages to *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *PLoS One* **10**, (2015).
  197. Ritchie, A. J. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infect Immun* **73**, 1648–1655 (2005).
  198. Gupta, R. K., Chhibber, S. & Harjai, K. Acyl homoserine lactones from culture supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* accelerate host immunomodulation. *PLoS One* **6**, e20860 (2011).
  199. Caldwell, C. C. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *Am J Pathol* **175**, 2473–2488 (2009).
  200. Jensen, P. Ø., Givskov, M., Bjarnsholt, T. & Moser, C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 292–305 (2010).
  201. Le Gouëllec, A., Moyno, O., Meynet, E., Toussaint, B. & Fauvelle, F. High-Resolution Magic Angle Spinning NMR-Based Metabolomics Revealing Metabolic Changes in Lung of Mice Infected with *P. aeruginosa* Consistent with the Degree of Disease Severity. *J. Proteome Res.* **17**, 3409–3417 (2018).
  202. Shen, D.-K. K. *et al.* High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: implications for tryptophan catabolites. *Microbiology* **154**, 2195–208 (2008).
  203. Bortolotti, P. *et al.* Tryptophan catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and potential for inter-kingdom relationship. **16**, 137 (2016).
  204. Quéneé, L. *et al.* Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques* **38**, 63–7 (2005).
  205. Farrow 3rd, J. M. *et al.* Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J. Bacteriol.* **189**, 3425–3433 (2007).
  206. Chen, W., Liang, X., Peterson, A. J., Munn, D. H. & Blazar, B. R. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* **181**, 5396–5404 (2008).
  207. Puccetti, P. & Fallarino, F. Generation of T cell regulatory activity by plasmacytoid dendritic cells and tryptophan catabolism. *Blood Cells Mol Dis* **40**, 101–105 (2008).
  208. Mizgerd, J. P. Acute lower respiratory tract infection. *N. Engl. J. Med.* **358**, 716–727 (2008).
  209. Bouhafs, R. K. L. L., Samuelson, A. & Jarstrand, C. Lipid peroxidation of lung surfactant due to reactive oxygen species released from phagocytes stimulated by bacteria from children with cystic fibrosis. *Free Radic. Res.* **37**, 909–917 (2003).
  210. Genestet, C. *et al.* Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing. *Free Radic. Biol. Med.* **73**, 400–410 (2014).
  211. Riordan, J. R. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science (80-. )*. **245**, 1066–1073 (1989).
  212. Kerem, E., Conway, S., Elborn, S., Hejerman, H. & Consensus, C. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **4**, 7–26 (2005).
  213. B. C. Marshall, A. Elbert, K. Petren, S. Rizvi, A. Fink, J. Ostrenga, A. S. *Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2014 Annual Data Report.* (2015).
  214. Sousa, A. M. & Pereira, M. O. *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs-A Review. *Pathogens* **3**, 680–703 (2014).
  215. Salsgiver, E. L. *et al.* Changing Epidemiology of the Respiratory Bacteriology of Patients With Cystic Fibrosis. *Chest* **149**, 390–400 (2016).
  216. Aaron, S. D., Stephenson, A. L., Cameron, D. W. & Whitmore, G. A. A statistical model to predict one-year risk of death in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Epidemiol.* **68**, 1336–1345 (2015).
  217. Konstan, M. W. *et al.* Risk Factors For Rate of Decline in Forced Expiratory Volume in One Second in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis. *J. Pediatr.* **151**, (2007).
  218. Vandevanter, D. R. *et al.* Pulmonary outcome prediction (POP) tools for cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* **45**, 1156–1166 (2010).
  219. Bhagirath, A. Y. *et al.* Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm. Med.* **16**, (2016).
  220. Emerson, J., Rosenfeld, M., McNamara, S., Ramsey, B. & Gibson, R. L. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **34**, 91–100 (2002).
  221. Malhotra, S., Hayes, D. & Wozniak, D. J. Cystic fibrosis and *pseudomonas aeruginosa*: The host-microbe interface. *Clinical Microbiology Reviews* **32**, (2019).
  222. Smith, W. D. *et al.* Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *FEMS Microbiology Letters* **364**, (2017).
  223. Hauser, A. R., Jain, M., Bar-Meir, M. & McColley, S. A. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 29–70 (2011).
  224. Faure, E., Kwong, K. & Nguyen, D. *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infections: How to Adapt Within the Host? *Frontiers in Immunology* **9**, 2416 (2018).
  225. Behrends, V. *et al.* Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections. *Env. Microbiol* **15**, 398–408 (2013).
  226. Quinn, R. A. *et al.* Neutrophilic proteolysis in the cystic fibrosis lung correlates with a pathogenic microbiome. *Microbiome* **7**, (2019).
  227. Marvig, R. L., Sommer, L. M., Molin, S. & Johansen, H. K. Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat Genet* **47**, 57–64 (2015).
  228. Smith, E. E. *et al.* Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8487–8492 (2006).
  229. Damkiaer, S., Yang, L., Molin, S. & Jelsbak, L. Evolutionary remodeling of global regulatory networks during long-term bacterial adaptation to human hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7766–7771 (2013).
  230. Marvig, R. L. *et al.* Within-host microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in Italian cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol* **15**, 218 (2015).
  231. La Rosa, R., Johansen, H. K. & Molin, S. Convergent Metabolic Specialization through Distinct Evolutionary Paths in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* **9**, (2018).
  232. Klockgether, J. *et al.* Intracolon diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis airway isolates

- TBCF10839 and TBCF121838: distinct signatures of transcriptome, proteome, metabolome, adherence and pathogenicity despite an almost identical genome sequence. *Env. Microbiol* **15**, 191–210 (2013).
233. Depke, T., Thöming, J. G., Kordes, A., Häussler, S. & Brönstrup, M. Untargeted LC-MS Metabolomics Differentiates Between Virulent and Avirulent Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomolecules* **10**, 1041 (2020).
  234. Mielko, K. A. *et al.* Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 178 (2019).
  235. Behrends, V. *et al.* Metabolite profiling to characterize disease-related bacteria: gluconate excretion by *Pseudomonas aeruginosa* mutants and clinical isolates from cystic fibrosis patients. *J Biol Chem* **288**, 15098–15109 (2013).
  236. Borgos, S. E. F. *et al.* Rapid metabolic profiling of developing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by high-resolution mass spectrometry fingerprinting. *Ann. Microbiol.* **65**, 891–898 (2015).
  237. Römling, U., Greipel, J. & Tümmler, B. Gradient of genomic diversity in the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *Mol. Microbiol.* **17**, 323–332 (1995).
  238. Jacobs, C., Huang, L. J., Bartowsky, E., Normark, S. & Park, J. T. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J.* **13**, 4684–94 (1994).
  239. Torrens, G. *et al.* Targeting the permeability barrier and peptidoglycan recycling pathways to disarm *Pseudomonas aeruginosa* against the innate immune system. *PLoS One* **12**, e0181932 (2017).
  240. Zamorano, L. *et al.* AmpG inactivation restores susceptibility of pan- $\beta$ -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1990–1996 (2011).
  241. Huang, W. *et al.* PAMDB: a comprehensive *Pseudomonas aeruginosa* metabolome database. *Nucleic Acids Res* **46**, D575–D580 (2018).
  242. Bitonti, A. J., Kelly, S. E. & McCann, P. P. Regulation of growth and macromolecular synthesis by putrescine and spermidine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Life Sci.* **34**, 1513–1520 (1984).
  243. Shah, P. & Swiatlo, E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology* **68**, 4–16 (2008).
  244. Carriel, D. *et al.* A novel subfamily of bacterial AAT-fold basic amino acid decarboxylases and functional characterization of its first representative: *Pseudomonas aeruginosa* LdcA. *Genome Biol. Evol.* **10**, 3058–3075 (2018).
  245. Michael, A. J. Polyamine function in archaea and bacteria. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 18693–18701 (2018).
  246. Stalon, V., Vander Wauven, C., Momin, P. & Legrain, C. Catabolism of arginine, citrulline and ornithine by *Pseudomonas* and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2487–2495 (1987).
  247. Harun, S. N., Hennig, S., Wainwright, C. & Klein, K. A systematic review of studies examining the rate of lung function decline in patients with cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews* **20**, 55–66 (2016).
  248. Nkam, L. *et al.* A 3-year prognostic score for adults with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **16**, 702–708 (2017).
  249. Lu, C. D., Itoh, Y., Nakada, Y. & Jiang, Y. Functional analysis and regulation of the divergent spuABCDEFHG-spuI operons for polyamine uptake and utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **184**, 3765–3773 (2002).
  250. Yeung, A. T. Y., Bains, M. & Hancock, R. E. W. The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **193**, 918–931 (2011).
  251. Zhou, L., Wang, J. & Zhang, L. H. Modulation of bacterial Type III secretion system by a spermidine transporter dependent signaling pathway. *PLoS One* **2**, e1291 (2007).
  252. Twomey, K. B. *et al.* Microbiota and Metabolite Profiling Reveal Specific Alterations in Bacterial Community Structure and Environment in the Cystic Fibrosis Airway during Exacerbation. **8**, e82432 (2013).
  253. Cezard, A., Monard, S., Bréa-Diakite, D., Guillon, A. & Si-Tahar, M. Metabokines reviewed: Essential mediators of anti-infectious immunity. *Medecine/Sciences* **37**, 342–348 (2021).
  254. Kaiko, G. E. *et al.* The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. *Cell* **165**, 1708–1720 (2016).
  255. Kelly, C. J. *et al.* Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe* **17**, 662–671 (2015).
  256. Arpaia, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **504**, 451–455 (2013).
  257. Yang, W. *et al.* Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity. *Nat. Commun.* **11**, 1–18 (2020).
  258. Liu, L. *et al.* Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell. Immunol.* **277**, 66–73 (2012).
  259. Singh, N. *et al.* Blockade of dendritic cell development by bacterial fermentation products butyrate and propionate through a transporter (Slc5a8)-dependent inhibition of histone deacetylases. *J. Biol. Chem.* **285**, 27601–27608 (2010).
  260. Singh, N. *et al.* Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* **40**, 128–139 (2014).
  261. Ranganathan, P. *et al.* GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental Colitis. *J. Immunol.* j11700604 (2018). doi:10.4049/jimmunol.1700604
  262. Errea, A. *et al.* Lactate Inhibits the Pro-Inflammatory Response and Metabolic Reprogramming in Murine Macrophages in a GPR81-Independent Manner. *PLoS One* **11**, e0163694 (2016).
  263. SHAN, T. *et al.* M2-TAM subsets altered by lactic acid promote T-cell apoptosis through the PD-L1/PD-1 pathway. *Oncol. Rep.* **44**, 1885–1894 (2020).
  264. Haas, R. *et al.* Lactate regulates metabolic and proinflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. *PLoS Biol.* **13**, e1002202 (2015).
  265. Macias-Ceja, D. C. *et al.* Succinate receptor mediates intestinal inflammation and fibrosis. *Mucosal Immunol.* **12**, 178–187 (2019).
  266. Littlewood-Evans, A. *et al.* GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **213**, 1655–1662 (2016).
  267. Nadjombati, M. S. *et al.* Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. *Immunity* **49**, 33–41.e7 (2018).
  268. Schneider, C. *et al.* A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. *Cell* **174**, 271–284.e14 (2018).
  269. Lei, W. *et al.* Activation of intestinal tuft cell-expressed *sucnr1* triggers type 2 immunity in the mouse small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 5552–5557 (2018).
  270. Ottinger, C. A., Honeyfield, D. C., Densmore, C. L. & Iwanowicz, L. R. Impact of thiamine deficiency on T-cell dependent and T-cell independent antibody production in lake trout. *J. Aquat. Anim. Health* **24**, 258–273 (2012).
  271. Dey, S. & Bishayi, B. Riboflavin along with antibiotics balances reactive oxygen species and inflammatory cytokines and controls *Staphylococcus aureus* infection

- by boosting murine macrophage function and regulates inflammation. *J. Inflamm. (United Kingdom)* **13**, 1–21 (2016).
272. Mazur-Bialy, A. I. & Pocheć, E. Riboflavin reduces pro-inflammatory activation of adipocyte-macrophage co-culture. Potential application of vitamin B2 enrichment for attenuation of insulin resistance and metabolic syndrome development. *Molecules* **21**, (2016).
273. Von Martels, J. Z. H. *et al.* Riboflavin Supplementation in Patients with Crohn's Disease [the RISE-UP study]. *J. Crohn's Colitis* **14**, 595–607 (2020).
274. Mohedano, M. L. *et al.* Real-time detection of riboflavin production by *Lactobacillus plantarum* strains and tracking of their gastrointestinal survival and functionality in vitro and in vivo using mCherry labeling. *Front. Microbiol.* **10**, 1748 (2019).
275. Hong, G. *et al.* Administration of nicotinamide riboside prevents oxidative stress and organ injury in sepsis. *Free Radic. Biol. Med.* **123**, 125–137 (2018).
276. Ganji, S. H., Kamanna, V. S. & Kashyap, M. L. Niacin decreases leukocyte myeloperoxidase: Mechanistic role of redox agents and Src/p38MAP kinase. *Atherosclerosis* **235**, 554–561 (2014).
277. Ferreira, R. G. *et al.* Neutrophil recruitment is inhibited by nicotinamide in experimental pleurisy in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **685**, 198–204 (2012).
278. He, W. *et al.* Vitamin B5 reduces bacterial growth via regulating innate immunity and adaptive immunity in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
279. Qian, B., Shen, S., Zhang, J. & Jing, P. Effects of Vitamin B6 Deficiency on the Composition and Functional Potential of T Cell Populations. *J. Immunol. Res.* **2017**, (2017).
280. Kobayashi, C., Kurohane, K. & Imai, Y. High dose dietary pyridoxine induces T-helper type 1 polarization and decreases contact hypersensitivity response to fluorescein isothiocyanate in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 532–538 (2012).
281. Katunuma, N. *et al.* Inhibition of intracellular cathepsin activities and suppression of immune responses mediated by helper T lymphocyte type-2 by peroral or intraperitoneal administration of vitamin B6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 151–155 (2000).
282. Skupsky, J. *et al.* Biotin Supplementation Ameliorates Murine Colitis by Preventing NF- $\kappa$ B Activation. *Cmgh* **9**, 557–567 (2020).
283. Elahi, A. *et al.* Biotin Deficiency Induces Th1- and Th17-Mediated Proinflammatory Responses in Human CD4 + T Lymphocytes via Activation of the mTOR Signaling Pathway. *J. Immunol.* **200**, 2563–2570 (2018).
284. Socha-Banasiak, A. *et al.* Folate status, regulatory T cells and MTHFR C677T polymorphism study in allergic children. *Adv. Med. Sci.* **61**, 300–305 (2016).
285. Corcoran, T. B., O'Neill, M. P., Webb, S. A. R. & Ho, K. M. Inflammation, vitamin deficiencies and organ failure in critically ill patients. *Anaesth. Intensive Care* **37**, 740–747 (2009).
286. Tal, S., Shavit, Y., Stern, F. & Malnick, S. Association between vitamin B12 levels and mortality in hospitalized older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* **58**, 523–526 (2010).
287. Zelante, T. *et al.* Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* **39**, 372–385 (2013).
288. Alexeev, E. E. *et al.* Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor. *Am. J. Pathol.* **188**, 1183–1194 (2018).
289. Wlodarska, M. *et al.* Indoleacrylic Acid Produced by Commensal *Peptostreptococcus* Species Suppresses Inflammation. *Cell Host Microbe* **22**, 25–37.e6 (2017).
290. Fang, H. *et al.* Effect of Taurine on Intestinal Microbiota and Immune Cells in Peyer's Patches of Immunosuppressive Mice. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1155**, 13–24 (Springer New York LLC, 2019).
291. Shiba, T. *et al.* p-Cresyl sulfate decreases peripheral B cells in mice with adenine-induced renal dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **342**, 50–59 (2018).
292. Shiba, T. *et al.* Effects of intestinal bacteria-derived p-cresyl sulfate on Th1-type immune response in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **274**, 191–199 (2014).
293. Azevedo, M. L. V. *et al.* p-Cresyl sulfate affects the oxidative burst, phagocytosis process, and antigen presentation of monocyte-derived macrophages. *Toxicol. Lett.* **263**, 1–5 (2016).
294. Levy, M. *et al.* Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* **163**, 1428–1443 (2015).
295. Jutel, M. *et al.* Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* **413**, 420–425 (2001).
296. Caron, G. *et al.* Histamine Induces CD86 Expression and Chemokine Production by Human Immature Dendritic Cells. *J. Immunol.* **166**, 6000–6006 (2001).
297. Mazzoni, A., Young, H. A., Spitzer, J. H., Visintin, A. & Segal, D. M. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J. Clin. Invest.* **108**, 1865–1873 (2001).
298. Van Der Pouw Kraan, T. C. T. M. *et al.* Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors. *J. Clin. Invest.* **102**, 1866–1873 (1998).
299. Zhang, M. *et al.* Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: A counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J. Exp. Med.* **185**, 1759–1768 (1997).
300. Zhang, M., Borovikova, L. V., Wang, H., Metz, C. & Tracey, K. J. Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation. *Mol. Med.* **5**, 595–605 (1999).
301. Morón, B. *et al.* Activation of Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 2 by Spermidine Exerts Anti-Inflammatory Effects in Human THP-1 Monocytes and in a Mouse Model of Acute Colitis. *PLoS One* **8**, e73703 (2013).
302. Carriche, G. M. *et al.* Regulating T-cell differentiation through the polyamine spermidine. *J. Allergy Clin. Immunol.* **147**, 335–348.e11 (2021).
303. Sasabe, J. & Suzuki, M. Emerging role of D-Amino acid metabolism in the innate defense. *Front. Microbiol.* **9**, 933 (2018).
304. Braun, H. S., Sponder, G., Pieper, R., Aschenbach, J. R. & Deiner, C. GABA selectively increases mucin-1 expression in isolated pig jejunum. *Genes Nutr.* **10**, 1–8 (2015).
305. Bajic, S. S. *et al.* GABA-producing natural dairy isolate from artisanal zlatar cheese attenuates gut inflammation and strengthens gut epithelial barrier in vitro. *Front. Microbiol.* **10**, 527 (2019).
306. Ren, W. *et al.* Intestinal microbiota-derived GABA mediates interleukin-17 expression during enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Front. Immunol.* **7**, 685 (2017).
307. Pundir, P. *et al.* A Connective Tissue Mast-Cell-Specific Receptor Detects Bacterial Quorum-Sensing Molecules and Mediates Antibacterial Immunity. *Cell Host Microbe* **26**, 114–122.e8 (2019).
308. Li, Q., Ren, Y. & Fu, X. Inter-kingdom signaling between gut microbiota and their host. *Cellular and Molecular Life Sciences* **76**, 2383–2389 (2019).
309. Lyte, M. & Ernst, S. Alpha and beta adrenergic receptor involvement in catecholamine-induced growth of gram-negative bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 447–452 (1993).

310. Flierl, M. A., Rittirsch, D., Huber-Lang, M., Vidya Sarma, J. & Award, P. Catecholamines - Crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening Pandora's box? *Molecular Medicine* **14**, 195–204 (2008).
311. McFarland, A. P. *et al.* Sensing of Bacterial Cyclic Dinucleotides by the Oxidoreductase RECON Promotes NF- $\kappa$ B Activation and Shapes a Proinflammatory Antibacterial State. *Immunity* **46**, 433–445 (2017).
312. Whiteley, A. T. *et al.* Bacterial cGAS-like enzymes synthesize diverse nucleotide signals. *Nature* **567**, 194–199 (2019).
313. Woodward, J. J., Lavarone, A. T. & Portnoy, D. A. C-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science (80-. )*. **328**, 1703–1705 (2010).
314. Mager, L. F. *et al.* Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science (80-. )*. **369**, 1481–1489 (2020).
315. Cipriani, S. *et al.* The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. *PLoS One* **6**, e25637 (2011).
316. Mencarelli, A. *et al.* The Bile Acid Sensor Farnesoid X Receptor Is a Modulator of Liver Immunity in a Rodent Model of Acute Hepatitis. *J. Immunol.* **183**, 6657–6666 (2009).
317. Gadaleta, R. M. *et al.* Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut* **60**, 463–472 (2011).
318. Song, X. *et al.* Microbial bile acid metabolites modulate gut ROR $\gamma$ + regulatory T cell homeostasis. *Nature* **577**, 410–415 (2020).
319. Campbell, C. *et al.* Bacterial metabolism of bile acids promotes generation of peripheral regulatory T cells. *Nature* **581**, 475–479 (2020).
320. Ana, D., Na, C., Bielawski, J., Hannun, Y. A. & Kasper, D. L. Membrane sphingolipids as essential molecular signals for Bacteroides survival in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4666–4671 (2011).
321. Brown, E. M. *et al.* Bacteroides-Derived Sphingolipids Are Critical for Maintaining Intestinal Homeostasis and Symbiosis. *Cell Host Microbe* **25**, 668–680.e7 (2019).
322. Olszak, T. *et al.* Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science (80-. )*. **336**, 489–493 (2012).
323. Schröder, N. W. J. *et al.* Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J. Biol. Chem.* **278**, 15587–15594 (2003).
324. Michelsen, K. S. *et al.* The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs): Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J. Biol. Chem.* **276**, 25680–25686 (2001).
325. Hong, S. W. *et al.* Lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans* interacts with Toll-like receptor 2 through the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macrophages. *Mol. Immunol.* **57**, 284–291 (2014).
326. Dunne, D. W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M. & Joiner, K. A. The type I macrophage scavenger receptor binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 1863–1867 (1994).
327. Ellingsen, E. *et al.* Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* **8**, (2002).
328. von Aulock, S. *et al.* Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus for neutrophil recruitment. *Immunobiology* **208**, 413–422 (2003).
329. Hara, H. *et al.* The NLRP6 Inflammasome Recognizes Lipoteichoic Acid and Regulates Gram-Positive Pathogen Infection. *Cell* **175**, 1651–1664.e14 (2018).
330. Riehl, T. E. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG protects the intestinal epithelium from radiation injury through release of lipoteichoic acid, macrophage activation and the migration of mesenchymal stem cells. *Gut* **68**, 1003–1013 (2019).
331. Epaulard, O. *et al.* Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system-based vector. *Mol. Ther.* **14**, 656–61 (2006).
332. Epaulard, O. *et al.* Optimization of a type III secretion system-based *Pseudomonas aeruginosa* live vector for antigen delivery. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 308–13 (2008).
333. Dietrich, G., Collioud, A. & Rothen, S. A. Developing and manufacturing attenuated live bacterial vaccines. *BioPharm Int.* **21**, 6–14 (2008).
334. Oettinger, T., Jørgensen, M., Ladefoged, A., Hasløv, K. & Andersen, P. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: Review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber. Lung Dis.* **79**, 243–250 (1999).
335. Germanier, R. & Fuer, E. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* **131**, 553–558 (1975).
336. Galán, J. E. & Curtiss, R. Virulence and vaccine potential of phoP mutants of *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* **6**, 433–443 (1989).
337. Felgner, S. *et al.* aroA-Deficient *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is More Than a Metabolically Attenuated Mutant. *MBio* **7**, (2016).
338. Mekalanos, J. J. Live bacterial vaccines: environmental aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 312–319 (1994).
339. Cheminay, C. & Hensel, M. Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 87–98 (2008).
340. Toussaint, B. *et al.* Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector. *Expert Rev Vaccines* **12**, 1139–1154 (2013).
341. Wang, Y., Toussaint, B. & Le Gouellec, A. *Bacterial vectors for the delivery of tumor antigens. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1139**, 429–441 (2014).
342. Paterson, Y., Guirnalda, P. D. & Wood, L. M. *Listeria* and *Salmonella* bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. *Semin. Immunol.* **22**, 183–9 (2010).
343. Le Gouellec, A. *et al.* Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages. *Hum. Vaccin. Immunother.* **8**, 1454–1458 (2012).
344. Wang, Y. *et al.* Optimization of Antitumor Immunotherapy Mediated by Type III Secretion System-based Live Attenuated Bacterial Vectors. *J. Immunother.* **35**, 223–234 (2012).
345. Blumentals, I. I., Kelly, R. M., Gorziglia, M., Kaufman, J. B. & Shiloach, J. Development of a defined medium and two-step culturing method for improved exotoxin A yields from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2013–2020 (1987).
346. Brockstedt, D. G. *et al.* Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. *Nat. Med.* **11**, 853–60 (2005).
347. Worgall, S., Martushova, K., Busch, A., Lande, L. & Crystal, R. G. Apoptosis induced by *Pseudomonas aeruginosa* in antigen presenting cells is diminished by genetic modification with CD40 ligand. *Pediatr. Res.* **52**, 636–644 (2002).
348. Karttunen, J., Sanderson, S., Shastri, N. & Kattunen, J.

- Detection of Rare Antigen-Presenting Cells by the lacZ T-Cell Activation Assay Suggests an Expression Cloning Strategy for T-Cell Antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 6020–6024 (1992).
349. Palucka, K. & Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* **12**, 265–277 (2012).
350. Banchereau, J. & Palucka, A. K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat rev Immunol* **5**, 296–306 (2005).
351. Berthoin, L. *et al.* Targeted release of transcription factors for cell reprogramming by a natural micro-syringe. *513*, 678–687 (2016).
352. Williams, M. A. & Bevan, M. J. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* **25**, 171–192 (2007).
353. Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (80-. )* **313**, 1960–1964 (2006).
354. Sato, E. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18538–18543 (2005).
355. Zhang, L. *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* **348**, 203–213 (2003).
356. Kaech, S. M. *et al.* Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* **4**, 1191–1198 (2003).
357. Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol* **31**, 137–161 (2013).
358. Bachmann, M. F., Wolint, P., Schwarz, K., Jager, P. & Oxenius, A. Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J Immunol* **175**, 4686–4696 (2005).
359. Seder, R. A., Darrah, P. A. & Roederer, M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat rev Immunol* **8**, 247–258 (2008).
360. Wherry, E. J. *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* **4**, 225–234 (2003).
361. Stark, F. C., Sad, S. & Krishnan, L. Intracellular bacterial vectors that induce CD8(+) T cells with similar cytolytic abilities but disparate memory phenotypes provide contrasting tumor protection. *Cancer Res* **69**, 4327–4334 (2009).
362. Wesley Alexander, J. & Fisher, M. W. Vaccination for pseudomonas aeruginosa. *The American Journal of Surgery* **120**, 512 (1970).
363. Lányi, B. Serological properties of Pseudomonas aeruginosa. II. Type-specific thermolabile (flagellar) antigens. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **17**, 35–48 (1970).
364. Bartell, P. F., Orr, T. E. & Chudio, B. Purification and Chemical Composition of the Protective Slime Antigen of Pseudomonas aeruginosa. *Infect. Immun.* **2**, 543–548 (1970).
365. Sainz-Mejías, M., Jurado-Martín, I. & McClean, S. Understanding Pseudomonas aeruginosa-Host Interactions: The Ongoing Quest for an Efficacious Vaccine. *Cells* **9**, (2020).
366. Knirel, Y. A., Bystrova, O. V., Kocharova, N. A., Zähringer, U. & Pier, G. B. Review: Conserved and variable structural features in the lipopolysaccharide of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Endotoxin Research* **12**, 324–336 (2006).
367. Schaad, U. B. *et al.* Safety and immunogenicity of Pseudomonas aeruginosa conjugate A vaccine in cystic fibrosis. *Lancet* **338**, 1236–1237 (1991).
368. Lang, A. B. *et al.* Vaccination of cystic fibrosis patients against Pseudomonas aeruginosa reduces the proportion of patients infected and delays time to infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**, 504–510 (2004).
369. Zuercher, A. W. *et al.* Antibody responses induced by long-term vaccination with an octavalent conjugate Pseudomonas aeruginosa vaccine in children with cystic fibrosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**, 302–308 (2006).
370. Zuercher, A. W. *et al.* Cellular immunity in healthy volunteers treated with an octavalent conjugate Pseudomonas aeruginosa vaccine. *Clin. Exp. Immunol.* **143**, 132–138 (2006).
371. Hancock, R. E. W. *et al.* Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis: A class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect. Immun.* **42**, 170–177 (1983).
372. Penketh, A., Pitt, T., Roberts, D., Hodson, M. E. & Batten, J. C. The relationship of phenotype changes in Pseudomonas aeruginosa to the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **127**, 605–608 (1983).
373. Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T. & Howell, P. L. Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol* **2**, 167 (2011).
374. Pier, G. B. *et al.* Human immune response to Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide (alginate) vaccine. *Infect Immun* **62**, 3972–3979 (1994).
375. Faezi, S. *et al.* Preparation of Pseudomonas aeruginosa alginate-flagellin immunoconjugate. *Biologicals* **47**, 11–17 (2017).
376. Prince, A. Flagellar activation of epithelial signaling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **34**, 548–551 (2006).
377. Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M. I. & Prince, A. Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **30**, 627–634 (2004).
378. Feuillet, V. *et al.* Involvement of toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12487–12492 (2006).
379. Crowe, B. A. *et al.* The first clinical trial of immuno’s experimental Pseudomonas aeruginosa flagellar vaccines. *Antibiot. Chemother.* **44**, 143–156 (1991).
380. Döring, G., Meisner, C., Stern, M. & Flagella Vaccine Trial Study, G. A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a Pseudomonas aeruginosa flagella vaccine in cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11020–11025 (2007).
381. Tart, A. H., Blanks, M. J. & Wozniak, D. J. The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates. *J Bacteriol* **188**, 6483–6489 (2006).
382. Sawa, T. *et al.* Active and passive immunization with the Pseudomonas V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat. Med.* **5**, 392–398 (1999).
383. Holder, I. A., Neely, A. N. & Frank, D. W. PcrV immunization enhances survival of burned Pseudomonas aeruginosa-infected mice. *Infect. Immun.* **69**, 5908–5910 (2001).
384. Moriyama, K., Wiener-Kronish, J. P. & Sawa, T. Protective effects of affinity-purified antibody and truncated vaccines against Pseudomonas aeruginosa V-antigen in neutropenic mice. *Microbiol. Immunol.* **53**, 587–594 (2009).
385. Wan, C. *et al.* Rational Design of a Chimeric Derivative of PcrV as a Subunit Vaccine Against Pseudomonas aeruginosa. *Front. Immunol.* **10**, 781 (2019).
386. Fakoor, M. H., Gargari, S. L. M., Owlia, P. & Sabokbar, A. Protective efficacy of the OprF/Opri/PcrV recombinant chimeric protein against pseudomonas aeruginosa in the burned BALB/c mouse model. *Infect. Drug Resist.* **13**, 1651–1661 (2020).
387. Fakoor, M. H., Owlia, P., Mousavi Gargari, S. L. &

- Sabokbar, A. In-Silico Analysis and Protective Efficacy of the PcrV Recombinant Vaccine against *Pseudomonas Aeruginosa* in the Burned and PA-Infected BALB/c Mouse Model. *Iran. J. Immunol.* **17**, 121–136 (2020).
388. Naito, Y. *et al.* The protective effects of nasal PcrV-CpG oligonucleotide vaccination against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Microbiol. Immunol.* **62**, 774–785 (2018).
389. Yang, F. *et al.* Protective Efficacy of the Trivalent *Pseudomonas aeruginosa* Vaccine Candidate PcrV-OprI-Hcp1 in Murine Pneumonia and Burn Models. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
390. Golpasha, I. D., Mousavi, S. F., Owlia, P., Siadat, S. D. & Irani, S. Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone-r-PcrV conjugate enhances survival of mice against lethal burn infections caused by *pseudomonas aeruginosa*. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **15**, 15–24 (2015).
391. Schaeffers, M. M. *et al.* PLGA-encapsulation of the *Pseudomonas aeruginosa* PopB vaccine antigen improves Th17 responses and confers protection against experimental acute pneumonia. *Vaccine* **36**, 6926–6932 (2018).
392. Mansouri, E. *et al.* Safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* hybrid outer membrane protein F-I vaccine in human volunteers. *Infect. Immun.* **67**, 1461–1470 (1999).
393. Westritschnig, K. *et al.* A randomized, placebo-controlled phase I study assessing the safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* hybrid outer membrane protein OprF/I vaccine (IC43) in healthy volunteers. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 170–183 (2014).
394. Rello, J. *et al.* A randomized placebo-controlled phase II study of a *Pseudomonas* vaccine in ventilated ICU patients. *Crit. Care* **21**, (2017).
395. Adlbrecht, C. *et al.* Efficacy, immunogenicity, and safety of IC43 recombinant *Pseudomonas aeruginosa* vaccine in mechanically ventilated intensive care patients - A randomized clinical trial. *Crit. Care* **24**, (2020).
396. Jing, H. *et al.* Oligomerization of IC43 resulted in improved immunogenicity and protective efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Int. J. Biol. Macromol.* **159**, 174–182 (2020).
397. Staczek, J., Gilleland, L. B., van der Heyde, H. C. & Gilleland, H. E. DNA vaccines against chronic lung infections by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **37**, 147–153 (2003).
398. Lin, I. Y. C., Van, T. T. H. & Smooker, P. M. Live-Attenuated Bacterial Vectors: Tools for Vaccine and Therapeutic Agent Delivery. *Vaccines (Basel)* **3**, 940–972 (2015).
399. Loch, C. & Mielcarek, N. Live attenuated vaccines against pertussis. *Expert Rev Vaccines* **13**, 1147–1158 (2014).
400. Priebe, G. P., Meluleni, G. J., Coleman, F. T., Goldberg, J. B. & Pier, G. B. Protection against Fatal *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Mice after Nasal Immunization with a Live , Attenuated aroA Deletion Mutant. *Society* **71**, 1453–1461 (2003).
401. Buret, A., Dunkley, M., Clancy, R. L. & Cripps, A. W. Effector mechanisms of intestinally induced immunity to *Pseudomonas aeruginosa* in the rat lung: Role of neutrophils and leukotriene B4. *Infect. Immun.* **61**, 671–679 (1993).
402. Buret, A., Dunkley, M. L., Pang, G., Clancy, R. L. & Cripps, A. W. Pulmonary immunity to *Pseudomonas aeruginosa* in intestinally immunized rats: Roles of alveolar macrophages, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1 $\alpha$ . *Infect. Immun.* **62**, 5335–5343 (1994).
403. Cripps, A. W., Dunkley, M. L. & Clancy, R. L. Mucosal and systemic immunizations with killed *Pseudomonas aeruginosa* protect against acute respiratory infection in rats. *Infect. Immun.* **62**, 1427–1436 (1994).
404. Cripps, A. W. *et al.* Safety and immunogenicity of an oral inactivated whole-cell *pseudomonas aeruginosa* vaccine administered to healthy human subjects. *Infect Immun* **74**, 968–974 (2006).
405. Fan, Y. *et al.* Hydrogen peroxide-inactivated bacteria induces potent humoral and cellular immune responses and releases nucleic acids. *Int. Immunopharmacol.* **69**, 389–397 (2019).
406. Sen-Kilic, E. *et al.* Defining the Mechanistic Correlates of Protection Conferred by Whole-Cell Vaccination against *Pseudomonas aeruginosa* Acute Murine Pneumonia. *Infect. Immun.* **89**, (2021).
407. Priebe, G. P. *et al.* Construction and Characterization of a Live , Attenuated aroA Deletion Mutant of *Pseudomonas aeruginosa* as a Candidate Intranasal Vaccine. *Society* **70**, 1507–1517 (2002).
408. Zaidi, T. S., Priebe, G. P. & Pier, G. B. A live-attenuated *Pseudomonas aeruginosa* vaccine elicits outer membrane protein-specific active and passive protection against corneal infection. *Infect Immun* **74**, 975–983 (2006).
409. Priebe, G. P. *et al.* IL-17 is a critical component of vaccine-induced protection against lung infection by lipopolysaccharide-heterologous strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* **181**, 4965–4975 (2008).
410. Kamei, A., Coutinho-Sledge, Y. S., Goldberg, J. B., Priebe, G. P. & Pier, G. B. Mucosal vaccination with a multivalent, live-attenuated vaccine induces multifactorial immunity against *Pseudomonas aeruginosa* acute lung infection. *Infect Immun* **79**, 1289–1299 (2011).
411. Cabral, M. P. *et al.* A live auxotrophic vaccine confers mucosal immunity and protection against lethal pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* **16**, e1008311 (2020).
412. Pier, G. B. Promises and pitfalls of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide as a vaccine antigen. *Carbohydr Res* **338**, 2549–2556 (2003).
413. Johansen, H. K. & Götzsche, P. C. Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cochrane database Syst. Rev.* **8**, CD001399 (2015).
414. Grimwood, K., Kyd, J. M., Owen, S. J., Massa, H. M. & Cripps, A. W. Vaccination against respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Hum Vaccin Immunother* **11**, e34296 (2015).
415. Priebe, G. P. & Goldberg, J. B. Vaccines for *Pseudomonas aeruginosa*: a long and winding road. *Expert Rev. Vaccines* (2014). doi:10.1586/14760584.2014.890053
416. Worgall, S. 40 years on: have we finally got a vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*? *Futur. Microbiol* **7**, 1333–1335 (2012).
417. Sharma, A., Krause, A. & Worgall, S. Recent developments for *Pseudomonas* vaccines. *Hum Vaccin* **7**, 999–1011 (2011).
418. Doring, G., Pier, G. B., Döring, G. & Pier, G. B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* **26**, 1011–24 (2008).
419. Audia, J. P. *et al.* In the absence of effector proteins, the *Pseudomonas aeruginosa* type three secretion system needle tip complex contributes to lung injury and systemic inflammatory responses. *PLoS One* **8**, e81792 (2013).
420. Sawa, T., Ito, E., Nguyen, V. H. & Haight, M. Anti-PcrV antibody strategies against virulent *Pseudomonas aeruginosa*. *Hum Vaccin Immunother* **10**, 2843–2852 (2014).
421. Milla, C. E. *et al.* Anti-PcrV antibody in cystic fibrosis: a novel approach targeting *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Pediatr. Pulmonol.* **49**, 650–658 (2014).
422. Fito-Boncompte, L. *et al.* Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun* **79**, 1176–1186 (2011).

423. Mutharia, L. M., Nicas, T. I. & Hancock, R. E. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. *J Infect Dis* **146**, 770–779 (1982).
424. Sun, X., Fiala, J. L. & Lowery, D. Patent watch: Modulating the human microbiome with live biotherapeutic products: intellectual property landscape. *Nat Rev Drug Discov* **15**, 224–225 (2016).
425. Blacher, E., Levy, M., Tatirovsky, E. & Elinav, E. Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *J Immunol* **198**, 572–580 (2017).
426. Choi, K. R. & Lee, S. Y. CRISPR technologies for bacterial systems: Current achievements and future directions. *Biotechnol Adv* **34**, 1180–1209 (2016).
427. Rovner, A. J. *et al.* Recoded organisms engineered to depend on synthetic amino acids. *Nature* **518**, 89–93 (2015).
428. Nunes-Alves, C. Synthetic biology: GMOs in lockdown. *Nat Rev Microbiol* **13**, 125 (2015).
429. Le Gouellec, A. *et al.* A safe bacterial microsyringe for in vivo antigen delivery and immunotherapy. *Mol. Ther.* **21**, 1076–1086 (2013).
430. Workalemahu, G. *et al.* Metabolic engineering of *Salmonella* vaccine bacteria to boost human  $V\gamma 2V\delta 2$  T cell immunity. *J Immunol* **193**, 708–721 (2014).
431. Yang, B. H. *et al.* Foxp3+ T cells expressing ROR $\gamma$ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* **9**, 444–457 (2016).
432. H, Z. *et al.* Polyamines Control eIF5A Hypusination, TFEB Translation, and Autophagy to Reverse B Cell Senescence. *Mol. Cell* **76**, 110–125.e9 (2019).
433. Wishart, D. S. *et al.* HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* **41**, (2013).
434. Brial, F., Le Lay, A., Dumas, M. E. & Gauguier, D. Implication of gut microbiota metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**, 3977–3990 (2018).
435. Perez de Souza, L., Alseikh, S., Scossa, F. & Fernie, A. R. Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry variants for metabolomics research. *Nat. Methods* doi:10.1038/s41592-021-01116-4
436. Da Silva, R. R., Dorrestein, P. C. & Quinn, R. A. Illuminating the dark matter in metabolomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 12549–12550 (2015).
437. Jarmusch, A. K. *et al.* ReDU: a framework to find and reanalyze public mass spectrometry data. *Nat. Methods* **17**, 901–904 (2020).
438. Nothias, L. F. *et al.* Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *bioRxiv* 812404 (2019). doi:10.1101/812404
439. Dührkop, K. *et al.* SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat. Methods* **16**, 299–302 (2019).
440. Schmid, R. *et al.* Ion Identity Molecular Networking in the GNPS Environment. *bioRxiv* 2020.05.11.088948 (2020). doi:10.1101/2020.05.11.088948
441. Shahaf, N. *et al.* The WEIZMASS spectral library for high-confidence metabolite identification. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
442. Vinaixa, M. *et al.* Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **78**, 23–35 (2016).
443. NIST20: Updates to the NIST Tandem and Electron Ionization Spectral Libraries | NIST. Available at: <https://www.nist.gov/programs-projects/nist20-updates-nist-tandem-and-electron-ionization-spectral-libraries>. (Accessed: 14th May 2021)
444. Smith, C. A. *et al.* METLIN: A metabolite mass spectral database. in *Therapeutic Drug Monitoring* **27**, 747–751 (Ther Drug Monit, 2005).
445. Horai, H. *et al.* MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J. Mass Spectrom.* **45**, 703–714 (2010).
446. Sawada, Y. *et al.* RIKEN tandem mass spectral database (ReSpecT) for phytochemicals: A plant-specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry* **82**, 38–45 (2012).
447. Wang, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **34**, 828–837 (2016).
448. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).
449. Human Microbiome Project, C. *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214 (2012).
450. Quinn, T. P. & Erb, I. Examining microbe–metabolite correlations by linear methods. *Nature Methods* **18**, 37–39 (2021).
451. Morton, J. T. *et al.* Learning representations of microbe–metabolite interactions. *Nat. Methods* **16**, 1306–1314 (2019).
452. Morton, J. T. *et al.* Reply to: Examining microbe–metabolite correlations by linear methods. *Nature Methods* **18**, 40–41 (2021).
453. Rosshart, S. P. *et al.* Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses. *Science (80-. )*. **365**, (2019).
454. Cassotta, M. *et al.* Links between nutrition, infectious diseases, and microbiota: Emerging technologies and opportunities for human-focused research. *Nutrients* **12**, 1–28 (2020).
455. Venema, K. & Van Den Abbeele, P. Experimental models of the gut microbiome. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* **27**, 115–126 (2013).
456. Marzorati, M. & Van De Wiele, T. An Advanced in Vitro Technology Platform to Study the Mechanism of Action of Prebiotics and Probiotics in the Gastrointestinal Tract. *J. Clin. Gastroenterol.* **50**, S124–S125 (2016).
457. Rinschen, M. M., Ivanisevic, J., Giera, M. & Siuzdak, G. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20**, 353–367 (2019).
458. Gerszten, R. E. & Wang, T. J. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature* **451**, 949–952 (2008).
459. Mayers, J. R. *et al.* Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development. *Nat. Med.* **20**, 1193–1198 (2014).
460. Rhee, E. P. *et al.* Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans. *J. Clin. Invest.* **121**, 1402–1411 (2011).
461. Wang, T. J. *et al.* Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat. Med.* **17**, 448–453 (2011).
462. Wang, T. J. *et al.* 2-Aminoadipic acid is a biomarker for diabetes risk. *J. Clin. Invest.* **123**, 4309–4317 (2013).
463. Mapstone, M. *et al.* Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat. Med.* **20**, 415–418 (2014).
464. Newgard, C. B. *et al.* A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab.* **9**, 311–326 (2009).
465. Koeth, R. A. *et al.* Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat. Med.* **19**, 576–585 (2013).
466. Sannicolo, S. *et al.* Identification of a predictive metabolic signature of response to immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: METABO-ICI clinical study protocol. *Respir. Med. Res.* 100845 (2021). doi:10.1016/j.resmer.2021.100845
467. Kaser, A. Genetic Risk of Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **383**, 1590–1591 (2020).

468. Imai, Y., Kuba, K. & Penninger, J. M. The renin-angiotensin system in acute respiratory distress syndrome. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* **3**, 225–229 (2006).
469. Kuba, K. *et al.* A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* **11**, 875–879 (2005).
470. Kimhofer, T. *et al.* Integrative Modeling of Quantitative Plasma Lipoprotein, Metabolic, and Amino Acid Data Reveals a Multiorgan Pathological Signature of SARS-CoV-2 Infection. *J. Proteome Res.* acs.jproteome.0c00519 (2020). doi:10.1021/acs.jproteome.0c00519
471. Shen, B. *et al.* Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell* **182**, 59–72.e15 (2020).
472. Y, C. *et al.* Kynurenic acid may underlie sex-specific immune responses to COVID-19. *Sci. Signal.* **14**, eabf8483 (2021).

# THE BLIND MEN AND THE ELEPHANT.

A [HINDOO](#) FABLE.

## I.

It was six men of Indostan  
To learning much inclined,  
Who went to see the Elephant  
(Though all of them were blind),  
That each by observation  
Might satisfy his mind.

## II.

The *First* approached the Elephant,  
And happening to fall  
Against his broad and sturdy side,  
At once began to bawl:  
"God bless me!—but the Elephant  
Is very like a wall!"

## III.

The *Second*, feeling of the tusk,  
Cried: "Ho!—what have we here  
So very round and smooth and sharp?  
To me 't is mighty clear  
This wonder of an Elephant  
Is very like a spear!"

## IV.

The *Third* approached the animal,  
And happening to take  
The squirming trunk within his hands,  
Thus boldly up and spake: "I see," quoth he, "the Elephant  
Is very like a snake!"

## V.

The *Fourth* reached out his eager hand,  
And felt about the knee.  
"What most this wondrous beast is like  
Is mighty plain," quoth he;  
"'T is clear enough the Elephant  
Is very like a tree!"

## VI.

The *Fifth*, who chanced to touch the ear,  
Said: "E'en the blindest man  
Can tell what this resembles most;  
Deny the fact who can,  
This marvel of an Elephant  
Is very like a fan!"

## VII.

The *Sixth* no sooner had begun  
About the beast to grope,  
Than, seizing on the swinging tail  
That fell within his scope,  
"I see," quoth he, "the Elephant  
Is very like a rope!"

## VIII.

And so these men of Indostan  
Disputed loud and long,  
Each in his own opinion  
Exceeding stiff and strong,  
Though each was partly in the right,  
And all were in the wrong!

## MORAL.

So, oft in theologic wars  
The disputants, I ween,  
Rail on in utter ignorance  
Of what each other mean,  
And prate about an Elephant  
Not one of them has seen!

The poems of John Godfrey Saxe (1872)