



**HAL**  
open science

# Implications de la production de kynurénines par *pseudomonas aeruginosa* dans la relation hôte-pathogène

Perrine Bortolotti

## ► To cite this version:

Perrine Bortolotti. Implications de la production de kynurénines par *pseudomonas aeruginosa* dans la relation hôte-pathogène. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S017 . tel-01480140

**HAL Id: tel-01480140**

**<https://theses.hal.science/tel-01480140>**

Submitted on 1 Mar 2017

**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.

Thèse délivrée par

L'Université Lille 2 – Droit et Santé

**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE**

**THÈSE D'UNIVERSITE**

**Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences**

Présentée et soutenue publiquement par

**PERRINE BORTOLOTTI**

Le 17 octobre 2016 à 14 heures

**IMPLICATIONS DE LA PRODUCTION DE KYNURENINES PAR PSEUDOMONAS  
AERUGINOSA DANS LA RELATION HOTE-PATHOGENE**

**JURY**

**Co-directeurs de thèse : Mme et M. les Professeurs Karine FAURE et Eric KIPNIS**

**Membres du jury:**

**Mme le Professeur Florence ADER (Rapporteur)**

**M. le Professeur David BOUTOILLE (Rapporteur et Président du Jury)**

**IMPLICATIONS DE LA PRODUCTION DE KYNURENINES  
PAR PSEUDOMONAS AERUGINOSA DANS LA RELATION  
HOTE-PATHOGENE**

# REMERCIEMENTS

*Un très grand merci :*

*A toute l'équipe du laboratoire EA7366,*

*Le Pr Benoit Guery pour m'avoir accueilli dans l'équipe de recherche,*

*Les Prs Eric Kipnis et Karine Faure pour avoir dirigé ce travail de thèse,*

*Les Drs Rodrigue Dessin, Camille Thieffry, Anne Boucher et Marion Thepaut, ainsi que Teddy Grandjean, Yu Haoran, Guillaume Jausions pour ces années de travail effectué ensemble,*

*Aux Prs Florence Ader et David Boutoille qui me font l'honneur de juger ce travail,*

*Au Pr Bertrand Toussaint, aux Drs Audrey Le Gouellec, Philippe Gosset, Muriel Pichavant, Benjamin Hennart, Olivier Lesouhaitier, ainsi qu'à Thierry Chassat, Carine Hauspie et Jacques Trauet, pour leur aide précieuse et la gentillesse avec laquelle ils l'ont apportée au cours de ces trois années,*

*A l'équipe du laboratoire de microbiologie de Pointe-à-Pitre et tout particulièrement aux Drs Sébastien Breurec et Sylvaine Bastian, pour m'avoir permis d'achever sereinement ce travail,*

*A ma famille, ma belle-famille, mes amis et Emmanuel, pour leurs encouragements et leur soutien inconditionnel.*

# Liste des abréviations

---

1MT	1-Méthyl-Tryptophane
AHL	Acyl-Homosérine Lactone
AHR	Récepteur aux arylhydrocarbones
AHRR	Represseur du récepteur aux arylhydrocarbones
ARNT	AhR Nuclear Translocator
BET	Bromure d'éthidium
BMDC	Bone marrow derived Dendritic Cell
BSA	Albumine sérique bovine
C4-HSL	N-butanoyl-L-homosérine lactone
CARD	CAspase Recruitment Domain
CCL	Chemokine (C-C motif) Ligand
CCR	Chemokine (C-C motif) Receptor
CD	Cluster de Différentiation
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigène
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
CX3CR	Chemokine (C-X3-C motif) Receptor
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) Ligand
CXCR	Chemokine (C-X-C motif) Receptor
DAMP	Danger-Associated Molecular Patterns
DC	Cellule Dendritique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
DR	Double Recombinant
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
FRO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ESM	Ecart Standard à la Moyenne
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
GAS	IFN- $\gamma$ Activating Site
GATA3	GATA binding protein 3
GCN2	General Growth Nonderepressible 2
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
Gm	Gentamicine
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPR	Récepteur couplé aux protéines G
Hsp90	Heat shock protein 90
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IDO	Indoléamine 2,3 Dioxygénase
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline

IGF	Insulin Growth Factor
IL	Interleukine
ILC	Innate Lymphoid Cells
IMF	Intensité moyenne de fluorescence
IMPa	Immunomodulating Metalloprotease of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IPAF	Interleukin-converting enzyme Protease Activating Factor
IRF	Interferon Regulatory Factor
ISRE	IFN-Stimulated Response Element
Kana	Kanamycine
KC	Keratinocyte chemoattractant
KO	Knockout
LB	Luria Bertani
Lec	Lectine
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBL	Mannose-Binding Lectin
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MMP	Matrix Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxydase
MR	Récepteur au mannose
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene (88)
NAC	N-acétyl-cystéine
NAD/NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NGAL	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
NK	Natural Killer
NLR	NOD-like receptor
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
<i>Pa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAVM	Pneumonie acquise sous ventilation mécanique
PBMC	Cellules du sang périphérique mononuclées
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
PFA	Paraformaldéhyde
PQS	<i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal
PqsR	<i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal Receptor
PRR	Pattern Recognition Receptors
PS	PhosphatidylSérine

PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
QS	Quorum Sensing
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROR $\gamma$	RAR-related Orphan Receptor $\gamma$
Rpm	Révolutions par minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SLAM	Signaling Lymphocytic Activation Molecule
SOCS3	Suppressor Of Cytokine Signaling 3
SOD	Superoxyde Dismutase
SP-A ou D	Surfactant Protein A ou D
SST3	Système de Sécrétion de Type Trois
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T reg	T régulateur
TCR	T Cell Receptor
TDO	Tryptophane 2,3 Dioxygénase
TGF	Tumor Growth Factor
Th	T helper
TLR	Toll-Like Receptors
TNF	Tumor Necrosis Factor
UFC	Unité formant colonie
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WT	Wild Type

# Sommaire

---

## INTRODUCTION

Chapitre 1. La pneumonie à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
1) <i>Pa</i> : caractéristiques microbiologiques .....	18
2) <i>Pa</i> en pathologie humaine .....	18
a. Un pathogène opportuniste .....	18
b. Le poumon : principale cible de <i>Pa</i> .....	19
c. <i>Pa</i> et pneumonie aigue .....	21
d. <i>Pa</i> et infection respiratoire chronique .....	25
3) Choix de la souche CHA .....	27
Chapitre 2. <i>Pa</i> et réponse immunitaire pulmonaire .....	28
1) Moyens de défense mécaniques contre l'infection pulmonaire .....	28
2) Réponse immunitaire innée .....	29
a. Les PRR et leurs PAMP dans l'infection à <i>Pa</i> .....	30
b. Rôle des cellules épithéliales .....	32
c. Rôle des macrophages .....	33
d. Rôle des polynucléaires neutrophiles .....	34
e. Rôle des cellules dendritiques .....	40
3) Réponses immunitaires adaptative et transitionnelle .....	44
a. Place de la réponse adaptative dans la pneumonie à <i>Pa</i> .....	44
b. Polarisation des Lc T helpers .....	44
c. La réponse Th17 .....	45
d. Rôles des autres populations lymphocytaires .....	46
4) Focus sur les cytokines d'intérêt dans la défense anti- <i>Pseudomonas</i> .....	48
a. TNF $\alpha$ .....	48
b. IL-8 (KC) .....	49
c. IL-1 $\beta$ et IL-18 .....	49
d. IL-10 .....	49
Chapitre 3. Rôle essentiel de la balance immunitaire .....	51
Chapitre 4. Stratégies thérapeutiques dans la pneumonie aigue à <i>Pa</i> : nouvelles perspectives	53
1) <i>Pa</i> : un pathogène problématique .....	53
2) Stratégie préventive .....	54
3) Stratégie anti-microbienne : l'antibiothérapie .....	54
4) Stratégie anti-lésionnelle : recherche translationnelle et thérapies adjuvantes .....	55
a. Cibler les facteurs de virulence .....	55
b. Restaurer une réponse immunitaire efficace .....	55
c. Contrôler la réponse immunitaire .....	56
Chapitre 5. La voie des kynurénines .....	57
1) Généralités sur les kynurénines .....	57
2) La voie des kynurénines chez l'homme .....	58
a. Voies métaboliques de synthèse des kynurénines chez l'homme .....	58
b. L'IDO1 .....	60
c. Rôle des autres enzymes de la voie des kynurénines .....	65
d. Production physiologique des métabolites de la voie des kynurénines .....	65
3) Voie des kynurénines chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	66
a. Voie métabolique de synthèse des kynurénines chez <i>Pa</i> .....	66
b. Régulateurs de la voie des kynurénines .....	67



c. Voie des kynurénines et virulence bactérienne .....	68
Chapitre 6. Implications de la voie des kynurénines dans la réponse anti-infectieuse .....	70
1) Rôle de l'IDO et des kynurénines dans la réponse anti-infectieuse.....	70
a. Rôle des kynurénines dans la réponse anti-infectieuse <i>in vitro</i> .....	70
b. Rôle des kynurénines dans la réponse anti-infectieuse <i>in vivo</i> .....	71
c. La voie des kynurénines dans le damage control .....	71
d. Voie des kynurénines et passage à la chronicité .....	72
2) Rôle du récepteur GPR35 .....	73
3) Rôle de l'AhR .....	74
a. Description de l'AhR.....	74
b. Ligands des AhR .....	75
c. Rôle de l'AhR dans l'immunité de barrière .....	76
d. Rôle de l'AhR au niveau pulmonaire.....	76
e. Maturation et activation des DC.....	78
f. L'AhR comme acteur du damage control dans la pneumonie.....	79
Chapitre 7. Les modèles <i>in vivo</i> .....	81
1) Le modèle de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	81
a. Description générale du modèle .....	81
b. Infection de <i>C. elegans</i> par <i>Pa</i> .....	83
c. Les mécanismes de défense chez <i>C. elegans</i> .....	83
d. Etude de l'interaction hôte-pathogène.....	84
e. Pertinence du modèle .....	84
2) Le modèle murin .....	85
a. Pertinence du modèle murin.....	85
b. Le modèle d'infection respiratoire aigue .....	86
c. Réponse immunitaire pulmonaire chez la souris.....	86
d. AhR, IDO et GPR35 chez la souris.....	87
Chapitre 8. Objectifs du travail .....	88

## MATERIELS ET METHODES

Chapitre 1. Souches, plasmides et oligonucléotides .....	90
1) Souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	90
a. Souche CHA.....	90
b. Souches mutantes de CHA.....	90
c. Souche clinique 13 et souches mutantes .....	90
2) Souches de <i>Escherichia coli</i> .....	91
3) Conditions de culture et de conservation des bactéries .....	91
4) Principaux antibiotiques utilisés : .....	92
5) Plasmides et vecteurs .....	92
6) Oligonucléotides .....	93
Chapitre 2 : Techniques de biologie moléculaire.....	94
1) La polymérisation en chaîne (PCR).....	94
2) Electrophorèse de l'ADN.....	95
3) Extraction sur gel des fragments d'ADN.....	96
4) Digestion enzymatique.....	96
5) Clonage .....	96
a. Sous-clonage.....	96
b. Déphosphorylation .....	97
c. Ligation.....	97
d. Transformation des souches d' <i>E. coli</i> et <i>Pa</i> .....	97

e.	Préparation de l'ADN plasmidique .....	97
f.	Dosage des acides nucléiques obtenus .....	98
Chapitre 3 :	Mutagenèse par échange allélique .....	98
1)	Échange allélique .....	98
a.	La conjugaison biparentale .....	99
b.	Sélection des clones « double recombinant » .....	99
c.	Excision de la cassette de résistance .....	100
d.	Mutagenèse tri-parentale : obtention de souches exprimant la Green fluorescent protein (GFP) .....	100
Chapitre 4 :	Modèles murins d'infection pulmonaire .....	101
1)	Animaux .....	101
2)	Réalisation d'un modèle d'agression pulmonaire aigue .....	101
a.	Instillations intra-nasales .....	101
b.	Préparation des inocula bactériens .....	101
3)	Réalisation d'un modèle de survie .....	102
4)	Réalisation d'un modèle de pneumonie chronique .....	102
a.	Préparation des billes d'agar .....	102
b.	Instillations endotrachéales .....	103
5)	Mise à mort des souris .....	104
6)	Paramètres recueillis lors des expérimentations .....	104
a.	Suivi clinique des souris .....	104
b.	Quantification de la charge bactérienne pulmonaire .....	104
c.	Dissémination bactérienne .....	105
d.	Lavages bronchoalvéolaires (LBA) .....	105
e.	Évaluation de la lésion pulmonaire .....	105
7)	Molécules utilisées <i>in vivo</i> .....	106
a.	1 <sub>LD</sub> méthyl-tryptophane (1 <sub>LD</sub> MT) .....	106
b.	L-kynurénine .....	106
c.	Acide kynurénique .....	106
Chapitre 5 :	Etude de la réponse de l'hôte <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> .....	107
1)	Numération formule sur liquide de lavage broncho-alvéolaire .....	107
2)	Mesures de la sécrétion de cytokines par Méthode ELISA .....	107
3)	Mesures de l'expression des transcrits par PCR quantitative en temps réel .....	107
a.	Extraction et purification des ARN du tissu pulmonaire .....	107
b.	Rétro-transcription: obtention des ADN complémentaires (ADNc) .....	108
c.	PCR quantitative .....	108
d.	Amorces utilisées pour les PCR quantitatives .....	109
e.	Analyse par la méthode des comparatives C <sub>T</sub> .....	110
4)	Analyses de la réponse cellulaire par cytométrie en flux .....	110
a.	Isolement des cellules alvéolaires et pulmonaires .....	110
b.	Analyse des types cellulaires par cytométrie en flux : marquages cellulaires de surface .....	111
c.	Analyse des types cellulaires par cytométrie en flux : marquages intracellulaires .....	112
Chapitre 6 :	Étude de la réponse de l'hôte <i>in vitro</i> .....	112
1)	Recueil et culture des macrophages péritonéaux .....	112
2)	Analyse de la cytotoxicité .....	113
3)	Dosage des cytokines dans les surnageants de macrophages par méthode ELISA .....	113
Chapitre 7 :	Dosage des métabolites de la voie des kynurénines .....	114
1)	Dosage colorimétrique par méthode d'Erlich Kovacs .....	114
2)	Dosage des métabolites de la voie des kynurénines par spectrométrie de masse .....	114

Chapitre 8 : Etude de la maturation et de l'activation des cellules dendritiques murines.....	115
1) Rôle des kynurénines bactériennes dans la maturation et l'activation des cellules dendritiques .....	115
Chapitre 9 : Modèle du nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	116
Chapitre 10 : Analyses statistiques.....	117

## RESULTATS

Chapitre 1: Etude de la voie des kynurénines chez <i>Pa</i> .....	119
1) Production de kynurénines par <i>Pa ex vivo</i> .....	120
a. Les vitesses de croissance des souches sauvages et mutantes sont similaires .....	120
b. <i>Pa</i> produit de la kynurénine en quantité soutenue .....	121
c. <i>Pa</i> produit de l'acide kynurénique et de la 3-OH-kynurénine .....	121
d. La voie des kynurénines est essentielle à la production d'anthranilate chez <i>Pa</i> .....	123
2) Etude de la production des kynurénines au niveau pulmonaire au cours de l'infection.....	125
a. Dosage des kynurénines intra-alvéolaires .....	125
b. Dosage des kynurénines dans le tissu pulmonaire .....	126
c. Implication de la voie des kynurénines de l'hôte dans la production globale des kynurénines .....	127
3) Rationnel de comparaison des différentes souches.....	129
Discussion .....	130
1) Constatations <i>ex vivo</i> .....	130
a. <i>Pa</i> produit de l'acide kynurénique .....	130
b. <i>Pa</i> produit de la 3-OH-kynurénine.....	131
c. La voie des kynurénines mène principalement à la production d'anthranilate chez <i>Pa</i> .....	132
2) Constatations <i>in vivo</i> .....	132
3) Rationnel pour un dialogue immunitaire inter-règne médié par la voie des kynurénines.....	133
Chapitre 2 : Rôle de la voie des kynurénines bactériennes au cours de l'infection chez <i>C. elegans</i> .....	135
1) Les kynurénines bactériennes ne présentent pas de toxicité directe sur <i>C. elegans</i> ...	135
2) Les kynurénines bactériennes sont impliquées dans la virulence de <i>Pa</i> au cours de l'infection .....	136
Discussion .....	137
Chapitre 3 : Rôle des kynurénines bactériennes dans un modèle murin d'infection respiratoire aigue .....	139
1) La production de kynurénines par les bactéries diminue la survie des souris .....	139
2) La production de kynurénines par les bactéries augmente le recrutement intra-alvéolaire de PNN .....	140
3) La production de kynurénines par les bactéries diminue la réponse cytokinique pro-inflammatoire à H12 et H24.....	143
4) La production de kynurénines bactériennes diminue la synthèse d'IL-17 et d'IL-22 à H24 par les cellules lymphocytaires.....	145
5) Effets de la supplémentation en L-kynurénine au cours de la pneumonie aigue à <i>Pa</i> .....	146
6) Effets de la supplémentation en acide kynurénique au cours de la pneumonie aigue à <i>Pa</i> .....	148
7) Implication de l'Ahr dans la réponse immune innée pulmonaire.....	152

a. L'AhR atténue la réponse inflammatoire de l'hôte au temps précoce de l'infection respiratoire aigue à <i>Pa</i> .....	153
b. L'AhR est impliqué dans l'immunomodulation médiée par les kynurénines.....	154
8) Implication de l'IDO dans la réponse immune innée pulmonaire.....	159
a. L'IDO est impliquée dans le recrutement cellulaire au cours de la pneumonie aigue à <i>Pa</i> .....	159
a. La voie des kynurénines bactériennes interagit avec la voie des kynurénines de l'hôte.....	163
Discussion.....	168
Chapitre 4 : Impact des kynurénines sur les APC <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	173
1) Kynurénines et DC <i>in vitro</i> .....	174
a. Les kynurénines modulent l'immunogénicité des DC2.4.....	174
b. Les kynurénines interfèrent avec la maturation et l'activation des BMDC.....	181
2) Kynurénines et APC <i>in vivo</i> .....	184
a. Les kynurénines bactériennes diminuent l'activation des DC <i>in vivo</i> .....	184
b. Les kynurénines bactériennes diminuent l'activation des macrophages pulmonaires <i>in vivo</i> .....	185
c. L'acide kynurénique diminue l'activation des APC <i>in vivo</i> .....	185
d. Rôle de l'AhR et de l'IDO dans l'activation des APC <i>in vivo</i> .....	187
e. Rôle de l'IDO dans l'activation des APC <i>in vivo</i> .....	190
Discussion.....	192
Chapitre 5. Rôle de la voie métabolique de l'antranilate au cours de l'infection respiratoire aigue à <i>Pa</i> .....	194
1) L'inhibition de la voie des kynurénines de <i>Pa</i> diminue la mortalité des souris.....	195
2) La voie des kynurénines bactériennes entraîne une exacerbation de la réponse neutrophilique de l'hôte.....	196
3) La voie des kynurénines bactériennes module l'activation des cellules présentatrices d'antigènes.....	200
4) La voie des kynurénines bactériennes exacerbe la réponse inflammatoire au cours de l'infection avec une souche clinique SST3 –.....	201
Discussion.....	204
Chapitre 6 : Rôle de la voie des kynurénines dans un modèle d'infection respiratoire chronique.....	206
1) La voie des kynurénines de <i>Pa</i> module le recrutement cellulaire alvéolaire au cours de l'infection respiratoire chronique.....	206
2) La voie des kynurénines de <i>Pa</i> altère la sécrétion d'IL-22 au cours de l'infection respiratoire chronique.....	207
Discussion.....	209
CONCLUSION-PERSPECTIVES.....	211
Travaux et Publications.....	212
BIBLIOGRAPHIE.....	214
RESUMÉ.....	234

# Table des figures

---

## INTRODUCTION

Figure 1: Le système respiratoire .....	20
Figure 2: Les voies aériennes et la barrière alvéolo-capillaire .....	21
Figure 3: Principaux facteurs de virulence de <i>Pa</i> lors de l'infection aigue des voies respiratoires. ....	24
Figure 4: Mécanismes de l'invasion tissulaire au cours de l'infection respiratoire aigue à <i>Pa</i> . ....	24
Figure 5: Physiopathologie de la pneumonie chronique à <i>Pa</i> .....	25
Figure 6: Mécanismes des lésions tissulaires au cours de la pneumonie chronique à <i>Pa</i> .....	27
Figure 7: Moyens de défenses mécaniques mis en jeu au cours de la pneumonie aigue .....	29
Figure 8: Principaux TLR et voies de signalisation associées impliqués dans la reconnaissance de <i>Pa</i> .....	31
Figure 9: Structure et rôles de l'inflammasome .....	32
Figure 10: Rôles des cellules épithéliales dans la réponse immunitaire .....	33
Figure 11: Alvéole saine contenant un macrophage alvéolaire en sentinelle .....	34
Figure 12: Mécanismes de recrutement des PNN sur le site infectieux depuis la lumière vasculaire .....	36
Figure 13: Recrutement intra-alvéolaire des PNN depuis l'interstitium .....	37
Figure 14: Principaux mécanismes de bactéricidie des PNN .....	38
Figure 15: Lésions tissulaires induites par les PNN adapté de Grommes <i>et al</i> .....	39
Figure 16: Etapes de maturation et d'activation des cellules dendritiques .....	40
Figure 17: La synapse immunologique adapté de Halloran <i>et al</i> .....	42
Figure 18: Principaux signaux activateurs et inhibiteurs au cours de l'interaction CPA-Lc .....	43
Figure 19: Les différentes possibilités de polarisation des lymphocytes T CD4 naïfs et principales cytokines produites .....	45
Figure 20: Régulation des mécanismes de bactéricidie des cellules NK .....	47
Figure 21: Rôle de la balance immunitaire dans la physiopathologie de l'infection .....	52
Figure 22: Voie métabolique des kynurénines chez l'homme .....	59
Figure 23: Principaux régulateurs de l'IDO1 .....	61
Figure 24: Boucle d'amplification intercellulaire de l'expression de l'IDO dans les DC .....	62
Figure 25: Contrôle de la réponse T effectrice et T régulatrice via l'IDO .....	63
Figure 26: Rôle immunomodulateur de l'IDO .....	64
Figure 27: Voies des kynurénines chez <i>Pa</i> .....	68
Figure 28: Mécanismes dépendants de l'IDO impliqués dans la chronicisation des infections .....	73
Figure 29: Voies canonique et non canoniques de la transduction du signal par l'Ahr .....	75
Figure 30: Rôle de l'Ahr dans l'immunogénicité des DC .....	79
Figure 31: Immunomodulation médiée par l'Ahr en fonction du temps et du ligand .....	80
Figure 32: Milieu de culture des nématodes <i>C. elegans</i> .....	82
Figure 33: Anatomie générale de <i>C. elegans</i> .....	83

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

<b>Figure 1</b> : Cartographies des plasmides pEX100Tlink et pUCGmlox .....	99
---	----

### Tableaux

Tableau 1: Description des souches de <i>Pa</i> utilisées dans ce travail.....	91
Tableau 2: Souches de <i>E. coli</i> utilisées pour la mutagenèse plasmidique.....	91
Tableau 3: Principaux antibiotiques utilisés.....	92
Tableau 4: Principaux plasmides et vecteurs utilisés pour les mutants de délétion.....	93
Tableau 5: Liste des oligonucléotides utilisés dans ce travail.....	94
Tableau 6: Descriptions des différents inocula des souches utilisées dans ces travaux.....	102
Tableau 7: Description du score clinique .....	104
Tableau 8: Molécules utilisées <i>in vivo</i> dans ce travail .....	106
Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour l'analyse des transcrits par PCR quantitative .....	110

## RESULTATS

### Figures

Figure 1: Voies métaboliques des souches de <i>Pa</i> et leurs mutants utilisées dans ce travail de thèse.....	120
Figure 2: Dosage des métabolites de la voie des kynurénines de la souche CHA et de ses mutants CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU en milieu LB non renouvelé.....	122
Figure 3: Dosage des métabolites de la voie des kynurénines de la souche clinique et de SC $\Delta$ kynA en milieu LB non renouvelé.....	123
Figure 4: Profil de sécrétion des différents métabolites de la voie des kynurénines des souches CHA, CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU au cours du temps <i>ex vivo</i> .....	124
Figure 5: Dosage des métabolites de la voie des kynurénines dans le LBA dans un modèle murin d'infection respiratoire aiguë avec les souches CHA, CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU. ....	126
Figure 6: Dosage des métabolites de la voie des kynurénines dans les tissus pulmonaires dans un modèle murin d'infection respiratoire aiguë à <i>Pa</i> .....	127
Figure 7: Dosage des métabolites de la voie des kynurénines dans le LBA dans un modèle murin d'infection respiratoire aiguë avec les souches CHA $\Delta$ kynU avec ou sans traitement par le 1-MT.....	128
Figure 8: Test de <i>fast-killing</i> avec les souches CHA, CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU.....	135
Figure 9: Test de <i>slow-killing</i> avec les souches CHA, CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU. ....	136
Figure 10 : Rôle de la production des kynurénines bactériennes dans un modèle de survie à 96 heures et sur l'évolution du poids. ....	140
Figure 11: Effet des kynurénines bactériennes sur l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte.....	141
Figure 12: Effets des kynurénines bactériennes sur la réponse immune cellulaire pulmonaire et alvéolaire. ....	143
Figure 13: Analyse de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë comparant des souris <i>Wt</i> infectées avec la souche CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU..	145
Figure 14: Analyse des cellules pulmonaires productrices d'IL-17 et d'IL-22. ....	145

Figure 15: Effets des kynurénines de synthèse sur l'évolution du processus infectieux et la réponse immune à H12.....	147
Figure 16: Effets des kynurénines de synthèse sur l'évolution du processus infectieux et la réponse immune à H24.....	148
Figure 17: Effets de l'acide kynurénique de synthèse sur l'évolution du processus infectieux et la réponse immune à H24. ....	150
Figure 18: Contrôle de l'absence de toxicité directe de l'instillation pulmonaire de L-kynurénine et d'acide kynurénique de synthèse. ....	151
Figure 19: Rôle de l'AhR sur l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte.....	155
Figure 20: Rôle de l'AhR dans la réponse cellulaire alvéolaire.....	156
Figure 21: Rôle de l'AhR dans la réponse cytokinique alvéolaire.....	157
Figure 22: Les kynurénines bactériennes augmentent l'activité transcriptionnelle de l'AhR.....	157
Figure 23: L'acide kynurénique active la transcription de l'IDO.....	158
Figure 24: Hypothèse de travail sur l'interaction des voies métaboliques bactérienne et de l'hôte au cours de l'infection respiratoire aigüe à <i>Pa</i> .....	158
Figure 25: Rôle de l'IDO dans l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte à H12.....	160
Figure 26: Effets de l'inhibition de l'IDO sur la formule des cellules immunitaires du LBA.....	161
Figure 27: Rôle de l'IDO sur la réponse cytokinique pulmonaire au cours de l'infection à CHAΔkynA.....	162
Figure 28: Rôle de l'IDO dans la modulation de la réponse cytokinique observée au cours de l'infection à CHAΔkynU.....	162
Figure 29: Rôle de l'IDO dans l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte à H24.....	163
Figure 30 : Les kynurénines bactériennes induisent l'expression transcriptionnelle de l'IDO.....	165
Figure 31: Rôles de l'AhR dans la maturation et l'activation des DC.....	173
Figure 32: Hypothèses de travail concernant le rôle des kynurénines sur l'immunogénicité des DC.....	174
Figure 33: Effet des kynurénines sur l'expression à la membrane des molécules de maturation et d'activation des DC.....	175
Figure 34: Effets des kynurénines sur la transcription de CD86.....	176
Figure 35: Effet des kynurénines sur la production de cytokines par les DC.....	177
Figure 36: Effets des kynurénines sur la transcription de l'IL-6 et du TNFα par les DC2.4.....	178
Figure 37: Effets des kynurénines sur la transcription des gènes CXCL1, CXCL2 et CXCL10.....	179
Figure 38: Effets des kynurénines sur l'expression à la membrane et la transcription de CCR7.....	180
Figure 39: Effets des kynurénines sur la production cytokinique des BMDC.....	182
Figure 40: Effets des kynurénines bactériennes sur l'activation des DC pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aigüe à <i>Pa</i> .....	184
Figure 41: Effets des kynurénines bactériennes sur l'activation des macrophages pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aigüe à <i>Pa</i> .....	185
Figure 42: Effets de l'acide kynurénique sur l'activation des DC pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aigüe à <i>Pa</i> .....	186
Figure 43: Effets de l'acide kynurénique sur l'activation des macrophages pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aigüe à <i>Pa</i> .....	186
Figure 44: Rôle de l'AhR dans l'activation des DC pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aigüe à <i>Pa</i> .....	188

Figure 45: Rôle de l'AhR dans l'activation des macrophages pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aiguë à <i>Pa</i> .	189
Figure 46: Rôle de l'IDO dans l'activation des DC pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aiguë à <i>Pa</i> .	190
Figure 47: Rôle de la voie de l'anthranilate dans un modèle de survie à 96 heures et sur l'évolution du poids.	196
Figure 48: Rôle de la voie de l'anthranilate dans un modèle de survie à 96 heures lors d'une infection avec une souche clinique.	196
Figure 49: Impact de l'activation de la voie de l'anthranilate sur l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte au cours de la pneumonie aiguë à <i>Pa</i> (souche CHA).	197
Figure 50: Impact de l'activation de la voie de l'anthranilate sur le recrutement cellulaire au cours de la pneumonie aiguë à <i>Pa</i> (souche CHA).	198
Figure 51: Impact de l'activation de la voie de l'anthranilate sur la réponse cytokinique de l'hôte au cours de la pneumonie aiguë à <i>Pa</i> (souche CHA).	200
Figure 52: Effet de la voie des kynurénines sur l'activation des CPA au cours de l'infection à <i>Pa</i> (souche CHA).	201
Figure 53: Impact de l'activation de la voie de l'anthranilate sur l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte au cours de la pneumonie aiguë à <i>Pa</i> (Souche clinique).	202
Figure 54: Impact de l'activation de la voie des kynurénines bactériennes sur la réponse cytokinique de l'hôte au cours de la pneumonie aiguë à <i>Pa</i> (souche clinique).	203
Figure 55: Analyse de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'agression pulmonaire chronique comparant souris <i>Wt</i> infectées avec la souche CHA par rapport à la souche CHA $\Delta$ kynA.	207
Figure 56: Impact de la voie des kynurénines bactériennes sur la production intra-alvéolaire d'IL-10, 17 et 22 dans un modèle murin d'infection respiratoire chronique à J5.	208

## **Tableaux**

Tableau 1: Comparaison de la vitesse de croissance des souches.	121
Tableau 2: Principaux effets des kynurénines sur les paramètres d'activation et de maturation des cellules dendritiques.	181

## **Synthèses**

Synthèse 1 : Voie des kynurénines hypothétique de <i>Pa</i> au vu des métabolites produits.	124
Synthèse 2 : Principales variations métaboliques des composés de la voie des kynurénines dans le tissu pulmonaire et le compartiment alvéolaire au cours de la pneumonie aiguë à <i>Pa</i> .	128
Synthèse 3 : Proposition de modèle d'interactions entre les kynurénines bactériennes, la voie des kynurénines de l'hôte et l'AhR, et impact sur l'évolution de la réponse immunitaire et l'évolution du processus infectieux.	167
Synthèse 4: Impact des kynurénines bactériennes sur le recrutement et les fonctions des APC au cours de la pneumonie aiguë à <i>Pa</i> .	193



# Partie 1. Introduction

---

*Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) est un pathogène opportuniste responsable d'infections pulmonaires sévères chez les patients à risque : patients atteints de mucoviscidose, immunodéprimés, et patients de réanimation. Malgré les progrès réalisés dans le traitement préventif et dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués au cours de la pneumonie à *Pa*, la mortalité attribuable reste élevée même sous traitement précoce et optimal (1). Les résistances naturelles étendues de *Pa* aux antibiotiques (2) et l'émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques de dernière génération complexifie la prise en charge, aboutissant parfois à une impasse thérapeutique (3). Dans ce contexte, l'appauvrissement de la filière industrielle de recherche et développement en antibiotiques rend alors le développement de thérapeutiques adjuvantes indispensable.

Des thérapeutiques adjuvantes au cours des infections à *Pa* peuvent viser à diminuer la pathogénicité du micro-organisme en ciblant différents facteurs de virulence tels que des protéines du système de sécrétion type 3 (SST3) (4) ou en interférant avec l'adhésion du pathogène aux cellules de l'hôte via les lectines (5). Une autre stratégie consiste à moduler la réponse immunitaire de l'hôte, qui lorsqu'elle est adaptée permet de limiter l'infection et éliminer le pathogène mais lorsqu'elle est excessive joue un rôle majeur dans la constitution des lésions et dans la gravité de l'infection. Des études récentes suggèrent que la voie des kynurénines pourrait être impliquée dans la pathogénicité de *Pa* (6).

Les kynurénines sont un groupe de métabolites produits par la voie enzymatique du catabolisme oxydatif d'un acide aminé, le tryptophane, activée en réponse à un stimulus inflammatoire chez l'homme (7). Les différents métabolites de la voie des kynurénines, notamment la kynurénine et l'acide kynurénique, possèdent des propriétés immunomodulatrices multiples et distinctes. Certains procaryotes tels que *Pa* possèdent également la voie enzymatique des kynurénines. Au cours de l'infection, la production de kynurénines par *Pa* pourrait donc interférer avec la mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte et sa régulation au cours des différentes phases de l'infection, altérant la balance immunitaire pulmonaire au profit du pathogène. A ce titre, la voie des kynurénines de *Pa* pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle.

L'objectif de ce travail est donc de déterminer le rôle joué par les métabolites de la voie des kynurénines de *Pa* au cours de l'infection et plus particulièrement sur la réponse immunitaire de l'hôte dans un modèle murin de pneumonie aiguë.

## ***Chapitre 1. La pneumonie à Pseudomonas aeruginosa***

### **1) *Pa* : caractéristiques microbiologiques**

*Pa* fut découvert en 1872 par Schroter qui lui donna le nom de *Bacillus aeruginosus* (« vert-de-gris » en latin) après observation d'un aspect bleuté du pus en présence de la bactérie. En 1882, Gessard isola le bacille et en fit la première description dans sa thèse de doctorat intitulée « De la Pyocyanide et de son Microbe », et lui donna le nom de bacille pyocyanique.

*Pa* est un bacille Gram négatif, de 1 à 5  $\mu$  m de long, mobile en ligne droite grâce à un flagelle monotriche polaire. Sur gélose, il forme des colonies irisées métalliques, parfois verdâtres, lisses et plates, qui produisent une odeur caractéristique de type seringa. C'est une bactérie aérobie possédant un métabolisme oxydatif, mais pouvant également survivre en milieu anaérobie en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électron (8). *Pa* se multiplie par division à une température optimale de 37°C, mais tolère des variations de température et de pH.

Le génome de PAO1, souche de référence de laboratoire de *Pa*, a été entièrement séquencé en 2000 (Données disponibles sur le site [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). Constitué de 6,3 Mégabases codant pour 5570 cadres de lecture, il s'agit d'un des plus grands génomes bactériens connus (9). Il contient également la plus forte proportion de gènes impliqués dans la régulation de la virulence et des fonctions métaboliques chez les procaryotes, expliquant l'adaptation et la résistance de la bactérie dans des niches écologiques variées et pauvres en nutriments (10).

Ces différentes caractéristiques microbiologiques font de *Pa* un saprophyte ubiquitaire de l'environnement retrouvé dans l'eau, le sol, les surfaces inorganiques, chez les animaux et les végétaux sous forme planctonique ou dans un biofilm (11,12). Chez l'Homme, *Pa* est une bactérie commensale de la peau ainsi que du tractus gastro-intestinal (13,14).

### **2) *Pa* en pathologie humaine**

#### **a. Un pathogène opportuniste**

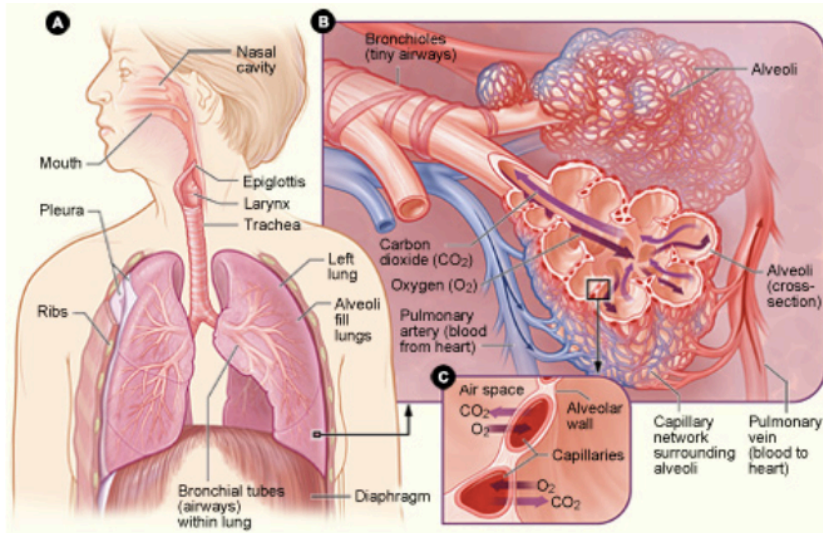
Inoffensif chez l'individu sain, *Pa* devient un pathogène opportuniste chez les patients présentant une altération des défenses immunitaires systémiques ou locales au niveau de multiples sites d'infection potentiels. *Pa* est responsable de bactériémies, de surinfections cutanées de plaies et de brûlures (15), d'infections urinaires, (15), d'infections ostéo-articulaires, oculaires (16) ou neuro-méningées. L'atteinte la plus fréquente est celle du

système respiratoire (1), pouvant être aiguë ou chronique selon le type de déficit immunitaire de l'hôte et les facteurs de virulence exprimés par la bactérie (17,18). *Pa* entraîne des infections chroniques associées à des exacerbations aiguës chez les sujets présentant un déficit chronique de l'immunité pulmonaire innée (mucoviscidose, bronchopneumopathie chronique obstructive, dilatation des bronches) (19) et des infections aiguës chez les patients sous ventilation mécanique invasive hospitalisés en unités de réanimation et de soins intensifs (18).

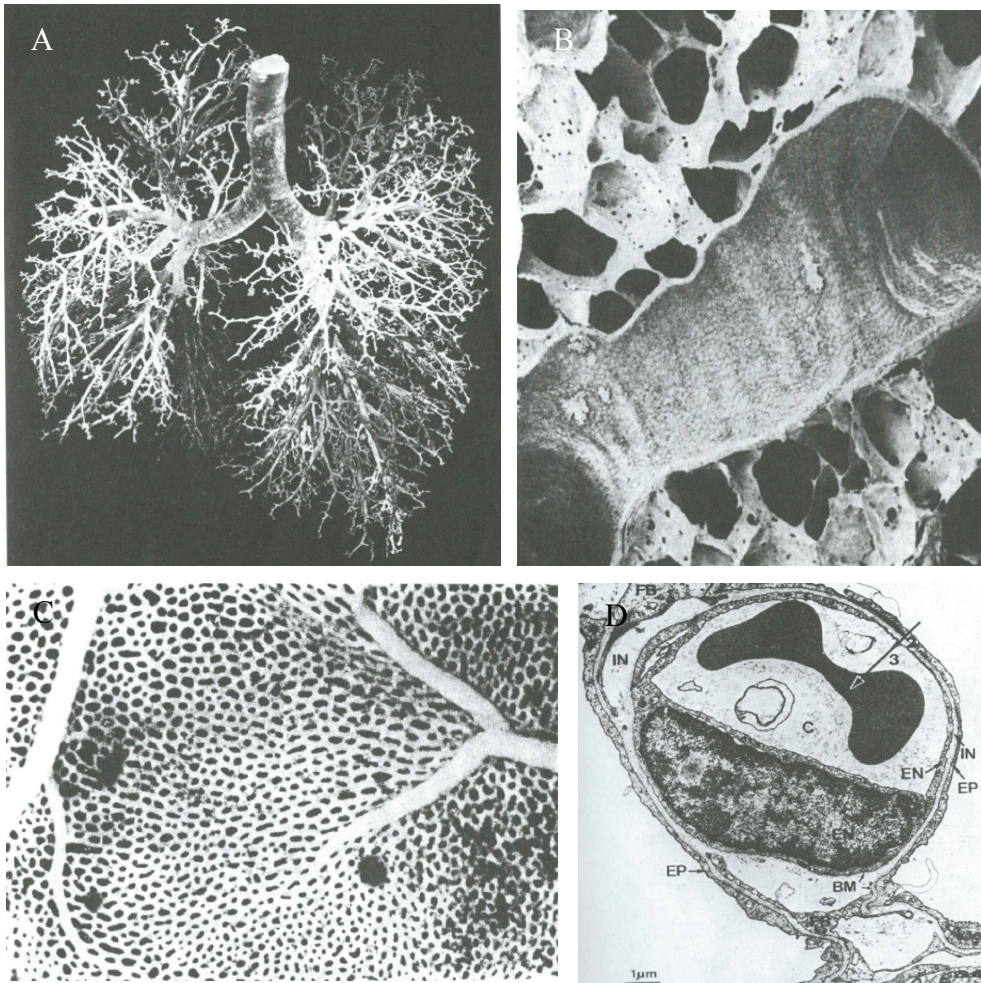
## **b. Le poumon : principale cible de *Pa***

### **1. *Physiologie pulmonaire***

Le poumon est l'organe permettant les échanges gazeux entre le sang et l'air indispensables à la respiration cellulaire aérobie chez les vertébrés. Il fait partie de l'appareil respiratoire constitué de la cage thoracique, du diaphragme, des voies aériennes supérieures (cavité oropharyngée, larynx et partie supérieure de la trachée), des voies aériennes inférieures (partie intra-thoracique de la trachée, bronches et bronchioles) et de la zone respiratoire comprenant les conduits et sacs alvéolaires et leur tissu conjonctif de soutien. Le poumon correspond aux voies aériennes inférieures et aux quelques 300 millions de sacs alvéolaires qui y sont rattachés. Le rôle de la zone respiratoire est d'assurer l'apport sanguin en oxygène et l'élimination du gaz carbonique par diffusion passive selon un gradient de concentration air - sang à travers une couche de tissu, appelée barrière alvéolo-capillaire (**Figure 1**). Selon la loi de diffusion de Fick, la quantité de gaz qui diffuse à travers une couche de tissu est proportionnelle à sa surface et inversement proportionnelle à son épaisseur. Avec ses 0,3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et une surface comprise entre 50 et 100  $\text{m}^2$  grâce à l'organisation alvéolée, la barrière alvéolo-capillaire est parfaitement adaptée à sa fonction d'échange gazeux dont l'efficacité dépend étroitement de l'intégrité de sa structure (20). En cas de lésion, c'est l'oxygénation de tout l'organisme qui est compromise avec un risque vital à très court terme (**Figure 2**).



**Figure 1: Le système respiratoire** A, Vue d'ensemble du système respiratoire B, Représentation du système broncho-alvéolaire et du réseau vasculaire entourant les parois alvéolaires dont l'ensemble constitue la paroi alvéolo-capillaire. La circulation de l'air est représentée par les flèches violettes, celle du sang veineux central appauvri en oxygène et riche en dioxyde de carbone par les flèches bleues, et celle du sang oxygéné et décarboxylé après échanges gazeux à travers la paroi alvéolo-capillaire par les flèches rouges C, Agrandissement de la paroi alvéolo-capillaire et représentation des échanges gazeux (élimination du dioxyde de carbone et oxygénation du sang). (National heart, lung and blood institute, nhlbi.hin.gov, « The respiratory system »)



**Figure 2: Les voies aériennes et la barrière alvéolo-capillaire.** **A**, Moulage des voies aériennes d'un poumon humain de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales (les alvéoles ne sont pas représentées) **B**, Photographie en microscopie électronique d'une coupe de poumon montrant plusieurs alvéoles et une petite bronchiole. **C**, Vue d'une paroi alvéolaire montrant le réseau dense de capillaires avec une artère à gauche et une veine à droite **D**, Photographie en microscopie électronique d'un capillaire pulmonaire (C) dans la paroi alvéolaire contenant une hématie. La flèche noire représente la diffusion du gaz alvéolaire vers le globule rouge à travers la paroi d'environ 0,3 µm, constituée de l'épithélium alvéolaire (EP), l'interstitium (IN), l'endothélium capillaire (EN) et le plasma (John B West, La physiologie respiratoire, 4<sup>ème</sup> édition, Edition Pradel, 1995)

## 2. *Pneumonie : définition et épidémiologie*

La pneumonie ou infection respiratoire basse est une infection du parenchyme pulmonaire qui résulte de l'invasion et de la multiplication d'un microorganisme, dépassant les capacités de défense de l'hôte et provoquant des lésions tissulaires (21). Les pneumonies bactériennes peuvent être divisées en deux catégories, celles affectant les hôtes immunocompétents, imputables à des bactéries hautement virulentes comme le pneumocoque, et celles provoquées par des bactéries commensales et/ou environnementales à la faveur d'une dépression immunitaire, comme c'est le cas pour *Pa* (17).

La pneumonie est la quatrième cause de mortalité dans le monde et la première cause de mortalité par maladie infectieuse en Europe (22,23). La pneumonie nosocomiale est l'infection nosocomiale la plus fréquente après l'infection urinaire et la première cause de mortalité à l'hôpital en France (chiffres réseau R.A.I.S.I.N, enquêtes nationales de prévalence 2012 et 2013). *Pa* est le premier pathogène impliqué dans les infections respiratoires chroniques (24). Plus particulièrement, chez les malades atteints de mucoviscidose, l'infection respiratoire est la première cause de morbidité et de mortalité (24). Il représente également la première bactérie en cause et le pathogène associé au pronostic le plus péjoratif au cours des PAVM (pneumopathies acquises sous ventilation mécanique) (25,26).

### c. *Pa et pneumonie aigue*

#### 1. *Physiopathologie de la pneumonie aigue à Pa*

La forte prévalence de *Pa* dans les pneumonies nosocomiales s'explique par l'exposition de malades dont l'état général est altéré à un réservoir bactérien important, endogène par portage oropharyngé ou gastro-intestinal, ou exogène à partir du milieu hospitalier et des dispositifs de soin (27). Les pneumonies aiguës communautaires à *Pa* sont rares car le réservoir et les facteurs de risque sont moins présents. La pneumonie nosocomiale la plus fréquente est la PAVM. La PAVM à *Pa* fait le plus souvent suite à une colonisation pulmonaire par la bactérie qui résulte de microinhalations des micro-organismes de l'oropharynx vers les voies aériennes inférieures. L'évolution du processus infectieux est favorisée par l'altération des mécanismes de défense pulmonaires. La présence d'une sonde

d'intubation trachéale source de lésions épithéliales trachéo-bronchiques et réservoir bactérien potentiel par stagnation au-dessus du ballonnet, l'altération de la clairance muco-ciliaire, l'âge élevé, une éventuelle neutropénie ou un traitement immunosuppresseur (27) sont les principaux facteurs de risque de PAVM à *Pa* (14,28). Les infections pulmonaires aiguës à *Pa* sont caractérisées par une forte multiplication bactérienne sous forme planctonique mobile, invasive et cytotoxique via l'expression de nombreux facteurs de virulence.

## **2. Facteurs de virulence impliqués dans la pneumonie aigue**

Une fois présent dans les voies aériennes inférieures, *Pa* adhère à la surface des cellules épithéliales par des protéines membranaires, des adhésines, sécrétées telles que les lectines (LecA et LecB) ou constitutives, telles que le flagelle et les pili de type 4 (27). Flagelle et pili sont aussi responsables de la mobilité bactérienne, permettant la dispersion des micro-organismes et leur déplacement vers les zones de multiplication les plus favorables (29). *Pa* sécrète alors un arsenal de molécules responsables de la destruction des principaux éléments de défense antibactériens présents au niveau des voies aériennes.

Les élastases et autres protéases permettent d'inactiver les immunoglobulines et les composés du complément contenus dans le mucus tapissant l'épithélium. Les rhamnolipides en synergie avec les phospholipases hydrolysent le surfactant alvéolaire, facilitant l'accès des facteurs de virulence bactériens à leur cible cellulaire. L'exotoxine A, lipases, phospholipases, phénazines et lectines solubles sécrétées ont une action cytotoxique sur les cellules épithéliales pulmonaires et les jonctions serrées intercellulaires sont clivées par les élastases. Enfin, le lipopolysaccharide (LPS), le flagelle et pili présents à la surface de la paroi bactérienne sont reconnus par les PRR (pathogen recognition receptors) de l'hôte et induisent une réaction pro-inflammatoire intense qui accentue les dommages épithéliaux. L'action synergique de ces différents facteurs altère la fonction barrière de l'épithélium respiratoire, permettant l'invasion tissulaire par la bactérie puis sa dissémination systémique (17,30,31).

Parmi les autres facteurs de virulence exprimés à la phase aigue de l'infection, le système de sécrétion de type trois (SST3), présent chez 70% des souches cliniques, est un déterminant majeur de la virulence de *Pa* et aggrave le pronostic de l'infection (31). Ce système sécrétoire en forme d'aiguille permet à la bactérie « d'injecter » des toxines directement dans les cellules de l'hôte, entraînant d'importantes lésions tissulaires. La conformation du SST3, composé de nombreuses protéines, peut être décrite en trois parties distinctes : une partie trans-membranaire servant de base à l'aiguille, l'aiguille extra-

membranaire elle-même, et une partie terminale dont le rôle est de permettre l'ancrage de l'aiguille dans la membrane des cellules grâce au « translocon », complexe composé des protéines PopB, PopD, et PcrV. Les protéines injectées sont les exotoxines ExoS ou ExoU qui ne sont jamais co-sécrétées, ExoY et ExoT. ExoS possède une double activité de GTPase et d'ADP-ribosyltransférase désorganisant le cytosquelette d'actine des cellules, ExoT possède une activité similaire, ExoY est une adénylate cyclase dont le rôle dans l'infection reste à déterminer et ExoU est une phospholipase extrêmement cytotoxique entraînant une nécrose cellulaire rapide (28).

D'autres facteurs de virulence contribuent également à la valeur adaptative/sélective (« fitness ») bactérienne, comme la pyoverdine, principal sidérophore de *Pa* qui permet son approvisionnement en fer, indispensable à la croissance bactérienne, à partir de celui contenu dans le milieu (27). La régulation de l'expression de ces facteurs est un phénomène complexe qui implique pour certains le système de quorum-sensing (QS). Le QS est un système de communication entre bactéries permettant l'adaptation de *Pa* à son environnement en coordonnant l'expression des facteurs de virulence en fonction de la phase aigüe ou chronique de l'infection, des caractéristiques du milieu environnant et de la densité bactérienne. Les messagers sont des petites molécules appelées auto-inducteurs, produites par chaque bactérie, diffusant librement entre les membranes et jouant un rôle de cofacteur d'un facteur de transcription spécifique. Lorsque la densité bactérienne atteint un niveau critique, la concentration proportionnelle en auto-inducteurs est suffisamment élevée pour déclencher l'activation coordonnée de gènes cibles pour toute la population bactérienne (32). Trois couples « auto-inducteur / facteur de transcription » sont connus chez *Pa*, l'AHL (3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone) activant l'activateur transcriptionnel LasR, le C4 HSL (butyryl homoserine lactone) activant RhIR et le PQS (*Pseudomonas* quinolone signal correspondant au 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone) activant PqsR (33,34). Le système de quorum-sensing est également impliqué dans la régulation de la survie bactérienne et la formation du biofilm (27).

Les principaux facteurs de virulence de *Pa* exprimés au cours de l'infection respiratoire aigüe sont représentés dans la **Figure 3**. Les différentes étapes de l'infection aboutissant à l'invasion tissulaire par la bactérie sont résumées dans la **Figure 4**.



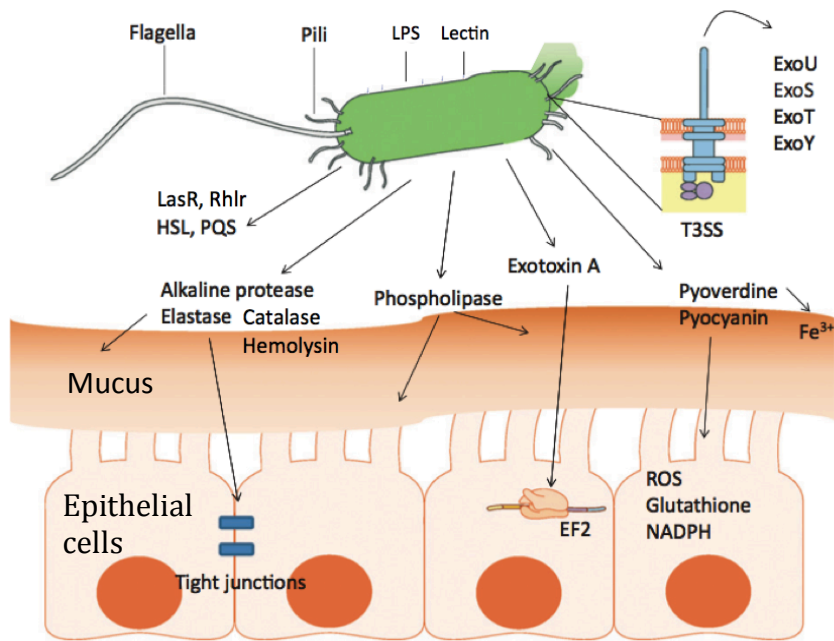


Figure 3: Principaux facteurs de virulence de *Pa* lors de l'infection aigüe des voies respiratoires (27).

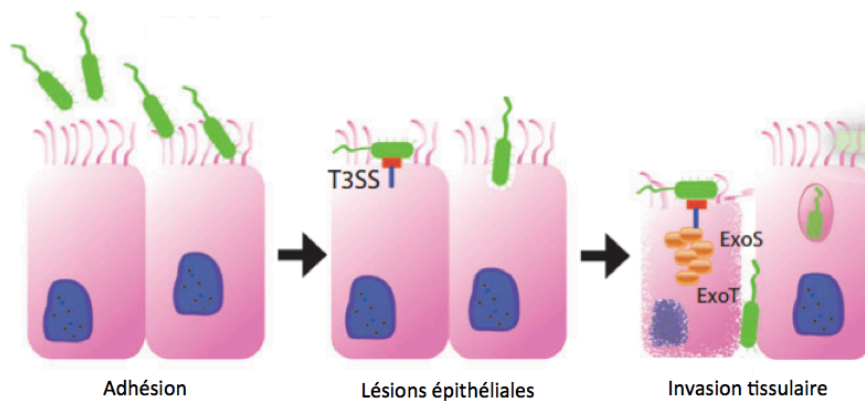


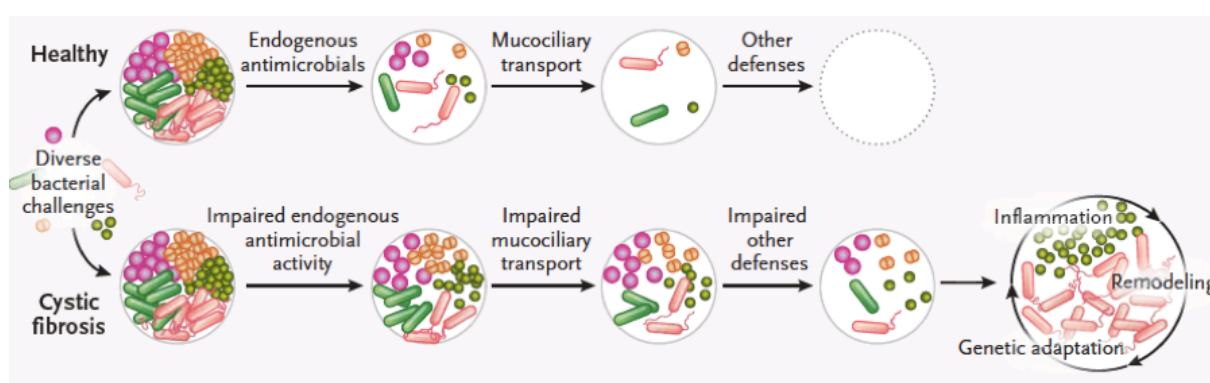
Figure 4: Mécanismes de l'invasion tissulaire au cours de l'infection respiratoire aigüe à *Pa* (17). Les multiples facteurs de virulences exprimés par *Pa* lors d'une infection respiratoire aigüe lui permettent d'adhérer à l'épithélium respiratoire, de l sionner les cellules épithéliales et leurs jonctions intercellulaires jusqu'à entraîner une destruction de la barrière épithéliale, facilitant ainsi l'invasion tissulaire.

La PAVM   *Pa* peut être r solvative *ad integrum* sous traitement antibiotique et traitement des facteurs favorisants. Les récidives et les échecs thérapeutiques conduisant au décès malgré une antibiothérapie adaptée suggèrent cependant que la restauration concomitante des défenses de l'hôte est indispensable à l'élimination du pathogène (17). Chez des malades à risque dont l'immunité pulmonaire innée est altérée, l'infection peut persister au long cours et devenir chronique.

#### d. *Pa* et infection respiratoire chronique

##### 1. *Physiopathologie de la pneumonie chronique*

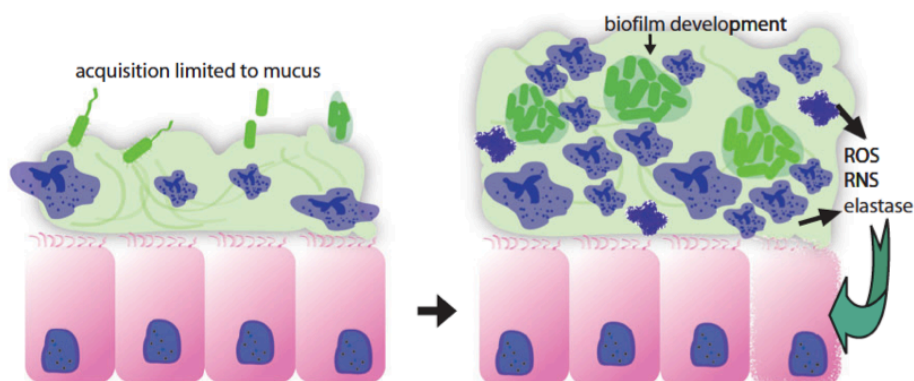
A la différence du caractère transitoire de la pneumonie aigüe où *Pa* est éradiqué des voies aériennes après guérison, la pneumonie chronique correspond à la persistance pendant plusieurs années de la bactérie dans les voies aériennes (17). L'exemple le plus typique d'infection chronique est celui des malades atteints de la mucoviscidose, qui acquièrent *Pa* le plus souvent à l'adolescence et restent infectés jusqu'à la fin de leur vie. Ces patients sont porteurs d'une mutation inactivatrice d'un canal chlore CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) responsable d'une déshydratation du mucus des voies aériennes devenant épais, visqueux et incapable d'assurer son rôle dans l'éradication du pathogène des voies aériennes (35). Initialement, les bactéries inhalées déclenchent une infection respiratoire aigüe accompagnée d'une réponse inflammatoire intense, mais dont l'efficacité est altérée par la consistance pathologique du mucus d'une part, et par d'autres dysfonctionnements de l'immunité innée inhérents à la pathologie d'autre part, aboutissant à l'échec de l'élimination des micro-organismes. Progressivement, ceux-ci adaptent leur mode de vie à l'environnement pulmonaire et constituent une stimulation immunologique durable entraînant une réponse neutrophilique persistante mais inefficace, responsable en grande partie des lésions tissulaires et de l'inflammation pulmonaire chronique observées le long de l'évolution de la maladie. L'infection persistante et l'inflammation non contrôlée qui en résulte aboutissent à une détérioration progressive de la fonction pulmonaire avec remodelages et obstructions sévères des voies aériennes dont l'évolution est souvent fatale (**Figure 5**) (17,27,35).



**Figure 5: Physiopathologie de la pneumonie chronique à *Pa* (35)** Chez un individu sain (en haut), les moyens de défenses permettant de tuer puis d'éliminer les pathogènes qui pénètrent dans les voies aériennes assurent l'homéostasie de l'environnement pulmonaire et préviennent la survenue d'infections respiratoires. Chez les patients dont les moyens de défense sont altérés (en bas), les bactéries prolifèrent dans les voies aériennes et adaptent leur mode de vie à l'environnement pulmonaire où elles persistent dans le temps. Cela génère une réaction inflammatoire chronique responsable de remodelage tissulaire conduisant à une altération de la fonction respiratoire.

## 2. Facteurs de virulence impliqués dans la pneumonie chronique

Le phénotype des souches de *Pa* retrouvées dans les pneumonies chroniques est différent de celui des souches responsables de pneumonies aiguës. Alors que ces dernières expriment un vaste arsenal de facteurs de virulence, les isolats retrouvés dans les pneumonies chroniques perdent ou répriment progressivement l'expression des facteurs de virulence les plus immunogènes comme le flagelle, les pili ou l'antigène O du LPS (36), et certains autres facteurs de virulence tels que le SST3 ou la pyocyanine (27). Les bactéries produisent à ce stade des exopolysaccharides associés parfois une surproduction d'alginate définissant le phénotype mucoïde, favorable à la constitution de biofilm dans les voies aériennes (37,38). Le biofilm correspond à un agrégat bactérien attaché à une surface et entouré d'une matrice extracellulaire permettant à la bactérie de se protéger du système immunitaire et des antibiotiques (39,40). La consistance et la purulence du mucus constituent une surface propice à l'adhésion bactérienne (41). La croissance bactérienne lente due à la pauvreté du biofilm en oxygène et en nutriments contribue également à la résistance aux antibiotiques. Le mode de vie en biofilm ainsi que le caractère faiblement immunogène et peu cytotoxique des souches correspondent à une stratégie de « camouflement bactérien » qui, associée à une réponse immunitaire locale défaillante, explique les difficultés à éliminer la bactérie et la persistance de l'infection dans le temps. Cependant, la présence de microcolonies de *Pa* dans le biofilm constitue un stimulus inflammatoire persistant entraînant le recrutement de PNN dans les voies aériennes. Les PNN échouent le plus souvent à éliminer les bactéries protégées par leur biofilm, mais sont responsables de lésions des tissus adjacents (**Figure 6**). Enfin, le biofilm constitue un réservoir de bactéries qui peuvent épisodiquement se disperser et être responsables d'épisodes d'exacerbations aiguës. Celles-ci génèrent des dommages tissulaires locaux engendrant un cercle vicieux pro-inflammatoire qui favorise la pérennisation de l'infection et accélère la dégradation de la fonction respiratoire (17).



**Figure 6: Mécanismes des lésions tissulaires au cours de la pneumonie chronique à *Pa* (17)** Le biofilm permet la persistance de foyers bactériens qui constituent un stimulus inflammatoire chronique responsable du recrutement sur site de cellules effectrices (PNN) incapables d'éliminer les bactéries mais pourvoyeuses de lésions des tissus adjacents.

### **3) Choix de la souche CHA**

La souche de *Pa* majoritairement utilisée dans ce travail est la souche CHA. Elle a initialement été isolée chez un patient atteint de mucoviscidose 4 ans après le premier épisode de colonisation des voies aériennes à *Pa* (42). Elle partage une grande analogie avec le génome de PAO1. Récemment, CHA a été incluse dans le panel de référence international des souches de *Pa* (43). Elle présente un phénotype mucoïde (44), mais possède un flagelle, des pili de type IVa fonctionnels et exprime fortement le SST3 permettant la sécrétion d'ExoS, ExoT et ExoY. Ces caractéristiques lui confèrent une virulence préservée compatible avec l'étude des infections respiratoires aiguës *in vivo*, mais autorisent également son utilisation dans des modèles de pneumonies chroniques (45).

## ***Chapitre 2. Pa et réponse immunitaire pulmonaire***

Avec ses 10000 litres d'air respirés quotidiennement, et sa surface d'échange entre 100 et 200 m<sup>2</sup>, le poumon est un organe en contact constant avec le milieu extérieur et exposé en permanence à de nombreux pathogènes. Pourtant, les poumons des individus sains sont la plupart du temps exempts de toute infection, reflétant la grande efficacité des fonctions barrière et anti-infectieuses des mécanismes de défense innés pulmonaires (46). Plusieurs systèmes de défenses principaux existent contre la pneumonie aigüe à *Pa* (17).

### **1) Moyens de défense mécaniques contre l'infection pulmonaire**

Les voies aériennes constituent une réelle barrière physique contre les pathogènes dont la fonction est directement dépendante de sa composition cellulaire. En plus du rôle barrière, les voies aériennes jouent un rôle essentiel dans la clairance du pathogène. Les acteurs impliqués sont le mucus qui tapisse les voies respiratoires, l'escalator muco-ciliaire, et la structure de l'épithélium empêchant son franchissement par les micro-organismes (**Figure 7**) (47).

Les voies aériennes sont revêtues de deux types d'épithéliums: d'une part, un épithélium de revêtement localisé à la surface des voies respiratoires, et d'autre part, un épithélium glandulaire situé dans la sous-muqueuse. L'épithélium de revêtement est constitué de cellules étroitement juxtaposées dont les jonctions serrées assurent l'étanchéité contre les micro-organismes. Les principales cellules sont les cellules ciliées qui couvrent plus de 50% des voies respiratoires, du larynx jusqu'aux bronchioles terminales. Le mucus contient des mucines (protéines glycosylées branchées de chaînes oligosaccharidiques), dont le rôle est de lier les particules de l'environnement. Il est principalement produit par les cellules caliciformes, nombreuses dans les voies aériennes supérieures et dont la densité se réduit jusqu'à disparaître dans les bronchioles terminales, où la synthèse de mucus est assurée par les cellules de Clara. Le battement continu des cils de bas en haut permet de remonter le mucus et les particules qu'il a piégé depuis les voies aériennes jusqu'au carrefour oropharyngé où il est ensuite dégluti. Au niveau alvéolaire, les pneumocytes de type I forment l'épithélium de revêtement et les pneumocytes de type II assurent la sécrétion du surfactant permettant de diminuer la tension de surface pour éviter le collapsus alvéolaire (47,48).

Le mucus et le surfactant contiennent des peptides cationiques bactéricides appelés peptides antimicrobiens ( $\beta$ -défensines et cathélicidines) à l'action bactéricide directe sur *Pa*.

Des opsonines comme les protéines du complément y sont également présentes. Leur activation dans le surfactant est facilitée par la présence de lectines (protéines SP-A et SP-D). L'opsonisation des bactéries qui en résulte facilite l'action des cellules phagocytaires (49).

Le système muco-ciliaire dans son ensemble est donc un élément de défense capital car en plus de ses propriétés bactéricides directes et indirectes, il empêche la stagnation des bactéries et donc l'atteinte d'une concentration locale en facteurs de virulence suffisamment élevée pour être lésionnelle. Les défauts de ce système sont responsables d'infections bactériennes aiguës (PAVM) ou chroniques (mucoviscidose, syndrome de Kartagener, broncho-pneumopathie chronique obstructive) (49). En plus des systèmes de défense mécaniques, le système immunitaire inné permet à l'hôte infecté d'activer une réponse cellulaire rapide et aspécifique grâce à la détection précoce de l'intrusion par un pathogène.

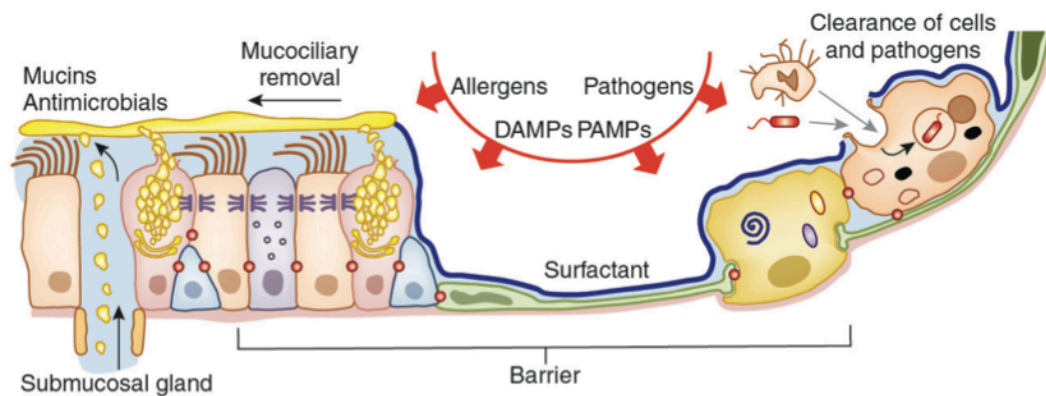


Figure 7: Moyens de défenses mécaniques mis en jeu au cours de la pneumonie aiguë (49).

## 2) Réponse immunitaire innée

L'activation de la réponse immunitaire innée se fait par la reconnaissance de motifs moléculaires très conservés au cours de l'évolution et donc communs à de nombreux micro-organismes, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) ou de DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) libérés par les cellules endommagées, par leurs récepteurs les PRR (Pathogen Recognition Receptor) (50). Ces récepteurs aspécifiques exprimés par les cellules de l'immunité innée permettent la détection précoce d'un pathogène présent dans les voies aériennes (51). La reconnaissance d'un PAMP par un PRR déclenche chez l'hôte un signal de danger. Cette reconnaissance provoque l'activation immédiate des cellules de l'immunité innée résidentes (macrophages alvéolaires, cellules épithéliales, cellules dendritiques, cellules lymphoïdes innées) (52,53), entraînant la sécrétion de cytokines et de chémokines qui permettent de recruter sur le site infectieux les polynucléaires neutrophiles (PNN), cellules phagocytaires professionnelles indispensables à l'éradication de *Pa* (54). La reconnaissance du pathogène stimule également la phagocytose et permet aux cellules

présentatrices d'antigène (CPA) que sont les macrophages et les cellules dendritiques (DC) d'initier la réponse immunitaire adaptative. Cette réponse adaptative, moins rapide mais plus spécifique que la réponse innée (55), conduit à la production d'anticorps spécifiques de haute affinité pour l'antigène bactérien (56), et au recrutement d'effecteurs lymphocytaires B et T.

#### **a. Les PRR et leurs PAMP dans l'infection à *Pa***

Les PRR constituent un groupe hétérogène de récepteurs sécrétés ou cellulaires dont les fonctionnalités varient en fonction de la famille protéique à laquelle ils appartiennent.

Les PRR sécrétés ont principalement un rôle d'opsonine facilitant la phagocytose du pathogène. Les PRR cellulaires sont impliqués dans la transduction du signal de danger. Ils sont composés de récepteurs de surface ou endosomiques dont les plus étudiés sont les Toll-like receptors (TLRs), ainsi que de récepteurs intracytoplasmiques tels que les Nod-like receptors (NLRs) (57).

##### **1. Les TLR**

Les TLR sont des protéines transmembranaires possédant un large domaine extracellulaire ou extra-endosomique. La plupart d'entre eux sont présents au niveau de l'épithélium respiratoire et des cellules de l'immunité innée (52). Quatre TLR sont impliqués dans la reconnaissance de *Pa* : TLR4, TLR5 et TLR2 à la surface cellulaire, et TLR9 sur l'endolysosome. Le TLR4 reconnaît le LPS et le TLR5 reconnaît la flagelline. Ce sont les deux TLR les plus impliqués dans la réponse anti-*Pseudomonas* (51). Le TLR2 est un récepteur du peptidoglycane qui a montré un rôle déterminant dans les infections bactériennes extracellulaires. Il reconnaît les pili et le LPS (58). Enfin, le TLR9 reconnaît les dinucléotides CpG non méthylés de l'ADN des bactéries internalisées (59).

La liaison d'un PAMP avec ces TLR entraîne via la protéine adaptatrice MyD88 l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B). Le complexe protéique NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription impliqué dans la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor), les interleukines (IL) IL-6, IL-12p40, pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18, le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor), et des chémokines, telles que l'IL-8 équivalent à KC (keratinocyte-chemoattractant) chez la souris, qui permettent le recrutement des neutrophiles et MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1) qui participe au recrutement des monocytes/macrophages. Ces cytokines permettent le recrutement et l'activation des cellules effectrices de l'immunité innée (342).

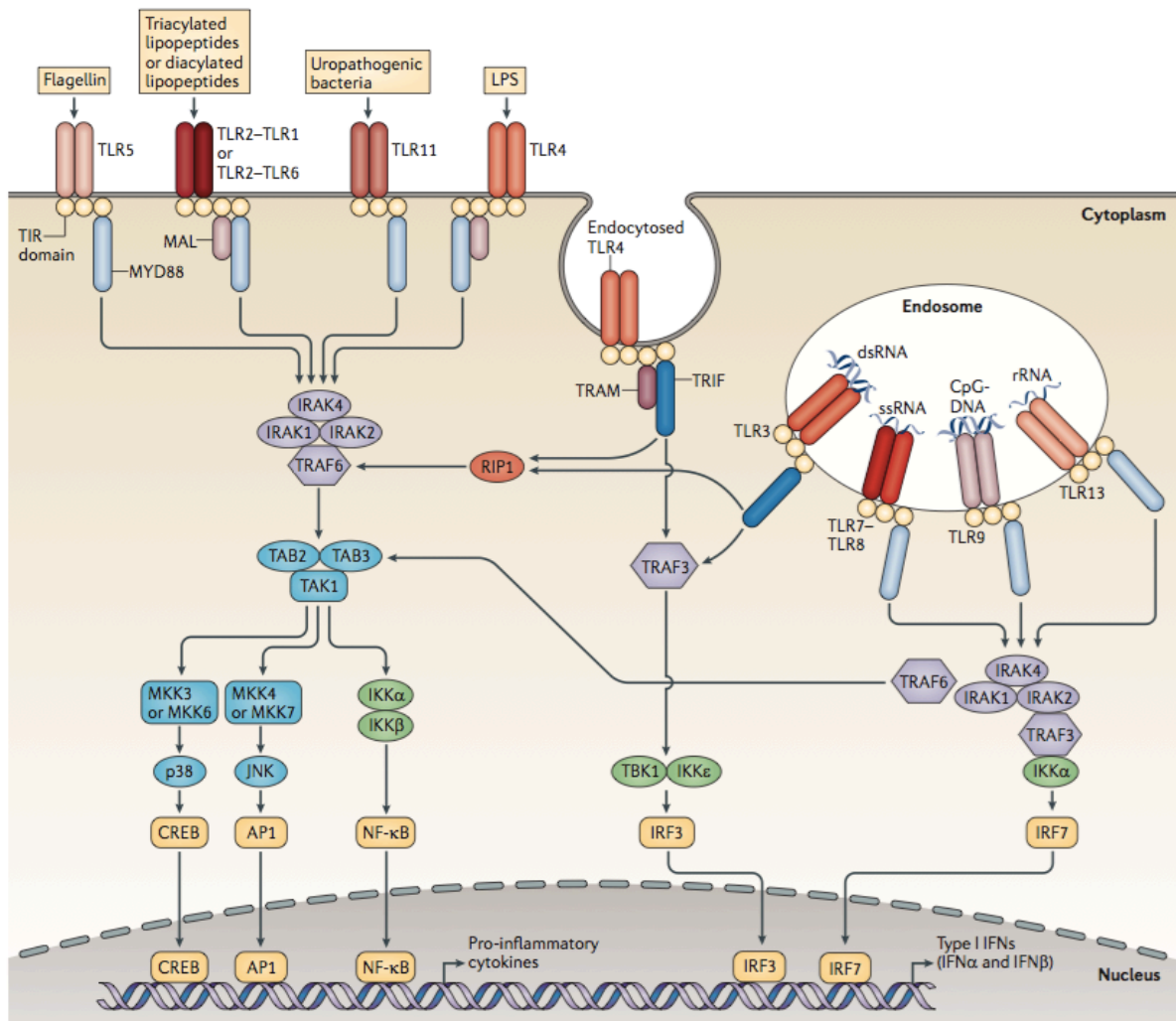


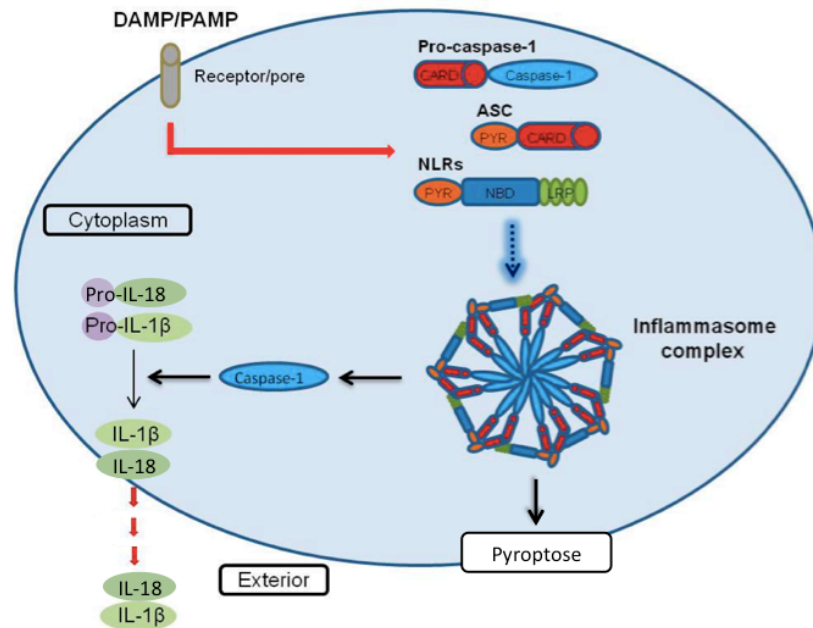
Figure 8: Principaux TLR et voies de signalisation associées impliqués dans la reconnaissance de *Pa* (60).

## 2. Les NLR

Les Nod-like receptors (NLRs) (61) reconnaissent des motifs semblables aux TLRs mais permettent de détecter des PAMPs intracellulaires. Parmi les NLR, le récepteur NLRC4 est impliqué dans la reconnaissance de motifs protéiques de *Pa* comme certaines protéines du SST3 ou la flagelline. Son activation permet l'assemblage d'une plateforme protéique appelée inflammasome entraînant l'activation de la caspase-1. La caspase-1 est responsable de la maturation protéolytique et de la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18, participant à la réponse inflammatoire et au recrutement des cellules phagocytaires (62,63). L'activation du NLR entraîne également une mort cellulaire à membrane intacte par pyroptose, constituant un moyen de défense contre les infections à bactéries intra-cellulaires (**Figure 9**) (64). Le rôle de la mort par pyroptose dans les infections à *Pa* n'est à ce jour pas entièrement élucidé mais semblerait se faire au détriment de l'hôte au cours de l'infection aigüe par une souche



exprimant le SST3 principalement extracellulaire et possiblement bénéfique en l'absence d'expression du SST3 par l'internalisation de la bactérie (62).



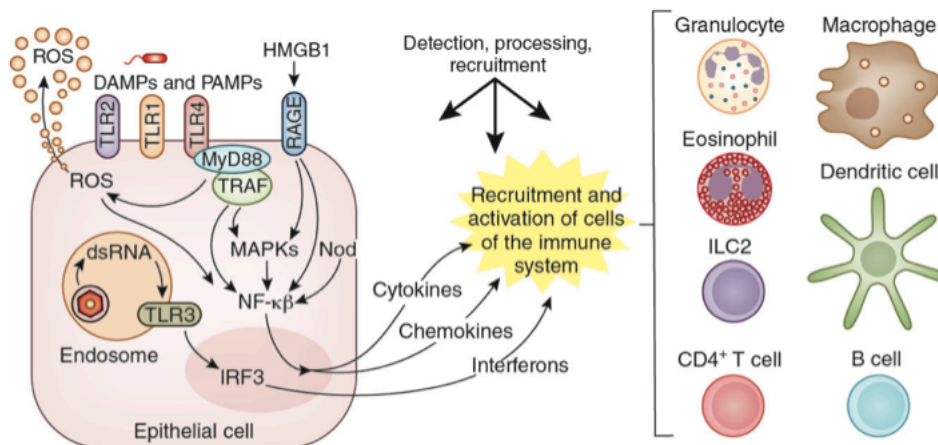
**Figure 9: Structure et rôles de l'inflammasome (65).**

NLR : nod-like receptor, ASC : protéine adaptatrice contenant un domaine de recrutement de caspase CARD.

Les PRR sont retrouvés dans les CPA professionnelles que sont les macrophages et les DC, et également au niveau des cellules épithéliales.

### **b. Rôle des cellules épithéliales**

En plus des fonctions de défense mécanique assuré par leurs jonctions serrées, les cellules épithéliales respiratoires jouent un rôle important dans l'initiation et l'orchestration de la réponse immunitaire innée grâce à leurs nombreux PRR de surface et intracytoplasmiques (66). En réponse à la détection du pathogène et aux stimulations cytokiniques des cellules immunitaires environnantes, elles sécrètent des chémokines (KC, MIP-2, MCP-1) et cytokines (IL-6) favorisant l'activation des CPA et le recrutement des PNN (67). Elles sont également responsables de la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de peptides antimicrobiens, notamment les  $\beta$ -défensines, qui en plus de leur action bactéricide jouent un rôle immunomodulateur par leurs propriétés d'attraction et d'activation des cellules immunitaires (**Figure 10**) (46,51).



**Figure 10: Rôles des cellules épithéliales dans la réponse immunitaire (49)**

### c. Rôle des macrophages

Les macrophages alvéolaires représentent la principale cellule sentinelle des voies respiratoires permettant l'élimination des éléments étrangers représentant un danger pour l'organisme (phagocytose des particules étrangères et des pathogènes) (**Figure 11**). La principale chémokine impliquée dans le recrutement et l'activation des macrophages est MCP-1, (Monocyte chemoattractant protein 1) sécrétée par les cellules épithéliales en réponse à un signal de danger (68,69). Cependant, comparé aux PNN qui sont essentiels à la résolution de l'infection, leur rôle exact au cours de la pneumonie aiguë à *Pa* est imparfaitement connu (17). Les macrophages alvéolaires contribuent possiblement à la clairance bactérienne de manière directe par phagocytose puis destruction bactérienne dans le phagolysosome, mais les résultats des travaux sur ce sujet sont contradictoires (17). Leur rôle majeur réside dans l'orchestration de la réponse immunitaire. L'activation de leurs PRR entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) et chémokines (IL-8/KC) permettant, en coopération avec les cellules épithéliales, le recrutement des PNN sur le site infectieux. Leur capacité à présenter l'antigène via leur CMH de classe II participe à l'initiation de la réponse adaptative. Enfin, leur capacité à phagocyter les cellules apoptotiques, appelée efferocytose, est essentielle dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire (17,51).

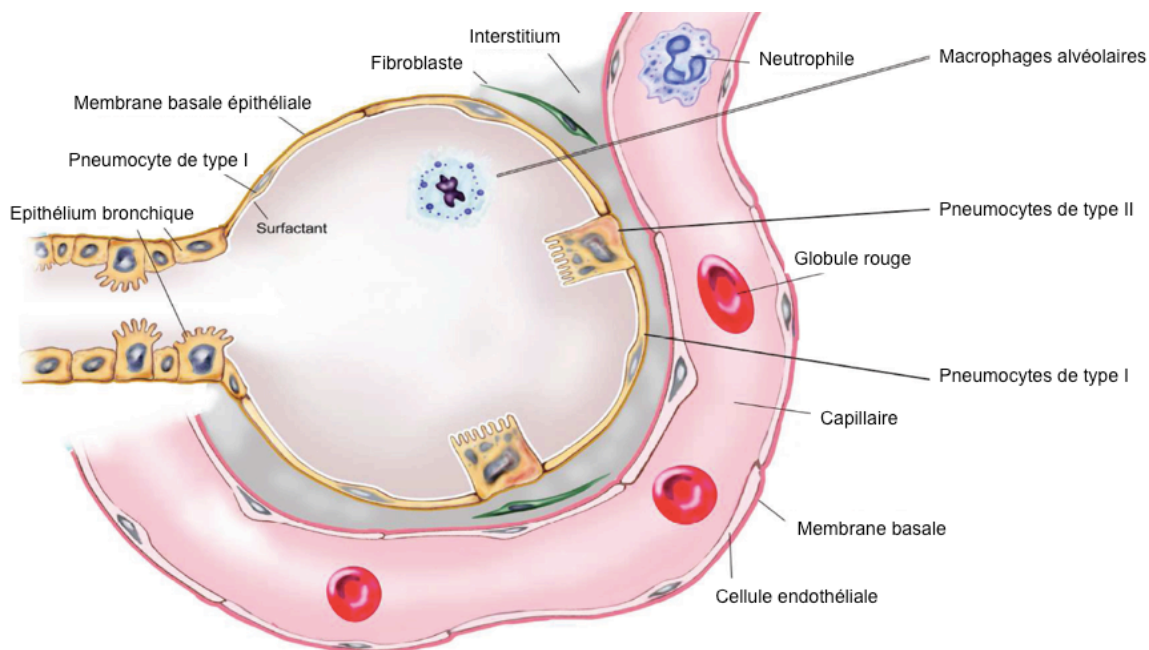


Figure 11: Alvéole saine contenant un macrophage alvéolaire en sentinelle adapté de Grommes *et al.* (70)

#### d. Rôle des polynucléaires neutrophiles

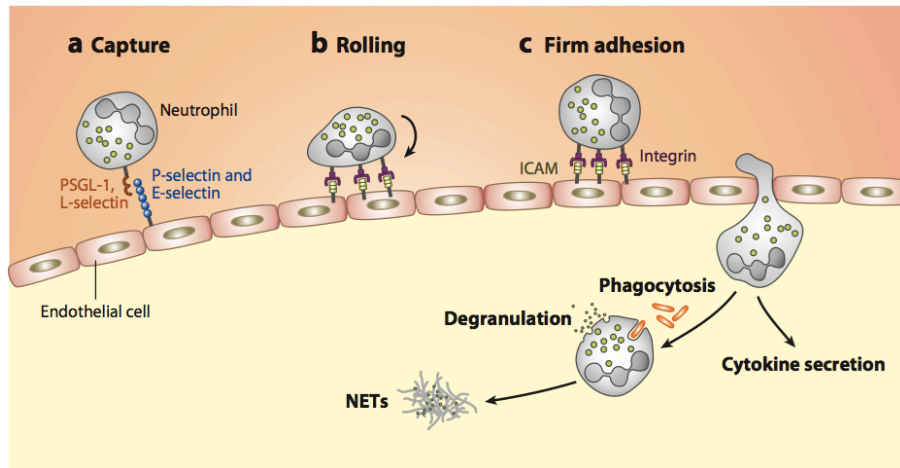
Les PNN sont les principaux acteurs du contrôle et de la résolution de l'infection, comme clairement démontré par l'extrême susceptibilité des souris neutropéniques à l'infection à *Pa* (71). Dans la littérature, le rôle des PNN est souvent réduit à leurs fonctions pro-inflammatoires et d'élimination des pathogènes. Les PNN sont en réalité des cellules complexes impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques (72). Au cours de la réponse immunitaire, ils possèdent la capacité de présenter l'antigène et de réguler la réponse immunitaire innée et adaptative en interagissant avec un grand nombre de types cellulaires. Les PNN sont indéniablement les acteurs majeurs de l'inflammation aiguë, mais sont également impliqués dans les processus d'inflammation chronique, et pour certains types de PNN aux propriétés anti-inflammatoires, dans la résolution de l'infection et la réparation tissulaire (73). Les PNN entretiennent une relation particulière avec le tissu pulmonaire, aux mécanismes encore imparfaitement compris. En comparaison à la circulation sanguine systémique, les PNN matures sont présents de manière physiologique en quantité 50 fois supérieure dans les capillaires pulmonaires, constituant ainsi une « patrouille » d'effecteurs rapidement mobilisable. Ce phénomène n'est pas retrouvé dans les autres organes (73,74). Le rôle des PNN au cours de l'infection respiratoire aiguë est ambivalent. Indispensable à l'élimination du pathogène, ils sont aussi pourvoyeurs de lésions tissulaires en cas de réponse excessive ou dérégulée (70). L'évolution de la pneumonie repose donc sur une réponse

neutrophilique efficace mais contrôlée. Le recrutement rapide des PNN sur le site infectieux puis la mise en jeu de leurs principaux mécanismes de microbicidie conditionnent le contrôle du processus infectieux (38).

### **1. Recrutement des PNN sur le site infectieux**

Au cours d'une infection respiratoire aigüe, les PNN sont recrutés massivement depuis les capillaires pulmonaires jusque dans les alvéoles en réponse aux stimuli pro-inflammatoires induits par l'infection. Contrairement à l'extravasation classique des PNN depuis le sang vers divers organes, le recrutement alvéolaire des PNN implique une séquestration interstitielle initiale des cellules après passage transendothélial, puis une migration transépithéliale jusque dans l'alvéole (70).

Le recrutement des PNN est initié par les cellules endothéliales qui une fois activées par certains facteurs bactériens (LPS, fMLP) ou par des cytokines (IL-1 $\beta$ , l'IL-17 ou le TNF $\alpha$ ) expriment à leur surface des molécules d'adhésion telles que les selectines (P- et E-selectines) et certaines intégrines (ICAM1, VLA-4). Ces molécules d'adhésion sont reconnues par deux molécules constitutivement exprimées à la surface des PNN, la glycoprotéine PGSL1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) et la L-selectine, permettant les phénomènes de capture puis de « rolling ». Au cours du rolling, l'interaction de ces molécules avec les selectines endothéliales, associée à la stimulation par les cytokines, chémokines et dérivés bactériens, entraînent le regroupement et le changement conformationnel d'intégrines  $\beta 2$  à la surface des PNN (75). Celles-ci se lient ensuite aux intégrines endothéliales telles que ICAM-1 et VLA-4, interrompant le rolling et permettant l'adhésion ferme des PNN à la paroi endothéliale, étape indispensable à la migration transendothéliale (76). Celle-ci peut se faire par voie paracellulaire ou transcellulaire. Les signaux d'activation déclenchés par la liaison des molécules d'adhésion des PNN avec l'endothélium, renforcés par les stimuli de l'environnement cytokinique, permettent la réorganisation du cytosquelette cellulaire nécessaire à la diapédèse puis à la migration des cellules jusqu'au site de l'infection (**Figure 12**).



**Figure 12: Mécanismes de recrutement des PNN sur le site infectieux depuis la lumière vasculaire (77)**

Arrivés dans l'interstitium, les PNN doivent migrer à travers la barrière épithéliale pour atteindre l'alvéole. Cette migration se fait en plusieurs étapes similaires à la migration transendothéliale mais fait intervenir des molécules d'adhésion différentes et n'est possible que par la voie paracellulaire. Des molécules d'adhésion spécifiques comme le CD47, exprimé à la fois par les PNN et les cellules épithéliales, possèdent un rôle majeur dans la migration transépithéliale des PNN, bien démontré au niveau intestinal mais plus discuté au niveau pulmonaire (76,78). La migration des PNN vers le site infectieux se fait selon le gradient de concentration de molécules chemo-attractantes, particulièrement de la famille des chémokines CXC telles que l'IL-8 (ou KC chez la souris) et MIP-2 (77). Chez les souris traitées par anticorps anti-récepteur des chémokines CXC, le recrutement pulmonaire de PNN diminue de plus de 50% et s'associe à une baisse de la survie (79). En parallèle, l'activation des PNN se poursuit par l'engagement de leurs PRR avec les ligands de l'environnement. Cette stimulation soutenue et croissante des PNN au cours de leur migration aboutit à l'activation de leurs principaux mécanismes de microbicidie. Les PNN pleinement activés se rassemblent sur le site infectieux, où les concentrations des molécules chemo-attractantes sont les plus élevées (**Figure 13**)(77).

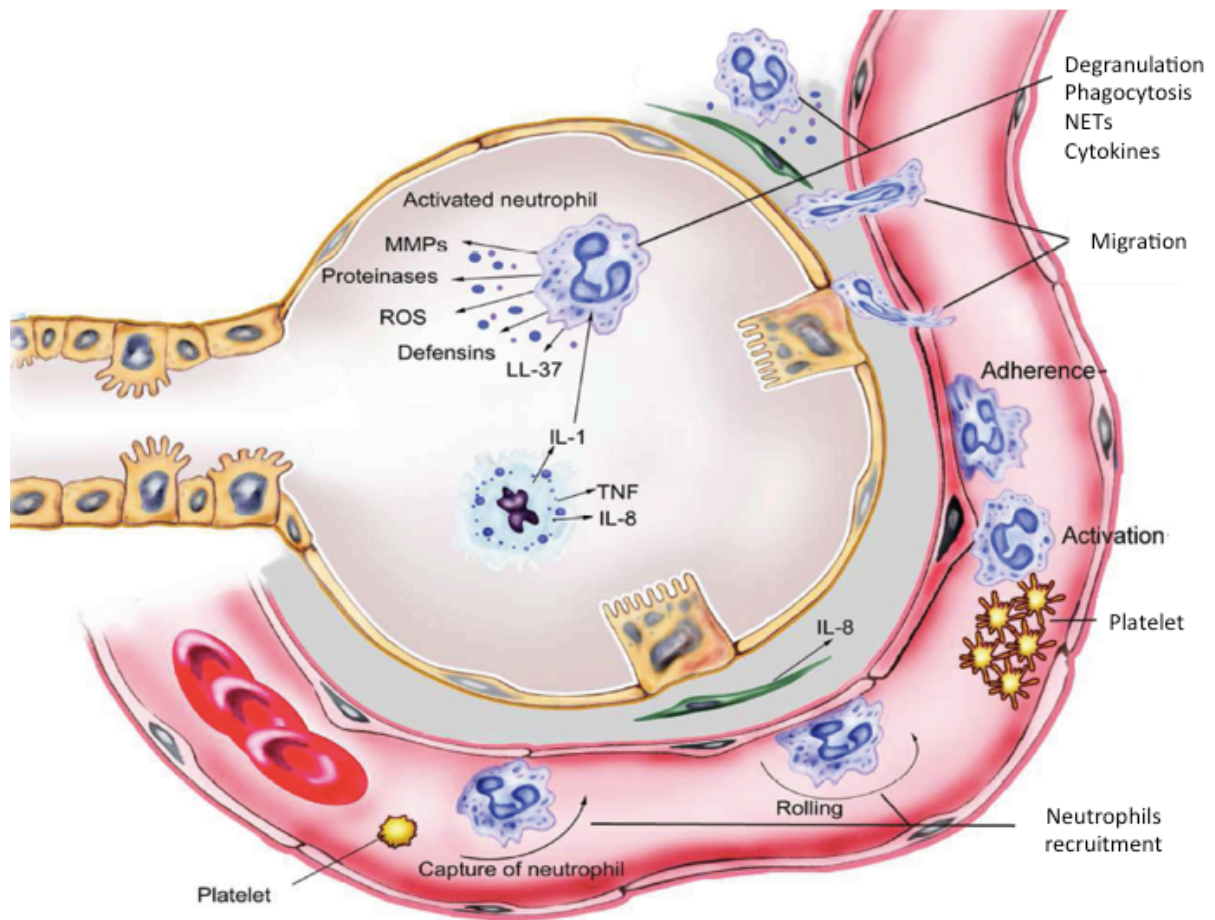


Figure 13: Recrutement intra-alvéolaire des PNN depuis l'interstitium adapté de Grommes *et al.* (70)

## 2. Mécanismes de microbicidie des PNN

Le rôle principal des PNN dans le poumon est l'élimination microbienne (ou « clairance » bactérienne). Plusieurs mécanismes de bactéricidie coexistent : la production d'espèces réactives de l'oxygène, d'enzymes de dégradation (les métalloprotéases et sérines protéases des PNN : l'elastase, la cathepsine G, la proteinase 3), et d'autres protéines antimicrobiennes (cathélicidines, défensines, lactoferrine etc) permettant de tuer les bactéries dans l'environnement après dégranulation, ou dans le phagolysosome après phagocytose. Enfin, la NETose, consistant en l'extrusion de « filaments » formés de chromatine et de protéines antimicrobiennes qui capturent et éliminent les micro-organismes, est une autre voie de microbicidie propre aux PNN (**Figure 14**) (38). La bactéricidie par les PNN est un phénomène saturable, parfois dépassé en cas de charge bactérienne élevée (80). Elle peut être altérée à la fois par des facteurs bactériens (rhamnolipides, SST3, pyocyanine, molécules du QS) et des facteurs de l'hôte impactant sur leur survie ou leur capacité de phagocytose (81).

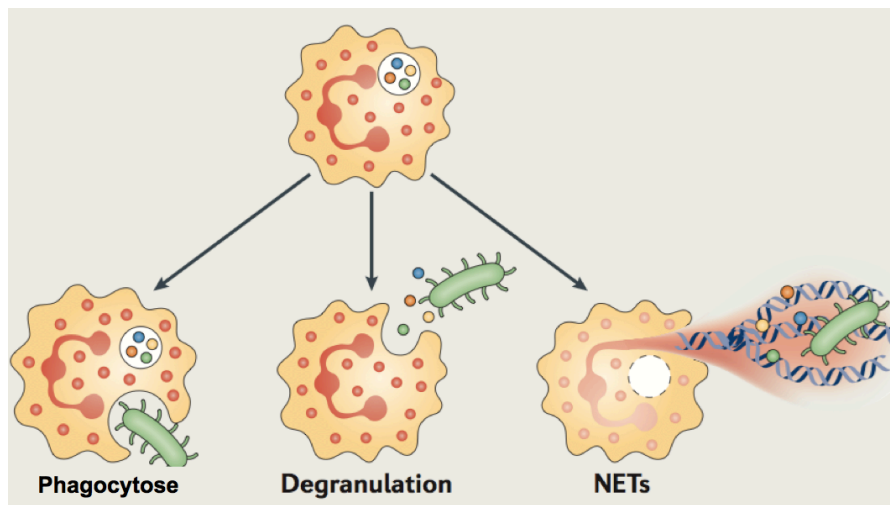
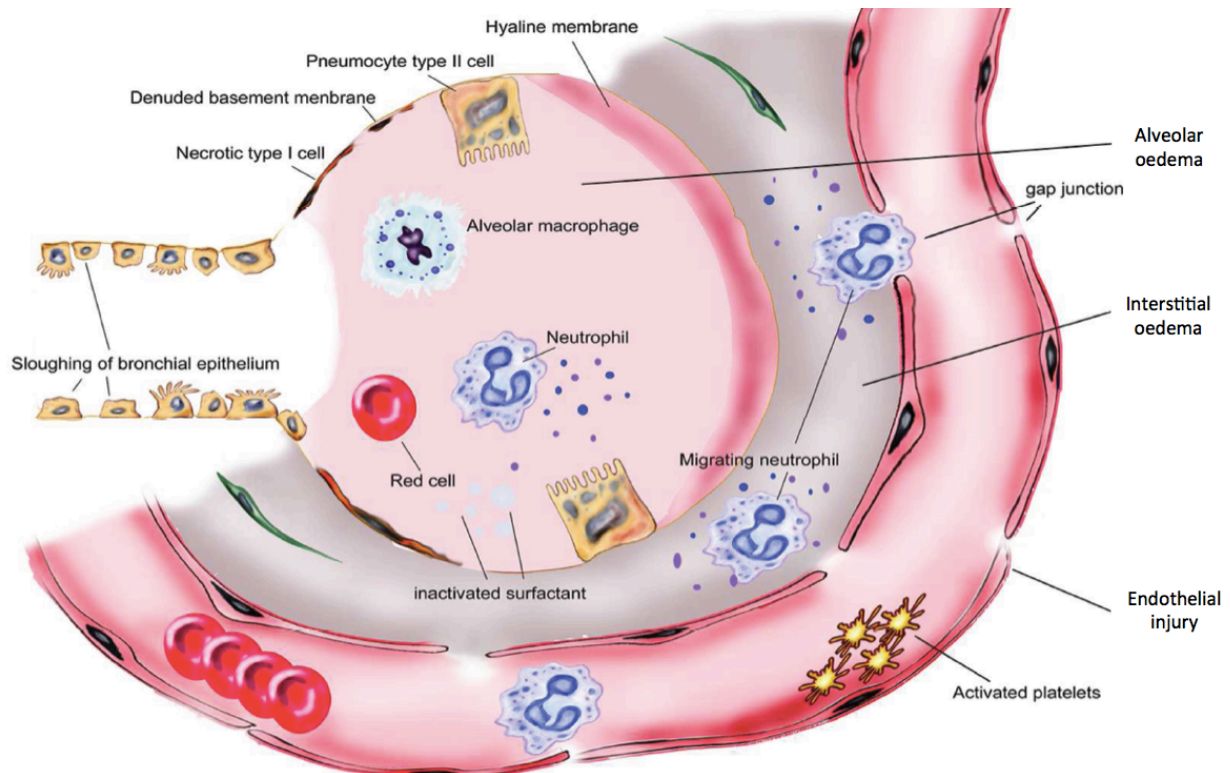


Figure 14: Principaux mécanismes de bactéricidie des PNN (82)

### 3. *PNN et lésions tissulaires*

Bien que les PNN soient essentiels pour la défense de l'hôte, ils peuvent entraîner en cas de réponse excessive ou dérégulée d'importants dommages tissulaires qui aggravent le pronostic de la pneumonie (73). Par exemple, une corrélation a été démontrée entre la richesse du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) en PNN, la sévérité des lésions pulmonaires et la mortalité chez les patients atteints de syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) d'origine infectieuse (83). Par ailleurs, la diminution du recrutement des PNN par inhibition de l'IL-8, ou la déplétion partielle en PNN diminuent la sévérité de la pneumonie dans des modèles animaux (84,85). Les dommages tissulaires imputables aux PNN résultent de plusieurs mécanismes physiopathologiques. La migration d'un grand nombre de PNN activés et regroupés en clusters à travers l'épithélium alvéolaire entraîne la formation de lésions épithéliales secondaires à la séparation mécanique des cellules au niveau de leurs jonctions serrées. Ces lésions sont ensuite propices à la formation de larges zones alvéolaires dénudées de leur épithélium correspondant à des « ulcères », caractéristiques du SDRA. Les médiateurs solubles relargués par dégranulation des PNN activés dans l'interstitium pulmonaire et lors de leur migration vers le site infectieux contribuent à la constitution et à l'aggravation de ces lésions. Les molécules impliquées sont principalement les élastases, les métalloprotéases, certains médiateurs lipidiques et défensines, et les espèces réactives de l'oxygène. L'action conjointe de ces médiateurs avec les facteurs mécaniques entraînent la mort par apoptose et nécrose des cellules épithéliales, puis leur desquamation aboutissant, en association avec les dommages interstitiels et endothéliaux, à la destruction de la barrière alvéolo-capillaire. La

forte augmentation de perméabilité qui en résulte aboutit à la formation d'un œdème interstitiel et intra-alvéolaire riche en protéines dit « lésionnel », compromettant les échanges gazeux et la compliance pulmonaire (**Figure 15**) (76).



**Figure 15: Lésions tissulaires induites par les PNN** adapté de Grommes *et al* (70)

Au cours de l'infection aiguë, les lésions sont en partie limitées par la faible durée de vie des PNN qui entrent en apoptose après quelques heures ou jours. Les PNN apoptotiques favorisent leur propre élimination via la sécrétion de substances appelées « find me » qui permettent le recrutement sur site de monocytes/macrophages. Ceux-ci éliminent les PNN par efferocytose, contribuant activement à la résolution de l'inflammation. Par ailleurs, le processus d'efferocytose promeut chez les macrophages une réponse anti-inflammatoire permettant la réparation des lésions et le retour à l'homéostasie tissulaire (86,87).

Lors des infections chroniques où le stimulus bactérien persiste dans le temps, la réponse immunitaire neutrophilique devient la principale source de dommages tissulaires, comme c'est le cas par exemple au cours de la mucoviscidose (88). Les mécanismes qui sous-tendent ce déséquilibre sont encore mal compris, entre activation dérégulée des PNN, piégeage et nécrose de ceux-ci dans le mucus, ou influence des autres types cellulaires impliqués dans la défense pulmonaire (89,90,91).



## e. Rôle des cellules dendritiques

### 1. Généralités sur les DC

Dans les tissus où elles résident, les DC immatures exercent des fonctions de sentinelles permanentes. A ce stade elles expriment les TLR et des récepteurs Fc $\gamma$ . Elles ont la capacité de phagocyter ou d'endocyter des antigènes, de les cliver en multiples peptides qui sont ensuite liés aux molécules du CMH de classe II alors intracytoplasmiques. Stimulées par le contact avec les pathogènes et le microenvironnement cytokinique, les DC s'activent et deviennent matures. Cette maturation s'accompagne de modifications morphologiques (augmentation du diamètre, apparition de dendrites) et phénotypiques. Elles n'expriment alors plus leurs PRR, perdent leur fonction d'endocytose et deviennent de réelles CPA professionnelles en surexprimant les molécules du CMH II à la membrane. Elles expriment également toute une série de molécules d'adhésion et de co-stimulation telles que le CD80, CD86 et CD40, indispensables à l'activation lymphocytaire en cas de reconnaissance antigénique (55). La maturation cellulaire s'accompagne aussi de l'expression à la membrane de récepteurs de chémokines tel que CCR7, permettant la migration des DC vers les zones lymphoïdes suivant le gradient de concentration des chémokines CCL19 et CCL21, ses deux ligands produits par les ganglions lymphatiques. L'activation de CCR7 permet également l'augmentation de l'expression des molécules du CMH et de co-stimulation (**Figure 16**) (92).

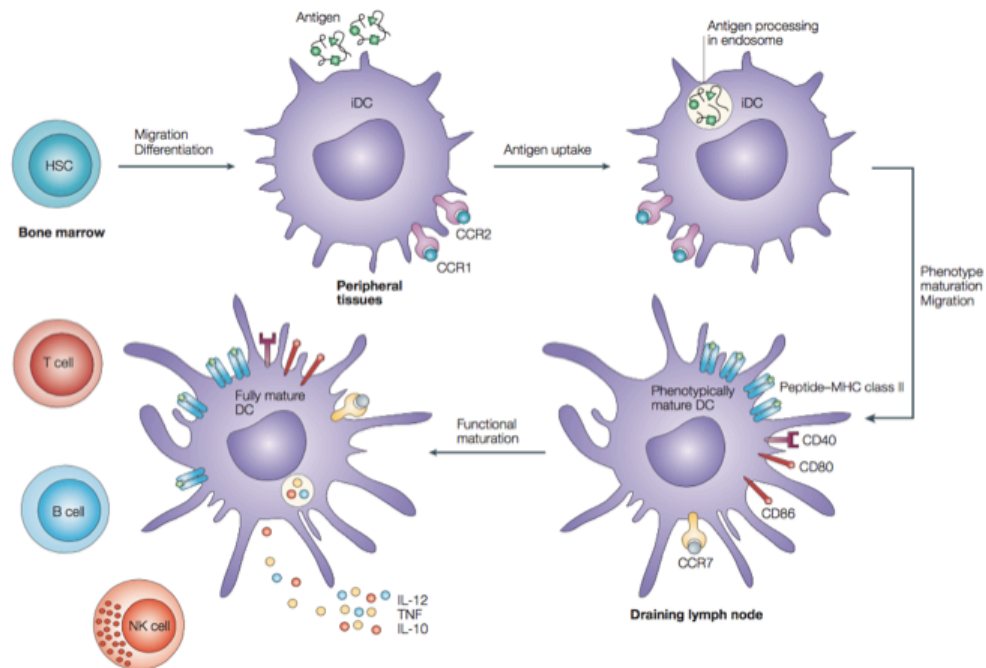


Figure 16: Etapes de maturation et d'activation des cellules dendritiques (93)

## 2. *L'activation lymphocytaire*

Au niveau des organes lymphoïdes secondaires, l'activation des lymphocytes (Lc) T CD4 naïfs par les DC matures se fait par interactions successives de protéines de membrane aboutissant à la formation d'une zone de contact rapproché entre les deux cellules : la « synapse immunologique ». La formation de cette synapse permet la transmission au Lc de signaux d'activation nécessaires à son expansion clonale. Trois signaux majeurs d'activation sont classiquement décrits (**Figure 17**) (94).

Le premier signal est la reconnaissance spécifique du complexe peptide-CMH par le TCR entraînant une forte liaison et le début du processus de sélection clonale. Leur liaison est renforcée par le CD4 jouant un rôle de co-récepteur.

Un deuxième signal est nécessaire pour poursuivre l'activation spécifique de l'antigène. Les CD80 et CD86 à la surface des DC sont reconnues par le CD28 lymphocytaire. Une signalisation impliquant le TCR et le CD28 activés induit alors l'expression de CD40-Ligand (CD154) à la surface du Lc. La liaison au CD40 des DC induit une augmentation de l'expression de CD80/CD86, qui à son tour renforce le signal du CD28, constituant une boucle positive d'activation. L'engagement du TCR, de toutes ses molécules de costimulation et du complexe CD3 dans cette liaison spécifique entraîne l'activation de voies de signalisations intracellulaires permettant la translocation nucléaire de divers facteurs de transcription dont NFAT, AP-1 et NFκB. Leur activation permet la synthèse de molécules indispensables à l'activation lymphocytaire et à sa prolifération clonale, notamment l'IL-2 et la chaîne α de son récepteur membranaire (CD25). L'activation de cette voie de signalisation combinée à l'action d'autres stimulations cytokiniques permet l'activation de la kinase mTOR, régulateur central du métabolisme et de la survie cellulaire.

L'activation de mTOR constitue le 3<sup>ème</sup> signal nécessaire à la progression du Lc activé dans le cycle cellulaire, la prolifération clonale et la différenciation fonctionnelle (94,95). L'absence des signaux délivrés par les molécules de co-stimulation aboutit à l'anergie lymphocytaire ou à leur apoptose.

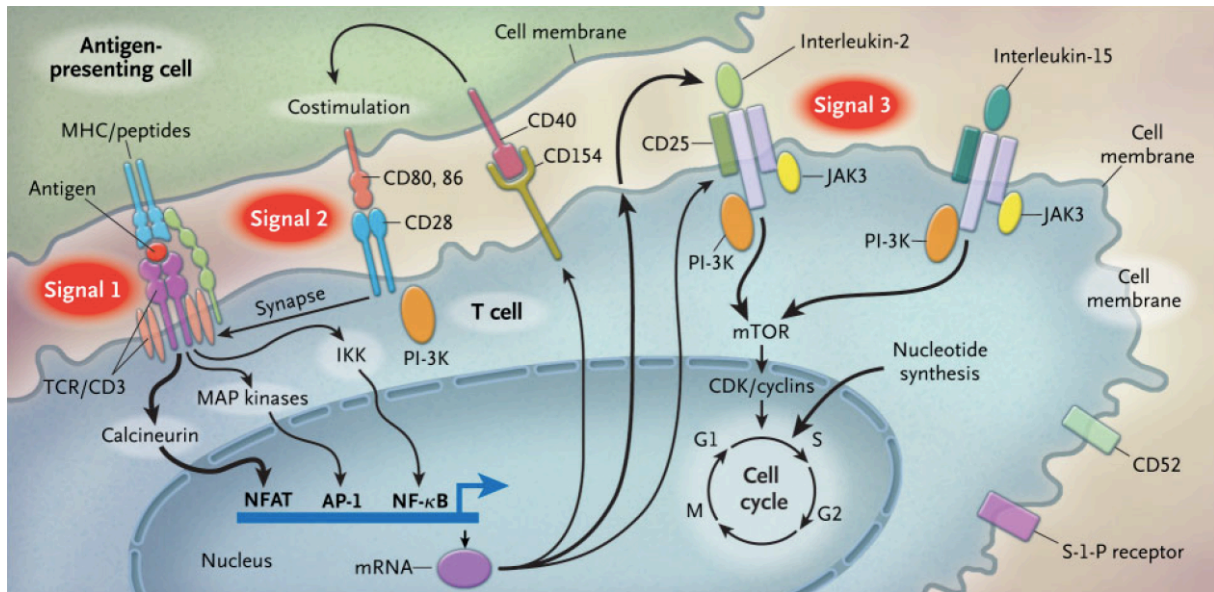


Figure 17: La synapse immunologique adapté de Halloran et al (94).

L'activation des Lc T CD4+ naïfs est suivie de leur polarisation en lymphocytes T CD4+ dits « auxiliaires » ou « helpers » dont le type est défini par leurs profils de production cytokinique (Th1, Th2, Th17, Treg etc). Ces cellules vont ensuite orchestrer la mise en place de la réponse adaptative, notamment par l'aide apportée aux Lc T CD8 cytotoxiques et aux Lc B spécifiques de l'antigène en plus d'un effet d'amplification de la réponse innée. La polarisation des Lc est dépendante du microenvironnement cytokinique créé par les DC en fonction de leur nature et du type de stimulation initiale. Un milieu riche en IL-12 et IFN $\gamma$  favorise la polarisation Th1, l'association IL-6, IL-1 $\beta$  et TGF $\beta$  favorise une polarisation Th17 et l'IL-2 associée au TGF $\beta$  et à l'IL-10 induisent une polarisation T régulatrice (96). Les DC sont donc à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (55).

### 3. Mécanismes de rétrocontrôle

En parallèle, il existe des mécanismes de rétrocontrôles afin d'empêcher une prolifération lymphocytaire excessive. La signalisation TCR/CD28 induit également l'expression lymphocytaire de CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) qui se lie aux CD80/CD86 mais avec une affinité beaucoup plus forte (20 à 100 fois plus) que le CD28 et délivre des signaux inhibiteurs de l'activation et de la prolifération. La boucle positive d'activation décrite ci-dessus est inhibée, conduisant à un état de tolérance (97). Plus tardivement, la molécule PD-1 (programmed cell death-1) est exprimée à la membrane du Lc. La reconnaissance de ses ligands (PD-L1 et PD-L2) inhibe l'activation lymphocytaire et promeut la tolérance (98). Les principaux signaux activateurs et inhibiteurs de la synapse immunologique sont résumés dans la **figure 18**.

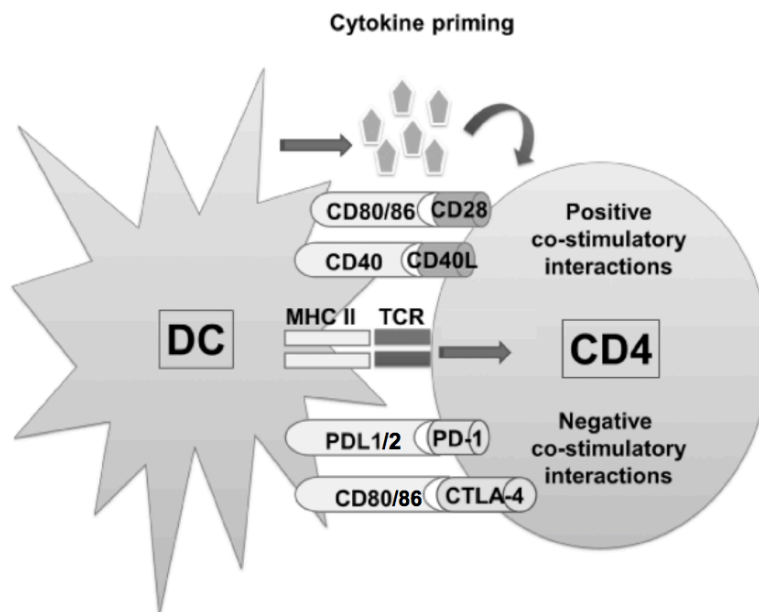


Figure 18: Principaux signaux activateurs et inhibiteurs au cours de l'interaction CPA-Lc

#### 4. Populations pulmonaires de DC

Au niveau pulmonaire, les DC regroupent des populations cellulaires d'origines variées. On peut répertorier les DC pulmonaires en DC myéloïdes ou conventionnelles (cDC) et plasmocytoides (pDC) toutes deux issues des cellules souches hématopoïétiques, et les DC dérivées des monocytes (moDC). Parmi les cDC, on distingue les cellules exprimant l'intégrine CD103, et les cellules exprimant l'intégrine CD11b. Conditionné par leur profil de production cytokinique et leur molécules de membranes, les CD103+ cDC sont plutôt associées aux réponses Th1 et Th2, alors que les CD11b+ cDC sont associées à l'induction préférentielle de réponse type Th2 et Th17. Les pDC sont impliquées dans la réponse antivirale par leur grande capacité à produire les interférons de type I. Les moDC sont essentiellement pro-inflammatoires. Cependant, ces observations dépendent largement des conditions expérimentales, soulignant l'importance des signaux environnementaux dans les fonctions et la plasticité des DC (99).

#### 5. Interactions entre DC et Pa

Il a été montré que *Pa* peut diminuer la capacité des DC à induire une réponse adaptative. Suite à une infection chronique par *Pa* les DC stimulées *ex vivo* par du LPS ont une expression diminuée des facteurs de costimulation. Egalement, certaines molécules du QS peuvent inhiber la production de cytokines telle que l'IL-12 par les DC et diminuer leur faculté à induire une prolifération des lymphocytes T *in vitro*. *Pa* peut donc impacter la

maturation et la différenciation des DC, modifiant ainsi le profil de réponse anti-bactérienne (100).

### **3) Réponses immunitaires adaptative et transitionnelle**

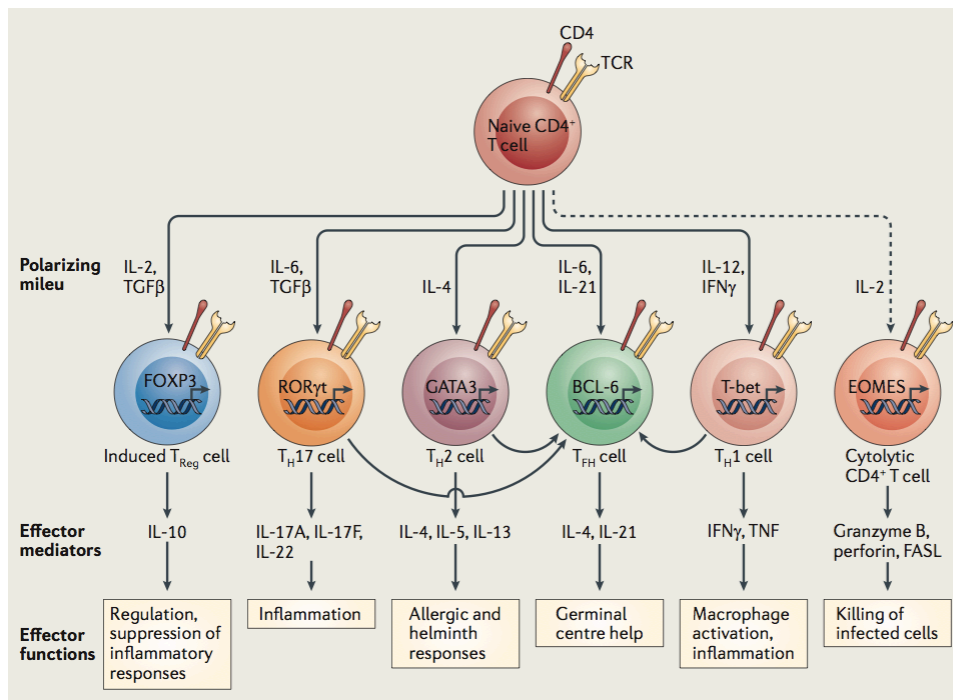
#### **a. Place de la réponse adaptative dans la pneumonie à *Pa***

La réponse immunitaire adaptative est arrivée secondairement avec l'évolution chez les espèces supérieures. Cette réponse est, contrairement à la réponse innée, plus tardive, conduisant à la production d'anticorps ou de cellules cytotoxiques spécifiquement dirigés contre le pathogène mis en cause. L'activation du système adaptatif correspond donc à l'activation et à l'expansion clonale de lymphocytes T et B, régulée par les Lc T helpers, et dont l'action est spécifiquement dirigée contre le pathogène présent. En plus de cette spécificité, le système adaptatif est capable de garder en mémoire les antigènes déjà connus et répond ainsi plus rapidement et plus efficacement lors d'un nouveau contact avec le même antigène (101). L'importance du système immunitaire adaptatif au cours des infections pulmonaires à *Pa* est peu connue, de par la difficulté à créer des modèles d'infection persistante. Les données sur ce sujet sont contradictoires. Le rôle des anticorps dans la défense contre *Pa* est débattu, permettant probablement de limiter l'extension de l'infection mais insuffisant pour la résoudre. La déplétion de certaines cellules lymphocytaires telles que les T régulateurs ne semble pas avoir d'impact sur la clairance bactérienne ou la réponse immunologique. En revanche, l'environnement cytokinique auquel contribuent les Lc semble jouer un rôle d'importance, faisant notamment intervenir les Lc Th1 et Th17 (17). Par exemple, certaines espèces de souris sont plus susceptibles à l'infection à *Pa*. Cette différence a été en partie attribuée à leur fond génétique déterminant une réponse plutôt de type Th2 (Balb c) ou Th1 (C57Bl/6), ces dernières montrant une meilleure clairance bactérienne (102).

#### **b. Polarisation des Lc T helpers**

En fonction des cytokines produites, les Lc T helpers se différencient en plusieurs sous-types qui orchestrent la réponse adaptative de manière distincte (**Figure 19**). Les Lc Th1 produisent de l'IFN- $\gamma$  et du TNF $\alpha$ . Ils renforcent l'activation des macrophages, entretiennent les stimuli pro-inflammatoires et facilitent la réponse T CD8 cytotoxique. La réponse Th1 est considérée comme la plus adaptée au cours de l'infection bactérienne, en association avec la réponse Th17. Les Lc Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) favorisent la production d'anticorps qui vont opsoniser les micro-organismes et faciliter leur destruction par les cellules phagocytaires

professionnelles (neutrophiles et macrophages). Ils sont impliqués dans la réponse anti-parasitaire et promeuvent les réactions allergiques (56). Les Lc T régulateurs, caractérisés par leur facteur de transcription nucléaire spécifique FOXP3, sécrètent majoritairement de l'IL-10, leur conférant des propriétés anti-inflammatoires et facilitatrices de la réparation tissulaire. Cependant, leur rôle est mal établi au cours de la pneumonie à *Pa*.



**Figure 19: Les différentes possibilités de polarisation des lymphocytes T CD4 naïfs et principales cytokines produites (96)**

### c. La réponse Th17

Les Lc de type Th17 ont été découverts plus récemment et jouent un rôle majeur dans les infections à bactéries extracellulaires telles que *Pa* (50,103). Leurs fonctions à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative les situent dans une réponse appelée réponse transitionnelle (104). Suite à la stimulation du facteur de transcription STAT3 en réponse à l'IL-23, l'IL-6 et au TGF- $\beta$  (souris)/ à l'IL-1 $\beta$  (homme) (105), les Lc Th17 produisent de nombreuses cytokines telles que l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22 par activation du facteur de transcription nucléaire ROR $\gamma$ t (106) (retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t).

#### 1. L'IL-17

L'IL-17A et l'IL-17F conduisent à la sécrétion de facteurs de croissances cellulaires ainsi que la production de chémokines de type CXC. Elles ont un rôle majeur dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles sur le site infectieux. En plus des cellules Th17,

les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (107), Natural Killer (NK), NKT (108) et surtout les innate lymphoid cells (ILC) (109) sécrètent de l'IL-17A dans les phases précoces de la réponse innée.

## **2. L'IL-22**

L'IL-22 est un membre de la famille des IL-10-cytokines (110). Elle est impliquée dans la réparation des épithélia et particulièrement l'épithélium pulmonaire chez l'humain ainsi que l'expression de peptides antimicrobiens par les épithéliums digestifs, cutanés et pulmonaires (111). Une étude récente a démontré que la sécrétion concomitante d'IL-17A et d'IL-22 permettait d'augmenter l'expression de peptides antimicrobiens inductibles par les différents épithélia (112). Le rôle clé de l'IL-22 est maintenant bien démontré *in vivo* dans des modèles de pneumonie aiguë à Gram négatif dans la clairance bactérienne et la limitation des lésions tissulaires (113). Les principales cellules impliquées dans la sécrétion d'IL-22 en dehors des cellules T CD4<sup>+</sup> sont les cellules T CD8<sup>+</sup>, T $\gamma\delta$ , les NK et les ILCs (111). Les macrophages et les cellules dendritiques CD11c<sup>+</sup> sont aussi capables de produire de l'IL-22 lorsqu'elles sont stimulées à la fois par de l'IL-23 et du LPS ou du peptidoglycane (114).

## **3. L'IL-23**

L'IL-23 fait partie de la famille des IL-12-cytokines, comprenant l'IL-12 et l'IL-23. Chaque cytokine est un hétérodimère comprenant l'IL-12p70 pour l'IL-12 et l'IL-23p19 pour l'IL-23, associé à l'IL-12p40 (115). Elles sont produites par des cellules de l'immunité innée comme les macrophages alvéolaires ou les cellules dendritiques (114) et conditionnent la polarisation lymphocytaire en cellules Th1 par l'IL-12 (IL-12p70) et Th17 par l'IL-23 (IL-23p19). L'IL-23 est également impliquée aux temps tardifs dans l'activation des cellules Th17 permettant de faire perdurer cette réponse dans le temps (106). Enfin, elle conduit à la sécrétion d'IL-17A par les cellules possédant un IL-23R comme les invariant NKT (iNKT), les ILC ainsi que les lymphocytes T $\gamma\delta$  (116). Par ce biais, l'IL-23 permet le recrutement précoce des PNN et semble primordiale dans la réponse pulmonaire anti-infectieuse (117).

### **d. Rôles des autres populations lymphocytaires**

#### **1. Les lymphocytes T $\gamma\delta$**

Les lymphocytes T $\gamma\delta$  sont des cellules T hautement spécialisées appartenant à la réponse transitionnelle (80,81). Leur population représente 1 à 5% du compartiment lymphocytaire total chez l'humain comme chez la souris. Ces lymphocytes T $\gamma\delta$  constituent une des premières lignes de défense contre les infections par leur localisation stratégique dans les zones d'interface avec le milieu extérieur comme la peau, les poumons ou le tube digestif

(118). Ils peuvent y détecter un nombre important de signaux de danger car ils possèdent de nombreux TLRs. Ils sont une source importante d'IL-17 et d'IL-22 et contribuent au recrutement sur site des PNN.

## 2. Les cellules NK et NKT

Les cellules NK et NKT expriment toutes deux le récepteur activateur NKG2D capable de reconnaître directement des cellules infectées par liaison avec certains ligands exprimés à leur surface en condition de stress. Il s'agit chez l'homme des molécules MIC, (MHC class I related) ULBP, (UL-16 binding protein) et chez la souris des molécules H-60 et Rae1. Le blocage par anticorps de ces récepteurs entraînent *in vivo* une diminution des molécules pro-inflammatoires et des taux de NO dans les BAL au cours de la pneumonie à *Pa*, aboutissant à une augmentation significative de la charge bactérienne (119).

Les cellules NK sont des cellules de l'immunité innée possédant deux rôles. Ils entraînent la lyse cellulaire grâce à l'exocytose de granules cytotoxiques et la synthèse de ligands se fixant aux récepteurs de mort de la cellule cible. Ils sont également producteurs de cytokines (IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  etc) activant d'autres cellules immunitaires professionnelles (120). Les cellules NK utilisent leurs différents récepteurs activateurs ou inhibiteurs pour réguler leurs propres fonctions. Le récepteur activateur active la cellule NK quand il reconnaît un signal de danger, alors que le récepteur inhibiteur interrompt le processus cytotoxique lorsqu'il reconnaît le soi via le CMH I à la surface de la cellule rencontrée (**Figure 20**). Ces cellules possèdent également le facteur de transcription ROR $\gamma$ T et sécrètent de l'IL-22 (120). La sécrétion d'IL-17 par les NK semble principalement dépendante de l'IL-6 en l'absence de l'IL-23R (105).

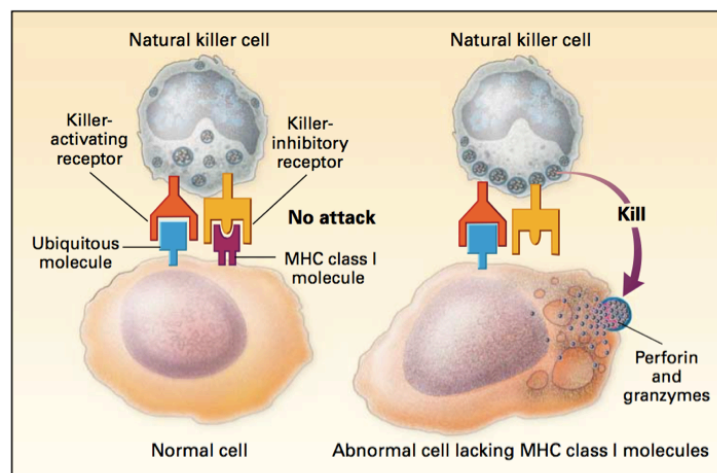


Figure 20: Régulation des mécanismes de bactéricidie des cellules NK (50).



Les cellules NKT sont des lymphocytes T exprimant des marqueurs de cellule NK à leur surface comme le NK1.1 (108). Ces cellules reconnaissent des antigènes lipidiques et les présentent par l'intermédiaire du CD1d. Parmi les NKT, les iNKT sont capables de produire de l'IL-17 en réponse à la stimulation du TCR ou de l'IL-23R. Les CD4-/NKT1.1+ NKT ont été récemment décrits comme des producteurs d'IL-17 mais le mécanisme n'est pas connu à l'heure actuelle. Leur importance *in vivo* est encore mal définie, les expérimentations sur souris déficientes pour le CD1d retrouvant des résultats contradictoires (17).

### **3. Les Innate lymphoid cells (ILCs)**

Les ILCs sont des cellules lymphoïdes présentes au niveau des muqueuses jouant un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes extracellulaires et le maintien de l'intégrité des organes dits « barrières » tels que le poumon ou l'intestin (109). Elles sont impliquées dans l'initiation précoce de l'inflammation dans ces organes en réponse à l'infection ou à des lésions tissulaires. Trois groupes d'ILC sont actuellement identifiés : les ILC de type 1, 2 et 3 (121). Les ILC1 expriment le facteur de transcription T-bet et sécrètent des cytokines de type Th1. Les ILC2 expriment le facteur de transcription gata3 et sécrètent des cytokines de type Th2. Les ILC3 expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Elles ont un rôle majeur dans la réponse immunitaire pulmonaire, car elles représentent la principale source d'IL-17 et d'IL-22 (122), et participent à la transition entre réponse innée et adaptative. En dépit de leur rareté, elles sont essentielles dans la régulation de l'homéostasie et la réparation tissulaire, comme l'attestent les phénomènes d'allergie, d'auto-immunité ou d'inflammation chronique qui surviennent en cas de dérégulation de cette population cellulaire (121,122).

#### **4) Focus sur les cytokines d'intérêt dans la défense anti-*Pseudomonas***

##### **a. TNF $\alpha$**

Le TNF $\alpha$  est sécrété essentiellement par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales au niveau pulmonaire. Le rôle du TNF $\alpha$  au cours de la réponse immunitaire innée est majeur car il est la première cytokine libérée en quelques minutes lors d'une réaction inflammatoire et représente le principal activateur des cellules phagocytaires. Il contribue au recrutement des effecteurs cellulaires en activant les cellules endothéliales. Le TNF  $\alpha$  stimule sa propre synthèse ainsi que celle de l'IL-1 et de l'IL-6 par activation de la voie NF $\kappa$ B. Il induit également la synthèse plus tardive des molécules anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou Muc1 (123,124). A ce titre, le TNF $\alpha$  est l'initiateur, l'amplificateur puis le régulateur de la

réponse immunitaire innée (125). Les souris déficientes pour cette cytokine ont une clairance bactérienne effondrée au cours de la pneumonie à *Pa* (126).

#### **b. IL-8 (KC)**

L'IL-8 (chez l'homme) ou KC (chez la souris) sont les principales chémokines responsables de la migration des PNN vers le site infectieux. Elles sont comme le TNF $\alpha$  rapidement produites au cours de la réaction inflammatoire par les cellules épithéliales ou les macrophages alvéolaires après stimulation de leurs TLR par *Pa*. Le recrutement alvéolaire des PNN et la clairance bactérienne sont altérés chez les souris déficientes en KC et celles traitées par anticorps bloquant le récepteur CXCR2, démontrant l'importance de cette cytokine *in vivo* (79). Les patients atteints de mucoviscidose chez qui les taux d'IL-8 sont élevés dans les crachats ont une altération plus importante de leurs fonctions respiratoires, suggérant également le rôle de l'IL-8 dans l'inflammation chronique excessive (127).

#### **c. IL-1 $\beta$ et IL-18**

Ces cytokines de la superfamille des cytokines IL-1 sont principalement produites par les macrophages et polarisent la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1. Leur rôle dans la pneumonie aiguë à *Pa* semble plus délétère que bénéfique dans les modèles murins. Les souris IL-1 $\beta$  KO et celles traitées par antagoniste du récepteur de l'IL-1 $\beta$  montrent une meilleure clairance bactérienne par rapport aux contrôles. L'IL-1 $\beta$  est également impliquée dans le recrutement des PNN (128). L'IL-18 stimule la production par les cellules NK et T d'IFN $\gamma$ , dont l'importance au cours de la pneumonie à *Pa* est mal définie. L'IL-18 peut également activer la sécrétion de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'autres chémokines, probablement par activation de la voie NF $\kappa$ B. Le rôle de l'IL-18 au cours de la pneumonie à *Pa* a été étudié au moyen de souris IL-18 KO et par traitement avec des anticorps neutralisants. Dans les deux modèles, on observait une meilleure clairance bactérienne et une amélioration de la survie par rapport aux contrôles, suggérant comme pour l'IL-1 $\beta$  un rôle délétère au cours de l'infection respiratoire aiguë à *Pa* (31).

#### **d. IL-10**

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire impliquée dans le contrôle et la résolution de l'infection au cours de la pneumonie à *Pa*. Son pic de production survient vers la 24<sup>ème</sup> heure après le début de l'infection, au moment où les concentrations de cytokines et chémokines pro-inflammatoires diminuent (129). En inhibant la production de cytokines proinflammatoires et les fonctions des CPA, l'IL-10 permet de limiter l'inflammation et les

lésions tissulaires provoquées par les PNN (31). Les modèles utilisant des souris IL-10 KO retrouvent une infiltration excessive de PNN au niveau des voies aériennes associée à une production prolongée de cytokines proinflammatoires (130). De plus, la supplémentation des souris en IL-10 entraînent une amélioration de leur survie (131). Ces résultats confirment la nécessité de systèmes de contre-régulation de la réponse inflammatoire au cours de l'infection afin de limiter les dommages tissulaires qui conditionnent le pronostic. En revanche, une production excessive et soutenue d'IL-10 peut être délétère en atténuant la réponse pro-inflammatoire nécessaire à la clairance pulmonaire de *Pa* (132). Ainsi, l'IL-10 est un acteur essentiel du maintien de l'équilibre dans la balance immunitaire.

### ***Chapitre 3. Rôle essentiel de la balance immunitaire***

La physiopathologie des différents types de pneumonies à *Pa* illustre parfaitement le rôle de la balance immunitaire dans le pronostic infectieux, correspondant au concept du « dommage-réponse » décrit par Casadevall *et al* (**Figure 21**). Cette théorie fait jouer au micro-organisme et à son hôte une part égale dans l'apparition de dommages tissulaires qui déterminent l'évolution et le pronostic du processus infectieux. Elle postule que la pathogénèse des infections microbiennes est directement due aux interactions entre l'hôte et la bactérie, dont le résultat peut être bénéfique ou néfaste (133). *Pa* n'est jamais pathogène pour un sujet immunocompétent et le développement d'une pneumonie à *Pa* nécessite la présence d'un déficit immunitaire sous-jacent. L'interaction des facteurs de virulence bactériens avec le système immunitaire de l'hôte permet la détection du pathogène et initie la réponse immunitaire. L'efficacité de l'immunité mise en place au cours de la pneumonie aiguë à *Pa* est essentielle pour le contrôle du processus infectieux et la clairance bactérienne. Mais une réponse immunitaire excessive ou dérégulée peut être responsable d'importants dommages tissulaires aggravant le pronostic (70). A l'inverse, une réponse immunitaire inefficace peut conduire à la persistance de l'infection. Lors de la pneumonie chronique, c'est essentiellement l'inflammation inadaptée et persistante qui génère les lésions tissulaires.

La balance immunitaire conditionne donc la sévérité de l'infection. Ceci est particulièrement vrai au cours des infections respiratoires, où l'intégrité du tissu pulmonaire assurant l'hématose est indispensable à la survie de l'hôte. De ce point de vue, l'objectif essentiel du traitement ne devrait pas viser à éliminer au plus vite le microorganisme au prix d'une inflammation intense accompagnée de dommages tissulaires importants, mais devrait au contraire chercher à limiter les lésions tissulaires par un juste équilibre entre contrôle du processus infectieux et intensité de la réponse de l'hôte. C'est dans ce sens que se tournent les perspectives thérapeutiques actuelles.

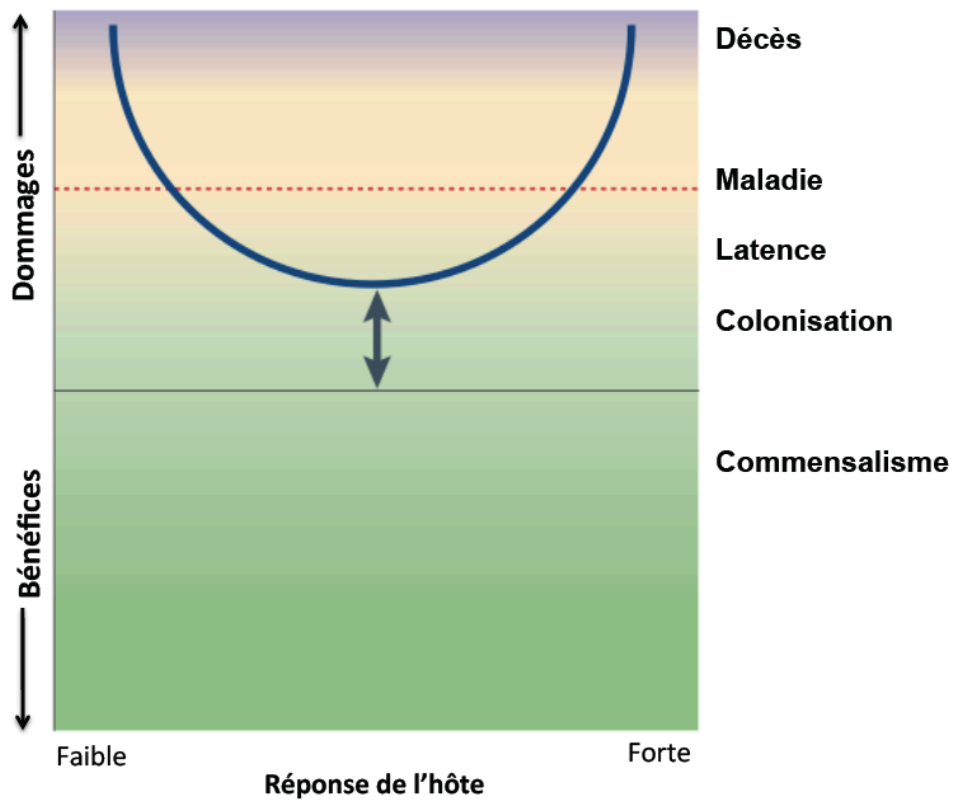


Figure 21: Rôle de la balance immunitaire dans la physiopathologie de l'infection adapté de Casadevall *et al* (133).

## ***Chapitre 4. Stratégies thérapeutiques dans la pneumonie aiguë à *Pa* : nouvelles perspectives***

### **1) *Pa* : un pathogène problématique**

De par ses caractéristiques microbiologiques intrinsèques, *Pa* est un pathogène problématique en matière de traitement préventif et curatif de l'infection.

En plus de sa faculté à coloniser naturellement le système oro-digestif humain, *Pa* est présent de manière ubiquitaire dans l'environnement. Sa résistance naturelle à de nombreux microbicides favorise la persistance sur les équipements et les surfaces des milieux de soins. Ces sources endogènes et exogènes constituent un inéluctable réservoir bactérien propice à la colonisation des voies aériennes puis au développement d'infections en cas d'altération des mécanismes de défense de l'hôte. Si éradiquer le réservoir semble impossible, prévenir la colonisation ou en limiter l'évolution vers le stade infectieux est un des challenges thérapeutiques futurs.

Une fois infectant, *Pa* met en œuvre de multiples mécanismes de résistance naturels ou acquis à un large panel d'antibiotiques : présence de  $\beta$ -lactamases, carbapénémases ou modification des protéines et enzymes cibles de certains antibiotiques comme les aminosides ou les fluoroquinolones, pompe à efflux ou encore imperméabilité. Ces facteurs de résistances résultent de multiples réarrangements génétiques tels que des mutations chromosomiques et des transferts de gènes horizontaux via plasmides, éléments génétiques mobiles ou phages. Leur association est responsable de l'acquisition de la multirésistance, définie comme la résistance à au moins un agent parmi les classes des carbapénèmes, des aminosides et des fluoroquinolones. Les données épidémiologiques révèlent une augmentation de l'incidence des infections à souches multirésistantes, voire totorésistantes lorsque *Pa* n'est plus sensible qu'à une seule des trois classes d'antibiotiques sus-citées (30).

Ces données éclairent les problématiques soulevées lors de la prise en charge des infections respiratoires à *Pa* auxquelles l'antibiothérapie seule ne peut pas faire face. Les facteurs de virulence bactériens et la réponse de l'hôte qui en résulte conditionnent le type et la sévérité de l'atteinte. En fonction des conditions environnementales et du statut immunitaire de l'hôte, *Pa* peut coloniser les voies aériennes de manière asymptomatique, être responsable d'une infection chronique ou encore se comporter comme une bactérie hautement virulente responsable d'infections aiguës sévères. Afin de développer des stratégies alternatives ciblées de prévention et de traitement, une connaissance approfondie des

interactions hôte-pathogènes est indispensable. La compréhension du fonctionnement des facteurs de virulence de la bactérie au sein de son environnement respiratoire a permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

## **2) Stratégie préventive**

La prévention des infections passe en premier lieu par l'éviction de la colonisation. A cette étape, l'antibiothérapie n'est d'aucune efficacité, voire peut se révéler contre-productive en déstabilisant les microbiotes digestif et pulmonaire créant ainsi une niche écologique favorable au développement de *Pa* tout en sélectionnant des clones résistants.

Dans le contexte aigu des patients de soins intensifs, une première approche consiste à préserver les mécanismes de défenses du malade en diminuant l'exposition aux dispositifs invasifs type sonde d'intubation orotrachéale responsables de lésions épithéliales et d'altération de la clairance muco-ciliaire ou en corrigeant un déficit immunitaire. Les biothérapies inhibant les facteurs bactériens impliqués dans la colonisation de l'arbre respiratoire constituent une seconde approche dans la prévention de la colonisation chez les patients à haut risque. Des anticorps monoclonaux humains ciblant le LPS (Mab KB001-A Panobacumab), l'exopolysaccharide Ps1, la flagelline de type b (LST-007), les polysaccharides de surfaces (MAb F598) ou des glycopeptides inhibiteurs de lectines (anti-LecA, anti-LecB), tous impliqués dans l'adhésion aux cellules épithéliales et la formation du biofilm, sont actuellement à l'étude chez l'animal et chez l'homme (134). Egalement, des anticorps dirigés contre le SST3 (Mab166 ; Mab KB001) sont en cours de développement (135,136). Chez les patients à risque d'infections chroniques comme les malades atteints de mucoviscidose ou de BPCO, des stratégies de biothérapies similaires sont actuellement développées (134).

Enfin, pour ces deux catégories de malades, la vaccination préventive apporterait un bénéfice incontestable. Bien que de nombreux candidats aient été développés et testés, très peu ont atteint les phases cliniques et aucun n'a actuellement obtenu de mise sur le marché (137). Les espoirs se tournent actuellement vers les vaccins à adénovirus et les nanovaccins favorisant une immunité humorale muqueuse tout en réduisant l'inflammation locale (138,139).

## **3) Stratégie anti-microbienne : l'antibiothérapie**

Au cours de l'infection respiratoire à *Pa*, l'antibiothérapie reste la pierre angulaire du traitement curatif. L'instauration précoce d'un traitement antibiotique adapté est cruciale pour le pronostic et doit prendre en compte le profil de résistance de la bactérie. Les molécules

utilisées peuvent avoir une action soit bactériostatique, soit bactéricide (140). Bien que plus efficace en terme de réduction de l'inoculum bactérien, la bactéricidie entraîne la libération de nombreux antigènes bactériens responsables d'une réaction inflammatoire majeure pouvant aggraver les lésions pulmonaires. Le phénomène de mortalité précoce antibio-indépendante bien décrit dans les pneumonies aiguës notamment à pneumocoque illustre l'importance majeure du contrôle de l'inflammation aiguë dans le pronostic de la pneumonie (141). Compte-tenu de la fréquente multi-résistance de *Pa* et des effets parfois délétères de l'antibiothérapie sur la balance immunitaire pulmonaire, d'autres stratégies curatives à visée anti-lésionnelle doivent être envisagées.

#### **4) Stratégie anti-lésionnelle : recherche translationnelle et thérapies adjuvantes**

Plusieurs exemples de thérapeutiques adjuvantes actuellement développées illustrent cette nouvelle approche (142). Certaines cherchent à limiter les dommages tissulaires secondaires aux propriétés cytotoxiques directes des facteurs de virulence ou à la réponse immunitaire qu'ils induisent (SST3, flagelle, LPS). Ces nouveaux traitements peuvent également tenter d'optimiser la réponse immunitaire dirigée contre *Pa* en rendant la bactérie visible lorsque celle-ci se camoufle par exemple dans un biofilm. Enfin, ils peuvent viser à moduler la réponse immunitaire lorsque son intensité est insuffisante ou au contraire excessive et fait pencher la balance en défaveur de l'hôte.

##### **a. Cibler les facteurs de virulence**

A l'instar des biothérapies à visée préventive, des vaccins et anticorps dirigés contre les facteurs cytotoxiques et pro-inflammatoires de *Pa* tels que le SST3, le LPS ou le flagelle sont en cours de développement, permettant une réduction des lésions épithéliales, de la mort des cellules immunitaires et du relargage de cytokines proinflammatoires tout en évitant l'émergence de résistance aux antibiotiques (134). Également, d'autres agents visant à diminuer la cytotoxicité liée au SST3 tels que des inhibiteurs de son régulateur ExsA (142), ou de l'activité enzymatique de ses toxines Exo-S et Exo-U (143) sont envisagés. Enfin, les inhibiteurs du quorum-sensing sont également des pistes intéressantes (142).

##### **b. Restaurer une réponse immunitaire efficace**

Même si *Pa* peut à certaines phases de l'infection se montrer hautement virulent, il sait aussi se faire discret et adopter une stratégie de camouflage/échappement notamment dans le biofilm, le rendant inaccessible aux antibiotiques et aux effecteurs immunitaires. Les moyens



de lutte contre le biofilm consistent à en limiter sa formation, sa maturation, ou à le détruire une fois formé (142). Entre autres, les glycopeptides dendrimères, les nanoparticules d'argent ou encore la lactoferrine ont récemment démontré une action inhibitrice sur le biofilm (134).

A ce camouflage bactérien entravant la mise en place d'une réponse immunitaire efficace, peut s'associer chez certains malades des dysfonctionnements de l'immunité pulmonaire, tels que des déficits en protéines impliquées dans l'immunité innée locale. Des thérapies substitutives sont actuellement en développement. Par exemple, une supplémentation en hypothiocyanite et lactoferrine faisant défaut chez ces malades, révèle un bénéfice potentiel dans le traitement de l'infection chronique. De la même manière, la supplémentation locale en lysozyme montre des propriétés anti-bactériennes et anti-inflammatoires prometteuses. Le bénéfice de ces traitements réside dans une activité anti-bactérienne locale synergique avec une action anti-biofilm et anti-inflammatoire, associées à un faible risque de toxicité (134).

### **c. Contrôler la réponse immunitaire**

Certains antibiotiques possèdent en plus de leur action antibactérienne des propriétés inhibitrices de la virulence bactérienne et anti-inflammatoires, permettant de contrôler l'infection tout en limitant l'emballement inflammatoire. L'azithromycine, antibiotique de la classe des macrolides en est un bon exemple dans la pneumonie à *Pa*. Un traitement prolongé chez des malades atteints de mucoviscidose a montré une amélioration de la fonction respiratoire, qui bien qu'elle soit transitoire, est une preuve de concept de l'importance de l'équilibre de la balance immunitaire au cours du traitement de la pneumonie (144). D'autres exemples illustrant ce concept existent pour le traitement de pneumonies aiguës secondaires à des pathogènes autres que *Pa* (145). Enfin, d'une manière plus générale, les thérapeutiques adjuvantes sus-citées qui possèdent à la fois des propriétés anti-virulences et anti-inflammatoires permettent de « désarmer » la bactérie tout en limitant une réponse excessive de l'hôte, et s'intègrent parfaitement dans la stratégie thérapeutique adjuvante anti-lésionnelle.

Les métabolites de la voie des kynurénines, produits à la fois par l'hôte et par *Pa* et possédant des propriétés immunomodulatrices diverses, pourraient intervenir dans la balance immunitaire pulmonaire au cours de l'infection respiratoire aiguë à *Pa*.

## ***Chapitre 5. La voie des kynurénines***

### **1) Généralités sur les kynurénines**

La voie des kynurénines est la principale voie de dégradation oxydative du tryptophane (7). Étudiée chez les eucaryotes depuis plus d'un siècle, elle est découverte récente par des études de génétique comparative chez quelques rares procaryotes dont *Pa* (146). Chez l'homme, la première étape de cette voie est réalisée par trois enzymes, la tryptophane 2,3 di-oxygénase (TDO), constitutive, présente dans le foie, l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) de type 1, inductible au cours de l'inflammation, présente dans de nombreuses cellules (épithéliales, endothéliales, myéloïdes etc) et l'IDO2 dont le rôle est moins bien connu. Le tryptophane est alors dégradé par une cascade enzymatique en plusieurs métabolites constituant le groupe des kynurénines (7). L'étude de ces molécules, historiquement réalisée pour leur rôle tolérogène dans la gestation et la carcinogénèse, a permis de découvrir chez elles de nombreuses autres fonctions biologiques (147). Produites en réponse à une inflammation, elles exercent un rôle de régulation visant à maintenir l'homéostasie, et réorientent la réponse cytokinique vers un profil anti-inflammatoire (148). Elles possèdent par ailleurs des propriétés immunomodulatrices sur la réponse adaptative aboutissant à un état d'immunotolérance (149). Produites également par les cellules de l'immunité innée comme les macrophages, les DC et les cellules épithéliales, leur fonction, dans ce contexte est moins bien connue. Le rôle des kynurénines de l'hôte sur les pathogènes est mal établi et varie en fonction du pathogène en cause et du caractère aigu ou chronique de l'infection (150). Des effets antimicrobiens dépendants de l'activation de l'IDO ont été observés, mais plusieurs études suggèrent que l'activation de cette voie se ferait au profit du pathogène par l'induction d'une immunotolérance (149). En plus de leur implication dans la régulation de l'inflammation et l'induction de l'immunotolérance, plusieurs indices suggèrent que les kynurénines peuvent jouer un rôle au cours des infections respiratoires, comme la forte expression de l'IDO dans le tissu pulmonaire de l'hôte ou l'implication de plusieurs récepteurs des kynurénines tels que l'Ahr, exprimé à haut niveau dans les poumons et dont le rôle dans l'immunité de barrière est majeur, et le GPR35, impliqué dans le recrutement des PNN sur le site infectieux (151,152,153). Par ailleurs, la voie des kynurénines de *Pa* contribue à la production de facteurs de virulence et s'active fortement au contact des cellules immunitaires (154), suggérant un rôle potentiel de ces métabolites au cours de la

pneumonie aigue à *Pa*. Si le rôle des kynurénines de l'hôte commence à être connu au cours des processus infectieux, il n'existe aucune donnée sur celui des kynurénines bactériennes.

## **2) La voie des kynurénines chez l'homme**

### **a. Voies métaboliques de synthèse des kynurénines chez l'homme**

L'IDO ou la TDO sont les premières enzymes de la voie des kynurénines, entraînant la dégradation du tryptophane en formyl kynurénine. La kynurénine formamidase permet ensuite la conversion de la formyl kynurénine en kynurénine. La kynurénine peut ensuite être métabolisée soit en acide kynurénique par la kynurénine aminotransférase (KAT), soit en 3-hydroxy-kynurénine par le kynurénine-3-monooxygénase (KMO). La kynuréninase assure la formation d'antranilate directement à partir de la kynurénine, et de 3-hydroxy-antranilate à partir de la 3-hydroxy-kynurénine. Le 3-hydroxy-antranilate peut ensuite être métabolisé en acide picolinique ou en acide quinolinique, le précurseur du NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) (7,155). La possibilité de doser les métabolites de la voie des kynurénines dans les milieux de culture prouve que ceux-ci sont sécrétés dans l'environnement par les cellules productrices. Cependant, les mécanismes exacts de sécrétion, efflux, transporteur ou diffusion passive, ne sont à ce jour pas connus. De la même façon, la manière dont les kynurénines atteignent leurs récepteurs intra-cytoplasmiques au niveau des cellules cibles n'a pas été étudié à ce jour.

La TDO et l'IDO sont les enzymes limitantes de la voie des kynurénines. Toutes deux sont exclusivement intracellulaires, non sécrétées (151). Ces deux enzymes diffèrent notamment dans leur répartition tissulaire, leur structure, leur spécificité de substrat et leur régulation (156). La TDO est une enzyme homotétramérique exprimée de manière constitutive à haut niveau dans le foie, et dans une moindre mesure dans le tissu cérébral (157). Elle est spécifique du L-tryptophane avec une affinité faible pour son substrat (158). L'activité de la TDO est induite par le tryptophane, la kynurénine et d'autres molécules tels que les glucocorticoïdes (159). Son rôle serait majeur dans la production de NAD via la voie des kynurénines (160).

L'IDO est une enzyme monomérique possédant une forte affinité pour le tryptophane. Il existe deux isoformes de cette enzyme chez l'Homme, l'IDO1 et l'IDO2. L'IDO2 présente 43% d'homologie avec l'IDO1, leurs gènes sont situés côte à côte sur le même chromosome, et proviennent probablement d'une duplication de gène au cours de l'évolution (161). Les vertébrés inférieurs ne possèdent en effet qu'une seule IDO dont la structure est beaucoup

plus proche de l'IDO2 (162). Sa distribution semble restreinte à certains tissus comme le rein, le foie ou le tissu cérébral, le placenta et quelques tissus tumoraux. Elle est également exprimée de manière constitutive dans les DC (163,164,165). Son affinité pour le L-tryptophane est inférieure à celle de l'IDO1 et son activité catalytique est plus faible. Comme l'IDO1, l'IDO2 est inhibée par le 1-méthyl-tryptophane (1MT). Son seul régulateur transcriptionnel connu est l'aryl hydrocarbure receptor (AhR), dont la kynurénine est un ligand physiologique (166,167). Il est possible que l'IDO2 ne soit active qu'en présence de certains inducteurs, comme l'IFN $\gamma$  ou le LPS. A l'heure actuelle, le rôle de l'IDO2 est encore peu élucidé (168). Elle serait impliquée dans la régulation de la tolérance immunitaire de manière partiellement redondante avec l'IDO1 en facilitant la polarisation des Lc naïfs en Lc T régulateurs (169). Par rapport à l'IDO2, l'IDO1 présente une distribution tissulaire beaucoup plus étendue, et ses fonctions notamment immunomodulatrices ont été largement étudiées. La voie des kynurénines chez l'Homme est représentée dans la **figure 22**.

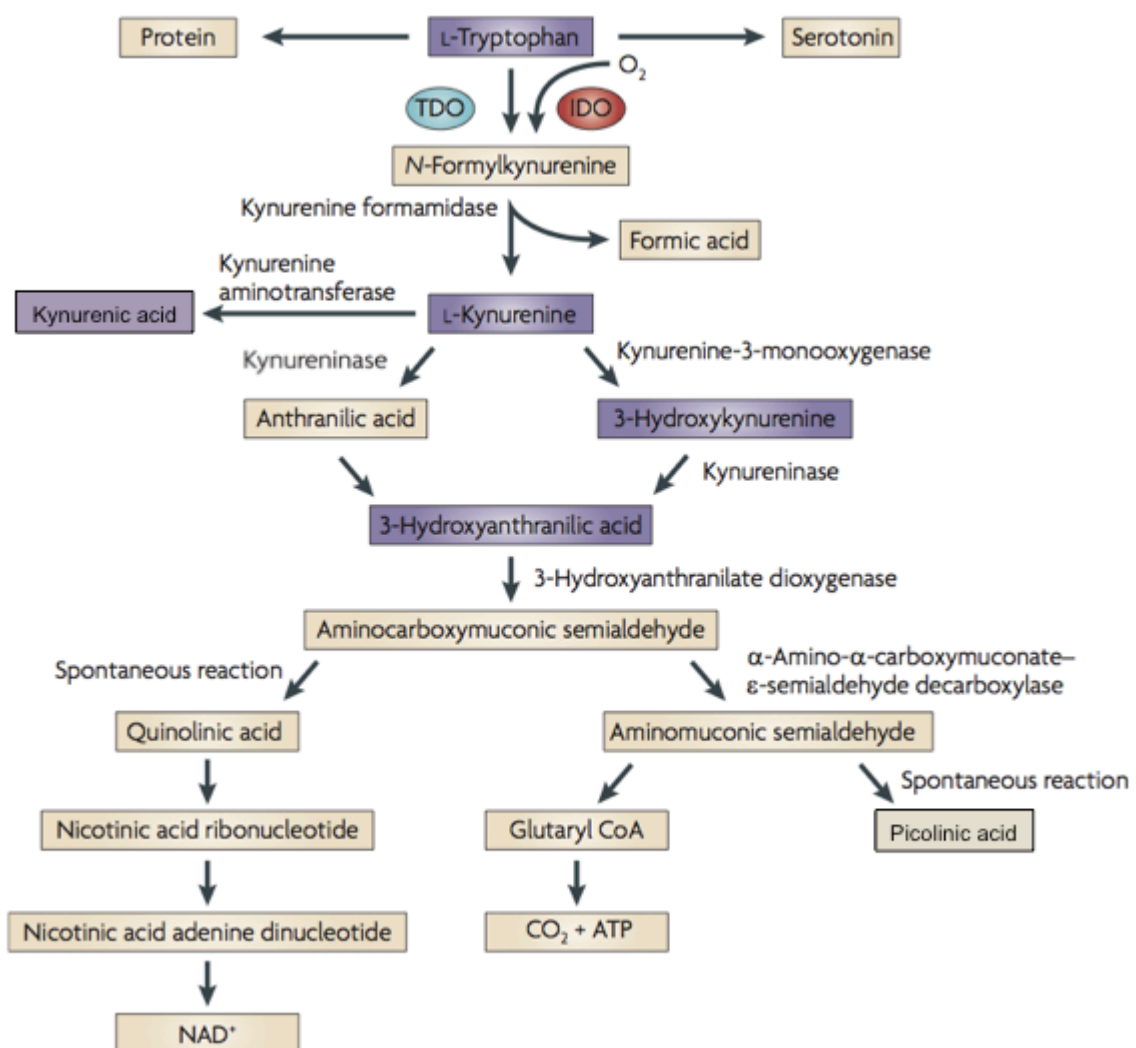


Figure 22: Voie métabolique des kynurénines chez l'homme (155)

## **b. L'IDO1**

### **1. Distribution de l'IDO1**

L'IDO1 a fait l'objet de nombreux travaux de recherche au cours des deux dernières décennies, car elle constitue un régulateur à part entière du système immunitaire impliqué dans des pathologies très diverses, et constitue à ce titre une cible thérapeutique d'intérêt. L'IDO1 est fortement exprimée dans les tissus pulmonaire, splénique, le tractus gastro-intestinal, dans les cellules de l'immunité notamment les macrophages, les DC et les cellules épithéliales (150). L'expression de l'IDO1 existe à bas niveau de manière constitutive mais est fortement induite au cours de l'inflammation en réponse à de nombreux stimuli. La voie de l'IDO1 devient la voie métabolique quasi-exclusive de la dégradation du tryptophane dans ce contexte.

### **2. Régulation de l'IDO1**

L'activité de l'IDO1 est régulée en deux étapes : la modulation de sa transcription puis de son activité catalytique. Ces deux processus sont majoritairement induits par l'IFN $\gamma$  de manière autocrine et paracrine via la voie de signalisation JAK1-STAT1/IRF1 (170). De manière indépendante de l'IFN $\gamma$ , d'autres molécules comme le TNF $\alpha$ , l'IL-6, le LPS et autres ligands des TLR, ou l'activation du CD28 et du CD40L entraînent également l'augmentation de l'expression de l'IDO1 par des voies alternatives impliquant les facteurs de transcription NF $\kappa$ B, STAT3 et de la p38 MAPK (**Figure 23**) (171,172).

L'IDO1 peut être exprimée sans présenter pour autant d'activité catalytique. Le caractère délétère d'une activité constitutive permanente (par surconsommation du tryptophane) suggère que celle-ci est finement régulée (170). L'activité catalytique de l'enzyme n'apparaît qu'une fois la cellule activée par l'IFN $\gamma$ , les cytokines pro-inflammatoires, ou l'engagement de certains récepteurs comme CD80/86. La régulation de cette activité met en jeu des inducteurs comme la COX-2 ou co-facteurs comme les anions superoxydes. Elle implique probablement des modifications post-traductionnelles, des régulateurs de la stabilité de l'enzyme et de la production de l'hème indispensable au fonctionnement du site catalytique (173,174). L'activité de l'IDO1 peut être au contraire diminuée par certaines cytokines comme l'IL-4 et le TGF $\beta$ . L'enzyme peut être dégradée par le protéasome, après phosphorylation par la SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signaling 3) ou liaison d'oxyde nitrique (NO) à l'hème de son site actif (175,176). Plusieurs ERO ont également été impliquées dans l'inhibition de l'activité de l'enzyme, comme l'H $_2$ O $_2$  via

l'oxydation de plusieurs résidus cystéine (343,344). Ces mécanismes inhibiteurs post-traductionnels permettent de limiter l'immunomodulation induite par la voie des kynurénines (176).

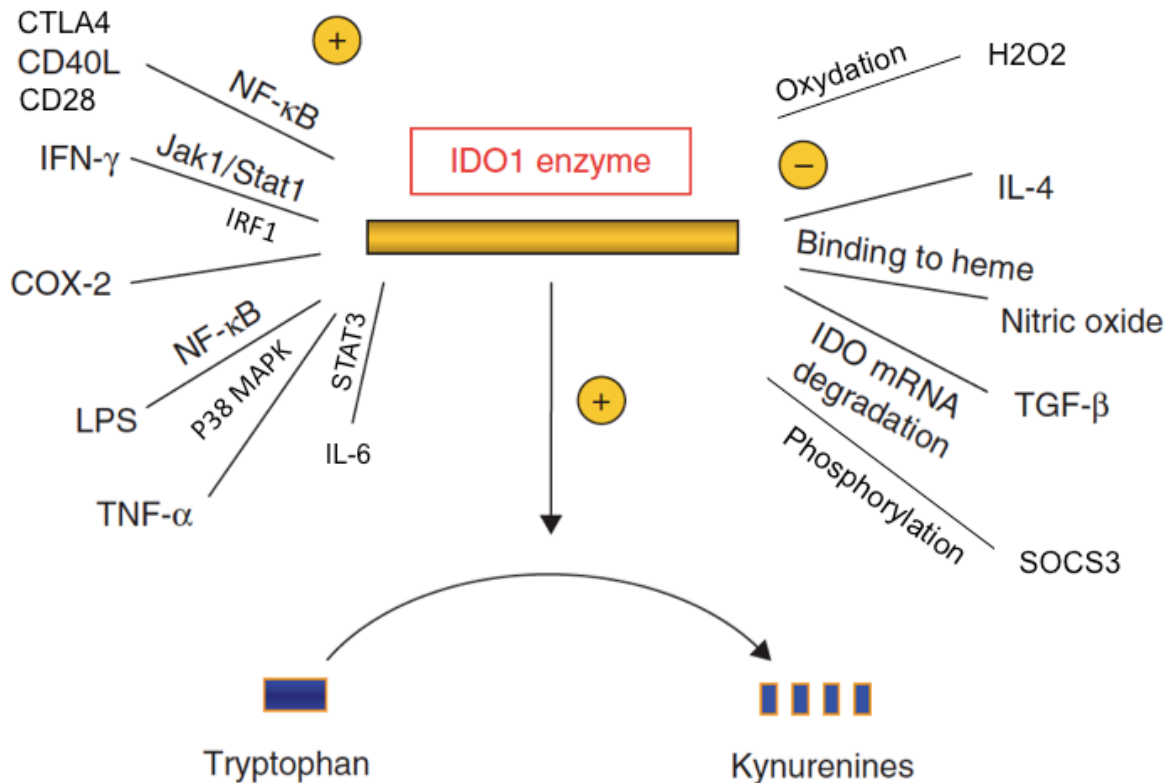


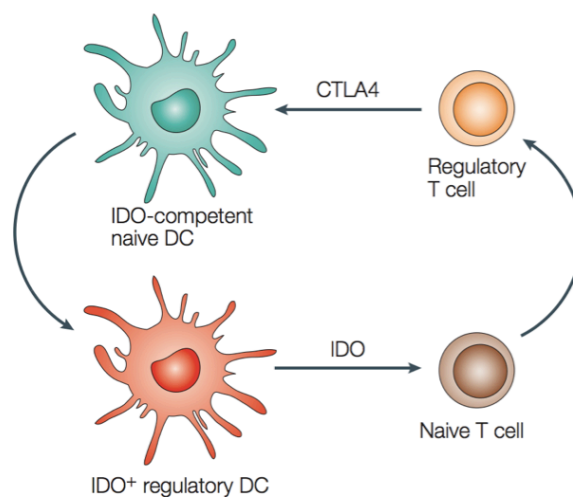
Figure 23: Principaux régulateurs de l'IDO1 (149)

### 3. Rôles immunomodulateurs de l'IDO

Les premiers travaux suggérant des fonctions immunomodulatrices de l'IDO1 ont mis en évidence son rôle essentiel dans la prévention du rejet fœtal médié par les Lc T au cours de la gestation chez la souris (177). L'IDO a ensuite été impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques où un déséquilibre de la balance immunitaire est mis en cause, tels que les mécanismes d'échappements tumoraux, les maladies auto-immunes, la grossesse, l'allergie, les maladies inflammatoires chroniques et la transplantation d'organe (155,178,179).

Plus récemment, le rôle de l'IDO dans la physiopathologie des maladies infectieuses commence à être exploré (150). Les effets immunomodulateurs, essentiellement immunosuppresseurs, de l'IDO sont médiés par la déprivation locale en tryptophane d'une part, et par la synthèse de métabolites bioactifs de la voie des kynurénines d'autre part, interférant avec les réponses innée et adaptative (151).

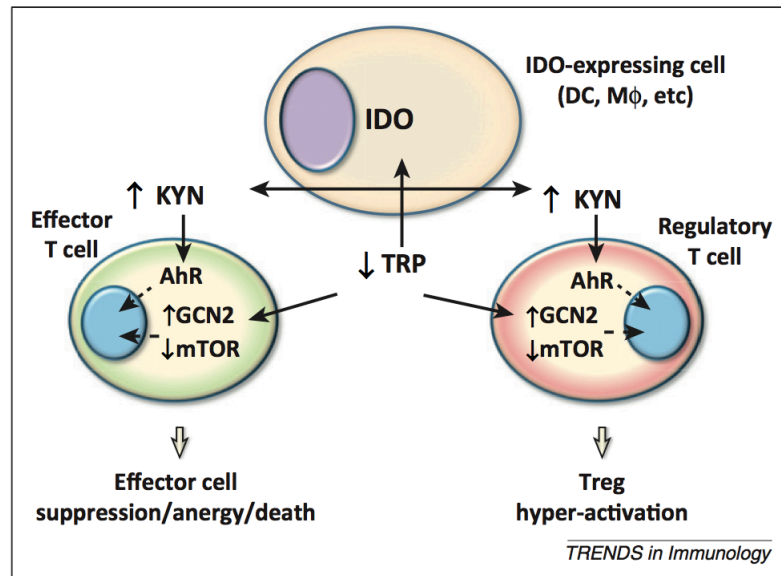
Un rôle essentiellement immunosuppresseur de l'IDO et de ses métabolites est décrit *in vitro* pour les différentes cellules impliquées dans la réponse innée. La voie des kynurénines interfère avec la phagocytose, la bactéricidie et l'apoptose des PNN (180,181). Les propriétés antioxydantes de l'acide kynurénique en font un « scavenger » des ERO capable d'atténuer la réponse inflammatoire précoce et le stress oxydatif (182). L'IDO inhibe la production de cytokines proinflammatoires par les monocytes/macrophages et promeut leur apoptose *in vitro* (183-185). *In vivo*, une étude chez le rat a démontré que le préconditionnement par l'acide kynurénique augmentait les taux sériques d'IL-10 et diminuait les taux de cytokines inflammatoires et la défaillance multiviscérale dans un modèle de choc thermique (186). Cette voie métabolique est également impliquée dans l'activation, la maturation et la réponse aux chémokines des DC (170,187-191). L'IDO constitue une voie de signalisation à part entière dans les CPA (macrophages et DC) permettant leur transformation en CPA aux propriétés tolérogènes qui induisent la polarisation des Lc en Lc T régulateurs et répriment la réponse pro-inflammatoire (170,178,192). Il existe des boucles de rétrocontrôle positif qui augmentent l'expression de l'IDO dans les DC, notamment intracellulaire via l'AhR et intercellulaire par rétrosignal du CTLA4 lymphocytaire (**Figure 24**) (170). Par ailleurs, des effets directs de l'IDO dans la signalisation intracellulaire permettent l'amplification et la persistance du phénotype tolérogène (193).



**Figure 24: Boucle d'amplification intercellulaire de l'expression de l'IDO dans les DC (170)**

Au niveau lymphocytaire, la consommation du tryptophane et la production de kynurénines induisent, par diverses voies de signalisation impliquant la kinase GCN2, mTOR et le récepteur AhR, l'apoptose et l'altération des capacités de microbicidie des cellules NK et des Lc Th1, et inhibent la prolifération des cellules T effectrices (CD8, NKT $\alpha\beta$ ), NK, et Lc B.

En revanche, elles favorisent la différenciation des lymphocytes T CD4 en cellules T régulatrices (**Figure 25**) (149,176,194). Le rôle de l'activité de l'IDO sur la polarisation Th17 semble varier selon les conditions expérimentales, tantôt inhibiteur, tantôt inducteur, de manière AhR-dépendante et indépendante (190,195-199). L'IDO est également impliquée dans l'immunosuppression induite par les voies de signalisation dépendantes de CTLA4 et PD-1 (200,201).



**Figure 25: Contrôle de la réponse T effectrice et T régulatrice via l'IDO (151)**

De ce fait, l'IDO1 contribue à l'homéostasie du système immunitaire en contrebalançant la réaction inflammatoire par ses propriétés immunosuppressives et tolérogènes. Elle participe également à la réparation tissulaire (**Figure 26**) (202). L'implication de l'IDO dans la balance immunitaire en fait une cible thérapeutique d'intérêt. Des inducteurs et inhibiteurs ont donc été développés à visée thérapeutique et comme outils pour la recherche fondamentale (149).



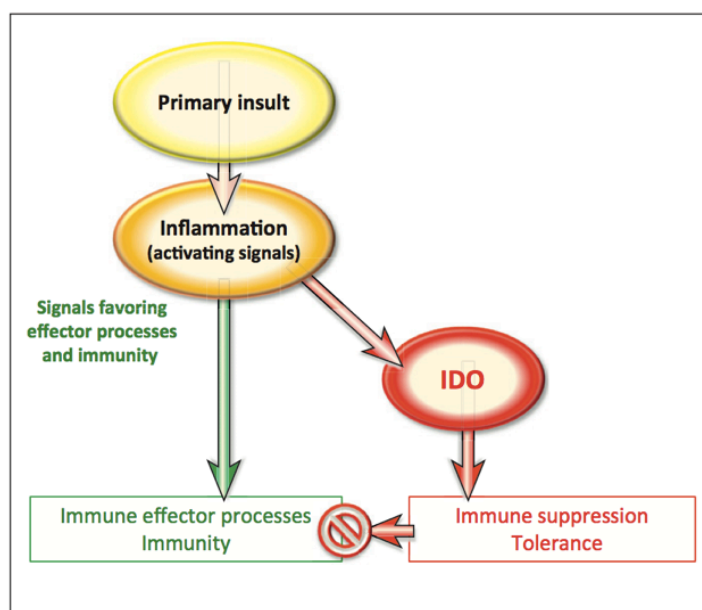


Figure 26: Rôle immunomodulateur de l'IDO (151).

#### 4. Inhibiteurs de l'IDO

Des inhibiteurs de l'IDO sont en cours de développement, essentiellement dans le domaine de la cancérologie au vu de l'implication de cette enzyme dans l'échappement tumoral. Ils sont essentiels à la compréhension du rôle de l'IDO en recherche fondamentale. L'inhibiteur le plus utilisé *in vitro* comme *in vivo* est le 1-méthyltryptophane (1MT). Cet analogue du tryptophane est un inhibiteur compétitif de l'IDO aux propriétés pharmacocinétiques intéressantes tant en recherche expérimentale qu'en pratique clinique, disponible par voie orale, présentant une faible liaison protéique ainsi qu'une clairance basse, sans toxicité rapportée jusqu'à ce jour (149). Le 1MT existe sous forme lévogyre, dextrogyre et en mélange racémique. Le 1-L-MT possède une affinité 100 fois supérieure au 1-D-MT pour l'IDO1 *in vitro*, mais les données *in vivo* sont contradictoires. Il existe cependant un effet agoniste de l'IDO1 décrit avec cet énantiomère, qui n'a finalement pas été retenu pour les essais cliniques (203). Le 1-D-MT est actuellement utilisé en études de phases 2 et 3 en recherche clinique. Son effet inhibiteur sur l'IDO2 semble inférieur à celui du 1-L-MT, mais l'impact sur l'activité lymphocytaire obtenu avec ce composé est plus importante qu'avec le 1-L-MT (204,205). Les études expérimentales utilisent principalement le mélange racémique (149).

### **c. Rôle des autres enzymes de la voie des kynurénines**

#### **1. La kynurénine mono-oxygénase (KMO)**

La KMO est exprimée dans toutes les cellules de l'organisme. Elle peut être activée de manière indépendante de l'IDO au cours des stimulations proinflammatoires (189). Son rôle est central dans la voie métabolique des kynurénines car elle contrôle la synthèse de métabolites bioactifs comme la 3-OH-kynurénine et l'acide quinolinique, alors que son inhibition favorise la production d'acide kynurénique. Ces métabolites ayant des rôles majeurs dans le fonctionnement cérébral, la KMO est considérée comme une cible thérapeutique d'intérêt dans de nombreuses pathologies neurologiques comme les maladies d'Alzheimer, de Huntington et de Parkinson (206). *In vitro*, il a été montré que l'activation de la KMO, en diminuant les concentrations de kynurénine et d'acide kynurénique, tous deux ligands de l'Ahr, inhibait la polarisation Th17 des Lc (197). Des inhibiteurs de cette enzyme sont d'ores et déjà en cours de développement (207).

#### **2. La kynurenine amino-transférase (KAT)**

La KAT est responsable de la synthèse d'acide kynurénique. Les KAT sont présentes dans les cellules d'origine monocytaires (208). Ils existent plusieurs isoformes de cette enzyme chez l'homme, majoritairement étudiés pour leurs fonctions au niveau du système nerveux central (206,209). Les KAT pourraient être impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire au cours de l'infection respiratoire, l'acide kynurénique étant le ligand du GPR35 et le métabolite possédant la plus grande affinité pour l'Ahr (184). Il n'y a pas de travaux sur le sujet à ce jour.

#### **3. La kynuréninase**

La kynuréninase catabolise la kynurénine et la 3-OH-kynurénine respectivement en anthranilate et 3-hydroxy-anthranilate. Elle constitue donc une étape clé de la régulation des concentrations de kynurénines en assurant leur dégradation. Des dysfonctionnements de cette enzyme ont été impliqués dans diverses pathologies neurologiques ainsi que dans l'hypertension artérielle ou l'insuffisance rénale chronique (210). Des inhibiteurs de la kynuréninase sont en développement (147).

### **d. Production physiologique des métabolites de la voie des kynurénines**

Les concentrations sériques physiologiques en tryptophane et kynurénine sont de l'ordre de quelques  $\mu\text{M}$  chez l'homme et dans les modèles de rongeurs. Le taux de

kynurénine sérique peut s'élever en cas d'inflammation ou d'infection (211-214). Les concentrations sériques de l'acide kynurénique sont de l'ordre du nM, mais peuvent augmenter jusqu'au  $\mu\text{M}$  en cas d'inflammation ou d'infection chez les mammifères (212,215). Les concentrations de ce métabolite sont également augmentées jusqu'au  $\mu\text{M}$  dans certains tissus tels que les reins, les intestins, la rate, les muscles et les poumons dans des circonstances pathologiques comme l'insuffisance rénale chronique, l'hypertension artérielle ou le diabète, mais il n'y a pas de donnée au cours de l'infection tissulaire (212,216,217). Certains auteurs suggèrent que les concentrations en acide kynurénique, et celles des autres métabolites de la voie par extension, pourraient être sous-estimées par les méthodes de dosage (184). Il n'existe pas à ce jour de données dans les tissus humains.

Peu de travaux expérimentaux ont étudié les concentrations des divers métabolites dans le tissu pulmonaire et dans le compartiment intra-alvéolaire. Pawlak *et al.* ont réalisé ces dosages dans le plasma et différents organes dont le poumon chez le rat en chromatographie HPLC. Ils retrouvaient des concentrations de l'ordre de la dizaine à plusieurs centaines de pmol/g (212). Les mêmes intervalles de concentrations étaient retrouvées pour le tryptophane chez l'homme (218). Les résultats des études s'intéressant à la concentration en tryptophane dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose montrent qu'il s'agit d'un milieu riche en acides aminés (de 12 mM en dehors des exacerbations à 18 mM au cours des exacerbations) favorisant la croissance de souches auxotrophes mais la concentration en tryptophane libre, évaluée sur une seule étude, n'est que de quelques  $\mu\text{M}$  (219,220). L'importance de la concentration du milieu de croissance en tryptophane pour la production de kynurénines par l'hôte n'est pas connue. L'influence d'un tel paramètre sur la production de kynurénines par *Pa*, qui est une bactérie prototrophe pour cet acide aminé dans son phénotype sauvage, est encore moins certaine (219).

### **3) Voie des kynurénines chez *Pseudomonas aeruginosa***

#### **a. Voie métabolique de synthèse des kynurénines chez *Pa***

Chez *Pa*, la première enzyme de la voie de synthèse des kynurénines est un homotétramère appelé la tryptophane 2,3 dioxygénase (TDO), codée par le gène *kynA* (221). Le tryptophane est transformé en formyl kynurénine par la TDO, puis en kynurénine par la kynurénine formamidase codée par le gène *kynB*. Enfin, la kynurénine est dégradée en anthranilate par la kynuréninase, codée par le gène *kynU* (221). Le gène *kynA* est localisé séparément des gènes *kynB* et *kynU* qui sont regroupés dans un même opéron putatif (222). Les causes et conséquences de cette répartition dissociée des gènes de la voie chez *Pa* ne sont

actuellement pas connues. Les niveaux de production des différents métabolites ont été approximativement estimés *in vitro* par dosage utilisant la réaction d'Ehrlich Kovacs, mais il n'existe pas de donnée *in vivo* (154). De la même manière que chez l'homme, les mécanismes de sécrétion des kynurénines ne sont pas connus chez *Pa*. La capacité de *Pa* à synthétiser d'autres molécules de la voie des kynurénines, telles que la 3-hydroxy-kynurénine ou l'acide kynurénique n'est pas encore déterminée (223). Cependant, certains travaux effectués sur d'autres souches de *Pseudomonas* tels que *P. fluorescens* montrent que ces bactéries peuvent produire de l'acide kynurénique et de la 3-hydroxy-kynurénine, suggérant la possibilité de retrouver chez *Pa* l'équipement génétique et enzymatique nécessaire à cette production (224,225,226). Il existe des boucles de régulation positive des gènes connus de cette voie qui sont activées par la kynurénine elle-même.

#### **b. Régulateurs de la voie des kynurénines**

Deux régulateurs positifs de la voie des kynurénines ont été mis en évidence : LasR et KynR.

LasR est un régulateur transcriptionnel du système *las*, qui contrôle la production de 3-oxo-C12-HSL, ainsi que dans le contrôle direct ou indirect de l'expression de plus de 300 gènes (345,346). En présence de kynurénine, LasR se fixe au promoteur de *kynB* et active la transcription de *kynB* et *kynU* (347).

KynR est un régulateur transcriptionnel de type Lrp/AsnC (Leucin-responsive regulator protein / asparagine synthase C) qui comme LasR possède un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison pour un ligand. KynR contrôle l'activité transcriptionnelle de *kynA* en présence de kynurénines, et de *kynB* en présence ou en absence de kynurénines en se fixant directement au niveau de leurs promoteurs. *In vitro*, le taux de kynurénines augmente au cours de la phase exponentielle de croissance de *Pa* par stimulation de leur propre synthèse via la présence de ces activateurs transcriptionnels (221).

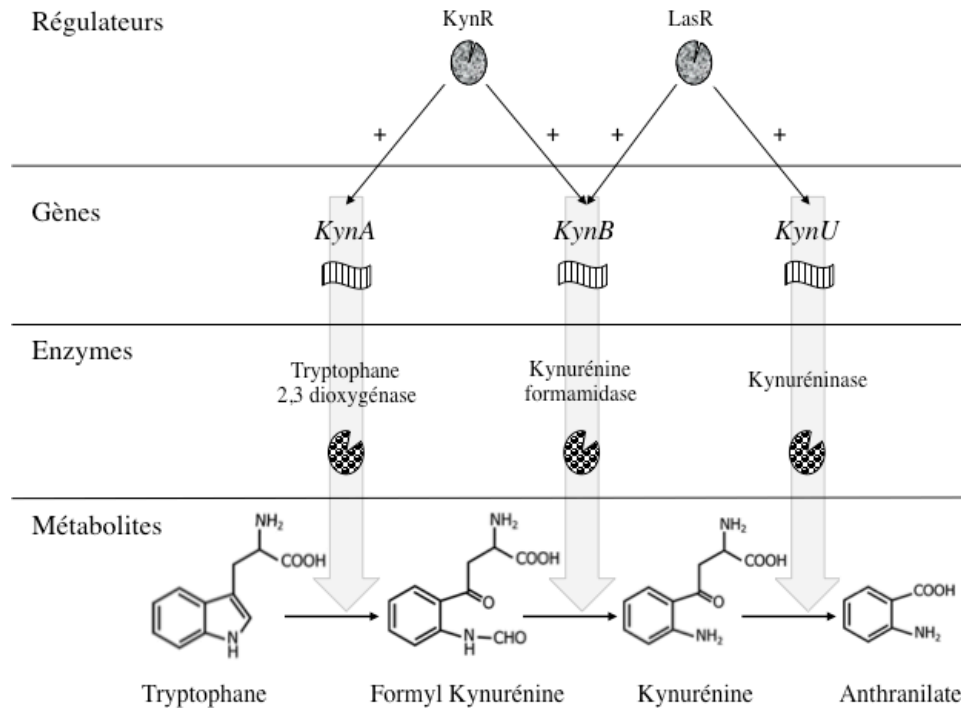


Figure 27: Voies des kynurénines chez *Pa.*

### c. Voie des kynurénines et virulence bactérienne

Plusieurs indices suggèrent que la voie des kynurénines est impliquée dans la virulence bactérienne.

Cette voie métabolique est nécessaire à la production de certains facteurs de virulence. Elle est une des deux sources permettant de produire l'anthranilate, qui est le précurseur direct du PQS et indirect des phénazines via le chorismate. Actuellement, l'hypothèse de la production d'anthranilate par *Pa* est qu'il provient du tryptophane via la voie des kynurénines en milieu riche, et du chorismate en milieu minimum (146,222,227). Le chorismate peut être converti en anthranilate par deux anthranilate synthases, TrpEG et PhnAB. Le gène *trpEG* est principalement exprimé à faible densité bactérienne durant la phase précoce de croissance, et serait plutôt impliqué dans la génération d'anthranilate destiné à la synthèse du tryptophane par les tryptophane synthases (227). Au contraire, le gène *phnAB* est principalement exprimé au cours de la phase tardive de croissance à forte densité bactérienne, et est coréglulé avec les gènes codant pour la synthèse du PQS. PhnAB serait principalement impliquée dans la production du PQS (227). Dans les faits, la part de chaque voie métabolique dans la synthèse d'anthranilate est inconnue *in vivo*.

L'activation de la voie des kynurénines au cours de l'infection est un autre indice de son implication dans la pathogénicité de *Pa*. Le contact de la bactérie avec des cellules

immunitaires entraîne une forte activité transcriptionnelle de *kynA in vitro*, particulièrement avec les PNN (154). *In vivo*, Shen *et al.* ont montré que certains métabolites issus du tryptophane produits au cours de cette phase de croissance réprimaient l'expression du SST3, de manière indépendante du Quorum-Sensing (6). Ceci suggère l'implication des kynurénines dans les infections respiratoires aiguës à *Pa*.

Enfin, grâce à ses régulateurs, *Pa* serait donc capable de « détecter » les kynurénines, y compris les kynurénines de l'hôte dans son environnement. Les enzymes bactériennes et humaines partageant les mêmes substrats (7), le système des kynurénines bactériennes pourrait de ce fait constituer un facteur de virulence potentiel, capable d'orienter la réponse immunitaire de l'hôte à son profit.

## ***Chapitre 6. Implications de la voie des kynurénines dans la réponse anti-infectieuse***

La voie des kynurénines est impliquée dans la réponse anti-infectieuse par ses propriétés immunomodulatrices directes, et via les récepteurs de ses métabolites bioactifs comme le GPR35 ou l'AhR. En fonction de la pathologie, son activation peut avoir un impact bénéfique ou délétère pour l'hôte (311).

### **1) Rôle de l'IDO et des kynurénines dans la réponse anti-infectieuse**

Le rôle de l'IDO et de ses métabolites dans l'infection est difficilement dissociable, et rarement individualisé dans la littérature. La déplétion en tryptophane du microenvironnement et la production de métabolites bioactifs par la voie de kynurénines permettent d'inhiber la réplication de certains microorganismes et la propagation virale. Cependant, en dérégulant la réponse immunitaire, la voie des kynurénines peut favoriser l'infection et promouvoir le passage à la chronicité. Enfin, les propriétés immunomodulatrices de la voie des kynurénines en font un acteur essentiel du damage-control.

#### **a. Rôle des kynurénines dans la réponse anti-infectieuse *in vitro***

L'activation de l'IDO peut entraîner *in vitro* une diminution de la croissance des micro-organismes auxotrophes pour le tryptophane. Ce phénomène est observé pour certaines bactéries (*Chlamydia trachomatis*, mycobactéries), parasites (*Toxoplasma gondii*) et virus (CMV, HSV, VHB) (149,151,170). En revanche, par leurs propriétés immunosuppressives, l'IDO et les kynurénines peuvent favoriser l'échappement des pathogènes aux défenses de l'hôte. Le cas le plus connu est celui du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Certaines protéines virales induisent par la voie des TLR l'expression et l'activation de l'IDO par les DC, inhibant la prolifération des cellules T effectrices à la faveur d'une réponse T régulatrice inefficace au contrôle de la réplication virale (149,348,349). Ce phénomène est également décrit au cours des infections parasitaires (leishmaniose) et bactériennes (*Escherichia coli*) (151). De manière intéressante, les pathogènes concernés sont principalement à développement intracellulaire. Cependant, les études *in vitro* semblent trop réductrices en regard des nombreux facteurs intervenant dans la régulation de cette voie métabolique. Leurs fonctions doivent donc être explorées dans ce sens dans des modèles pertinents pour l'étude des interactions hôte-pathogènes.

### **b. Rôle des kynurénines dans la réponse anti-infectieuse *in vivo***

*In vivo*, la voie des kynurénines est impliquée dans la réponse immunitaire anti-infectieuse mais son rôle exact n'est pas entièrement élucidé. Activée au cours de l'infection en réponse à l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et via les PRR, les études confèrent à la voie des kynurénines un rôle immunosuppresseur parfois délétère mais parfois bénéfique pour l'hôte (311).

Il existe plusieurs exemples illustrant l'action délétère de la voie des kynurénines au cours de l'infection. Lors d'une infection urinaire par *E. coli*, l'IDO est responsable d'une diminution de la production des cytokines et chémokines proinflammatoires ainsi que du recrutement des PNN en intra-vésical chez les souris sauvages comparées aux souris IDO<sup>-/-</sup>, entraînant une augmentation de la charge bactérienne (350). De même, l'activation de l'IDO augmente la mortalité des souris dans un modèle de péritonite par ponction-ligature caecale en altérant le recrutement péritonéal des PNN et des monocytes par diminution des taux de chémokines (228). Dans le cadre d'une infection pulmonaire grippale, l'activation de l'IDO entraîne une diminution de la production d'IL-6, de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\beta$  intra-alvéolaires, ainsi qu'une réponse lymphocytaire Th1, Th17 et T CD8 moins robuste (229). Dans ce même modèle, les effets immunosuppresseurs de l'IDO favorisent la survenue de surinfections bactériennes pulmonaires secondaires.

Dans ces travaux, le rôle immunosuppresseur de la voie des kynurénines favorise l'échappement du pathogène à la réponse immunitaire. Dans d'autres modèles, l'activation de la voie des kynurénines se fait au bénéfice de l'hôte par limitation des lésions tissulaires engendrées par une réponse inflammatoire trop intense, devenant à ce titre un acteur du damage-control.

### **c. La voie des kynurénines dans le damage control**

La réaction cytokinique et l'activation des PRR en réponse à l'intrusion d'un pathogène induit l'expression de l'IDO dans les CPA, qui acquièrent une activité immunosuppressive, constituant une boucle de contre-régulation de l'inflammation. Lors d'une administration de LPS chez les souris, l'IDO permet une augmentation de la production d'IL-10 et de TGF- $\beta$  mais une diminution des taux d'IL-6, de TNF- $\alpha$ , du recrutement des PNN et des lésions tissulaires associées (251). Lors d'une infection gastro-intestinale murine par *Candida albicans*, l'IDO est responsable de la même manière de la baisse des taux d'IL-6, d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  et de l'augmentation de l'IL-10, atténuant l'infection et les lésions inflammatoires associées (180). De même, lors d'une colite à *Clostridium difficile*, l'IDO permet de limiter les lésions tissulaires en régulant l'influx de PNN (181). Dans un modèle de



pneumonie à *Francisella novicidia*, l'inhibition de l'IDO entraîne une augmentation de la charge bactérienne et aggrave l'infection (230). Le même phénomène est observé dans les infections disséminées à *Trypanosoma cruzi* et *Toxoplasma gondii* (231). Enfin, Romani *et al.* prêtent aux kynurénines un rôle inhibiteur de la voie IL-23/IL-17 au profit de la voie T régulatrice au cours de l'infection chronique à *Candida albicans*, permettant de lutter contre l'excès d'inflammation dans cette pathologie (232). Le même phénomène est observé dans des modèles murins de pneumonie à *Mycobacterium tuberculosis* et dans l'inflammation chronique des voies aériennes au cours de la mucoviscidose (233,234).

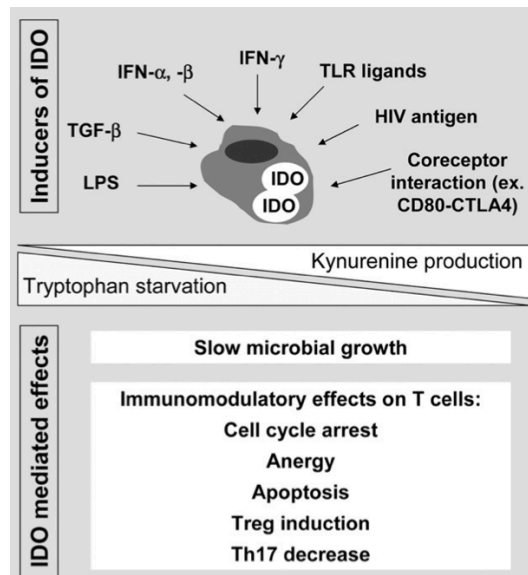
L'IDO et la voie des kynurénines régulent donc négativement la réponse pro-inflammatoire lors d'une infection, avec des effets bénéfiques ou délétères selon le modèle. En atténuant la réponse effectrice, la voie des kynurénines est également impliquée dans le passage à la chronicité des infections.

#### **d. Voie des kynurénines et passage à la chronicité**

Le rôle de l'IDO dans le passage à la chronicité des infections résulte de son impact sur la concentration en tryptophane de l'environnement et de ses propriétés immunosuppressives sur la réponse lymphocytaire (**Figure 28**). Certaines bactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis* ou *Bartonella henselae* activent l'IDO des macrophages et DC des granulomes, altérant les fonctions des Lc T effecteurs et favorisant la persistance du granulome. L'augmentation du taux de kynurénines dans l'environnement entraîne également le ralentissement de la croissance des pathogènes, rendant les traitements antibiotiques moins efficaces. Lors de l'infection par *Leishmania major*, le parasite active l'IDO, favorisant la polarisation lymphocytaire en Treg et diminuant la réponse T effectrice nécessaire à son élimination. Au cours de l'infection par le HIV, l'activation de l'IDO par le virus permet la persistance de l'infection par diminution de la réponse T effectrice. Le rapport des concentrations sériques de la kynurenine et du tryptophane est proportionnel à l'évolution vers le stade SIDA. L'activation de l'IDO et la production de kynurénines sont donc associées au passage à la chronicité dans certaines infections(235). Ce phénomène n'est actuellement démontré que pour les pathogènes intracellulaires où l'immunité adaptative joue un rôle majeur, mais peu de données existent pour les pathogènes extracellulaires.

Chez *Pa*, l'importance de la réponse Th17 dans le contrôle de l'infection respiratoire est maintenant bien démontrée (104,106,113,236). Par ailleurs, la déplétion en tryptophane de l'environnement semble favoriser la constitution du biofilm (237). De plus, certains métabolites du tryptophane sont impliqués dans la répression du SST3 de *Pa* (6). Or, certaines

données obtenues au laboratoire suggèrent que les formes SST3- de *Pa* se développent plus volontiers et persistent en intracellulaire (62). Toutes ces données suggèrent l'implication potentielle de la voie des kynurénines dans le passage à la chronicité de l'infection à *Pa*.



**Figure 28: Mécanismes dépendant de l'IDO impliqués dans la chronicisation des infections (235)**

Par ses propriétés immunomodulatrices, la voie des kynurénines aurait donc un rôle essentiel au contrôle de l'inflammation et dans la tolérance immunitaire notamment au niveau pulmonaire. Le rôle des kynurénines dans la réponse immunitaire au cours des infections respiratoires peut également être médié par des récepteurs tels que le GPR35 et l'AhR.

## 2) Rôle du récepteur GPR35

Le GPR35 est un des récepteurs pouvant être impliqué dans la modulation de la réponse immune par les kynurénines, l'acide kynurénique étant un de ses principaux ligands connus (184). Le GPR35 est un récepteur couplé aux protéines G liant le GTP, fortement exprimé dans certains tissus comme le tractus gastro-intestinal, le foie, le système nerveux central, le système cardiovasculaire et le poumon (238). Il est également exprimé par les cellules du système immunitaire, à haut niveau dans la rate et les leucocytes circulants, et de manière plus modeste dans les Lc T, NK, iNKT, les monocytes/macrophages, les PNN et les DC (153,184,239). Le GPR35 est impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire, mais son rôle n'est pas encore étudié dans tous les types cellulaires de l'immunité (240). Il intervient dans le recrutement des cellules immunitaires et module leur sécrétion cytokinique vers un profil anti-inflammatoire. Par exemple, l'activation du GPR35 par l'acide kynurénique atténue le phénotype pro-inflammatoire des monocytes/macrophages en diminuant la sécrétion de TNF $\alpha$  et d'HMBG1 lors d'une stimulation par du LPS (185). Le

GPR35 est impliqué dans le recrutement des monocytes et PNN en augmentant leur adhésion aux cellules endothéliales par activation de leurs intégrines de membrane (153). Au vu de ses propriétés et de sa distribution cellulaire, le GPR35 est donc un récepteur potentiellement impliqué dans les interactions hôte-pathogènes dépendantes des kynurénines.

Il faut tout de même interpréter avec prudence les résultats portant sur l'acide kynurénique et le GPR35, car même si les tissus qui l'expriment sont aussi les plus producteurs d'acide kynurénique, les concentrations nécessaires pour déclencher l'adhésion ferme des PNN sur l'endothélium étaient élevées, de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . De plus, le ligand semble plus puissant chez les rongeurs que chez l'homme (153,241). Même si les concentrations d'acide kynurénique peuvent atteindre de tels niveaux dans certains tissus au cours de l'inflammation, d'autres ligands agissant à moindre concentration ont été identifiés, tels que certains métabolites de la tyrosine ou la chémokine CXCL17 (242). En plus de son rôle partiellement connu dans le système immunitaire, le GPR35 est impliqué dans des processus variés tels que l'asthme, certaines pathologies du système nerveux central, gastro-intestinal, cardiovasculaire ou néoplasique (243). L'AhR, à l'instar du GPR35, est un autre récepteur des kynurénines aux effets pléiotropes et à large distribution impliqué dans la réponse immunitaire.

### **3) Rôle de l'AhR**

#### **a. Description de l'AhR**

L'AhR est un récepteur aux multiples ligands hautement exprimé dans les organes « barrières » qui constitue un véritable senseur de l'environnement essentiel au maintien de l'homéostasie tissulaire (152). L'AhR est un récepteur intra-cytoplasmique jouant le rôle de facteur de transcription une fois associé à son ligand. En dehors de toute stimulation, les AhR se situent dans le cytoplasme associés à des protéines chaperonnes, telles que Hsp90 (Heat shock protein 90). La liaison avec un ligand entraîne la translocation dans le noyau, la formation d'un hétérodimère avec la protéine ARNT (AhR Nuclear Translocator) pour la voie canonique, ou avec d'autres cofacteurs tels que NF $\kappa$ B pour la voie non-canonique, et le relargage des protéines chaperonnes (244). Le complexe ligand/AhR/ARNT ou ligand/AhR/cofacteur se lie ensuite à des séquences d'ADN connues comme étant les éléments de réponse aux xénobiotiques (XRE) (**Figure 29**) (244). La distribution des XRE sur plus de 600 gènes explique le large potentiel de régulation de l'AhR (152).

L'activité transcriptionnelle de certains gènes, comme CYP1A1, CYP1A2 (codant pour les cytochromes P450 correspondants) et AHRR (codant pour l'AhR repressor), est

constamment et intensément up-régulée lors de la stimulation de l’AhR. La mesure des transcrits de ces gènes est actuellement utilisée pour approcher l’activation de l’AhR. Celle-ci est régulée de manière complexe et fine, car les gènes cibles de l’AhR codent à la fois pour des protéines permettant de dégrader ses ligands ainsi que pour des protéines régulatrices de son activité (AHRR) (152).

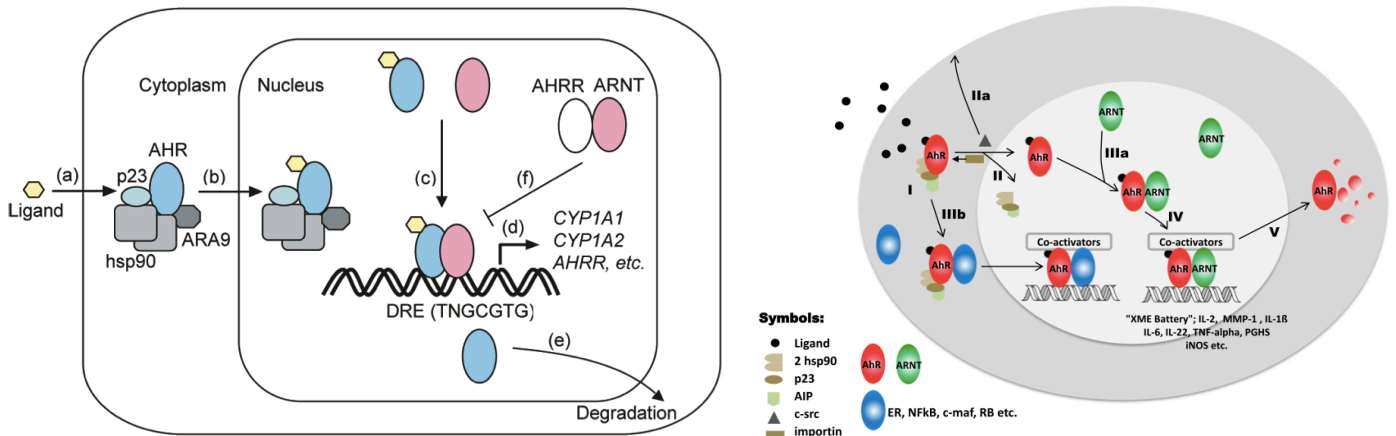


Figure 29: Voies canonique et non canonique de la transduction du signal par l'AhR (244)

### b. Ligands des AhR

Les panels de gènes cibles régulés par l’AhR sont fortement dépendant de la nature de la stimulation : propriétés physico-chimiques, affinité et concentration du ligand ainsi que durée d’exposition. L’AhR peut se lier à des ligands très divers, lui permettant de « sentir » son environnement puis d’initier une réponse adéquate visant à préserver l’intégrité tissulaire. L’AhR est activé par des molécules exogènes comme les polluants environnementaux, des molécules endogènes telles que des acides aminés ou substances du bol alimentaire, et divers facteurs produits par les micro-organismes présents au niveau des organes d’interface avec le milieu extérieur. *In vitro*, il existe des ligands de haute affinité capables d’activer l’AhR à des concentrations de l’ordre du nM (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin (TCDD) et 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ)) et des ligands de faible affinité nécessitant de plus hautes concentrations. La kynurénine, la 3-hydroxy-kynurénine et surtout l’acide kynurénine sont des ligands de faible affinité capables de stimuler l’AhR de manière autocrine et paracrine à des concentrations physiologiques et pathologiques (196,245). Les effets résultants de l’activation de l’AhR sont également dépendants des conditions environnementales et du type cellulaire mis en jeu.

### **c. Rôle de l'AhR dans l'immunité de barrière**

Les organes dits « de barrière » sont spécialisés dans la discrimination entre le dangereux et l'inoffensif, permettant la mise en place d'une réponse adaptée de défense ou au contraire de tolérance. De multiples composés de l'environnement, incluant les petites molécules produites par la flore symbiotique et parfois pathogène, sont rencontrés par ces organes. Les barrières épithéliales comportent un réseau de cellules immunitaires « sentinelles » capables de reconnaître les signaux de danger puis d'initier si nécessaire une réponse rapide et adaptée permettant le recrutement des cellules immunitaires effectrices depuis la circulation sanguine vers le site agressé. En revanche, les cellules sentinelles assurent également le maintien de la tolérance envers les stimuli non dangereux, essentiel à la préservation de l'intégrité des organes en empêchant l'auto-immunité, l'inflammation chronique et les destructions tissulaires qui en résultent. L'AhR est exprimé à haut niveau dans les organes barrières tels que la peau, le tube digestif ou le poumon et dans de nombreuses cellules de l'immunité innée et adaptative. Parmi les cellules immunitaires innées, les monocytes, les macrophages et les DC expriment fortement l'AhR. Les PNN semblent l'exprimer à faible niveau. De manière intéressante, les cellules productrices d'IL-17, comme les ILC du groupe 3, les Lc  $T\gamma\delta$  et Th17, sont les populations cellulaires qui expriment le plus fortement ce récepteur (340). Les Treg et les Lc B l'expriment également, mais plus faiblement (341).

L'AhR est impliqué dans de nombreuses pathologies inflammatoires, auto-immunes et infectieuses et constitue à ce titre une cible thérapeutique d'intérêt. On peut citer les exemples du psoriasis et de la dermatite atopique au niveau cutané, où le traitement par des ligands de l'AhR permet de réduire l'inflammation locale (152). Au niveau digestif, l'AhR est impliqué dans la prévention de colites et gastrites en permettant la différenciation et l'activation des ILC3, des Lc Th17 et Th22, aboutissant in fine à la synthèse d'IL-22 dont le rôle dans la protection épithéliale est majeur (246). Au niveau respiratoire, l'AhR est un des principaux acteurs de la balance immunitaire.

### **d. Rôle de l'AhR au niveau pulmonaire**

Au niveau pulmonaire, l'AhR est impliqué dans la régulation de la réponse immune innée et adaptative au cours des agressions respiratoires aiguës, qu'elles soient infectieuses ou toxiques. L'activation de l'AhR module l'intensité de la réponse inflammatoire, le recrutement des PNN, l'activation des DC et la polarisation de la réponse immunitaire adaptative.

### 1. Réponse inflammatoire et recrutement des PNN

La stimulation de l'AhR entraîne, de manière ligand-dépendante, une modification du profil de sécrétion cytokinique et du recrutement des PNN au cours de la réponse immunitaire innée. La littérature sur le sujet fournit des résultats extrêmement variables et parfois opposés en fonction du modèle et du ligand.

*In vitro*, l'exposition des macrophages à des ligands de l'AhR lors d'une stimulation proinflammatoire provoque soit une exacerbation soit une atténuation de la production de chémokines et cytokines proinflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'IL-6 (183). L'AhR régule également la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23 dans ces cellules, cytokines clés de la voie Th17 et Th22 (247).

*In vivo*, dans un modèle murin de pneumonie à *Listeria monocytogenes*, l'AhR possède un rôle protecteur, diminuant la mortalité des souris en augmentant la survie des macrophages pulmonaires et leur production d'ERO, tout en modérant leur production de cytokines proinflammatoires (248,249). De même, l'AhR atténue la production des cytokines proinflammatoires, le recrutement des PNN et les lésions tissulaires lors de l'exposition des souris à la fumée de cigarette (250). Enfin, il a été montré dans un modèle de choc endotoxinique que l'administration de LPS chez la souris stimulait la production de kynurénines, qui permettaient via l'AhR une décroissance rapide des taux de cytokines proinflammatoires, une augmentation de la synthèse de l'IL-10 et une diminution du recrutement des PNN et des lésions tissulaires associées (251). Dans ces modèles, l'AhR possède des propriétés anti-inflammatoires prévenant une réponse immune excessive et potentiellement délétère.

A l'inverse, dans des modèles murins de pneumonie à *Haemophilus influenzae*, l'activation de l'AhR provoque cette fois le recrutement excessif dérégulé de PNN responsable de lésions tissulaires, alors que les souris AhR KO présentent un défaut de recrutement des PNN dans ce modèle (252,253). Dans l'infection pulmonaire aiguë à *Pa* chez la souris, la détection des phénazines bactériennes par l'AhR augmente la production intra-alvéolaire de chémokines, le recrutement des PNN et la clairance bactérienne pulmonaire (254). L'AhR peut donc sous certaines conditions exacerber la réponse innée, avec des conséquences variables en fonction de la pathologie sous-jacente.

Un travail récent explore la physiopathologie du recrutement des PNN AhR-dépendant au niveau pulmonaire, sans pouvoir mettre en évidence de mécanisme dépendant de cytokines ou de molécules d'adhésion cellulaire, mais mettant en jeu les cellules épithéliales respiratoires. Les auteurs concluent à un mécanisme AhR-dépendant inconnu faisant

intervenir l'épithélium respiratoire, possiblement multifactoriel (255). D'autres travaux utilisant différents types de stimuli démontrent que le recrutement des PNN est ligand et temps-dépendant. Lors de l'administration de TCDD, qui possède une demi-vie longue et persiste dans le milieu, l'Ahr promeut le recrutement des PNN, alors que l'apport de FICZ, dont la demi-vie est courte, ne modifie pas leur recrutement, que son administration soit unique ou répétée (256). Le rôle de l'Ahr dans la balance inflammatoire et le recrutement des PNN varie en fonction de la nature et la durée de la stimulation *in vitro* comme *in vivo*, conférant à ce récepteur une fonction de régulateur de la réponse immune innée au cours d'une pathologie donnée.

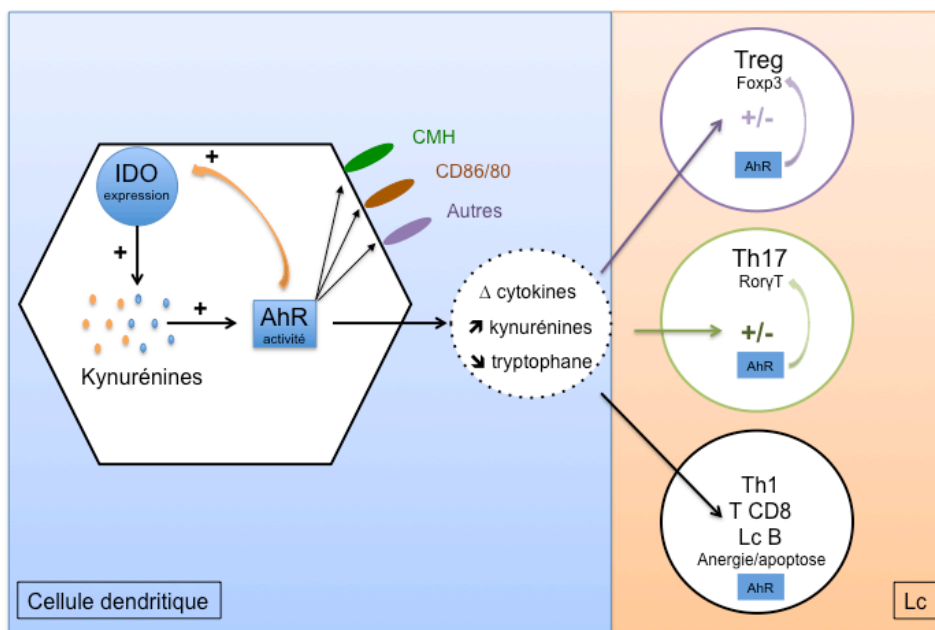
## **2. *Maturation et activation des DC***

L'Ahr intervient dans la maturation et l'activation des DC. *In vitro*, la stimulation de l'Ahr des DC module l'expression à la membrane du CMHII, du CD86, du CD80 et d'autres molécules de costimulation en fonction du ligand, modifiant ainsi leurs capacités d'immunostimulation lymphocytaire. L'activation de l'Ahr induit également l'expression des enzymes IDO1 et 2 responsables de la synthèse de kynurénines par les DC (257,258). Plusieurs travaux confirment l'existence de cette boucle de rétrocontrôle positif de la production de kynurénines via l'Ahr et l'IDO (166,190). Enfin, l'Ahr modifie le profil de production cytokinique des DC, favorisant le plus souvent la sécrétion d'IL-10. Par ces différents mécanismes, l'Ahr régule l'immunogénicité des DC, interférant avec leur capacité d'activation et de polarisation lymphocytaire. Plusieurs papiers confirment ces constatations *in vivo*, démontrant que l'Ahr est responsable d'une diminution des fonctions d'immunostimulation des DC, altérant l'expansion et de la différenciation des Lc T CD8 dans des modèles de pneumonie grippale (253). De manière intéressante, les données de la littérature s'accordent pour dire que les propriétés immunomodulatrices de l'Ahr sont fortement liées à ses interactions avec l'IDO et les métabolites du tryptophane, rendant cette voie métabolique particulièrement intéressante dans la régulation de la réponse immune innée et adaptative (172,251,259,260).

## **3. *Polarisation lymphocytaire***

L'Ahr régule la polarisation lymphocytaire en modulant la différenciation des Lc T naïfs soit en T régulateurs par activation de leur facteur de transcription Foxp3, soit en Th17 par activation de leur facteur de transcription Ror $\gamma$ T de manière ligand-dépendante (190,261). L'action des kynurénines sur la polarisation des Lc dépend encore une fois des conditions expérimentales, favorisant pour certains en association avec l'IL-10 la différenciation des T

régulateurs, tout en inhibitant la différenciation des Lc Th17, Th1 et l'activation des Lc T effecteurs (196). Pour d'autres, les kynurénines et notamment l'acide kynurénique promeuvent la différenciation Th17 via l'Ahr (**Figure 30**) (197). L'Ahr joue également un rôle dans d'autres populations lymphocytaires comme les NK dans lesquelles il favoriserait sous certaines conditions la production d'IL-10 (262). Ainsi, l'Ahr est impliqué dans les pathologies telles que de l'asthme ou la BPCO, qu'il atténue ou au contraire aggrave en fonction du type de ligand administré en modulant la réponse Th17 (263). Il est en partie responsable des lésions induites par la consommation de tabac dont les substances toxiques activent l'Ahr et promeuvent la synthèse inappropriée d'Il-17 (264). Le rôle de l'Ahr sur la réponse lymphocytaire notamment NK, Th1 et Th17 au cours des pneumonies aiguës bactériennes n'est pas connu à ce jour.



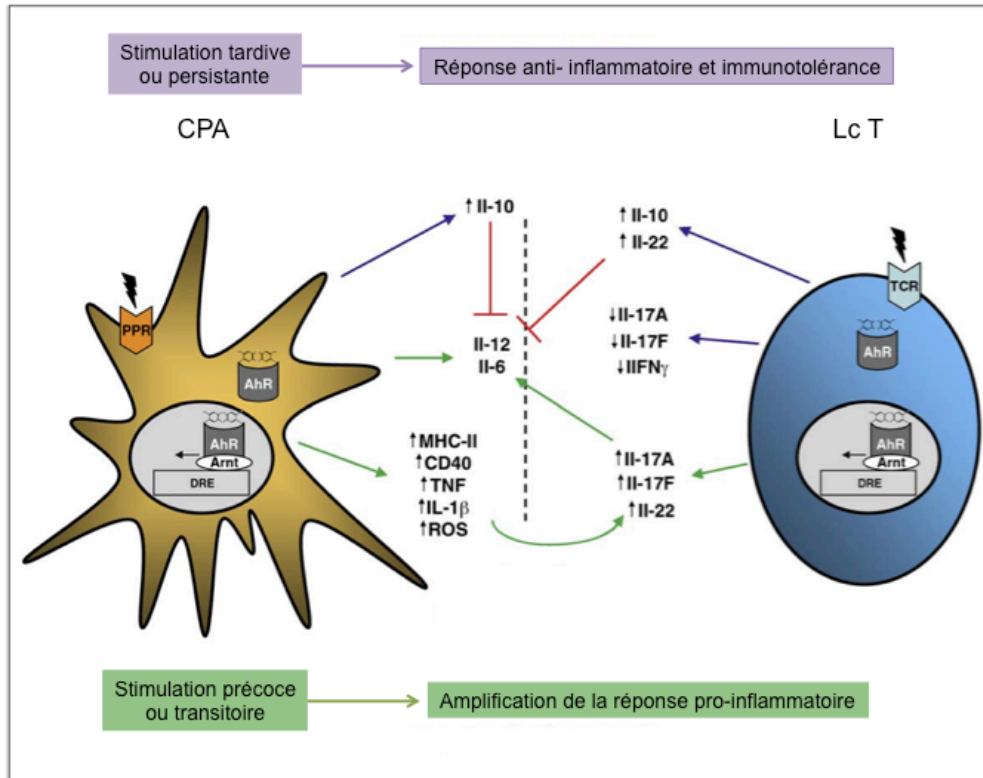
**Figure 30: Rôle de l'Ahr dans l'immunogénicité des DC** adapté de (190,257).

#### e. L'Ahr comme acteur du damage control dans la pneumonie

A la lumière des données de la littérature, l'Ahr constitue donc un régulateur essentiel impliqué dans de nombreux volets de l'immunité de barrière des organes d'interface. La diversité des réponses engendrées par son activation ne permet pas de lui attribuer un rôle prédéfini dans les types cellulaires où il intervient. L'Ahr est un acteur clé de l'adaptation des réponses innée et adaptative aux signaux perçus depuis l'environnement, s'inscrivant dans un processus dynamique de préservation de l'homéostasie tissulaire. Une stimulation persistante, trop intense ou inadaptée peut alors entraîner un déséquilibre de la balance inflammatoire (265,266). Il n'est donc par surprenant de constater que l'exposition à des



facteurs environnementaux activateurs de l’AhR augmente l’incidence des infections respiratoires (267). De manière synthétique, l’AhR semble exacerber l’intensité de la réponse innée aux premières heures de l’infection, puis participe à son atténuation au cours du temps via la production d’IL-10 et l’induction d’une réponse adaptative de type T régulatrice et Th22 (**Figure 31**). L’impact de la production de molécules bactériennes comme les kynurénines, susceptibles de moduler la réponse immunitaire AhR-dépendante, dans la physiopathologie de l’infection à *Pa* n’est actuellement pas connu.



**Figure 31: Immunomodulation médiée par l’AhR en fonction du temps et du ligand adapté de Veldhoen *et al.* (265)**

## ***Chapitre 7. Les modèles in vivo***

### **1) Le modèle de *Caenorhabditis elegans***

#### **a. Description générale du modèle**

##### **1. Histoire du modèle *C. elegans***

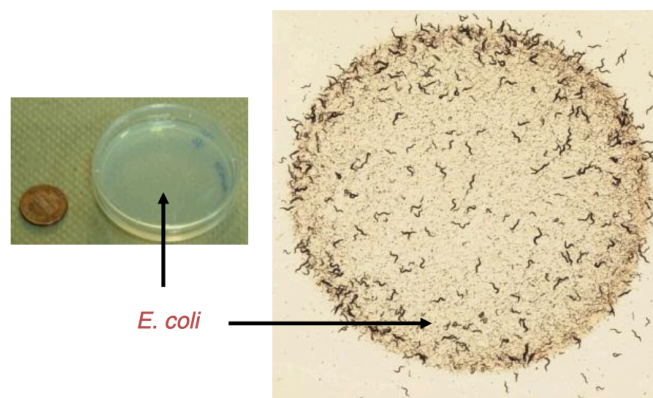
*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) est un petit nématode d'environ 1 mm de longueur, vivant dans les sols et se nourrissant de microorganismes. Il est isolé en 1900 par le biologiste français E. Maupas, qui en décrit l'anatomie précise. A partir des années 1940, les publications des biologistes C. Dougherty et V. Nigon permettent une meilleure connaissance de *C. elegans*, notamment sur ses modes de nutrition, croissance et reproduction (268,269). Son intérêt en tant que modèle animal débute dans les années soixante avec les travaux du biologiste moléculaire Sydney Brenner, désireux d'étudier l'impact du patrimoine génétique sur le comportement. S. Brenner recherchait un modèle pluricellulaire simple, adapté aux études génétiques et au système nerveux parfaitement connu afin de pouvoir générer des mutants et d'en évaluer l'impact sur le phénotype comportemental (270). Ses travaux restent actuellement la référence génétique pour *C. elegans*. Le génome de *C. elegans*, constitué de 100 mégabases avec environ 20 000 gènes, a été entièrement séquencé en 1998.

Le modèle s'est ensuite progressivement développé, permettant une meilleure compréhension de ce nématode et son utilisation dans des champs très divers de la recherche tels que les mécanismes de l'apoptose (271), les neurosciences (272), la résistance aux stress (273), la machinerie moléculaire de l'ARN interférence (274), les voies de signalisation intracellulaires (275), les maladies génétiques humaines (276) et plus récemment l'exploration des facteurs de virulence des pathogènes (277) la réponse immunitaire innée (278,279) et les interactions hôte-pathogènes (280,281). Cet essor a été facilité par les nombreux avantages que présente ce modèle en recherche.

##### **2. Culture de *C. elegans***

Les nombreux atouts de *C. elegans* en font un modèle de choix pour les chercheurs. Ses conditions de culture sont simples grâce à sa petite taille et à son mode de nutrition. Les animaux sont élevés en boîte de pétri sur une géloseensemencée avec une souche de bactéries *Escherichia coli* OP50 (**Figure 32**) (282). La température optimale de culture est comprise entre 15 °C et 25 °C. Leur temps de génération est rapide. A 20 °C, il ne faut que 3 jours à un œuf pour donner à son tour un adulte capable de pondre des œufs. Chaque adulte peut pondre

environ 300 œufs en 5 jours. Un nématode peut donc engendrer en 10 jours une population de 90 000 animaux génétiquement identiques. Les vers de génotype sauvage peuvent vivre jusqu'à 20 jours (270). Etant un animal hermaphrodite autofécondant, la population obtenue à partir d'un seul individu est clonale. De plus, le lignage cellulaire est invariant, ce qui signifie que la parenté et la position de chaque cellule sont identiques d'un individu à un autre (283). Chaque adulte hermaphrodite contient exactement 959 noyaux de cellules somatiques dont 302 appartiennent à des neurones. L'anatomie du ver est actuellement parfaitement décrite et sa connaissance est essentielle pour la compréhension de l'utilisation de *C. elegans* dans la recherche de facteurs de virulence bactérien et l'étude de la relation hôte-pathogène.



**Figure 32: Milieu de culture des nématodes *C. elegans***

### **3. Anatomie du ver**

En microscopie optique, *C. elegans* apparaît transparent et son anatomie est facilement visualisable en microscopie optique. La bouche de l'animal donne sur le pharynx dont le rôle est d'aspirer la nourriture vers un broyeur, qui la transforme en un lysat passant ensuite dans l'intestin où il est assimilé. La plupart des bactéries ingérées sont donc détruites lors du passage vers la partie postérieure du nématode. En coupe transversale, la structure de *C. elegans* est organisée en tubes intriqués (**Figure 33**). L'animal est entouré par une cuticule protectrice faite de collagène et de chitine qui constitue son épiderme. Sous cet épiderme se trouvent des faisceaux de muscles ainsi que des cordes nerveuses. Au centre se trouvent l'intestin et les gonades, baignés dans un fluide appelé liquide pseudocoelomique. L'intestin est constitué de 20 cellules épithéliales intestinales non renouvelables qui partagent des caractéristiques morphologiques proches des cellules épithéliales intestinales des mammifères, faisant de *C. elegans* un modèle de choix dans l'étude des interactions entre ces cellules et divers pathogènes (278).

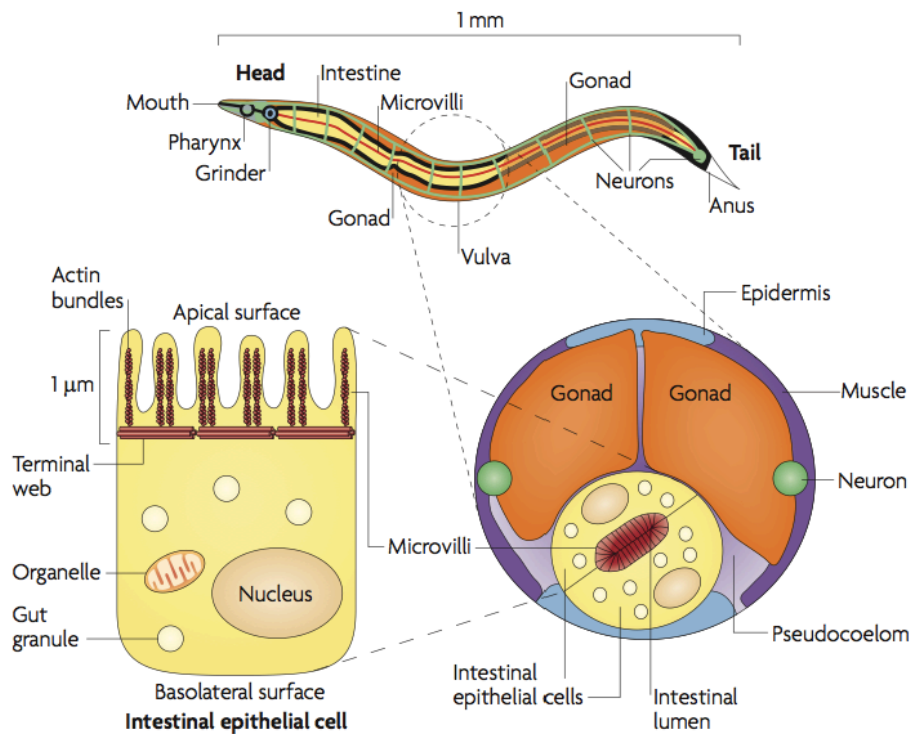


Figure 33: Anatomie générale de *C. elegans* (278).

### **b. Infection de *C. elegans* par *Pa***

Il existe deux modèles d'infection de *C. elegans* par *Pa*. Dans le modèle du « fastkilling », où vers et bactéries sont en contact dans un milieu liquide riche en sel, la mortalité survient beaucoup plus rapidement (quelques heures) et est due aux toxines bactériennes diffusibles dans le milieu (284). Dans le modèle du « slowkilling », les vers s'infectent en ingérant les bactéries pathogènes mises en culture sur la gélose à la place de *E.coli*. La mortalité survient en quelques jours suite à l'accumulation de bactéries dans le tube digestif du ver et à la constitution de biofilm (285,286).

### **c. Les mécanismes de défense chez *C. elegans***

*C. elegans* possède trois grands types de mécanismes de défense contre l'infection (287). Premièrement, le ver possède des neurones olfactifs lui permettant de détecter un

micro-organisme hostile et de s'en éloigner, ou a contrario d'identifier un micro-organisme comestible avant de l'ingérer. Ensuite, sa cuticule et son broyeur pharyngé assurent une protection mécanique contre l'infection. Enfin, *C. elegans* possède un système de défense inductible, ressemblant à l'immunité innée immédiate des mammifères. Ce dernier permet la reconnaissance des pathogènes et la production de composés antimicrobiens (peptides antimicrobiens, lectines, lysozymes et même ERO) associés à des molécules de réparation tissulaire. Bien que le nématode ne possède pas NF- $\kappa$ B, Myd88 et autres composants de la voie de signalisation des TLR, il élabore après stimulation de ses propres PRR une réponse immédiate qui utilise des voies de signalisation très conservées au cours de l'évolution et entre les espèces, incluant la voie de la MAP kinase p38 (mitogen-activated protein kinase), I $\kappa$ B, la  $\beta$ -caténine, et les facteurs de transcriptions FOXO (288). Les voies de signalisation mises en jeu sont spécifiques du pathogène infectant.

#### **d. Etude de l'interaction hôte-pathogène**

Plusieurs paramètres peuvent être utilisés pour évaluer la pathogénicité d'un micro-organisme, tels que le temps de survie des vers, leurs changements morphologiques ou de comportements après infection. On peut également évaluer l'accumulation ou la persistance bactérienne dans l'intestin. Les différents paramètres de ce modèle permettent le criblage de facteurs de virulence des pathogènes grâce à l'utilisation de mutants bactériens (délétion ou surexpression du gène codant pour le facteur à l'étude) (285).

La réponse de l'hôte peut être évaluée en analysant les variations d'expression de gènes par microarray ou qRT-PCR, ou par l'utilisation de gène rapporteur couplé à la GFP (278). Une autre approche est l'utilisation de nématodes mutants pour criblage des gènes d'intérêt impliqués dans les voies de signalisation étudiées. Cette technique a par exemple démontré l'importance du contrôle génétique de l'apoptose par la découverte du rôle de *ced-3*, gène homologue de la caspase-1 humaine et murine chez le vers (289).

#### **e. Pertinence du modèle**

Le modèle de *C. elegans* pour l'étude de la virulence bactérienne et des interactions hôte-pathogènes possède évidemment de nombreuses limites. On peut citer la température de culture des nématodes qui ne peut excéder 25 °C alors que le développement des pathogènes de mammifères au sein d'un hôte se fait à température supérieure. Cette différence affecte tout le micro-organisme, de son métabolisme général à son pouvoir pathogène. L'étude du rôle de l'immunité innée se limite aux voies de signalisations et peptides antimicrobiens en

l'absence d'effecteurs cellulaires, et le rôle de l'immunité adaptative ne peut y être étudié.

Cependant, les comparaisons entre les différentes séquences génétiques disponibles ont rapidement soulignées la pertinence du modèle pour la compréhension de la biologie des mammifères car 74% des protéines humaines présentent des homologues chez le vers. Grâce à ce modèle, des facteurs de virulence pertinents chez les mammifères produits par des bactéries telles que *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae* ou *Salmonella typhimurium* ont pu être étudiés ou identifiés à partir de travaux qui utilisent le nématode comme hôte (290,291,292). De la même manière, ce modèle s'est révélé efficace pour identifier de nouveaux facteurs de virulence de *Pa* dont l'importance a été ensuite confirmée chez le mammifère (286). En complément de ce premier modèle « d'approche », ce travail de thèse utilise le modèle murin.

## **2) Le modèle murin**

### **a. Pertinence du modèle murin**

Les systèmes impliqués dans la relation hôte-pathogène au cours de l'infection respiratoire aiguë mettent en jeu un nombre important de voies immunologiques, créant un environnement cytokinique et moléculaire complexe qui résulte de l'interaction entre de nombreux types cellulaires selon une cinétique déterminée. Ces interactions multiples ne peuvent être reproduites *in vitro*, justifiant l'utilisation de modèle *in vivo* (293). Bien qu'informatif, le modèle de *C. elegans* ne peut être qu'une approche rudimentaire de la relation hôte-pathogène.

Pour l'étude du rôle joué par des molécules comme les kynurénines au cours de la pneumonie aiguë, le modèle murin donne accès à un grand nombre d'informations tant sur le déroulement du processus infectieux que sur la réponse de l'hôte. Le principal déterminant de la gravité d'une pneumonie est le degré de lésion pulmonaire, qui conditionne l'importance de la perte de fonction du poumon (294). Cette lésion peut être estimée par l'étude de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire (295), ou encore l'inflammation tissulaire sur score histologique. L'évolution de la charge bactérienne pulmonaire peut être mesurée et l'invasivité bactérienne approchée par l'intensité de la dissémination extrapulmonaire systémique, vers la rate notamment. La proximité des systèmes immunitaires humains et murins rend l'étude de la réponse immunitaire pulmonaire murine pertinente (296).

Par rapport aux gros animaux, les modèles murins offrent l'avantage de la maniabilité et du faible coût de mise en œuvre. De plus, il existe un grand nombre de fonds génétiques disponibles ainsi que des lignées « knock-out » pour certains gènes d'intérêt, et la littérature extensive publiée sur le sujet constitue un riche référentiel externe (296).

### **b. Le modèle d'infection respiratoire aigue**

A l'inverse de certains pathogènes pour lesquels un faible inoculum suffit à provoquer une infection respiratoire aigue chez la souris immunocompétente, *Pa* nécessite un terrain propice pour entraîner une pneumonie. Un modèle de PAVM chez la souris étant techniquement difficile et peu représentatif des situations cliniques réelles, c'est le modèle de pneumonie aigue par instillation intra-nasale qui a été retenu. L'augmentation de l'inoculum instillé permet de pallier artificiellement à l'absence des facteurs favorisants. L'utilisation de souris génétiquement modifiées pour certains facteurs (souris CFTR KO) les rendant spontanément susceptibles à *Pa* est une autre possibilité mais génère d'autres problématiques comme la nécessité d'entretenir une lignée, des temps d'infection plus longs, une mortalité augmentée et un surcout (297).

L'administration de l'inoculum bactérien est réalisée par instillation intranasale, après avoir établi la reproductibilité de la technique et sa supériorité par rapport aux voies d'instillation endo- et intra-trachéale au sein du laboratoire (Mear JB, Faure E, Guery B, données non publiées). Cette technique simple nécessite une courte anesthésie par gaz halogéné inhalé et permet de délivrer un inoculum important préalablement calibré. Elle comporte comme pour les voies trachéales le risque d'une répartition inhomogène de l'inoculum mais réduit considérablement la mortalité per-procédure. Ses principaux inconvénients sont la diffusion de l'inoculum aux voies aériennes supérieures et la contamination du volume instillé par la flore naso-pharyngée.

### **c. Réponse immunitaire pulmonaire chez la souris**

Chez la souris comme chez l'homme, l'infection pulmonaire aigue entraîne une réponse immunitaire pulmonaire avec un recrutement cellulaire alvéolaire et tissulaire, dont l'étude est possible par lavage broncho-alvéolaire et cytométrie de flux sur cellules pulmonaires totales. La réalisation d'un LBA de poumon murin non infecté rapporte environ  $10^5$  cellules réparties en 90% de macrophages alvéolaires, 0 à 5% de polynucléaires neutrophiles et 5 à 10% de lymphocytes. La formule tissulaire après élimination des cellules épithéliales et celles du tissu conjonctif de soutien est composée de 50 à 70% de monocytes/macrophages interstitiels, 10 à 20% de lymphocytes, 5 à 20% de PNN et 5 à 10% de DC. Dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë à *Pa*, on observe un recrutement intense et précoce de PNN augmentant jusqu'à  $10^7$  le nombre de cellules par LBA, avec une évolution de la formule cellulaire alvéolaire comprenant plus de 90% de PNN, 0 à 5% de macrophages et 5 à 10% de lymphocytes (129).

#### **d. AhR, IDO et GPR35 chez la souris**

L'AhR, l'IDO1 et 2 et le GPR35 sont les principales protéines d'intérêt étudiées dans ce travail sur la relation hôte-pathogène médiée par les kynurénines. La souris possède les protéines orthologues à l'AhR (152), aux IDO (259) et au GPR35 (243) humains. Ceux-ci partagent des fonctions identiques ou proches et font déjà l'objet d'études détaillées dans la littérature. Le modèle murin constitue donc un choix pertinent pour l'étude de leurs interactions avec les kynurénines au cours de l'infection respiratoire à *Pa*.



## ***Chapitre 8. Objectifs du travail***

Les objectifs de ce travail de thèse sont :

- L'étude de la production des métabolites de la voie des kynurénines par *Pa* et l'évaluation de la pertinence de cette production au cours de l'infection
- L'étude de l'implication de la voie des kynurénines bactériennes dans la pathogénicité de *Pa*
- L'étude du rôle de l'activation de la voie des kynurénines de l'hôte via l'IDO au cours de l'infection pulmonaire aigue à *Pa*
- L'étude du rôle de la voie des kynurénines bactériennes sur la physiopathologie de l'infection pulmonaire aigue et notamment sur la réponse immunitaire innée de l'hôte
- L'étude du rôle des kynurénines sur les macrophages et les cellules dendritiques
- L'étude de l'implication de l'IDO et de l'AhR dans le dialogue inter-règne
- L'étude du rôle de la voie des kynurenines bactériennes dans un modèle de pneumonie chronique

## Partie 2. Matériels et méthodes

---

## ***Chapitre 1. Souches, plasmides et oligonucléotides***

### **1) Souches de *Pseudomonas aeruginosa***

#### **a. Souche CHA**

La souche de *Pa* utilisée dans ces travaux est la souche CHA. Elle a été isolée au CHU de Grenoble, à partir d'un lavage broncho-alvéolaire de patient atteint de mucoviscidose (42). Cette souche adopte un phénotype mucoïde dans les conditions de culture du laboratoire et exprime un système de sécrétion de type III (SST3) actif *in vivo* dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez la souris, et *in vitro* par une déplétion du milieu en calcium ou un contact cellulaire. Elle dispose des gènes codant pour les exotoxines ExoS, ExoT, ExoY du SST3 mais ne possède pas le gène codant pour l'exotoxine ExoU. Son phénotype de résistance aux antibiotiques est celui d'une souche sauvage, n'ayant pas acquis de résistances supplémentaires. La souche CHA est donc sensible aux carboxypénicillines, aux aminosides autres que la kanamycine, et à la tétracycline.

Les souches de *Pa* utilisées dans ce travail sont énumérées dans le tableau 1

#### **b. Souches mutantes de CHA**

Pour étudier l'implication de l'activation de la voie de synthèse des kynurénines de *Pa* au cours de l'infection, nous avons utilisé des souches mutantes de la souche CHA obtenues en mutagenèse par échange allélique. Ces souches ont été délétées par mutagenèse plasmidique pour les gènes codant pour les principales enzymes de la voie métabolique des kynurénines. Les souches obtenues, et leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 1. L'élaboration des souches mutantes a été réalisée par l'équipe du Pr Bertrand Toussaint (Hichem Chaker, laboratoire TheREx, Grenoble) selon leur protocole de laboratoire présenté ci-dessous.

#### **c. Souche clinique 13 et souches mutantes**

La souche clinique 13 est une souche isolée au CHU de Grenoble à partir du lavage broncho-alvéolaire d'un patient atteint de mucoviscidose. Cette souche a la particularité d'être hyperproductrice de kynurénines *in vitro*. Elle n'exprime le SST3, ni *in vitro*, ni *in vivo*. Elle possède des résistances acquises aux aminosides (amikacine-R, gentamicine-R, tobramicine-S), aux fluoroquinolones (ciprofloxacine-R et levofloxacine-R) et au céfépime. Le reste de son profil de résistance est de type sauvage. Afin d'étudier le rôle de la production de kynurénines par *Pa* au cours de l'infection pulmonaire, un mutant de cette souche délété pour le gène *kynA*, appelé *13ΔkynA* a été réalisé en mutagenèse par échange allélique.

Souches	Caractéristiques	Références
<b>CHA</b>	Souche mucoïde isolée des voies aériennes d'un patient atteint de mucoviscidose	Toussaint <i>et al.</i> , 1993
<b>CHAAkynA</b>	Souche CHA délétée du gène <i>kynA</i>	Shen <i>et al.</i> , 2008
<b>CHAAkynU</b>	Souche CHA délétée du gène <i>kynU</i>	Genestet <i>et al.</i> , 2014
<b>CHAApopBD</b>	Souche CHA délétée de l'opéron <i>popBD</i>	Epaulard <i>et al.</i> , 2006
<b>CHAApopBDΔkynA</b>	Souche Δ <i>popBD</i> délétée du gène <i>kynA</i>	Genestet <i>et al.</i> , 2014
<b>CHAApopBDΔkynU</b>	Souche Δ <i>popBD</i> délétée du gène <i>kynU</i>	Genestet <i>et al.</i> , 2014
<b>CHAApopBDΔkynA p<sub>kynA</sub></b>	Souche Δ <i>popBD</i> Δ <i>kynA</i> complétée avec le plasmide <i>p<sub>kynA</sub></i>	Genestet <i>et al.</i> , 2014
<b>Souche 13</b>	Souche clinique isolée des voies aériennes d'un patient atteint de mucoviscidose	Genestet <i>et al.</i> , 2014
<b>Souche 13ΔkynA</b>	Souche 13 délétée du gène <i>kynA</i>	Genestet <i>et al.</i> , 2014

Tableau 1: Description des souches de *Pa* utilisées dans ce travail

## 2) Souches de *Escherichia coli*

Les souches d'*E. coli* utilisées pour la mutagenèse plasmidique sont décrites dans le tableau 2.

Souches	Caractéristiques	Références
<b>DH5α</b>	Bactéries compétentes à la transformation des plasmides	Invitrogen
<b>S17-1</b>	Souche donneuse pour la conjugaison biparentale	Simon <i>et al.</i> , 1983

Tableau 2: Souches de *E. coli* utilisées pour la mutagenèse plasmidique

## 3) Conditions de culture et de conservation des bactéries

Les souches utilisées sont cultivées en milieu liquide de Luria-Bertani (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO) à 37°C pendant 12 heures à partir d'un tube cryoconservé ou d'une colonie prélevée sur un étalement de la souche sur boîte de pétri BCP conservée à 4°C. Lorsque l'on souhaite utiliser les bactéries en phase exponentielle de croissance, les souches de *Pa* sont

remises en culture juste avant utilisation pendant 3 heures dans du milieu de culture frais (c.f. schéma). Les souches sont ensuite calibrées par densitométrie optique à 600 nm (Amersham, General Electric healthcare, Life science, UK). Les souches de *Pa* et d'*E. Coli* sont conservées à -80°C dans du milieu de culture LB additionné de 40 % de glycérol.

#### 4) Principaux antibiotiques utilisés :

Les antibiotiques sont utilisés pour sélectionner les souches ayant intégré un vecteur ou un plasmide d'intérêt contenant la cassette de résistance. Les concentrations varient en fonction des souches et de la culture en milieu solide (boîte de pétri) ou liquide. Les antibiotiques sont dilués dans de l'eau stérile à l'exception de la tétracycline diluée dans de l'éthanol absolu stérile.

Antibiotiques	<i>E. Coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Liquide	Gélose	Liquide	Gélose
Gentamicine	10 µg/mL	10 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
Carbénicilline	-	-	300 µg/mL	600 µg/mL
Ampicilline	100 µg/mL	100 µg/mL	-	-
Kanamycine	50 µg/mL	50 µg/mL	-	-
Tétracycline	20 µg/mL	20 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL

Tableau 3: Principaux antibiotiques utilisés

#### 5) Plasmides et vecteurs

Les plasmides et vecteurs utilisés dans ce travail sont énumérés tableau 4.

Plasmide	Caractéristiques*	Références
pTOPO	Vecteur de clonage bout-franc, Kana <sup>R</sup>	Invitrogen
pEX100Tlink	Vecteur suicide de remplacement allélique, Amp <sup>R</sup> (Cb <sup>R</sup> )	Quénée <i>et al.</i> , 2005
pCM157	Plasmide portant la séquence codant pour la Cre recombinase, Tc <sup>R</sup>	Marx et Lidstrom, 2002
pUCGmlox	Vecteur contenant le gène <i>aacC1</i> encadré des séquences <i>lox</i> , Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Quénée <i>et al.</i> , 2005
pKO- <i>kynA</i>	Vecteur dérivé du plasmide pEX100Tlink, contenant la cassette de résistance à la gentamycine encadrée par deux séquences <i>lox</i> et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène	Shen <i>et al.</i> , 2008

Plasmide	Caractéristiques*	Références
	<i>kynA</i> , Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	
pKO- <i>kynU</i>	Vecteur dérivé du plasmide pEX100Tlink, contenant la cassette de résistance à la gentamycine encadrée par deux séquences lox et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène <i>kynU</i> , Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Genestet <i>et al.</i> , 2014
pKO- <i>popBD</i>	Vecteur dérivé du plasmide pEX100Tlink, contenant la cassette de résistance à la gentamycine encadrée par deux séquences lox et les régions flanquantes en 5' et 3' du gène <i>popBD</i> , Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Epaulard <i>et al.</i> , 2006
pUCP20	Vecteur de clonage, mobilisable dans <i>E. coli</i> et <i>Pa</i> , Amp <sup>R</sup> (Cb <sup>R</sup> )	West <i>et al.</i> , 1994
p <i>kynA</i>	Vecteur dérivé du plasmide pUCP20 contenant le cadre de lecture du gène <i>kynA</i> , Amp <sup>R</sup> (Cb <sup>R</sup> )	Genestet <i>et al.</i> , 2014
Mini-CTX-lux	Mini-CTX-lux, Tc <sup>R</sup>	Laskowski <i>et al.</i> , 2004
Mini-CTX-p <i>kynA</i> ::lux	Contient l'opéron <i>luxCDABE</i> sous le contrôle du promoteur du gène <i>kynA</i>	Genestet <i>et al.</i> , 2014
pFLP2	Plasmide portant la séquence codant pour la Flp recombinase, Amp <sup>R</sup> (Cb <sup>R</sup> )	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pET15b	Plasmide de surexpression, promoteur T7, tag 6His en N-terminal, Amp <sup>R</sup>	Novagen
pET15b- <i>kynA</i>	Vecteur dérivé du plasmide pET15b contenant le gène <i>kynA</i> , cloné NdeI/XhoI	Cette étude

Tableau 4: Principaux plasmides et vecteurs utilisés pour les mutants de délétion

\*Kana<sup>R</sup> : kanamycine résistance ; Amp<sup>R</sup> : ampicillin résistance; Gm<sup>R</sup> : gentamycine résistance; Tc<sup>R</sup> : tetracycline résistance; Cb<sup>R</sup> : carbenicilline résistance; KO : knock out

## 6) Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés pour ce travail sont listés dans le tableau 5.

Nom	Séquences*	Description
kynA-U1 kynA-U2	5'-AGAGCTCTGCTCAACGGCGGCGGAAAGCGTT-3' 5'-TAAGCTTCTCTCCGTCGGTTTCTCCCTG-3'	Amplification de la région en amont du gène <i>kynA</i>
kynA-D1 kynA-D2	5'-TAAGCTTAGCATGCTCGATACCATCCTC-3' 5'-AGGATCCATCGACCAACGCCTGATCAA-3'	Amplification de la région en aval du gène <i>kynA</i>
kynA-1 kynA-2	5'-TACCGTCGCTGCCTACCAGGC-3' 5'-CATGGGGCTTTTGGCGCAAGA-3'	Vérification de $\Delta$ <i>kynA</i>
kynA-C1 kynA-C2	5'-TCGAGCTCGTGTCTTGCCTCACTCC-3' 5'-GAGGATCCCTACAGGTGGAACGGAGCC-3'	Amplification du cadre de lecture du gène <i>kynA</i> pour la complémentation
kynU-U1 kynU-U2	5'-AGAGCTCGATGGCGTCCAGGGACA-3' 5'-TAAGCTTGCCGTCGAGGTAGATCAC-3'	Amplification de la région en amont du gène <i>kynU</i>
kynU-D1 kynU-D2	5'-TAAGCTTCGAGCATGCCAGG-3' 5'-ATCTAGAACACCACCAGGCGCAC-3'	Amplification de la région en aval du gène <i>kynU</i>
kynU-1 kynU-2	5'-CGACTGCCTGGCGCTCGA-3' 5'-TTGTGCCGGACCTGGTAGC-3'	Vérification de $\Delta$ <i>kynU</i>
pkynA-F pkynA-R	5'-TAAGCTTCGCTGGATGGAGTGG-3' 5'-AAGATCTCTCCGCGGCAGGCGTC-3'	Amplification du promoteur <i>kynA</i>

<b>kynA-F</b>	5'-GCATATGGGGCGCATCGTAAAA-3'	Amplification du gène <i>kynA</i>
<b>kynA-R</b>	5'-CCTCGAGCGCGTTGAATTGAAC-3'	

Tableau 5: Liste des oligonucléotides utilisés dans ce travail

\* Les zones soulignées correspondent aux sites de restriction.

## Chapitre 2 : Techniques de biologie moléculaire

### 1) La polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de PCR qui amplifie une séquence définie d'ADN est utilisée à deux fins : disposer d'une séquence pour un clonage ou détecter un évènement (présence d'une séquence, taille d'une séquence, etc). Elle s'effectue dans un thermocycleur automatique (Master cycler gradient, Eppendorf, Germany) et commence par une dénaturation de la matrice à 95°C pendant 2 à 5 min, suivie de 35 cycles de synthèse et se termine par une étape d'élongation de 10 min à 72°C.

Un cycle de synthèse est constitué de trois étapes :

- 1 - Dénaturation de l'ADN double brin, 95 °C pendant 45 secondes à 5 min.
- 2 - Hybridation des amorces sur la matrice à  $T_m - 4$  °C, 45 secondes. La température d'hybridation ou *melting temperature* ( $T_m$ ) dépend de la richesse en bases C et G des amorces et de leur degré de complémentarité avec la matrice. Elle se calcule selon la formule suivante (basée sur la séquence commune à l'amorce et à la matrice) :  $T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})$ .
- 3 - Elongation par l'ADN polymérase à partir des amorces. La durée est dépendante de l'ADN polymérase utilisée et de la longueur de la séquence à amplifier (1 min pour 1 kb).

Pour faciliter les clonages des fragments de PCR, des sites de restriction sont rajoutés aux extrémités des amorces. Deux températures d'hybridation sont utilisées. La première est calculée sans tenir compte des séquences des sites de restriction rajoutées qui ne s'hybrident pas à la matrice, 5 cycles de synthèse sont alors effectués en début de réaction avec celle-ci. Puis 25 cycles sont effectués avec la seconde température d'hybridation correspondant à la totalité de la longueur des amorces. Dans cette situation, le mélange réactionnel est composé de :

Réactifs	Concentration
ADN matrice	10 à 100 ng
Amorce sens	0,3 $\mu\text{M}$
Amorce anti-sens	0,3 $\mu\text{M}$

dNTP	0,2 mM de chaque
Tampon de polymérase	1X
Polymérase	2,5 U (Taq) / 1,25 U (Pfu)
Eau	Qsp 50 $\mu$ L

Pour la PCR sur colonie bactérienne, l'ADN matrice provient d'une colonie bactérienne mise en suspension dans 100  $\mu$  L d'eau stérile et lysée par augmentation de température de la suspension à 95° C pendant 5 min, ou par simple contact de la colonie bactérienne avec un cône stérile directement immergé dans le mélange pour PCR. Dans ce cas, la durée de l'étape de dénaturation est allongée à 5 minutes. Pour la vérification de la délétion des gènes kynA ou kynU, la réaction est réalisée avec le mélange d'enzymes « High Fidelity PCR enzyme mix » (Thermo scientific, ref K0191). Le mélange réactionnel est composé de :

Réactifs	Concentration
ADN matrice	10 à 100 ng
Amorce sens	1 $\mu$ M
Amorce anti-sens	1 $\mu$ M
dNTP	0,2 mM de chaque
Tampon de polymérase	1X
Polymérases	1,25 U
Eau	Qsp 25 $\mu$ L

Le cycle utilisé est le suivant :

- Dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes
- Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
- Hybridation des amorces à 55°C pendant 30 secondes
- Elongation à 72°C pendant 1 minutes 30 secondes

Ces trois étapes sont répétées 35 fois

- Extension finale à 72°C pendant 10 minutes

## 2) Electrophorèse de l'ADN

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose dans un tampon TAE (Tris 40 mM, acide acétique 0,1 %, EDTA 2 mM, pH 8,5). La concentration d'agarose est dépendante de la taille des fragments à séparer. Dans la majorité des cas, nous utilisons des gels d'agarose à 1,5 % en tampon TAE, avec 1  $\mu$ g/mL de bromure d'éthidium (BET). Les échantillons à déposer sur le gel sont, au préalable, additionnés de 1/5 (v/v) d'une solution de charge (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol FP 0,25 %, glycérol 30%, Thermo scientific) afin de visualiser la migration et d'augmenter la densité des échantillons



pour les entraîner au fond du puit. Après une migration entre 25 et 120 V selon la taille des échantillons, l'ADN est visualisé par fluorescence du BET sous rayons ultraviolets (UV 312 nm).

Pour la vérification de la présence de la mutation, les longueurs des amplicons à rechercher sont les suivantes :

Gènes	Souches	Longueur (pb)
<i>KynA</i>	WT	1330
	$\Delta$ <i>kynA</i> loxée	1625
	$\Delta$ <i>kynA</i> déloxée	790
<i>KynU</i>	WT	1227
	$\Delta$ <i>kynU</i> loxée	1346
	$\Delta$ <i>kynU</i> déloxée	510

### 3) Extraction sur gel des fragments d'ADN

Après migration de l'ADN dans un gel d'agarose, le fragment d'intérêt est découpé rapidement sur table UV. L'extraction est réalisée en utilisant le kit QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon le protocole spécifié par le fabricant. L'agarose est dissout, puis l'ADN est piégé par une matrice de silice, lavée avec une solution contenant de l'éthanol, puis élué avec un tampon d'élution ou de l'eau.

### 4) Digestion enzymatique

Les enzymes de restriction utilisées pour digérer l'ADN sont des endonucléases bactériennes. Une séquence comprise dans un plasmide peut ainsi être excisée. Les enzymes sont utilisées suivant les instructions des fabricants (Roche, Reinach, Suisse et Invitroge, corporation, Carlsbad, CA) à des concentrations de 1 à 2 U/ $\mu$ g d'ADN/heure. Les conditions d'incubation peuvent varier selon l'enzyme, mais la plupart ont une activité optimale à 37°C. Si nécessaire, l'enzyme peut être inactivée par exposition à une température de 65°C pendant 15 mn. La digestion peut être vérifiée par une migration sur gel d'agarose.

### 5) Clonage

Le clonage permet d'obtenir une grande quantité d'acides nucléiques permettant d'aboutir à une construction d'ADN particulière pour être utilisé dans un plasmide, pour une fusion etc...

#### a. Sous-clonage

Cette étape est utilisée pour disposer en quantités importantes d'un fragment d'ADN encadré par les sites de restriction voulus pour contrôler son insertion dans le vecteur. Le système

utilisé dans ce travail est le système Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit® (Invitrogen, Carlsbad, CA) selon le protocole du fabricant du kit.

#### **b. Déphosphorylation**

Cette étape est utilisée lors du clonage d'un fragment d'intérêt dans un plasmide linéarisé afin d'empêcher la recircularisation du plasmide sans inclure l'insert. Ceci permet l'augmentation du rendement d'insertion du fragment d'intérêt. La phosphatase alcaline de crevette (*shrimp alkaline phosphatase*) possède une activité de déphosphorylation du phosphate en 5' d'un brin d'ADN. Si les deux extrémités d'un plasmide sont ainsi traitées, la ligation ne pourra pas se faire entre elles, mais uniquement avec une extrémité non déphosphorylée, en l'occurrence celle du fragment à cloner. La réaction de déphosphorylation s'effectue généralement dans un volume total de 10 µl. Ceci est réalisé dans le tampon de l'enzyme avec 1 unité d'enzyme et 50 ng d'ADN à 37°C pendant 60 mn. Puis, l'enzyme est inactivée par incubation à 65°C pendant 15 mn.

#### **c. Ligation**

On utilise habituellement la T4 ligase (Roche, Reinach, Suisse). Les fragments en présence ont des extrémités cohésives générées par la même enzyme de restriction préalablement choisie.

#### **d. Transformation des souches d'*E. coli* et *Pa***

La transformation est réalisée en ajoutant 3 à 5 µl du plasmide ou de la solution de ligation dans 100 µl de bactéries compétentes, immédiatement après décongélation. Après 30 minutes d'incubation dans la glace, les bactéries subissent un choc thermique par un passage de 45 secondes à 42°C. Après 2 minutes de refroidissement dans la glace, 450 µl du milieu LB sont ajoutés et les bactéries transformées sont incubées à 37°C pendant 1 heure sous agitation (250 rpm). Les bactéries sont ensuite étalées sur le milieu LB gélosé contenant l'antibiotique de sélection et incubées à 37°C.

#### **e. Préparation de l'ADN plasmidique**

Cette méthode implique trois étapes : la préparation d'une culture bactérienne, la récupération et lyse des bactéries et la purification du plasmide. La technique dite de « miniprep » permet une extraction et une purification d'ADN plasmidique rapide et simple à

partir d'une culture liquide. Nous avons utilisé le kit QIAprep Miniprep® (Quiagen, Hilden, Allemagne). L'ADN plasmidique est purifié par adsorption sur une colonne de silice.

#### **f. Dosage des acides nucléiques obtenus**

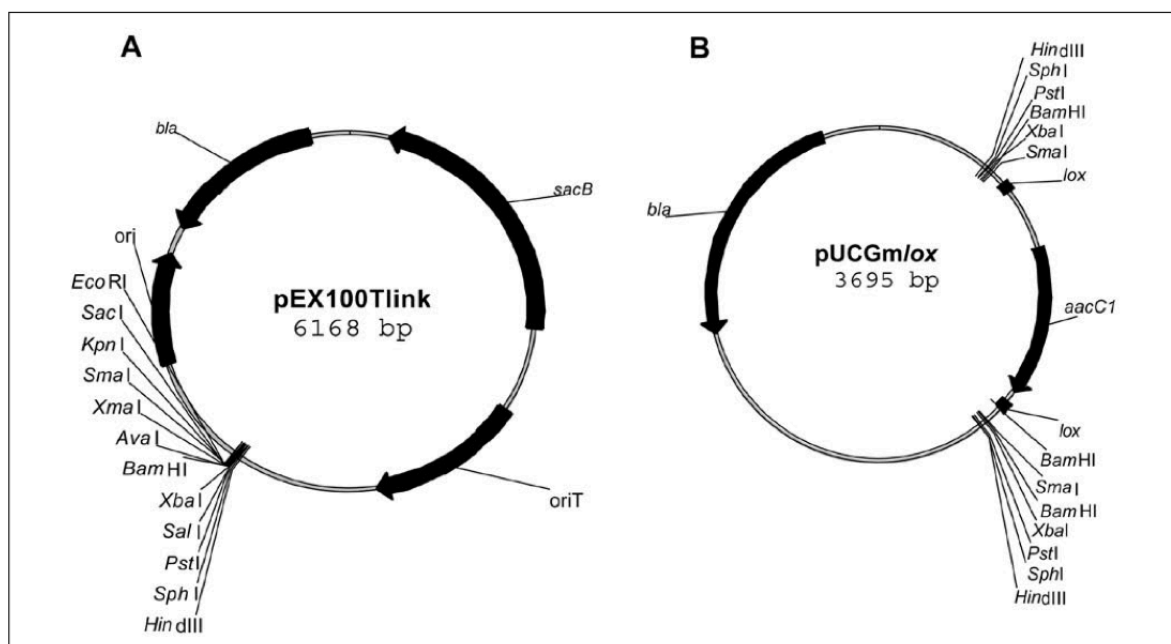
Cette étape permet de vérifier que la taille des fragments d'acides nucléiques obtenus correspond à celle attendue lors du choix des séquences. La quantité de fluorescence émise par le BET est proportionnelle à la masse totale de l'ADN. La quantité d'ADN dans l'échantillon est estimée en comparant le niveau de fluorescence de l'échantillon et celui du marqueur de poids moléculaire. 1 à 5 ng d'ADN peuvent être détectés par cette méthode.

### ***Chapitre 3 : Mutagenèse par échange allélique***

L'échange allélique est effectué par une double recombinaison homologue entre les séquences homologues aux séquences encadrant le gène d'intérêt. La technique utilisée est celle développée par Quénéé (298) . Elle repose sur l'utilisation d'un vecteur suicide, pEX100Tlink, incapable de se répliquer chez *Pa*. Il possède un site de clonage multiple, le gène *bla3* qui confère une résistance à l'ampicilline et à la carbénicilline pour *Pa* et le gène *sacB* qui induit une sensibilité au saccharose. Le produit du gène *sacB* est une enzyme permettant de dégrader le saccharose; il en résulte un dérivé toxique pour la bactérie.

#### **1) Échange allélique**

Les fragments de 1 à 2 kb, correspondant aux séquences encadrant en 5' et 3' du gène d'intérêt, sont d'abord clonés dans le vecteur pEX100Tlink, puis la cassette *aacCI* conférant une résistance à la gentamicine est insérée entre ces deux fragments. Cette cassette est encadrée de deux courtes séquences nucléotidiques, *loxP*, reconnues par la recombinase Cre qui permettra d'exciser le gène de résistance *aacCI* une fois la double recombinaison sélectionnée. Ce vecteur est ensuite transféré dans la souche de *Pa* par conjugaison biparentale.



**Figure 1 : Cartographies des plasmides pEX100Tlink et pUCGmlox**

### a. La conjugaison biparentale

La conjugaison biparentale est réalisée avec la souche d'*E. coli* S17.1 contenant le vecteur d'échange allélique. La souche d'*E. coli* et la souche de *Pa* sont cultivées jusqu'à la phase exponentielle de croissance puis mélangées et déposées, sans étalement, sur le milieu LB gélosé sans NaCl. Après une nuit à 37°C, la culture est reprise dans 1 mL du milieu LB et étalée sur le milieu PIA (Pseudomonas Isolation Agar) contenant de la gentamicine. Le vecteur pEX100Tlink ne pouvant se répliquer dans *Pa* (**Figure 1**), seules les souches ayant intégré la cassette *aacC1* par simple ou double recombinaison homologue entre les séquences encadrant le gène d'intérêt pourront se développer sur ce milieu.

### b. Sélection des clones « double recombinant »

L'évènement de recombinaison peut être simple ou double. Une simple recombinaison, entre une séquence encadrant le gène d'intérêt au niveau du plasmide et son homologue génomique entraîne l'insertion complète du plasmide pEX100Tlink, incluant les gènes *bla* et *sacB*, dans le génome. Chez ces clones simple recombinant (SR), le gène d'intérêt est reconstitué et non invalidé. Lors d'un évènement de double recombinaison homologue, un pour chaque partie encadrant le gène, le gène d'intérêt est remplacé par la cassette *aacC1* sans incorporation des gènes *bla* et *sacB* dans le génome. Ce sont ces clones doubles recombinants (DR) que l'on cherche. En premier lieu, les clones recombinants, ayant incorporé dans leur génome la cassette *aacC1*, sont sélectionnés sur milieu PIA contenant de la gentamicine. La proportion

de clones DR obtenue est variable selon le gène ciblé, en raison des différents niveaux de compaction de l'ADN qui rendent des zones du génome plus ou moins accessibles à la recombinaison. Puis, les colonies sont contre-sélectionnées sur le milieu PIA avec 5% du saccharose grâce au gène *sacB*. Du fait de la toxicité qu'entraîne la présence de ce gène sur ce milieu, seuls les clones ayant éliminé *sacB* pourront se développer. Ceci se produit soit par réversion du premier événement de recombinaison, soit par un second événement de recombinaison conduisant à une souche DR. Ces clones contre-sélectionnés sont ensuite repiqués sur milieu PIA gentamicine pour éliminer les révertants et sur PIA cabécicilline afin de sélectionner les clones DR. Ces mutants par insertion/délétion, avec un profil double recombinant, sont vérifiés par PCR sur ADN génomique.

### **c. Excision de la cassette de résistance**

Les clones DR sont électroporés avec le plasmide pCM157 portant un gène de résistance à la tétracycline et le gène codant la recombinase Cre. Cette enzyme reconnaît la séquence *loxP* et entraîne une délétion par une recombinaison entre deux sites *loxP*. Les clones transformants sélectionnés sur tétracycline sont ensuite cultivés en milieu LB liquide supplémenté en tétracycline afin de permettre l'expression de l'enzyme Cre et l'élimination du gène *aacCI*. Ensuite, on cure le plasmide pCM157 en réalisant plusieurs cultures en milieu LB liquide sans antibiotique. Enfin, les colonies sont repiquées sur milieu PIA, PIA tétracycline pour vérifier que le plasmide a été curé et sur milieu PIA gentamicine afin de sélectionner les clones ne possédant plus la cassette *aacCI*. L'excision de ce gène est vérifiée par PCR sur l'ADN génomique de ses mutants.

### **d. Mutagenèse tri-parentale : obtention de souches exprimant la Green fluorescent protein (GFP)**

Les souches de *Pa* d'intérêt ainsi que 2 souches de *E. coli* (une contenant le plasmide helper pRK2013, une souche S17 contenant le vecteur miniCTX-GFP) sont utilisées. Les 2 souches de *E. coli* sont étalées sous forme de goutte (30µL) sur des boîtes contenant un milieu LB sans sel pendant 2 heures. La souche de *Pa* est mise à incuber sous agitation à 300 rpm endant 2 heures à 42°C. Puis, 30 µL de milieu contenant la souche de *Pa* d'intérêt sont ajoutés sur la goutte contenant les souches de *E. coli*. Le temps de contact est de 4 à 6 heures. La goutte est récupérée avec 300 à 500 µL de LB liquide puis mise sous agitation à 200 rpm pendant 10 minutes à 37°C. Enfin 100 µL du mélange sont étalés sur milieu PIA (*Pseudomonas* isolation agar) supplémenté en Tétracycline (Tc200).

## ***Chapitre 4 : Modèles murins d'infection pulmonaire***

### **1) Animaux**

Les animaux utilisés pour les expériences sont des souris mâles de fond génétique C57BL/6J âgées de 6 à 10 semaines, pesant entre 18 et 25g (Laboratoires Janvier, France,). Celles-ci sont hébergées en secteur SOPF (specific opportunist-pathogen-free) de l'animalerie de la faculté de médecine de Lille ou de l'animalerie de l'institut Pasteur de Lille avec un libre accès à la nourriture et à l'eau. Toutes les expériences ont été soumises à l'approbation du Comité d'éthique du Nord-Pas-de-Calais sur l'expérimentation animale et ont été réalisées dans un établissement accrédité (N° B59-108) en accord avec la directive gouvernementale N°86/609/CEE.

### **2) Réalisation d'un modèle d'agression pulmonaire aigue**

#### **a. Instillations intra-nasales**

Les souris sont anesthésiées pour une courte durée (30 secondes) au Sevoflurane (Sevoflurane, Abbott, Queensborough, UK). Elles sont instillées par voie intra-nasale à l'aide d'une micropipette avec 50  $\mu$ L de solution contenant l'inoculum bactérienne désiré. Les souris contrôles sont instillées avec du Sérum Salé Isotonique (SSI) ou au Phosphate Buffer Saline (PBS). Les souris sont remises en cage après réveil complet et appréciation clinique de leur vitalité.

#### **b. Préparation des inocula bactériens**

Les inocula du modèle d'agression pulmonaire aiguë ont été calibrés pour obtenir une lésion pulmonaire suffisante et une mortalité nulle ou faible à 4, 12, 24 heures et 48 heures. Le SST3 étant le facteur de virulence majeur dans les pneumonies aiguës, les souches *CHA $\Delta$ popBD* (SST3 non fonctionnel) sont utilisées à des inocula plus élevés pour induire une lésion ou une mortalité équivalente à la souche sauvage. La culture est réalisée en milieu liquide de Luria-Bertani pendant 12 heures à 37°C, sous agitation modérée (350 rpm). Afin d'obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance, la souche est relancée en déposant 500  $\mu$ L de la suspension bactérienne dans 20 ml de milieu LB stérile. Le culot bactérien est lavé deux fois avec du PBS par centrifugation à 2000 g pendant 5 minutes, puis resuspendu dans 2 mL de PBS. L'inoculum bactérien est calibré par densité optique à 900 nm, après avoir réalisé une courbe d'équivalence DO / inoculum pour chaque souche (Annexe 1). L'inoculum final est

toujours vérifié par dilutions successives puis étalements sur gélose BCP (Biomerieux, France). Le dénombrement bactérien est réalisé après une incubation de 24 heures à 37°C. Les différents inocula utilisés pour ces travaux sont résumés dans le tableau 6.

### 3) Réalisation d'un modèle de survie

Les souris sont instillées par voie intra-nasale selon le même protocole d'instillation que pour la réalisation d'un modèle d'agression pulmonaire aiguë. A l'inverse des inocula utilisés pour l'agression pulmonaire aiguë, ceux utilisés pour les expériences de survie induisent une mortalité de 100% à 96 heures chez les souris *Wt* C57BL/6J. Le poids des souris et le score clinique sont recueillis toutes les 12 heures. La souffrance animale est évaluée selon le protocole établi par le comité d'éthique.

Souches	Inoculum (CFU/souris)	
	Agression aiguë	Survie
<i>CHA</i> et mutants	$5.10^6$	$1.10^7$
<i>CHA</i> $\Delta$ <i>popBD</i> et mutants	$5.10^7$	$1.10^8$
Souche 13 et mutants	$5.10^6$	$1.10^8$

Tableau 6: Descriptions des différents inocula des souches utilisées dans ces travaux

### 4) Réalisation d'un modèle de pneumonie chronique

#### a. Préparation des billes d'agar

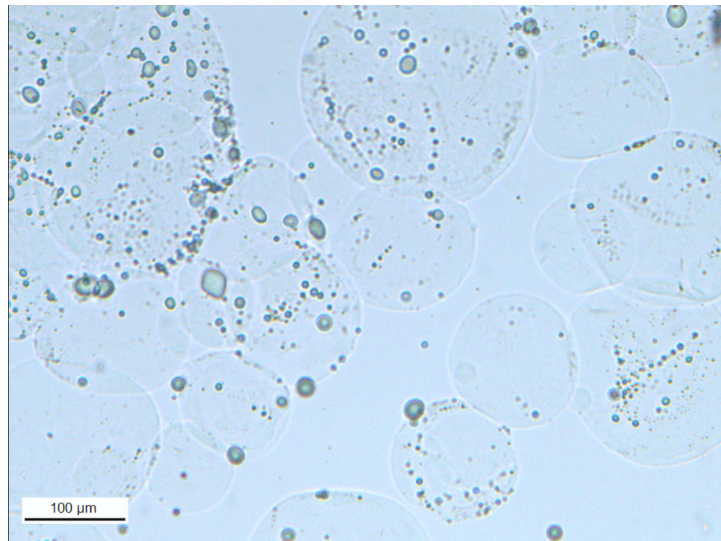
Le modèle de pneumonie chronique est réalisé par l'instillation aux souris de billes d'agar dans lesquelles un inoculum calibré de *Pa* a été incorporé. L'agar est un polymère de galactose qui se présente sous forme solide à température ambiante (température de solidification = 35°C) et sous forme liquide à haute température (température de fusion = 90°C). A l'inverse de l'instillation intra-nasale, ces billes permettent une distribution progressive du contenu dans les poumons des souris.

La fabrication des billes suit plusieurs étapes :

- Un millilitre de PBS contenant  $10^{10}$  CFU de *Pa* est incorporé à 9 ml de TSA (Tryptic soy agar, Sigma-aldrich, Saint Louis, MO) liquéfié. La suspension est homogénéisée au vortex puis versée dans un erlenmeyer contenant 30 mL d'huile minérale stérile préchauffée à 56°C.
- Le mélange est ensuite vigoureusement agité à 6500 tours/minute au moyen d'une hélice rotative pendant 2 minutes avec immersion dans l'eau du bain-marie à 56°C

puis à 0°C par immersion dans de la glace pendant 10 minutes, permettant la gélification de l'agar sous forme de microbilles contenant les bactéries.

- Le mélange est centrifugé à 12000g pendant 20 minutes afin de récupérer les billes d'agar et d'éliminer l'huile. Ensuite, quatre lavages à 12000 G pendant vingt minutes sont successivement réalisés : le premier avec 10 mL de sodium deoxycholate (NaDOC) à 0,5%, le deuxième avec 10 mL de NaDOC à 0,25% et les deux derniers avec 10 mL de PBS.
- La taille, l'homogénéité et la qualité des billes sont vérifiées par microscopie optique :



- La solution finale contenant les billes est ensuite tamisée (Filtres 80 meshes, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ) afin d'éliminer les billes supérieures à 200 µm risquant d'obstruer les voies aériennes des souris.
- L'inoculum final est mesuré par dilutions successives puis étalements sur gélose BCP. Le dénombrement bactérien est réalisé après une incubation de 24 heures à 37°C. La suspension est conservée à 4°C pendant 24 heures.
- L'instillation est réalisée le lendemain de la préparation des billes, après dénombrement bactérien et calibration de la suspension selon l'inoculum cible.

### **b. Instillations endotrachéales**

Après une courte anesthésie au sévoflurane (Abbott, France), les souris sont placées en décubitus dorsal proclive. Elles sont instillées par insertion d'une canule métallique à bout mousse de 24 gauge (Canule de gavage droite, Popper and Sons, Inc., New Hyde Park, NY) dans la trachée via l'oropharynx (voie endo-trachéale) avec un volume de 50 µL contenant



entre  $2.10^5$  et  $5.10^5$  CFU, soit  $4.10^6$  à  $1.10^7$  CFU/mL. Les animaux contrôles sont instillés avec 50  $\mu$ l de solution de billes stériles.

## 5) Mise à mort des souris

Les souris sont sacrifiées par une injection intra-péritonéale (IP) de 300  $\mu$ L de pentobarbital sodique à 5,47% (Laboratoire CEVA, Libourne, France).

## 6) Paramètres recueillis lors des expérimentations

### a. Suivi clinique des souris

Afin d'évaluer l'état clinique global des souris, deux outils sont utilisés simultanément : le poids et le score clinique.

Le suivi du poids consiste en une pesée avant instillation (H0) de l'inoculum bactérien et avant euthanasie. Des pesées intermédiaires sont réalisées toutes les 12 heures. La variation pondérale est exprimée en pourcentage du poids à J0.

Le score clinique est composé de trois paramètres : l'aspect hérissé de la fourrure, la mobilité de la souris et sa température. Ces paramètres sont recueillis au moment de chaque pesée.

Score clinique	0	1	2
<b>Fourrure</b>	Aspect normal	Légèrement hérissée	Très hérissée
<b>Température</b>	Normotherme	-	Hypotherme
<b>Mouvements</b>	Mobilité normale	Mobilité réduite	Immobile

**Tableau 7: Description du score clinique**

### b. Quantification de la charge bactérienne pulmonaire

Après sacrifice, la cage thoracique est ouverte par une incision latéro-thoracique permettant de visualiser le médiastin et les deux champs pulmonaires. Après exsanguination par ponction intracardiaque, les poumons sont prélevés et homogénéisés dans 1 mL de PBS stérile. Le tube de 2 ml utilisé pour recueillir l'organe est pesé avant et après recueil, permettant de déterminer le poids de l'organe prélevé. L'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un broyeur, chaque échantillon est broyé avec précaution pendant 10 secondes puis le broyeur est lavé selon un protocole comprenant quatre lavages (eau stérile, éthanol absolu, eau stérile, eau stérile). Les souches de *Pa* sont dénombrées sur leur aspect visuel et au besoin par la positivité du test à l'oxydase après étalement de dilutions en série sur géloses BCP cultivées à 37°C pendant 24h. Le compte est rapporté au poids du poumon pesé pour chaque échantillon.

### **c. Dissémination bactérienne**

La mesure de la charge bactérienne splénique sert d'estimation de la dissémination bactérienne systémique. La rate est repérée par transparence du péritoine à jour frisant. Une incision de quelques millimètres est réalisée en regard et la rate est prélevée. La rate est ensuite déposée dans un tube de 2 ml contenant 1 mL de SSI puis broyée selon les mêmes modalités que le poumon. Les micro-organismes viables sont comptés après étalement de dilutions en série sur géloses BCP ou cétrimide cultivées à 37°C pendant 24h.

### **d. Lavages bronchoalvéolaires (LBA)**

Après ouverture de la cage thoracique, la trachée est exposée chirurgicalement, le diaphragme est ouvert par une incision sur les piliers postérieurs et une aiguille à bout mousse de 24 Gauge est introduite dans la trachée via l'oropharynx. Cinq cents microlitres de PBS stérile à 4°C sont alors injectés dans la trachée puis récupérés par aspiration, cette opération est répétée deux fois. Les 1,5 ml de liquide de lavage broncho alvéolaire (LBA) sont conservés dans la glace jusqu'à leur utilisation. Le LBA est centrifugé 10 minutes à 250g. Le surnageant est prélevé, aliquoté puis conservé à -80°C. Le culot cellulaire est conservé dans la glace pour analyses.

### **e. Évaluation de la lésion pulmonaire**

La perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire est évaluée par la mesure du passage alvéolo-interstitiel d'albumine marquée à l'Iso-ThioCyanate de Fluoresceine (FITC) (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO). La fluorescence pulmonaire mesurée est proportionnelle à la concentration d'albumine-FITC dans le sang et au degré de lésion de la barrière alvéolo-capillaire. Pour ce faire, 2 heures avant sacrifice, 200 µl de SSI contenant 2 mg/ml d'albumine-FITC sont injectés par voie intra-péritonéale. Les souris sont ensuite sacrifiées puis exsanguinées par ponction du ventricule droit au moyen d'une seringue pré-héparinée. Les poumons sont prélevés et homogénéisés dans 1 ml de SSI. L'homogénat de poumon et le sang collectés sont alors centrifugés séparément à 1000g pendant 10 minutes. Un volume de 100 µl de chacun des surnageants est prélevé, et la fluorescence est mesurée sur chacun des échantillons (excitation: 487nm, émission: 520nm ; Mithras LB 940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Un ratio est établi, le permeability index (PI) évaluant la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire (295).

## 7) Molécules utilisées *in vivo*

### a. 1<sub>LD</sub> méthyl-tryptophane (1<sub>LD</sub>MT)

Le 1<sub>LD</sub>MT est un inhibiteur de l'IDO 1 et 2 humaine et murine. Commercialisé sous forme de poudre, il doit être resolubilisé dans de la soude à 1 molaire, puis tamponné par de l'acide dose pour dose afin d'obtenir un pH neutre. Les doses et la voie d'administration ont été établies en fonction des données de la littérature (251). La voie intra-péritonéale (IP) a été préférée pour l'administration du 1<sub>LD</sub>MT car la présence d'une lésion pulmonaire induite favorise le passage à travers la membrane alvéolo-capillaire, permettant d'obtenir une diffusion augmentée du secteur plasmatique vers le secteur interstitiel et alvéolaire. De plus c'est une voie plus facile d'accès que la voie intraveineuse (IV) dont l'absorption correspond à environ 4/5e de la dose IV. La posologie décrite est de 200 mg/kg, administrés 12 heures avant le début de l'infection.

### b. L-kynurénine

Pour l'administration de L-kynurénine dont l'objectif est de reproduire les concentrations intra-alvéolaires de kynurénines bactériennes, la voie intra-nasale (IN) a été préférée. La molécule commercialisée sous forme de poudre est reconstituée dans du PBS. La dose a été calculée pour atteindre la limite haute des concentrations mesurées au préalable dans les LBA par méthode de Erlich-Kovacs, soit 2 mM par souris.

### c. Acide kynurénique

Pour l'administration de L-kynurénine dont l'objectif est de reproduire les concentrations intra-alvéolaires de kynurénines bactériennes, la voie intra-nasale (IN) a été préférée. La molécule commercialisée sous forme de poudre est reconstituée dans du PBS. La dose a été calculée pour atteindre la limite haute des concentrations mesurées au préalable dans les LBA par méthode de Erlich-Kovacs, soit 2 mM par souris.

Traitement	Origine	Posologie	Voie	Durée
1 <sub>LD</sub> MT	Sigma-aldrich	200 mg/kg	IP	1 injection à H-12
L-kynurénine	Sigma-aldrich	1 mM/souris	IP	1 instillation à H0

Tableau 8: Molécules utilisées *in vivo* dans ce travail

## ***Chapitre 5 : Etude de la réponse de l'hôte in vivo et ex vivo***

### **1) Numération formule sur liquide de lavage broncho-alvéolaire.**

Le culot cellulaire obtenu à l'issue du LBA est suspendu dans 500 µl de PBS. Vingt microlitres de cette suspension sont prélevés et mélangés à 20 µl de bleu trypan 0,04% (Invitrogen corporation, Carlsbad, CA). Une numération cellulaire est effectuée sur cellule de Malassez. La formule est déterminée après dépôt sur lame de verre d'une monocouche cellulaire à partir de 100µl de cette suspension par centrifugation au cytopspin (Cytospin shandon, Waltham, MA), et coloration au May Grünwald Giemsa.

### **2) Mesures de la sécrétion de cytokines par Méthode ELISA**

La mesure des taux d'interleukines dans les surnageants de LBA est réalisée à l'aide des ELISA development kits de chez Peprotech (Peprotech, Rocky Hill, NJ) ou des kits duoset® de chez R&D (R&D, Minneapolis, MN) selon les données du fabricant. Le test nécessite un anticorps de capture et un anticorps de détection. Une réaction colorimétrique utilisant la Streptavidine-HRP couplée à un anticorps est employée. La réaction est arrêtée par une solution d'acide sulfurique 2N (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO). La lecture est réalisée par absorptiométrie aux longueurs d'onde de 450 nm et 540 nm sur un lecteur Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Les résultats obtenus sont ensuite comparés à une gamme étalon obtenue grâce à une protéine recombinante. Les échantillons sont testés en double. Les différentes cytokines dosées sont : IL-1β (900-K47), IL-17 (900-K392), IL-22 (900-K257), IL-23 (DY1887), IL-10 (900-M53), TNFα (900-K54), IL-6 (900-K50), KC (900-M127), MCP1 (900-M126).

### **3) Mesures de l'expression des transcrits par PCR quantitative en temps réel**

#### **a. Extraction et purification des ARN du tissu pulmonaire**

L'extraction de l'ARN total à partir des prélèvements de poumon sec est réalisée à l'aide du kit GeneJET RNA Purification Kit® (ThermoScientific, Waltham, MA), selon le protocole indiqué par le fabricant. Brièvement, les échantillons sont lysés et homogénéisés dans un tampon de lyse contenant du dithiothréitol (DTT) capable de protéger l'ARN de l'activité des ARNases. Dans un second temps, le lysat obtenu est mélangé à une solution contenant de la protéinase K et de l'éthanol puis est transféré sur une colonne de purification en silice. Plusieurs étapes successives de centrifugation permettent alors de séparer l'ARN, retenu au

niveau de la membrane de silice, du reste du lysat. Par la suite, plusieurs lavages successifs à l'aide de tampons de lavage permettent d'éliminer les impuretés de la membrane. L'ARN pur est ensuite élué par lavage de la colonne par de l'eau sans ARNase.

La quantité d'ARN totale obtenue pour chaque échantillon est mesurée en ng/μl par densité optique au moyen d'un spectrophotomètre NanoVue Plus™ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). La pureté de l'échantillon est contrôlée par calcul du ratio 260 nm/280 nm, considéré comme satisfaisant lorsqu'il est supérieur à 2. La concentration de chaque échantillon est ensuite normalisée avec de l'eau sans ARNase afin d'obtenir une concentration finale de 25 ng/μl pour chaque échantillon, avant l'étape de rétrotranscription. Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

#### **b. Rétro-transcription: obtention des ADN complémentaires (ADNc)**

Elle permet la synthèse d'ADNc à partir d'une matrice d'ARN, grâce à une étape de transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique. Elle est réalisée grâce au kit AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) et à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler® (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Le volume de chaque réaction est de 20 μl, contenant 10 μl de cDNA Synthesis Master mix®, 3 μl d'amorces aléatoires, 1 μl de transcriptase inverse couplée à une enzyme inhibitrice d'ARNases et 6 μl d'ARN matrice. Chaque mélange réactionnel est ensuite incubé 5 minutes à 25°C pour permettre l'hybridation des amorces, puis 45 minutes à 55°C pour permettre la synthèse d'ADNc et enfin 5 minutes à 95°C pour terminer la synthèse d'ADNc. Chaque réaction est conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

#### **c. PCR quantitative**

Elle est réalisée en chimie SYBR®Green, à l'aide du kit Brilliant II SYBR®Green QPCR Master Mix® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) sur un appareil thermocycleur Sequence Detection System 7500 (Applied Biosystems, France). Cette technique requiert l'utilisation d'un agent intercalant, le SYBR®Green, capable de se lier à l'ADN double brin par un mécanisme de liaison non défini. Lorsqu'il est en solution, cet agent émet peu de fluorescence. Son émission de fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Durant l'étape d'élongation, il se fixe à l'ADN double brin naissant, entraînant une augmentation de la fluorescence. L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle d'élongation et décroît lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. La spécificité de

cette technique repose entièrement sur les amorces. Pour définir la positivité de la PCR, on détermine le nombre de cycles à partir duquel un signal est détectable. Le moment d'apparition de ce signal est appelé cycle seuil ou Ct (*cycle threshold*). La validité de cette technique de PCR est objectivée par l'analyse de la courbe de fusion. Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion spécifique appelée *melting temperature* ou Tm, définie comme étant la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme double brin, l'autre moitié sous forme simple brin. Cette Tm est définie par un pic unique sur la dérivée primaire de la courbe de fusion. Ainsi, les amplicons aspécifiques dont la Tm diffère de celle de l'amplicon d'intérêt peuvent être détectés par la présence de pics surnuméraires sur cette courbe de fusion.

Les produits issus de la rétrotranscription sont préalablement dilués avec de l'eau sans ARNases afin d'obtenir une concentration finale de 2,5 ng/μl. Le volume de chaque réaction est de 25 μl, contenant 12,5 μl Brilliant II SYBR®Green QPCR Master Mix, 300 nM de chaque amorce (Tableau 2), 7 μl d'eau sans ARNases et 4 μl d'ADN matrice. Les contrôles négatifs sont réalisés avec de l'ADN matrice de souris non infectées. Les conditions de PCR sont les suivantes : activation de la Taq ADN polymérase pendant 10 mins à 95°C, puis 40 cycles de dénaturation (30 secondes à 95°C) et hybridation/élongation (1 min à 60°C).

#### d. Amorces utilisées pour les PCR quantitatives

Les amorces ont été conçues grâce au logiciel Primerblast (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) (299) et à la database ENSEMBL (National Center for Biotechnology Information, USA) (300). Elles sont ensuite synthétisées sur commande par la société Eurogentec (Eurogentec, Liège, Belgique) (référence BA-DN001-004). Les différentes amorces utilisées sont présentées dans le tableau 9 ci-dessous.

Gène	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<b>Bactine</b>	GAATGGGTCAGAAGGACTCCTATG	CCATGTCGTCCCAGTTGGTAA
<b>IL-23</b>	CAGCGGGACATATGAATCTACTAAG	CACAACCATCTTCACACTGGATAC
<b>TGFβ</b>	ATTCAGCGCTCACTGCTCTT	GGGTCCCAGACAGAAGTTGG
<b>IL-22</b>	GCCGGACGTCTGTGTTGTTA	CATCGTCAACCGCACCTTT
<b>IL-17</b>	GCA-CTG-AGC-TTC-CCA-GAT	ACC-GCA-ATG-AAG-ACC-CTG-ATA
<b>IL-10</b>	GTGAAGACTTTCTTTCAAACAAAG	CTGCTCCACTGCCTTGCTCTTATT
<b>IL-1β</b>	CCAAAAGATGAAGGGCTGCT	TCATCAGGACAGCCCAGGTC

<b>TNF<math>\alpha</math></b>	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	GTGGGTGAGGAGCACGTAGT
<b>IL-6</b>	ACA-CAT-GTT-CTC-TGG-GAA-ATC-GT	AAG-TGC-ATC-ATC-GTT-GTT-CAT-ACA
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	GCTTTGCAGCTCTTCCTCAT	CCAGTTCCTCCAGATATCCAAG
<b>IDO1</b>	GCCTCCTATTCTGTCTTATGCAG	ATACAGTGGGGATTGCTTTGATT
<b>AhR</b>	AGGATCGGGGTACCAGTTCA	TACTTGGGGTTGACTGGGGA
<b>CYP1A1</b>	AGTTTGGGGAGGTTACTGGC	TTGGCATTCTCGTCCAGCTT
<b>CD86</b>	CCGTACCTGGTCATCACAGAG	CAGTCTCGAAGCTCGATGGC
<b>CXCL1</b>	TGCACCCAAACCGAAGTCAT	TTG-TCA-GAA-GCC-AGC-GTT-CAC
<b>CXCL2</b>	AGTGAAGTGGCGTGTCAATGC	CCGCCCTTGAGAGTGGCTAT
<b>CCL5</b>	CACTCCCTGCTGCTTTGC	CACACTTGGCGGTTCTTC

**Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour l'analyse des transcrits par PCR quantitative**

#### e. Analyse par la méthode des comparatives $C_T$

Les données brutes de QPCR sont ensuite analysées par la méthode comparative du  $C_T$ , qui calcule l'expression relative du gène d'intérêt par rapport à un gène rapporteur de contrôle selon la formule  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Le gène rapporteur choisi pour ces travaux est celui de la  $\beta$ -actine. La formule utilisée est la suivante :

$$\Delta\Delta C_T = \{ ( C_T \text{ gène d'intérêt} - C_T \text{ gène contrôle} ) \text{ échantillon A} - ( C_T \text{ gène d'intérêt} - C_T \text{ gène contrôle} ) \text{ échantillon B}$$

$C_T$ : cycle seuil (*threshold cycle*) correspondant au cycle de PCR au cours duquel le signal fluorescent d'amplification en temps réel croise une valeur seuil définie arbitrairement au préalable. La valeur numérique du  $C_T$  est inversement proportionnelle au nombre d'amplicons de la réaction.

#### 4) Analyses de la réponse cellulaire par cytométrie en flux

##### a. Isolement des cellules alvéolaires et pulmonaires

Toutes les manipulations décrites sont réalisées stérilement sous hotte à flux. Les poumons des souris sont recueillis puis hachés dans une boîte de pétri à l'aide d'un rasoir stérile. L'homogénat est suspendu dans du PBS supplémenté avec 2% de SVF (sérum de veau fœtal) et éventuellement un antibiotique adapté (Pénicilline 100UI/ml, Gentamycine 100 $\mu$ g/ml). Les homogénats sont ensuite soumis à l'action d'une collagénase extraite de la bactérie *Clostridium histolyticum* (*Clostridium histolyticum* collagenase, C2139 Sigma-aldrich, Saint

Louis, MO) à 0,1 mg/mL à 37°C pendant 30 minutes au bain-marie. La préparation est fluidifiée à plusieurs reprises grâce à des passages successifs dans des aiguilles de calibre de plus en plus réduit. La solution obtenue est centrifugée à 1500 g pendant 10 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite séparées en utilisant du Percoll 20% (2 mL de Percoll, 1mL de PBS 10X et 7 mL d'eau stérile). Les cellules sont centrifugées pendant 20 minutes à 1500 g. Le surnageant contenant les débris cellulaires est jeté et les cellules sont récupérées. Les globules rouges sont lysés (Lysis Buffer, BDpharmigen, UK). Les cellules sont finalement énumérées sur cellule de Malassez, puis réparties en puits. Cette étape est réalisée séparément pour les cellules pulmonaires totales et pour les cellules alvéolaires obtenues à partir des LBA.

#### **b. Analyse des types cellulaires par cytométrie en flux : marquages cellulaires de surface**

Les anticorps proviennent de chez BD Biosciences (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ). Les cellules sont incubées aux dilutions appropriées selon les différents panels ci-dessous :

- *le panel d'anticorps identifiant les cellules présentatrices d'antigène* (FITC-conjugated anti-Iab; PE-conjugated anti-F4/80; PerCP/Cy5-conjugated anti-CD103; PE/Cy7-conjugated anti-CD11c; APC-conjugated anti-CCR2; Alexa700-conjugated anti-CD86; APCH7-conjugated anti-LY6G; V450-conjugated anti-CD11b; V500-conjugated anti-CD45; ef605-conjugated anti-Ly6C)
- *le panel d'anticorps identifiant les cellules lymphoïdes* : antibody panel (FITC-conjugated anti-CD5; PE-conjugated anti-CD1.d tetramer; PerCP/Cy5-conjugated anti-NK1.1; APC-conjugated anti-CD25; Alexa700-conjugated anti-CD69; APCH7-conjugated anti-CD4; V450-conjugated anti-TCRb; V500-conjugated anti-CD8 and eF605-conjugated CD45)
- *le panel d'anticorps identifiant les innate lymphoïd cells* (FITC-conjugated anti-Lin (cd3, cd11b ly6c ly6g ly76 cd45/220); PerCP/Cy5-conjugated anti-NK1.1; PE/Cy7-conjugated anti-CD127; Alexa700-conjugated anti-CD90.2; APC/H7-conjugated anti-CD4; ef605-conjugated anti-CD45)(109).

Les cellules sont incubées pendant 30 minutes puis lavées avec du PBS et sont ensuite suspendues dans du PBS 2% SVF. Pour chaque anticorps, un isotype est utilisé pour déterminer les compensations. Les cellules sont analysées sur un LSR Fortessa® (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ). Juste avant analyse, chaque échantillon est filtré à travers un filtre de nylon stérile de 70 µm de diamètre. Les analyses sont réalisées grâce au logiciel FlowJo 8.7 (Treestar, Sanford, CA).



### **c. Analyse des types cellulaires par cytométrie en flux : marquages intracellulaires**

Pour le marquage intracellulaire, les cellules sont incubées pendant 4 heures avec 3 µg/mL de brefeldin A 1000X (eBioscience, San Diego, CA) puis lavées avec du PBS. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées selon le protocole du fabricant en utilisant le kit PermFix/PermWash® (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ). Les marquages intracellulaires utilisés sont : APC-conjugated anti-IL-17A et FITC-conjugated anti-IFN $\gamma$  (eBioscience, San Diego, CA). Pour chaque anticorps, un isotype est utilisé pour déterminer les compensations. Les cellules sont analysées après filtration sur un LSR Fortessa® (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ). Les analyses sont réalisées grâce au logiciel FlowJo 8.7 (Treestar, Sanford, CA).

## ***Chapitre 6 : Étude de la réponse de l'hôte in-vitro***

### **1) Recueil et culture des macrophages péritonéaux**

Les macrophages péritonéaux sont recueillis après stimulation de leur différenciation par une injection intrapéritonéale de 2 ml de thioglycolate stérile. A J3 après l'injection, les souris sont sacrifiées et les macrophages sont recueillis après trois lavages péritonéaux successifs par injection/réaspiration de 5 ml de PBS. Après centrifugation à 250 g les macrophages sont suspendus dans des boites de pétri contenant du milieu de culture IMDM (Gibco, Gaithersburg, MD) supplémenté en sérum de veau fœtal (10%), pénicilline et streptomycine (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO) puis placés en étuve à 37°C en atmosphère enrichie à 5% en CO<sub>2</sub>. Toutes les manipulations sont réalisées stérilement sous hotte à flux. A 5 heures d'incubation, le surnageant est éliminé et les macrophages sont décollés par méthode chimique (Versène, Gibco, Gaithersburg, MD) et mécanique au *cell scraper*. Le milieu contenant les cellules est centrifugé, puis le culot est suspendu dans 1 ml de milieu. La concentration cellulaire est mesurée sur un hémocytogramme de Malassez après coloration au bleu trypan. La solution est ensuite calibrée pour obtenir une concentration de 5.10<sup>5</sup> cellules/ml. Puis, elle est déposée sur plaque 96 puits à raison de 100 µl par puit soit 5.10<sup>4</sup> cellules par puit. Les cellules sont conservées en incubateur à 37°C et le milieu de culture est changé quotidiennement. Le jour de l'infection des macrophages, le milieu initial est remplacé par du milieu IMDM supplémenté avec 10% de SVF, sans antibiotique. En fonction de l'expérience, les macrophages sont pré-stimulés par 50 ng/mL de LPS pendant 3 heures avant infection ou par de la L-kynurénine 0,5 mM pendant 12 heures avant infection. Les macrophages sont infectés avec les souches *CHAΔpopBD* ou ses mutants dans 100 µL à MOI

20 ou 40 selon les expériences. Une fois le temps d'exposition souhaité écoulé, l'infection est arrêtée par l'adjonction de gentamicine (400 µg/mL) ou de ceftazidime (200 µg/mL), cette dernière étant dépourvue d'activité bactéricide intracellulaire (301). Dans les expériences où les bactéries extracellulaires doivent être éliminées, 7 lavages au PBS sont réalisés en plus du traitement antibiotique.

## **2) Analyse de la cytotoxicité**

La cytotoxicité de la souche bactérienne est analysée par l'intensité de la lyse cellulaire estimée par la quantité de LDH libérée dans le surnageant. Deux cents microlitres de surnageants des macrophages sont prélevés, 50µl de ces surnageants sont déposés sur une plaque 96 puits et sont utilisés pour réaliser le dosage de la LDH, les 150 µl restants sont conservés à -80°C pour dosage des cytokines par ELISA et dosage des métabolites de la voie des kynurénines. A la plaque de culture contenant les macrophages, 10µl de Triton X-100 1% (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO) sont ajoutés dans chaque puit qu'on laisse incubé pendant 1 heure à 37°C afin d'obtenir une lyse cellulaire complète. Les 50µl résiduels dans chaque puit de la plaque contenant les lysats cellulaires sont transférés sur une plaque 96 puits pour réaliser le dosage des LDH cellulaires totales. Enfin, 50 µL d'un mélange commercial de réactifs (Cytotoxicity assay kit®, Roche, Reinach, Suisse) sont ajoutés dans chaque puit des plaques contenant les 50 µl de surnageants ou 50 µL de lysats cellulaires. Les plaques sont laissées sous étuve à 37°C pendant 20 minutes pour permettre la réaction colorimétrique. Le dosage des LDH du surnageant et du produit de lyse cellulaire est réalisé par absorbance, selon les recommandations du fabricant. La DO est lue immédiatement à 482 nm. Le pourcentage de lyse des macrophages est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{DO Echantillon} - \text{DO}_0}{\text{DO Lysat} - \text{DO}_0} \times 100$$

DO<sub>0</sub>= moyenne des surnageants des contrôles négatifs.

## **3) Dosage des cytokines dans les surnageants de macrophages par méthode ELISA**

Les surnageants de macrophages sont conservés à -80°C. Les dosages sont réalisés selon le protocole fourni par le fabricant (Peprotech, Rocky Hill, NJ). Les différentes cytokines dosées sont : IL-1β (900-K47), IL-17 (900-K392), IL-22 (900-K257), IL-10 (900-M53), TNFα (900-K54), IL-6 (900-K50).

## ***Chapitre 7 : Dosage des métabolites de la voie des kynurénines***

### **1) Dosage colorimétrique par méthode d’Ehrlich Kovacs**

Afin de doser les kynurénines et notamment la L-kynurénine accumulée dans le surnageant des cultures bactériennes et les BAL, le réactif d’Ehrlich Kovacs (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) est utilisé (Boyanova et al., 2002). Ce dernier contient du n-Butanol, de l’acide chlorhydrique et du Diméthylamino-4-benzaldéhyde et est utilisé dans la recherche d’indole. Après une centrifugation de l’échantillon à 10 000g, le surnageant est récupéré et 100 µL sont mélangés avec 100 µL du réactif d’Ehrlich Kovacs. Après 10 min d’incubation à l’abri de la lumière, à température ambiante, l’absorbance est mesurée à 490 nm. À l’aide d’une gamme de L-kynurénine synthétique, la concentration de kynurénines produits dans l’échantillon est déterminée. Du milieu de culture ou du PBS sont utilisés comme contrôle négatif lors de mesures respectivement dans le surnageant de culture de souche ou le LBA. Cependant, ce dosage est peu spécifique de la L-kynurénine et réagit également avec l’anthranilate. C’est pourquoi un dosage plus spécifique des métabolites a été mis au point par technique de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (electrospray ionization liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-ESI/MS/MS) dans le laboratoire de Toxicologie du CHRU de Lille (Dr. B. Hennart).

### **2) Dosage des métabolites de la voie des kynurénines par spectrométrie de masse**

Afin de doser la production des métabolites de la voie des kynurénines *ex vivo*, les souches sauvages de *Pa* ainsi que leurs mutants sont mises en culture dans du milieu LB non renouvelé après calibration initiale par DO. A H4, H6, H8 et H24, 500 µL de milieu de culture sont prélevés, centrifugés à 2000g pendant 5 minutes, et immédiatement congelés à -80°C. Pour doser les kynurénines *in vivo* dans le tissu pulmonaire, le tissu pulmonaire prélevé au cours de l’infection est homogénéisé dans 500 µL de PBS mélangé avec 50% de RIPA buffer (ThermoScientific, Waltham, MA) et supplémenté avec un inhibiteur de protéase (Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets™, Pierce, ThermoScientific, Waltham, MA), puis centrifugé (2000 g pendant 10 minutes) après 10 minutes sur glace. Les surnageants sont immédiatement congelés à -80°C puis secondairement utilisés pour les dosages. Pour doser les kynurénines dans le liquide de LBA, les LBA sont centrifugés immédiatement après extraction à 400 G pendant 10 minutes, le surnageant est immédiatement congelé à -80°C pour dosages ultérieurs. Les concentrations de tryptophane,

kynurénine, acide kynurénique, 3 hydroxykynurénine, anthranilate, 3 hydroxy-anthranilate, acide xanthurénique, acide quinaldique et acide 8 hydroxyquinaldique sont dosées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (electrospray ionization liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-ESI/MS/MS). Cette procédure est développée selon des méthodes déjà publiées, avec quelques modifications(302). Cent microlitres de surnageant de LBA, de poumon ou de milieu de culture sont analysés après ajout de 100 µl d'acétonitrile contenant du tryptophane-D5 concentré à 50 000 nM comme standard interne. Les échantillons sont vortexés, puis centrifugés 15 minutes à 15000g et 100 µl de surnageant est ajouté à 500 µl d'eau ppi. Cinquante microlitres de ce soluté sont injectés dans le système UPLC-MS/MS (Xevo TQ-S Detector®, Waters, Milford, USA) équipé avec une colonne Acquity® HSS C18 (Waters, Milford, USA). Le logiciel d'acquisition et d'analyse de données utilisé est Chromalinks® software (Waters, Milford, USA).

## ***Chapitre 8 : Etude de la maturation et de l'activation des cellules dendritiques murines***

### **1) Rôle des kynurénines bactériennes dans la maturation et l'activation des cellules dendritiques**

Les kynurénines sont des ligands du récepteur AhR, dont l'implication dans la maturation, l'activation (257) et l'immunogénicité (190) des cellules dendritiques est connu. Pour étudier l'impact de la production de kynurénines bactériennes sur ces cellules, des cellules dendritiques immortalisées de souris C57Bl6 (lignée DC 2.4 ; gracieusement fournie par le laboratoire TheREx) ont été infectées avec la souche *CHAΔpopBD* ou ses mutants. Ces cellules ont la particularité d'être immatures. Elles expriment à leur surface le CMHI, le CD11c et le CD54 mais une très faible quantité de CD80, et n'expriment pas le CMHII, le CD86, le CD40 et le CCR7. Les cellules sont cultivées à partir d'un tube cryoconservé (SVF 90% et DMSO 10%) dans du RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine (2 mM), streptomycine (100µg/mL), penicilline (100U/ml), acides aminés non essentiels (100µM), 2-mercaptoethanol (2-ME, 50µM) et 10% de serum de veau fœtal à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub>. Dans un premier temps, la stimulation de la maturation et de l'activation des CD est réalisée par l'administration de LPS (1µg/mL) pendant 24 heures dans le milieu de culture, auquel est ajouté des doses croissantes de kynurénines ou d'acide

kynurénique. Les cellules sont ensuite recueillies dans du PBS 2% SVF, et marquée par des anticorps de surface anti-CMH II (FITC), anti-CD86 (APC), anti-CD80 (PE-Cy7), anti-CD40 (PE-Cy5), anti-CMHIIa (FITC), anti-CCR7 (PE-Cy7) ou leurs isotypes contrôles pendant 40 minutes à 4°C dans l'obscurité. Après incubation, les cellules sont lavées et fixées selon le protocole du fabricant en utilisant le kit PermFix/PermWash® (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ). Pour chaque anticorps, un isotype est utilisé pour déterminer les compensations. Les cellules sont analysées après filtration sur un LSR Fortessa® (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ). Les analyses sont réalisées grâce au logiciel FlowJo 8.7 (Treestar, Sanford, CA).

Nous avons ensuite voulu reproduire les résultats obtenus avec les DC2.4 en utilisant une culture de BMDC. Les BMDC sont générées à partir des cellules de moelle osseuse fémorale et tibiale. Brièvement, l'animal est sacrifié, la moelle osseuse est récupérée stérilement en purgeant le canal osseux avec du RPMI au moyen d'un trocard de 25 gauge, puis suspendue et filtrée à 70µm dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de serum de veau fœtal, glutamine stable 1X, acides aminés non essentiels 1X, penicilline-streptomycine 1X et 2β mercapto-éthanol. Les cellules sont comptées puis réparties en boîte de pétri à raison de 2.10<sup>6</sup> à 5.10<sup>6</sup> cellules par boîte dans 10 ml de milieu. Les boîtes sont conservées en étuve à 37° en milieu enrichi à 5% de CO<sub>2</sub> et en atmosphère saturée en vapeur d'eau. A J3, chaque boîte de pétri est supplémentée avec 10 ml de milieu RPMI complet + 20 µg/ml de GM-CSF murin. A J7, les cellules d'intérêt sont rondes, non ou faiblement adhérentes et se regroupent en amas dans le surnageant. Ces cellules sont récupérées, dénombrées puis centrifugées 8 minutes à 400 G, et resuspendues dans du milieu complet + GM-CSF 20 µg/ml pour obtenir 1 million de cellules /ml. Les cellules sont ensuite utilisées à J10, mises en puits puis soumises aux différentes conditions expérimentales comme décrites précédemment.

## ***Chapitre 9 : Modèle du nématode *Caenorhabditis elegans****

Les manipulations effectuées sur le modèle de *C. elegans* ont été réalisées par l'équipe du Dr Olivier Lesouhaitier (Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM EA 4312), Université de Rouen, France).

### ***Synchronisation de *Caenorhabditis elegans* et test de virulence.***

La souche sauvage Bristol N2 de *Caenorhabditis elegans* a été obtenue auprès du *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN). *C. elegans* est cultivé en condition standard à 23°C sur gélose de culture spécifique de ce nématode (NGM: 3 g NaCl, 2.5 g peptone, 17 g agar, 5 mg cholestérol, 1 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>, 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 25 ml 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dans 1 L d'H<sub>2</sub>O), avec *E. coli* OP50 comme source alimentaire (Sulston & Hodgkin, 1988).

Les cultures synchrones de vers sont obtenues comme décrit précédemment (Blier *et al*, 2011). Les tapis bactériens utilisés pour les tests de survie sont préparés en répandant 50 µl de chaque souche de *Pa* sur des boîtes de pétri NGM de 35 mm supplémentées avec 0,05 mg ml<sup>-1</sup> de 5-fluoro-2'-deoxyuridine et si besoin 5 µmol.L<sup>-1</sup> de tryptophane. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C puis placées à température ambiante pendant 4 heures. Ensuite, 15 à 20 vers L4 (âgés de 48 heures) synchronisés sont mélangés à une solution M9 (3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g NaHPO<sub>4</sub>, 5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O dans 1 litre), placés sur boîte de pétri et incubés à 23°C. Le score de survie des vers est mesuré à 1 heure, 24 heures puis chaque jour suivant en utilisant un microscope optique Axiovert® S100 (Zeiss, Oberkochen, Germany) équipé avec une caméra Nikon digital DXM 1200F (Nikon Instruments, Melville, NY). Les vers sont considérés comme morts lorsqu'ils restent statiques sans mouvement constaté au niveau de leur broyeur pendant 20 secondes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de vers vivants, et sont analysés par le test du log-rank.

## ***Chapitre 10 : Analyses statistiques***

Les variables quantitatives sont analysées grâce à une analyse de variance à un facteur (one-way ANOVA) suivi d'un post-test de Bonferonni lorsque celles-ci sont significatives. Les survies sont analysées grâce à un test du log-rank. Les calculs et les courbes sont réalisés grâce au logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Softwares Inc. La Jolla, CA). Un *p* inférieur à 0,05 est considéré comme significatif. Les résultats sont exprimés en moyenne ± déviation standard.

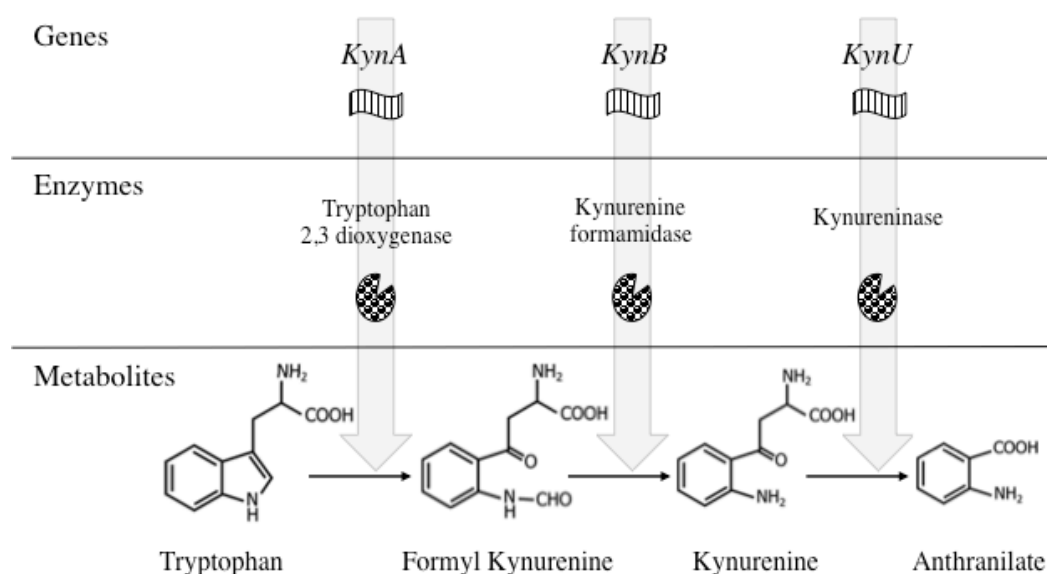
## Partie 3. Résultats

---

## Chapitre 1: Etude de la voie des kynurénines chez *Pa*

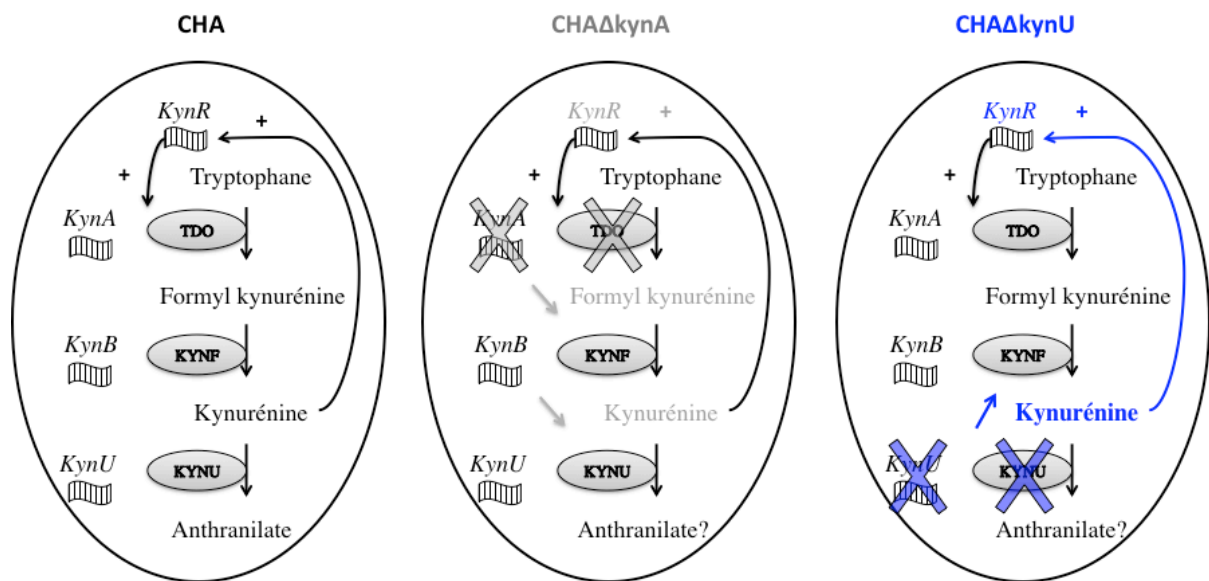
L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier le rôle de la voie des kynurénines de *Pa* au cours de l'infection. Actuellement, on sait que *Pa* possède trois enzymes fonctionnelles de la voie métabolique codées par les gènes *kynA*, *kynB* et *kynU* (c.f. **Figure de rappel**). Cependant, la nature exacte des métabolites que *Pa* est capable de produire ainsi que leur quantité ne sont pas connues. En utilisant une méthode de dosage par HPLC-MS/MS, nous avons analysé les métabolites sécrétés par la souche sauvage CHA ainsi que par une souche clinique (SC) isolée chez un patient du CHRU de Grenoble, dans leur environnement *ex vivo* puis *in vivo* dans notre modèle murin de pneumonie.

**Figure de rappel**



Afin de pouvoir par la suite évaluer l'impact des métabolites bactériens au cours de l'infection, nous avons également étudié la production des métabolites de la voie des kynurénines par les mutants CHA $\Delta$ *kynA* et SC $\Delta$ *kynA* ne possédant la TDO, première enzyme de la voie des kynurénines de *Pa*, et CHA $\Delta$ *kynU* ne possédant pas de kynuréninase nécessaire à la métabolisation de la kynurénine en anthranilate (**Figure 1**). Toutes les expériences *ex vivo* sont effectuées en milieu LB non renouvelé sous agitation à 37°C.





**Figure 1: Voies métaboliques des souches de *Pa* et leurs mutants utilisées dans ce travail de thèse.** Dans ce schéma est représentée la voie des kynurénines de la souche sauvage CHA telle qu'elle est actuellement connue. Elle comporte les 3 gènes *kynA*, *kynB* et *kynU* codant respectivement pour les enzymes tryptophane 2,3 dioxygénase (TDO), kynurénine formamidase (KYNF) et kynuréninase (KYNU), et le régulateur transcriptionnel *kynR* activant la transcription de la TDO lors d'une stimulation par la kynurénine. En gris sont représentées les modifications attendues du mutant CHAΔ*kynA*, a priori incapable de produire de la kynurénine. En bleu sont représentées les modifications attendues du mutant CHAΔ*kynU*, surproduisant a priori la kynurénine. L'impact sur la production de l'antranilate n'est pas connu car *Pa* possède une autre voie métabolique de synthèse de ce composé.

## 1) Production de kynurénines par *Pa* *ex vivo*

### a. Les vitesses de croissance des souches sauvages et mutantes sont similaires

Au préalable à toutes les autres expériences, nous avons comparé la vitesse de croissance des souches sauvages par rapport à leurs mutants respectifs *ex vivo* en milieu LB non renouvelé en agitation à 37°C, afin de s'assurer de l'absence d'altération du « *fitness* » des souches par la construction des mutants et assurer la comparabilité des résultats ultérieurs. Pour chaque souche, nous avons mesuré la vitesse de croissance au cours de la phase exponentielle exprimée par le quotient de biomasse (Qx expo) et le temps de génération (en minutes), correspondant au temps de doublement de la population bactérienne au cours de la phase exponentielle. Il n'y a pas de différence de vitesse de croissance entre les souches CHA, CHAΔ*kynA*, CHAΔ*kynU* d'une part et entre SC et SCΔ*kynA* d'autre part (**Tableau 1**).

A	CHA	CHAΔkynU	CHAΔkynA
Qx expo (h <sup>-1</sup> )	1.29	1.22	1.34
Temps de génération (min)	32	34	31

B	SC	SCΔkynA
Qx Expo (h <sup>-1</sup> )	0,37	0,41
Temps de génération (mn)	111	103

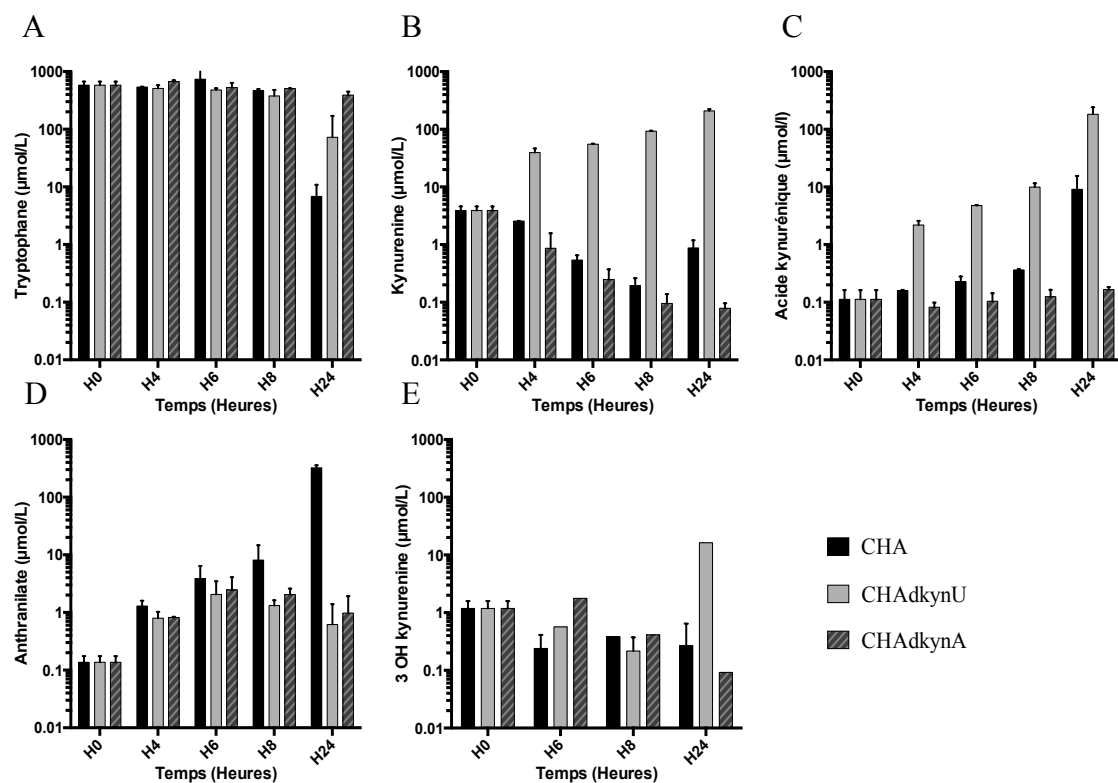
**Tableau 1: Comparaison de la vitesse de croissance des souches A,B,** Calcul des quotients de biomasse et des temps de générations correspondant en phase exponentielle de croissance des souches **A**, **CHA** et mutants **B**, Souche clinique et mutant, Qx expo : quotient de biomasse calculé selon la formule  $Qx\ expo\ (h^{-1}) = (LN(A2) - LN(A1))/(t2-t1)$ , A : DO du milieu de culture à un temps donnée, t : temps correspondant. Temps de génération (min) =  $(LN(2)/Qx\ expo) \times 60$ .

#### **b. Pa produit de la kynurénine en quantité soutenue**

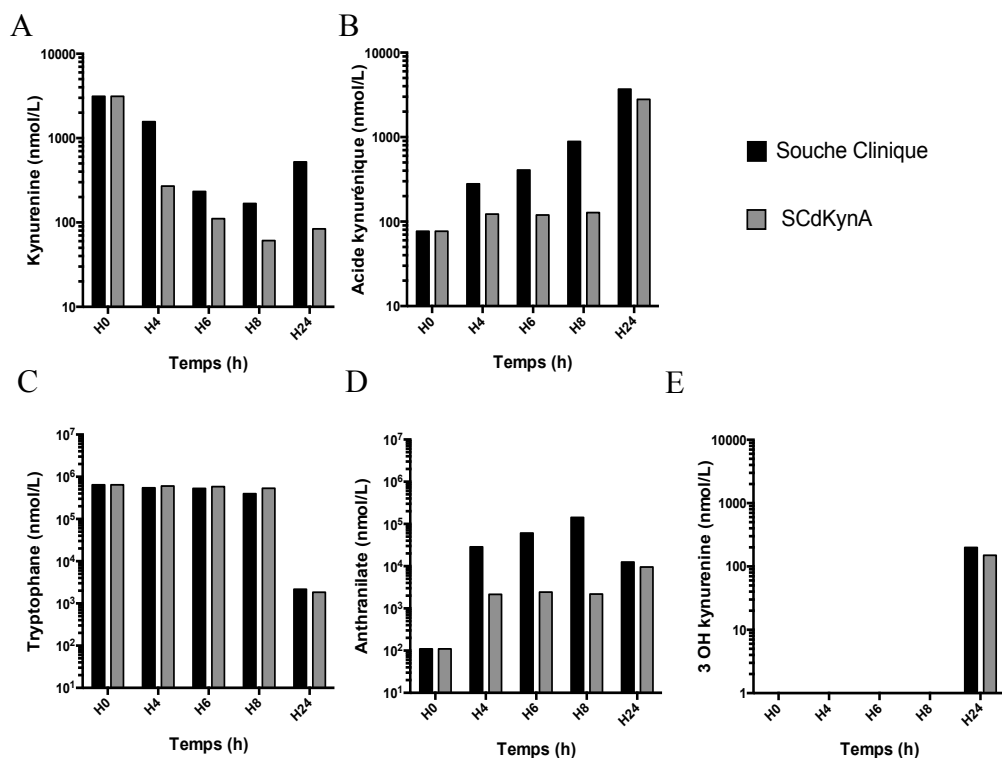
*Pa* possède la voie enzymatique permettant la production de kynurénine. Cependant, les quantités de kynurénine produites ne sont actuellement qu’approchées par des dosages utilisant la méthode d’Erlich-Kovacs. Nous avons dosés par HLPC-MS/MS la kynurénine produite par les différentes souches *ex vivo* en milieu LB non renouvelé à H4, H6, H8 et H24. Nous montrons que *Pa* est capable de produire de la kynurénine à des concentrations de l’ordre du μM. Comme attendu, le mutant CHAΔkynU surproduit la kynurénine, alors que les mutants CHAΔkynA et SCΔkynA n’en produisent pas (**Figures 2 et 3**).

#### **c. Pa produit de l’acide kynurénique et de la 3-OH-kynurénine**

A ce jour, nous savons que *Pa* est capable de produire de la kynurénine et de l’antranilate, mais il n’existe aucune donnée sur les capacités de production d’autres métabolites de la voie. Nous avons constaté que *Pa* peut produire de l’acide kynurénique et de la 3-OH–kynurénine *ex vivo*, suggérant l’existence d’autres enzymes fonctionnelles de la voie, telles que la kynurénine aminotransférase (KAT) et la kynurénine monooxygénase (KMO) chez *Pa*. Les concentrations de ces deux métabolites sont augmentées dans le milieu de culture de la souche CHAΔkynU par rapport à la souche CHA, alors qu’elles ne s’élèvent pas avec la souche CHAΔkynA (**Figures 2 et 3**). Chez *Pa*, la voie des quinolinines menant à l’acide kynurénique est donc une voie métabolique additionnelle, préférentiellement activée lorsque la voie de l’antranilate est inhibée, comme c’est le cas pour la souche CHAΔkynU (**Tableau 2**).



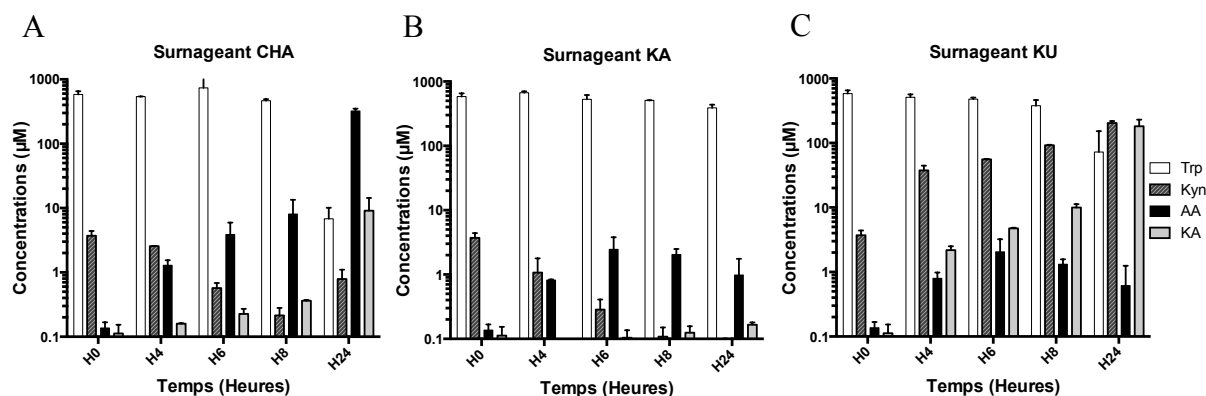
**Figure 2: Dosage des métabolites de la voie des kynurénines de la souche CHA et de ses mutants CHAΔkynA et CHAΔkynU en milieu LB non renouvelé** A, B, C, D, E Dosage des concentrations des métabolites de la voie des kynurénines bactériennes en 3OHkynurénine, acide kynurénique et anthranilate au cours du temps en milieu LB liquide non renouvelé à 37°C pour les souches CHA (noir), CHAΔkynA (gris foncé) et CHAΔkynU (gris clair). A, Evolution des concentrations de tryptophane B, Evolution des concentrations de kynurénine C, Evolution des concentrations d'acide kynurénique D, Evolution des concentrations d'acide kynurénique E Evolution des concentrations d'anthranilate. Dosages effectués deux fois, en double, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.



**Figure 3: Dosage des métabolites de la voie des kynurénines de la souche clinique et de SC $\Delta$ kynA en milieu LB non renouvelé.** A, B, C, D Dosage des concentrations des métabolites de la voie des kynurénines en tryptophane, kynurénine, acide kynurénique et anthranilate au cours du temps en milieu LB liquide non renouvelé à 37°C pour la souche clinique (barre noire), et pour son mutant SC $\Delta$ kynA (barre grise). A, Evolution des concentrations de kynurénine B, Evolution des concentrations d'acide kynurénique C, Evolution des concentrations de tryptophane D, Evolution des concentrations d'anthranilate. E, Evolution des concentrations de 3 OHkynurénine. Dosages effectués une fois, en double.

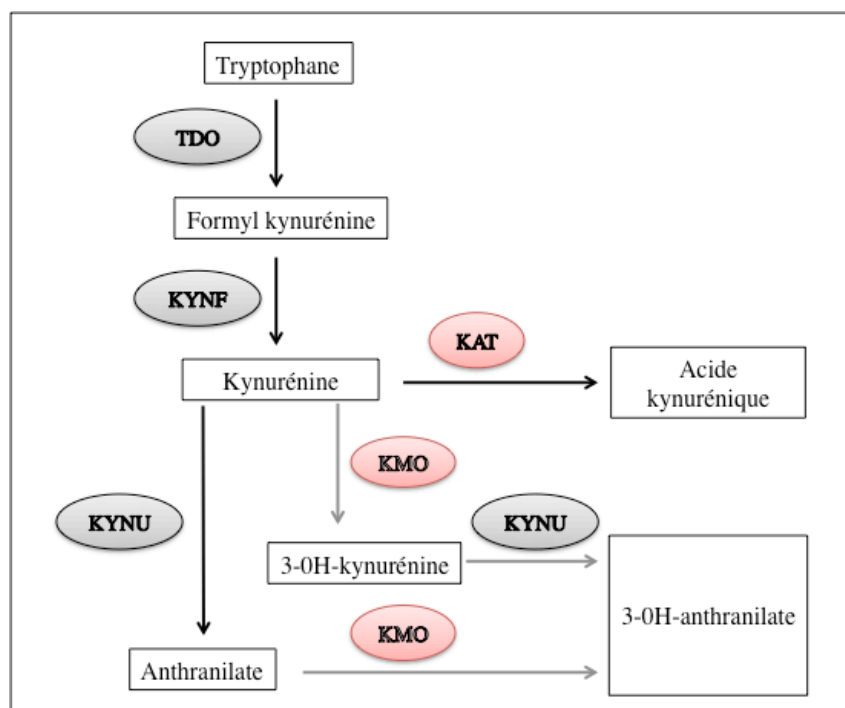
#### d. La voie des kynurénines est essentielle à la production d'anthranilate chez *Pa*

Deux voies métaboliques de production de l'anthranilate existent chez *Pa*, la voie des kynurénines et la voie de l'anthranilate synthase. La part relative de ces deux voies n'est pas connue dans la production de ce métabolite qui est un précurseur essentiel de facteurs de virulence bactériens tels que le PQS ou les phénazines. Nous montrons qu'*ex vivo* la voie des kynurénines est indispensable à la production d'anthranilate chez *Pa* car les mutants  $\Delta$ kynA et  $\Delta$ kynU sont incapables de produire de l'anthranilate (**Figure 2**). En figure 4 sont présentés les différents profils de sécrétion des trois souches CHA, CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU (**Figure 4**).



**Figure 4: Profil de sécrétion des différents métabolites de la voie des kynurénines des souches CHA, CHAΔkynA et CHAΔkynU au cours du temps *ex vivo*.** **A, B, C** Profils de sécrétion du tryptophane (blanc), de la kynurénine (gris foncé), de l'acide kynurénique (gris clair) et de l'antranilate (noir) *ex vivo* en milieu LB non renouvelé à 37°C au cours du temps. **A**, profil de sécrétion de la souche CHA. **B**, profil de sécrétion de la souche CHAΔkynA. **C**, profil de sécrétion de la souche CHAΔkynU. Dosages effectués deux fois, en double, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

La voie métabolique des kynurénines actualisée au vu des résultats des expériences effectuées dans ce travail est représentée ci-dessous (**Synthèse 1**), avec les enzymes dont l'activité n'était pas connue chez *Pa* au préalable représentées en rouge. Les flèches grises sont des voies hypothétiques basées sur les données de la littérature.



**Synthèse 1 : Voie des kynurénines hypothétique de *Pa* au vu des métabolites produits.** Enzymes connues TDO : tryptophane 2,3 dioxygénase, KYNF : kynurénine formamidase, KYNU : kynuréninase. Enzymes hypothétiques au vu des dosages des métabolites produits dans les surnageants des milieux de culture : KAT : kynurénine aminotransférase, KMO : kynurénine-monoxygénase.

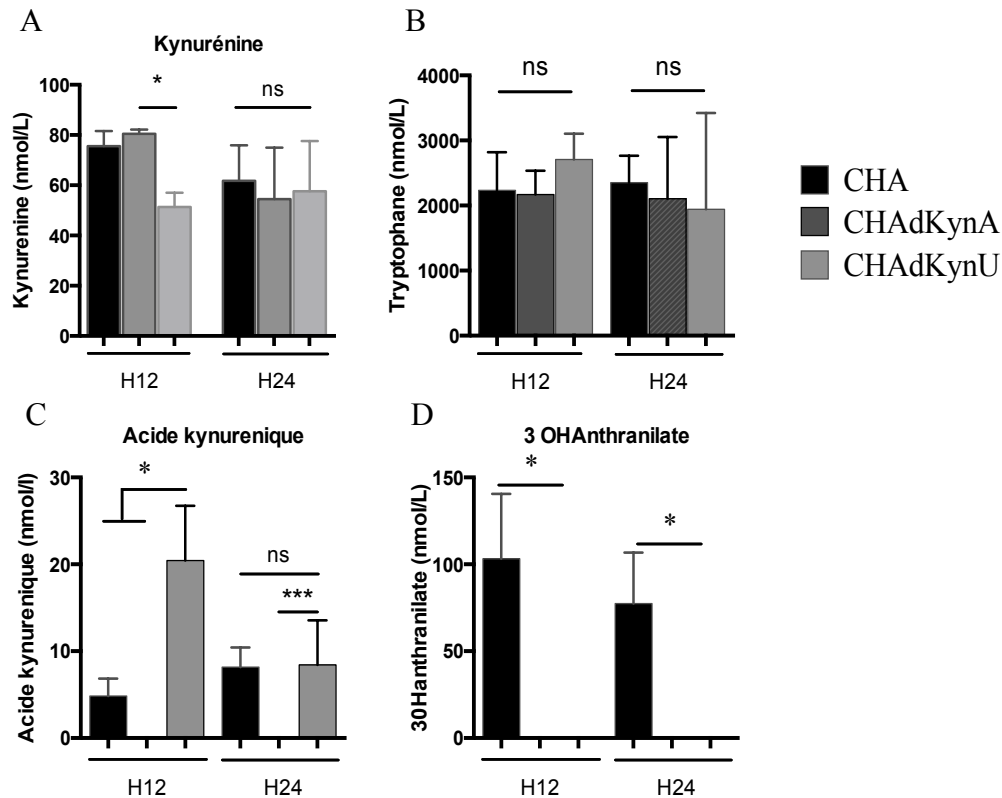
## 2) Etude de la production des kynurénines au niveau pulmonaire au cours de l'infection

Dans ce travail, nous souhaitons explorer l'hypothèse d'une immunomodulation médiée par la voie des kynurénines bactériennes au cours de l'infection respiratoire à *Pa*. A cette fin, nous avons observé si la présence d'enzymes bactériennes fonctionnelles au cours de l'infection avait un retentissement sur le métabolisme global des kynurénines au niveau pulmonaire et intra-alvéolaire.

### a. Dosage des kynurénines intra-alvéolaires

Nous avons mesuré les concentrations des métabolites de la voie des kynurénines dans les LBA de souris infectées par les souches sauvages de *Pa* et de leurs mutants. La technique ne permet pas de distinguer l'origine bactérienne ou murine des métabolites mais juste les variations du microenvironnement en fonction de la souche infectante. Lors d'une infection respiratoire aigüe à *Pa* sauvage possédant la voie des kynurénines, les concentrations d'anthranilate dans le LBA sont plus élevées qu'avec les souches mutées à H12 de l'infection. Lors de l'infection avec la souche  $CHA\Delta kynU$  ne possédant pas de kynuréninase, les concentrations en acide kynurénique dans le LBA sont plus élevées qu'avec les souches  $CHA$  et  $CHA\Delta kynA$ , mais les concentrations de tryptophane et de kynurénine sont diminuées à H12 (**Figure 5**). La baisse des taux de kynurénines dans le LBA lors de l'infection avec la souche  $CHA\Delta kynU$  pourrait être expliqué par une augmentation du catabolisme de ce métabolite par les bactéries, bien que cela soit purement hypothétique. De la même manière, la baisse des concentrations de tryptophane intra-alvéolaire au cours de l'infection avec la souche  $CHA\Delta kynU$  pourrait faire évoquer un métabolisme du tryptophane intensifié par rapport à l'infection à  $CHA$  et  $CHA\Delta kynA$ .

Finalement, l'ensemble de ces résultats démontre que la voie des kynurénines bactériennes interfère avec le métabolisme global des kynurénines dans le compartiment intra-alvéolaire.

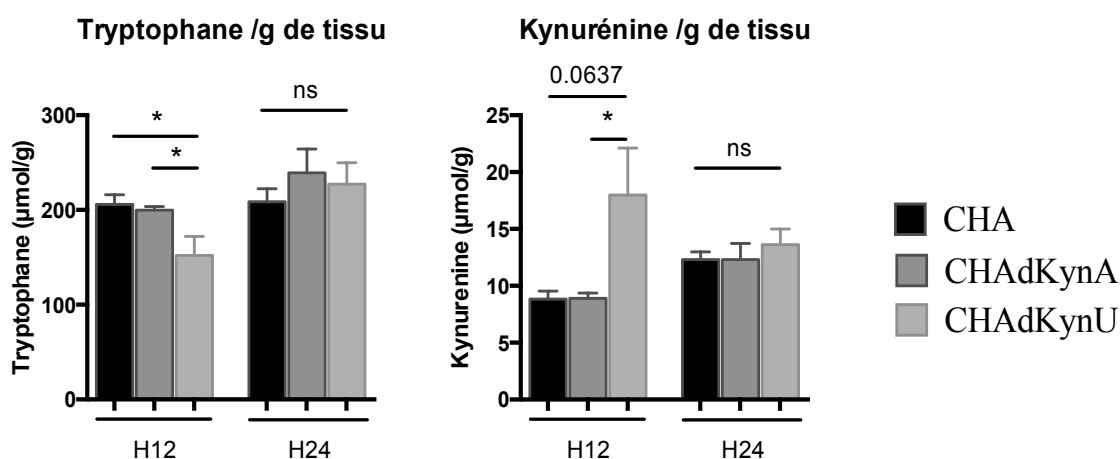


**Figure 5: Dosage des métabolites de la voie des kynurénines dans le LBA dans un modèle murin d'infection respiratoire aiguë avec les souches CHA, CHAΔkynA et CHAΔkynU.** A,B,C,D dosages effectués dans les surageants de LBA de souris infectées avec les souches CHA (barre noire), CHAΔkynA (barre grise foncée) et CHAΔkynU (barre grise claire) collectés à H12 et H24 après l'instillation. A, dosage de la kynurénine. B, dosage du tryptophane. C, dosage de l'acide kynurénique, D, dosage du 3OHAnthranilate (n=5 souris par groupe). Chaque dosage est effectué en double. Ns : non significatif \* p< 0,05.

### b. Dosage des kynurénines dans le tissu pulmonaire

Nous avons mesuré les concentrations des métabolites de la voie des kynurénines dans le tissu pulmonaire de souris infectées par la souche CHA et ses mutants. On note une diminution des concentrations tissulaires en tryptophane associé à une hausse des concentrations en kynurénine avec la souche CHAΔkynU par rapport aux souches CHA et CHAΔkynA à H12. Les autres métabolites ne sont pas dosés dans les tissus (**Figure 6**).

Au total, les capacités de production des différents métabolites de la voie des kynurénines par les bactéries ont un impact sur le métabolisme global des kynurénines (bactéries + hôte) *in vivo* au cours de l'infection respiratoire aiguë à *Pa*, tant dans le compartiment intra-alvéolaire que dans le tissu pulmonaire.

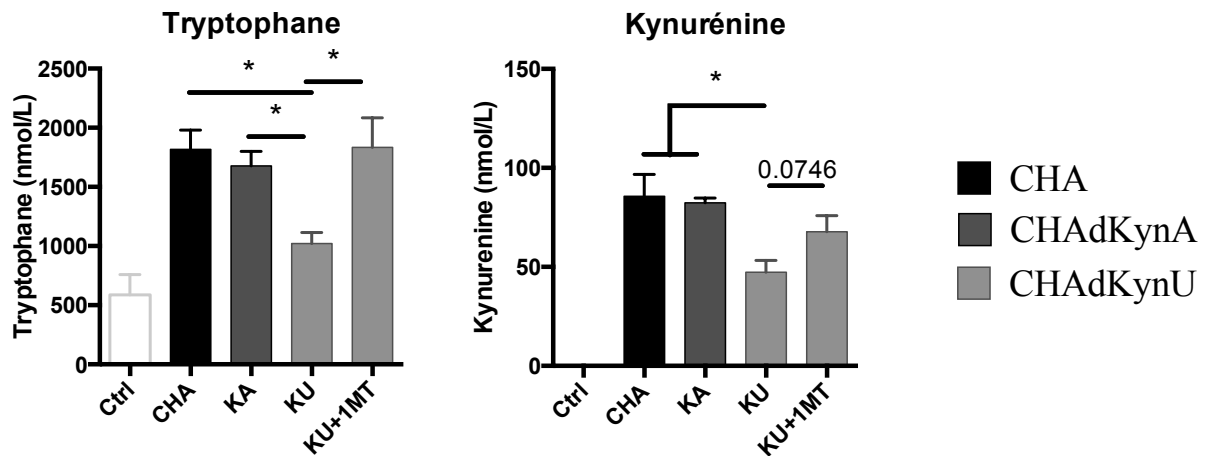


**Figure 6: Dosage des métabolites de la voie des kynurénines dans les tissus pulmonaires dans un modèle murin d'infection respiratoire aigu à *Pa*.** A, B dosages des métabolites de la voie des kynurénines effectués dans les tissus pulmonaires de souris infectées avec les souches CHA (barre noire), CHAΔkynA (barre grise foncée) et CHAΔkynU (barre grise claire) collectés à H12 et H24 après l'instillation. A, dosage du tryptophane dans le tissu pulmonaire. B, dosage de la kynurénine dans le tissu pulmonaire. (n=5 souris par groupe). Dosages effectués en double. \* p< 0,05

### c. Implication de la voie des kynurenines de l'hôte dans la production globale des kynurénines

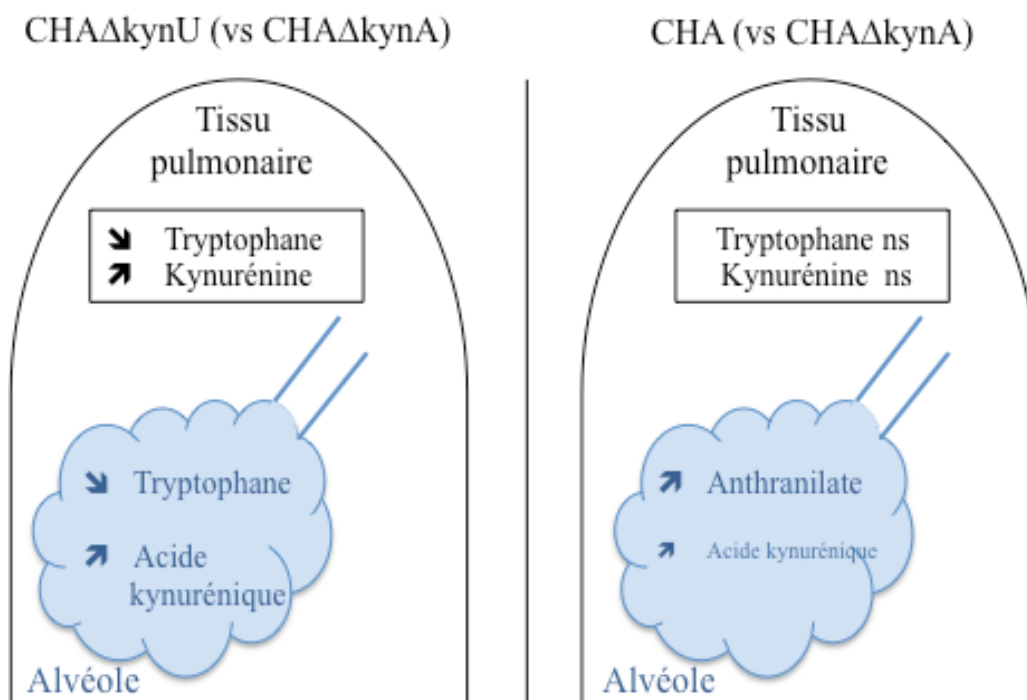
Afin d'évaluer l'implication de la voie métabolique de l'hôte dans les variations des concentrations alvéolaires des différents métabolites *in vivo*, les souris sont traitées par le 1-MT, inhibiteur de l'IDO, avant infection par la souche CHAΔkynU. Les différents métabolites sont ensuite dosés comme précédemment dans les LBA. L'inhibition de l'IDO par le 1-MT inhibe ou atténue les différences de concentrations en tryptophane et en kynurénine observées dans les LBA des souris infectées avec CHAΔkynA et CHAΔkynU (**Figure 7**). Ce résultat suggère l'implication de la voie de l'IDO de l'hôte dans les variations métaboliques constatées entre les différentes souches de *Pa*, et fait évoquer l'existence d'une interaction entre les voies bactériennes et humaines. Étonnamment, la concentration de kynurénine diminue avec la souche CHAΔkynU. Cela pourrait hypothétiquement être dû à une métabolisation rapide de la kynurénine en acide kynurénique.





**Figure 7: Dosage des métabolites de la voie des kynurénines dans le LBA dans un modèle murin d'infection respiratoire aiguë avec les souches CHAΔkynU avec ou sans traitement par le 1-MT.** A,B, dosages effectués dans les surnageants de LBA de souris infectées avec les souches CHAΔkynU, avec ou sans traitement par le 1-MT (gris clair) collectés à H12 après l'instillation (souches CHA (noir) et CHAΔkynA (gris foncé) affichées pour comparaison) **A**, dosage de la tryptophane. **B**, dosage de la kynurénine. Chaque dosage est effectué en double. \* p< 0,05.

Les principales différences métaboliques au niveau tissulaire et alvéolaire observées en fonction des souches infectantes lors de la pneumonie aiguë à *Pa* sont résumées dans le schéma de synthèse ci-dessous (**synthèse 2**).



**Synthèse 2 : Principales variations métaboliques des composés de la voie des kynurénines dans le tissu pulmonaire et le compartiment alvéolaire au cours de la pneumonie aiguë à *Pa*.** **A gauche**, variations observées au cours de l'infection avec la souche CHAΔkynU, comparée à l'infection avec la souche CHAΔkynA. **A droite**, variations observées au cours de l'infection avec la souche CHA, comparée à l'infection avec la souche CHAΔkynA.

### **3) Rationnel de comparaison des différentes souches**

Ce travail est principalement réalisé avec les souches CHA, CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU. En se rapportant aux résultats présentés dans ce premier chapitre, lorsque l'on compare les groupes infectés avec la souche CHA par rapport à ceux infectés avec CHA $\Delta$ kynA, on étudie le rôle de la voie des kynurénines bactériennes dans son ensemble, c'est-à-dire des kynurénines et surtout des métabolites d'aval, et notamment l'anthranilate qui est le précurseur direct du PQS.

Lorsque l'on compare les groupes infectés avec la souche CHA $\Delta$ kynA par rapport à ceux infectés avec la souche CHA $\Delta$ kynU, on étudie le rôle des métabolites produits par la voie des kynurénines, notamment la kynurénine et l'acide kynurénique qui s'accumulent en l'absence d'enzyme de dégradation.

La comparaison des infections à CHA par rapport à CHA $\Delta$ kynU est plus difficile à interpréter, car elle fait intervenir dans le raisonnement à la fois les variations de production d'anthranilate, et celles des métabolites de la voie des kynurénines.

La suite du travail repose essentiellement sur la comparaison entre CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU ou entre CHA $\Delta$ kynA et CHA.

## ***Discussion***

A la différence de la plupart des bactéries qui métabolisent le tryptophane de manière anaérobie en indole pyruvate et en ammonium (303), *Pa* dégrade le tryptophane par métabolisme oxydatif aérobie via la voie des kynurénines (225). L'étude comparative de cette voie chez divers organismes dont l'Homme montre que la kynurénine peut être catabolisée soit en acide kynurénique via une kynurénine aminotransférase (KAT), soit en anthranilate via une kynuréninase (226). Les enzymes composant la voie des kynurénines chez les bactéries et notamment chez *Pa* sont moins bien connues. En effet, l'équipement génétique codant pour les enzymes de la voie des kynurénines varie en fonction des souches bactériennes et l'activité des enzymes dépend de l'environnement de croissance des bactéries (226) (304). L'objectif de ce travail est d'explorer la possibilité d'un dialogue inter-règne entre l'hôte et le pathogène via les métabolites de la voie des kynurénines. Pour cela, l'étude qualitative et quantitative des métabolites produits est un prérequis indispensable.

Nos résultats démontrent la capacité de *Pa* à sécréter dans son environnement plusieurs métabolites issus de la voie des kynurénines, à des concentrations physiologiquement pertinentes. Cette sécrétion a lieu à la fois *ex vivo* dans le milieu de culture et *in vivo* dans le LBA et le tissu pulmonaire au cours de l'infection respiratoire aiguë. Une des limites techniques du dosage des métabolites dans ces expériences est qu'en cas de non-détection, on ne peut pas conclure à une absence de production du composé car il peut également s'agir d'une métabolisation rapide dans l'environnement ou d'un défaut de sécrétion.

### ***1) Constatations ex vivo***

#### ***a. Pa produit de l'acide kynurénique***

Dans ce travail, nous rapportons pour la première fois que *Pa* est capable de produire de l'acide kynurénique lors de sa croissance en milieu de culture, alors que d'autres travaux utilisant une méthode de comparaison n'identifiait pas de gène codant pour une KAT responsable de la synthèse d'acide kynurénique (223). Lorsque le gène *kynU*, codant pour une

kynuréninase, est délété, *Pa* CHAΔkynU produit de l'acide kynurénique en grande quantité, alors que la concentration d'anthranilate reste stable. A l'inverse, on ne détecte pas d'acide kynurénique dans le milieu de culture de la souche CHAΔkynA. L'hypothèse d'une voie de formation alternative d'acide kynurénique par une réaction entre l'anthranilate et l'acide orotique a été invalidée dans de précédents travaux (305). L'ensemble de ces résultats suggèrent que *Pa* exprime une KAT fonctionnelle, à l'instar d'autres espèces bactériennes du genre *Pseudomonas* (226,304). L'identification d'homologues de KAT chez *E. coli*, chez l'archéobactérie *Pyrococcus horikoshii*, ou chez l'Homme nous a fait rechercher la présence d'un homologue chez *Pa* (306) (307) (308). En utilisant BlastP sur Pseudomonas.com, nous retrouvons plusieurs séquences protéiques compatibles avec une KAT. La séquence ayant l'homologie la plus grande est située sur l'ORF PA3798 (*ybdL*), correspondant à une aminotransférase putative (*Pseudomonas* genome database in [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). On retrouve avec des scores de blast plus faibles d'autres séquences homologues au niveau des gènes GntR (PA2320) et PhhC (PA0870), correspondant à des aminotransférases essentielles pour le catabolisme des acides aminés aromatiques. D'autres expériences consistant à étudier les produits de l'enzyme synthétisée par transfert de gènes dans *E.coli*, seront nécessaires pour confirmer la présence d'une KAT fonctionnelle chez *Pa*.

#### **b. *Pa* produit de la 3-OH-kynurénine**

Nous montrons également pour la première fois que *Pa* peut convertir la kynurénine en 3-OH-kynurénine, possiblement par l'activité d'une KMO, comme le suggère la détection de 3-OH-kynurénine dans le milieu de culture de la souche CHAΔkynU. Comme pour la KAT, aucun gène codant pour une KMO n'a été identifié dans le génome de *Pa* à ce jour (223). Pourtant, d'autres espèces de *Pseudomonas*, tel que *P. fluorescens*, expriment une KMO fonctionnelle. Comme réalisé pour la recherche de la KAT, nous avons utilisé la séquence de la KMO de la souche 17400 de *P. fluorescens* (K84HF5), qui possède 36% d'identité et 54% d'homologie avec la KMO humaine, et dont l'activité a été préalablement démontrée de manière expérimentale (309). Nous retrouvons plusieurs séquences compatibles telles que PA4190 (PqsL) avec 28% d'homologie sur une séquence de 394 acide-aminés et PA3328, une monooxygénase putative FAD-dépendante avec 26% d'homologie. Ces homologies restent cependant faibles et comme pour la KAT, d'autres expériences seront nécessaires pour démontrer expérimentalement la présence d'une KMO fonctionnelle chez *Pa*.

L'étude quantitative des productions d'acide kynurénique et de 3-OH-kynurénine montre cependant que ces voies sont secondaires comparativement à la voie de l'antranilate.

### **c. La voie des kynurénines mène principalement à la production d'antranilate chez *Pa***

Les concentrations nettement supérieures d'antranilate par rapport à l'acide kynurénique et à la 3-OHkynurénine suggèrent cependant que la voie des kynurénines conduit principalement pour la souche sauvage à la production d'antranilate dans les conditions de culture utilisées pour ce travail. L'absence d'augmentation de la concentration d'antranilate après H4 dans les milieux de culture de CHAΔkynA et CHAΔkynU renforce cette hypothèse. Nos résultats sont en accord avec des données préalablement publiées sur le rôle prépondérant de la voie des kynurénines dans la production d'antranilate lors de la croissance bactérienne en milieu riche (222). L'augmentation initiale d'un facteur 10 de la concentration d'antranilate dans les milieux de culture des souches CHAΔkynA et CHAΔkynU suggère l'existence potentielle d'une voie enzymatique mineure de synthèse de l'antranilate.

Nous montrons dans ce travail que *Pa* est capable de produire et sécréter de la kynurénine, de l'acide kynurénique et de l'antranilate à des niveaux physiologiquement pertinents ( $\mu\text{M}$  à  $\text{mM}$ ) *ex vivo* en milieu riche, et de la 3-OH kynurénine à un moindre niveau de concentration. Des profils de sécrétion similaires sont retrouvés dans les milieux de culture d'une souche clinique de *Pa*. Nous avons ensuite étudié le profil de production des différents métabolites en fonction des souches *in vivo* dans un modèle murin d'infection respiratoire aigue.

## **2) Constatations *in vivo***

Dans les expériences menées *in vivo*, nous confirmons que la voie des kynurénines est essentielle à la production d'antranilate au cours de l'infection respiratoire aigue. L'augmentation des concentrations de 3-OH-antranilate dans les LBA des souris infectées avec la souche CHA, mais pas dans ceux des souris infectées avec les souches mutantes, confirme cette hypothèse. Ce résultat est en accord avec les données de Farrow *et al* qui montrent que la voie des kynurénines bactériennes revêt une importance particulière pour la production de PQS *ex vivo* dans un environnement riche en tryptophane (222). Lorsque la voie de l'antranilate est non fonctionnelle, la voie des kynurénines mène à la production d'acide kynurénique. L'augmentation précoce de la concentration d'acide kynurénique dans

les LBA des souris infectées par la souche CHAΔkynU à H12, mais non retrouvée à H24, est cohérente avec les données préalablement publiées sur l'activation transcriptionnelle du gène *kynA*, qui est surexprimé au cours des premières heures de contact entre *Pa* et les cellules immunitaires de l'hôte, puis retourne rapidement à son niveau transcriptionnel de base (154).

### **3) Rationnel pour un dialogue immunitaire inter-règne médié par la voie des kynurénines**

De manière intéressante, beaucoup de cellules eukaryotes produisent des métabolites de la voie des kynurénines, incluant l'antranilate, le 3-OH-antranilate, la kynurénine et l'acide kynurénique. Ces molécules possèdent des propriétés immunomodulatrices bien connues chez les mammifères (148). En plus de son implication dans la synthèse du PQS chez les bactéries, l'antranilate, ainsi que son métabolite le 3-OH-antranilate modulent les fonctions de certaines cellules immunes, comme les DC qu'elles activent, ou les lymphocytes T dont elles favorisent l'apoptose (310) (311) (312) (313) (312) (313). La kynurénine et l'acide kynurénique interfèrent avec le recrutement et les fonctions des cellules phagocytaires, diminuent l'immunogénicité des DC, et jouent un rôle dans la polarisation lymphocytaire. (154) (190) (151). Ces deux métabolites sont aussi des ligands connus de l'AhR, récepteur impliqué dans l'immunité des organes barrières (254). Les données générées *in vivo* suggèrent que l'expression de la voie des kynurénines à haut niveau par une souche bactérienne peut interférer avec le métabolisme global du tryptophane chez l'hôte au cours de l'infection pulmonaire aigüe (154), avec un impact possible sur la réponse immune de l'hôte (7). Le retentissement de l'activation de ces voies enzymatiques sur la physiopathologie de l'infection à *Pa* n'a pas encore été étudié et constitue la suite de ce travail.

## Chapitre 1: Etude de la voie des kynurénines chez *Pa*

### ➤ **Rationnel :**

Connaissance partielle des métabolites produits par *Pa ex vivo*

Aspect quantitatif de la production peu connu

Impact de l'activation de la voie des kynurénines de *Pa* au cours de l'infection *in vivo*?

### ➤ **Hypothèses :**

Possibilité de production d'autres métabolites que kynurénine et anthranilate?

Modulation du métabolisme global des kynurénines (hôte +bactéries) *in vivo*?

Concentrations physiologiquement pertinentes?

### ➤ **Méthode :**

Dosage par HPLC MS/MS des métabolites de la voie:

- *ex vivo* dans le milieu de culture
- *in vivo* dans le LBA et le tissu pulmonaire

### ➤ **Principaux résultats:**

*Ex vivo*:

. *Pa* produit de l'acide kynurénique et du 3-OH-kynurénine

. Métabolite final de la voie = anthranilate, mais = acide kynurénique si anthranilate synthase non fonctionnelle

. Concentrations :  $\mu\text{M}$  à  $\text{mM}$

*In vivo*:

. Voie essentielle à la production d'anthranilate

. Existence d'une voie additionnelle productrice d'acide kynurénique

. Interférences avec le métabolisme de l'hôte, modulation du métabolisme global de la voie des kynurénines

### ➤ **Principales limites:**

Présence des métabolites mais existence des enzymes non démontrée

Dosages tissulaires peu performants

Pas de distinction métabolites murins/bactériens

### ➤ **Perspectives immédiates:**

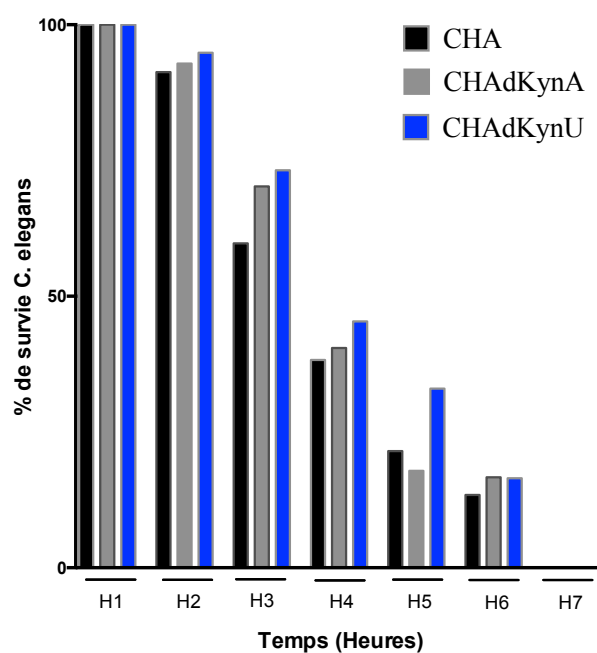
Possibilité d'interactions hôte-pathogènes via les métabolites de cette voie

## Chapitre 2 : Rôle de la voie des kynurenines bactériennes au cours de l'infection chez *C. elegans*

Afin de déterminer le rôle des kynurénines bactériennes au cours de l'infection, nous avons étudié la virulence des différentes souches dans un modèle d'infection utilisant le vers *C. elegans*. Ce modèle animal permet d'analyser la toxicité directe des métabolites d'intérêt sur les vers au cours d'une infection courte de quelques heures en milieu liquide (« *fast-killing* »), ainsi que leur rôle dans la virulence bactérienne lors d'une infection de plusieurs jours en milieu solide où les bactéries sont ingérées par les vers (« *slow-killing* »). Ces expérimentations ont été réalisées par l'équipe du Dr Lesouhaitier (EA 4312, Université de Rouen, France)

### 1) Les kynurénines bactériennes ne présentent pas de toxicité directe sur *C. elegans*

Au cours de l'expérience de *fast-killing* mettant en contact la souche CHA ou ses deux mutants CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU avec *C. elegans* en milieu liquide, on n'observe pas de différence de mortalité des vers entre les souches. La voie des kynurénines bactériennes n'est donc pas responsable de la production de métabolites toxiques pour le vers, et n'influe pas sur la sécrétion d'autres facteurs directement cytotoxiques (**Figure 8**).



**Figure 8:** Test de *fast-killing* avec les souches CHA, CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU. *C. elegans* est exposé aux souches de *Pa* CHA (barre noire), CHA $\Delta$ kynA (barre grise) et CHA $\Delta$ kynU (barre bleue) en milieu liquide pendant plusieurs heures. Les vers vivants sont dénombrés chaque heure. Test du log-rank. Il n'existe pas de

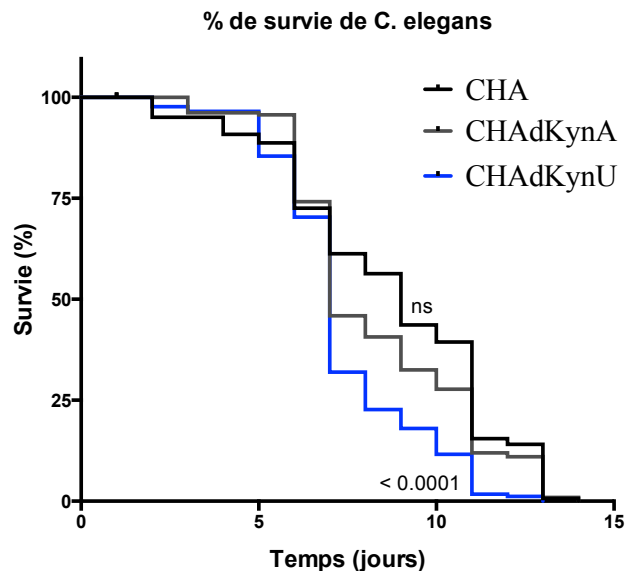


différence significative de mortalité des vers entre les trois groupes. CHA, n= 149 ; CHA $\Delta$ kynA, n= 84 ; CHA $\Delta$ kynU, n= 97. Une expérience représentative sur deux expériences. Analyse statistique réalisée par le test du log-rank.

## 2) Les kynurénines bactériennes sont impliquées dans la virulence de *Pa* au cours de l'infection

Lors de l'exposition des vers aux souches CHA, CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU dans le modèle du *slow-killing* sur gélose enrichie en tryptophane, on constate qu'il n'y a pas de différence de mortalité des vers au cours de l'infection avec les souches CHA et CHA $\Delta$ kynA. En revanche, la mortalité des vers infectés avec la souche CHA $\Delta$ kynU augmente par rapport aux vers infectés avec les souches CHA $\Delta$ kynA et CHA ( $p < 0,0001$ ) (**Figure 9**).

Ces résultats suggèrent que la surproduction de kynurénines joue un rôle dans la virulence de *Pa*, mais que la production d'anthranilate et des facteurs de virulence qui en découlent n'a pas d'impact sur le pronostic de l'infection dans ce modèle animal.



**Figure 9:** Test de *slow-killing* avec les souches CHA, CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU. *C. elegans* est exposé aux souches CHA (ligne noire), CHA $\Delta$ kynA (ligne grise) et CHA $\Delta$ kynU (ligne bleue) en milieu solide enrichi en tryptophane pendant plusieurs jours. Les vers vivants sont dénombrés chaque jour. Une expérience représentative sur trois expériences effectuées. CHA vs CHA $\Delta$ kynA : ns. CHA $\Delta$ kynU vs CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU vs CHA :  $p < 0,0001$ . CHA, n= 282 ; CHA $\Delta$ kynA, n= 417 ; CHA $\Delta$ kynU, n= 343. Analyse statistique réalisée par le test du log-rank.

## ***Discussion***

Bien qu'il soit un modèle d'étude rudimentaire, l'infection de *C. elegans* par *Pa* a déjà fait ses preuves dans l'identification de facteurs de virulence bactériens. Après ingestion, l'interaction des pathogènes avec les cellules épithéliales intestinales dotées d'un système immunitaire primitif détermine le pronostic de l'infection (278,285,286). Le système de défense inductible de *C. elegans* permet la reconnaissance des pathogènes par les PRR, l'activation de voies de signalisation spécifiques du pathogène et la production de composés antimicrobiens.

Comparé au fastkilling, le slowkilling est le modèle se rapprochant le plus de l'infection chez le mammifère et semble le plus adapté pour étudier les facteurs de virulence non cytotoxiques de *Pa* (314) (277,286). Le slowkilling est également le modèle de choix utilisé pour l'étude de l'implication des voies de signalisation du système immunitaire de *C. elegans* au cours de l'infection à *Pa* (288,315,316). La comparaison de la pathogénicité de la souche PA14 et de plusieurs mutants dans ce modèle par rapport aux modèles murins d'infection respiratoire aigue ou aux modèles végétaux retrouve une grande similitude de la virulence des souches chez les différents hôtes (286). Ces résultats sont retrouvés à plusieurs reprises par différentes équipes (317,318), renforçant l'idée que *C. elegans* est un modèle efficace pour identifier les gènes de *Pa* impliqués dans la pathogénicité chez les mammifères (319).

Dans ce travail, la délétion du gène *kynU* de *Pa* augmente la mortalité des vers, suggérant que ce gène et la kynuréninase qu'il code sont impliqués dans la pathogénicité de *Pa* chez le mammifère. L'absence de différence de mortalité entre les vers infectés par les souches CHA et CHA $\Delta$ kynA ne permet pas de mettre en évidence un rôle pathogène de la voie de l'antranilate dans ce modèle. Néanmoins, le modèle d'infection de *C. elegans* peut être pris en défaut et l'étude du rôle de l'immunité innée, en l'absence d'effecteurs cellulaires, reste très limitée. C'est pourquoi la suite des expériences de ce travail a été menée chez la souris, dans notre modèle d'infection respiratoire aigue.

## **Chapitre 2: Rôle de la voie des kynurenines bactériennes au cours de l'infection chez *C. elegans***

### ➤ **Rationnel :**

*C. elegans* = modèle de cytotoxicité (“fast-killing”) et modèle prédictif de la virulence bactérienne chez la souris (“slow-killing”)

Tester l'impact de la voie des kynurénines bactériennes dans ce modèle

### ➤ **Hypothèses :**

L'activation de la voie des kynurénines bactériennes module la virulence de *Pa*

### ➤ **Méthode :**

Infection de *C. elegans* (“fast-killing” et “slow-killing”) par CHA, CHAΔkynA et CHAΔkynU et observation de la mortalité des vers

### ➤ **Principaux résultats:**

Fast-killing: pas de différence de mortalité. Métabolites non cytotoxiques dans ce modèle

Slow-killing:

- surmortalité avec CHAΔkynU (production d'acide kynurénique, pas d'anthranilate)
- pas de différence de mortalité CHA/CHAΔkynA

### ➤ **Principales limites:**

Modèle rudimentaire

Pas d'immunité cellulaire

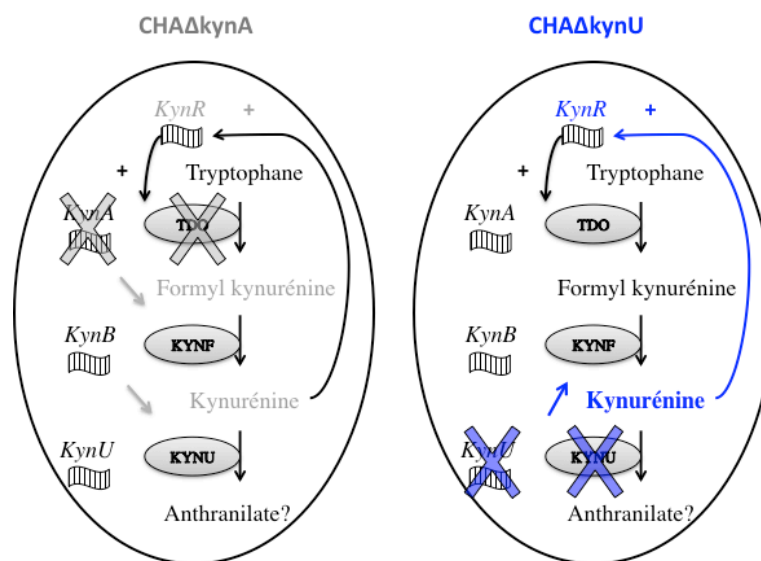
### ➤ **Perspectives immédiates:**

Certains métabolites de la voie (acide kynurénique) pourraient moduler la virulence de *Pa* chez la souris

Confirmation dans le modèle murin d'infection respiratoire aigue

## Chapitre 3 : Rôle des kynurénines bactériennes dans un modèle murin d'infection respiratoire aigue

Comme expliqué précédemment, le rôle des kynurénines bactériennes (kynurénine, 3-OH-kynurénine et acide kynurénique) est étudié en comparant à H12 et H24 les paramètres de l'infection respiratoire aigue provoquée par les souches CHA $\Delta$ kynA par rapport à CHA $\Delta$ kynU (cf figure de rappel). Lorsqu'ils ont été réalisés de manière concomitante, les résultats des expériences avec la souche CHA sont également présentés pour référence.



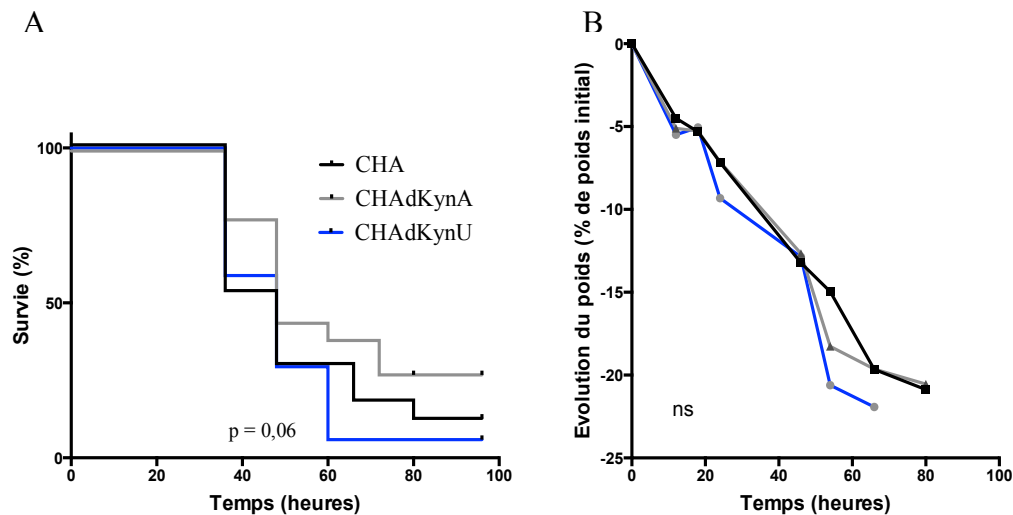
### Rappel des voies métaboliques

TDO : Tryptophane 2,3 dioxygénase, KYNF : kynurénine formamidase, KYNU : kynuréninase, *kynR* : régulateur transcriptionnel activant la transcription de la TDO lors d'une stimulation par la kynurénine

#### 1) La production de kynurénines par les bactéries diminue la survie des souris

La survie des souris infectées par la souche CHA $\Delta$ kynU tend à être diminuée par rapport à celles infectées par la souche CHA $\Delta$ kynA ( $p=0,06$ , test du log-rank) (**Figure 10**). Bien que non statistiquement significatif, ce résultat suggère que les kynurénines (kynurénine, 3-OHkynurénine et acide kynurénique) pourraient être impliquées dans la pathogénèse de l'infection respiratoire aigue. La difficulté de mettre en évidence l'impact de la production des kynurénines par *Pa* sur la survie provient du fait que cette bactérie possède de nombreux autres facteurs de virulence aux effets souvent redondants voire prépondérants. Parmi ces facteurs, le SST3 est un facteur déterminant de la virulence de la souche par la sécrétion

d'exotoxines cytotoxiques, ce qui est bien démontré pour la souche CHA. La mise en jeu au cours de l'infection de ces différents facteurs de virulence peut donc en partie « masquer » l'action des kynurénines, dont les effets ne sont pas cytotoxiques mais plutôt immunomodulateurs. Cela reste vrai même si on considère que la voie des kynurénines conditionne la production de PQS, dont l'implication dans la virulence n'a jamais été clairement démontrée au cours de l'infection respiratoire aigue.



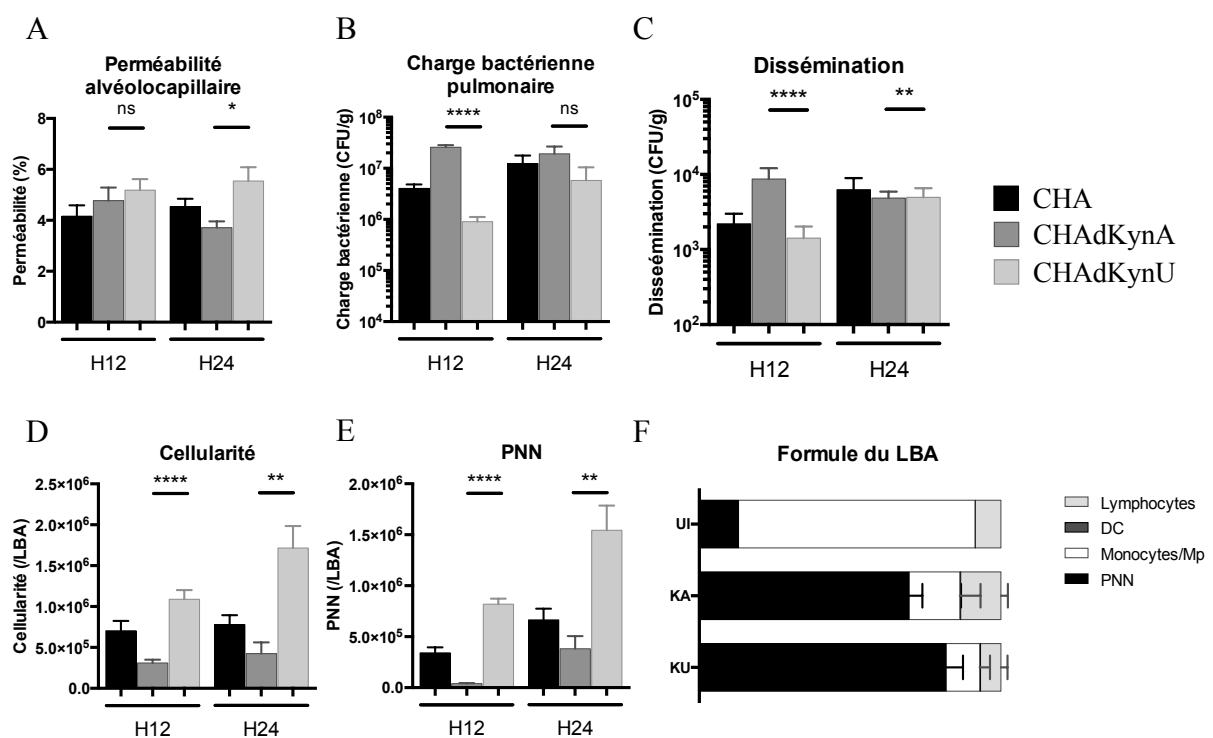
**Figure 10: Rôle de la production des kynurénines bactériennes dans un modèle de survie à 96 heures et sur l'évolution du poids.** **A.** Survie des souris en fonction du temps pour les souches CHAΔkynA (ligne grise) et CHAΔkynU (ligne bleue). La souche CHA est donnée en contrôle. Il existe une tendance à une meilleure survie des souris infectées par la souche CHAΔkynA par rapport à la souche CHAΔkynU ( $p= 0,06$ ). Analyse statistique réalisée par le test du log-rank. N = 18 souris par groupe. **B.** Evolution du poids. Il n'y a pas de différence d'évolution du poids entre les souris infectées par les différentes souches. N= 6 souris par groupe, une expérience représentative de 3 effectuées.

## 2) La production de kynurénines par les bactéries augmente le recrutement intra-alvéolaire de PNN

Dans le même modèle, nous avons étudié l'évolution du processus infectieux en fonction de la souche bactérienne aux moyens de plusieurs paramètres (**Figure 11**). La perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire, reflétant l'intensité de la lésion tissulaire pulmonaire, est un paramètre qui dépend à la fois de la virulence bactérienne et de la réponse immune de l'hôte. L'étude des charges bactériennes pulmonaires et spléniques permettant d'estimer la clairance bactérienne d'une part et la dissémination bactérienne extra-pulmonaire de l'autre. L'étude de la cellularité du LBA et de sa formule constitue une première approche de la réponse immune de l'hôte.

Deux profils évolutifs distincts semblent se dessiner pour l'infection à CHAΔkynU par rapport à CHAΔkynA. Lors de l'infection par la souche CHAΔkynU, la perméabilité de la

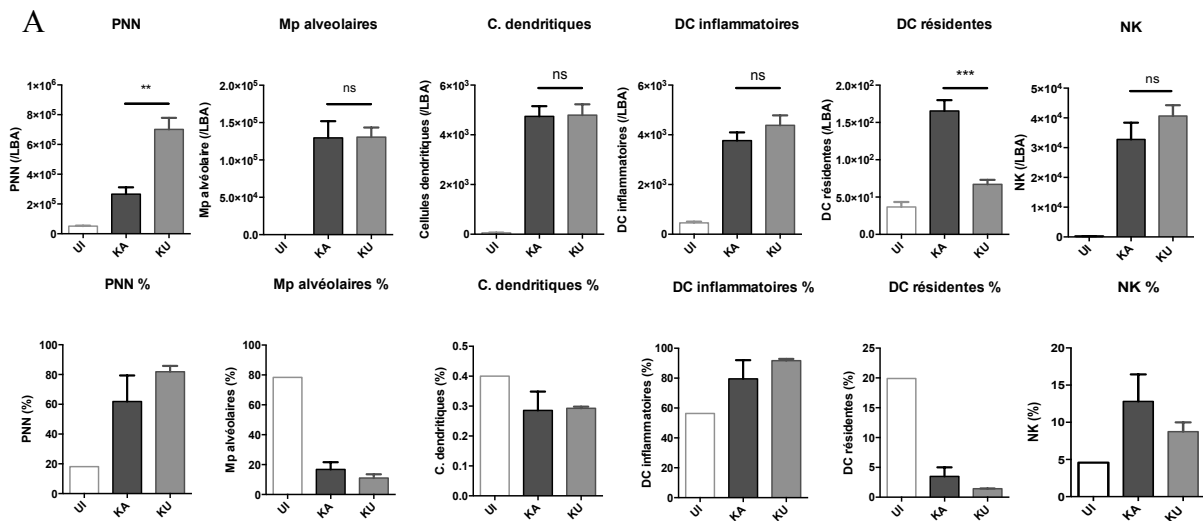
barrière alvéolo-capillaire est augmentée à H24, suggérant une majoration de la lésion pulmonaire lors de l'infection par une souche bactérienne produisant des kynurénines (**Figure 11A**). La charge bactérienne pulmonaire et la dissémination sont diminuées à H12, mais identiques à H24 (**Figure 11 B,C**). Egalement, on constate une augmentation franche du recrutement cellulaire alvéolaire et notamment des PNN aux deux temps, avec jusqu'à deux fois plus de PNN à H24 (**Figure 11 D,E,F**). Ce résultat pourrait en partie expliquer la plus grande clairance bactérienne initiale pour ce groupe, avec un recrutement initial de PNN suffisant pour clairer les bactéries sans aggraver la lésion, mais un recrutement qui se poursuit au-delà jusqu'à des niveaux de PNN pouvant aggraver la lésion pulmonaire à H24. Lors de l'infection par la souche CHA $\Delta$ kynA, on observe au contraire une cellularité diminuée aux deux temps, associée à une hausse de la charge bactérienne pulmonaire à H12, mais une atténuation de la lésion de la barrière alvéolo-capillaire à H24 (**Figure 11**), soit les phénomènes inverses de ceux observés avec CHA $\Delta$ kynU. Ces observations opposées liées aux délétions ayant des effets inverses sur la production de Kynurénine suggèrent fortement que les kynurénines bactériennes ont un rôle immunomodulateur sur le recrutement cellulaire, notamment des PNN à l'origine de leur implication dans la pathogénicité de *Pa*.

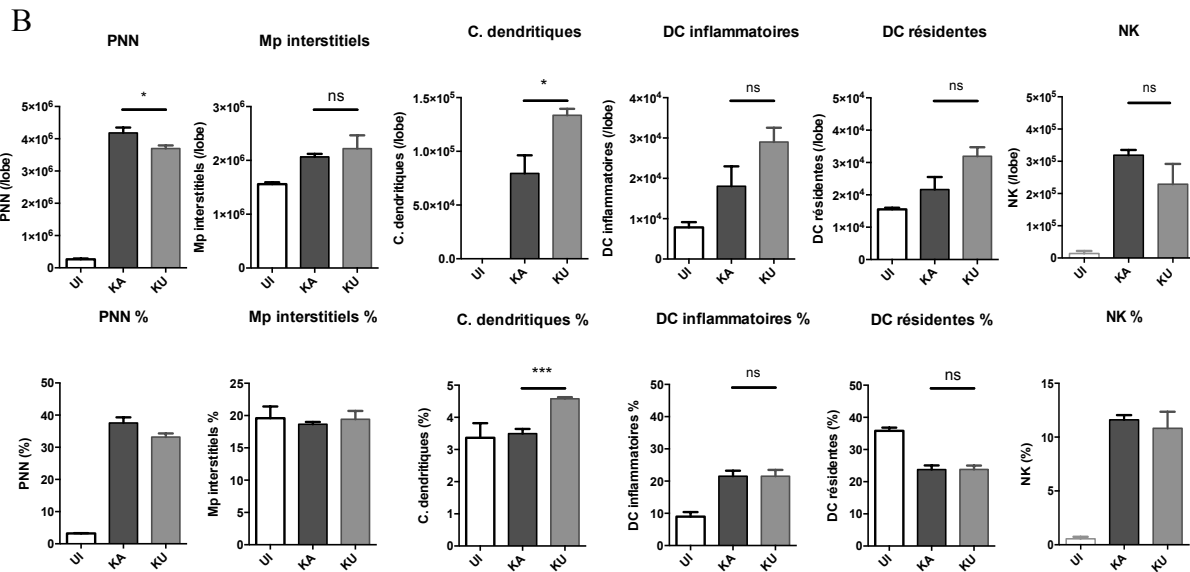


**Figure 11: Effet des kynurénines bactériennes sur l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte. A, B, C, D, E, F** Comparaison de l'évolution de la pneumonie à H12 et H24 d'infection respiratoire aigüe induite par les souches CHA $\Delta$ kynA (gris foncé) et CHA $\Delta$ kynU (gris clair), la souche CHA (noir) est donnée pour référence. **A**, perméabilité alvéolo-capillaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC **B**, charge bactérienne pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires **C**, dissémination bactérienne en UFC par gramme de rate

estimée par étalement et dilution d'homogénats spléniques **D**, cellularité du LBA mesurée par compte à l'état frais du culot cellulaire sur lame de Malassez **E**, recrutement alvéolaire des PNN mesuré par numération sur lame après coloration au MGG du culot cellulaire (n=5 par groupe, expériences représentatives de 3 effectuées) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne **F**, formule du LBA réalisée par cytométrie en flux à H12 de l'infection, une expérience effectuée par cytométrie en flux à H12.

Le détail du recrutement cellulaire alvéolaire et pulmonaire a ensuite été étudié par cytométrie en flux à H12 de l'infection (**Figure 12**). Pour chaque type cellulaire, les résultats sont présentés en valeur absolue de cellules (figure supérieure) et en % de cellules CD45+ (figure inférieure). On observe une majoration du recrutement des PNN vers le compartiment alvéolaire au cours de l'infection avec la souche CHAΔkynU ( $7.10^5$  vs  $3.10^5$  PNN/LBA), ainsi qu'une diminution du nombre de DC résidentes (**Figure 12A**). De manière concomitante, on note une baisse des PNN dans le tissu pulmonaire des souris infectées avec la souche CHAΔkynU ( $3,7.10^6$  vs  $4,5.10^6$ /lobe pulmonaire). Il n'y a pas de différence entre les groupes pour les macrophages et les cellules NK, que ce soit dans le LBA ou les cellules pulmonaires. Ces résultats suggèrent un recrutement de PNN depuis les vaisseaux pulmonaires vers les alvéoles au cours de l'infection avec la souche CHAΔkynU.



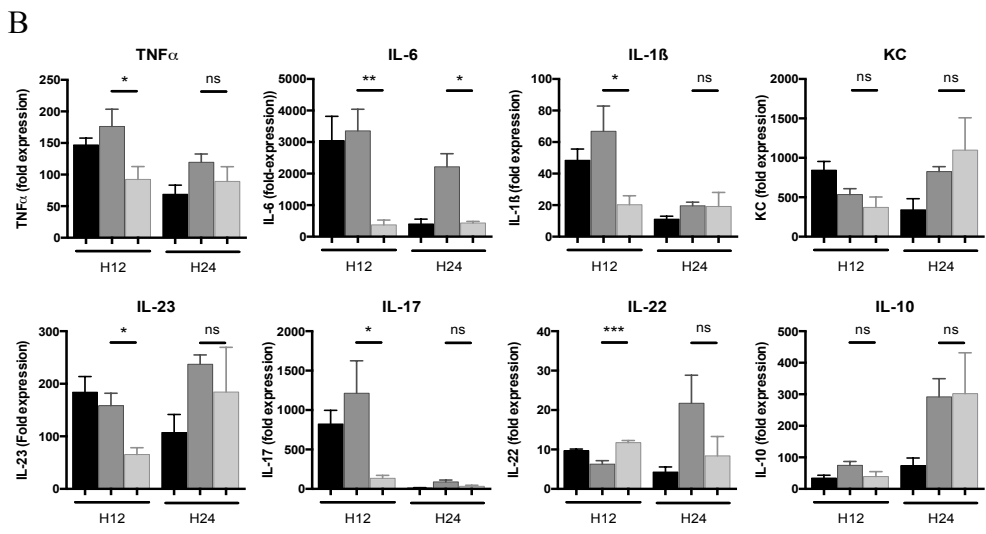
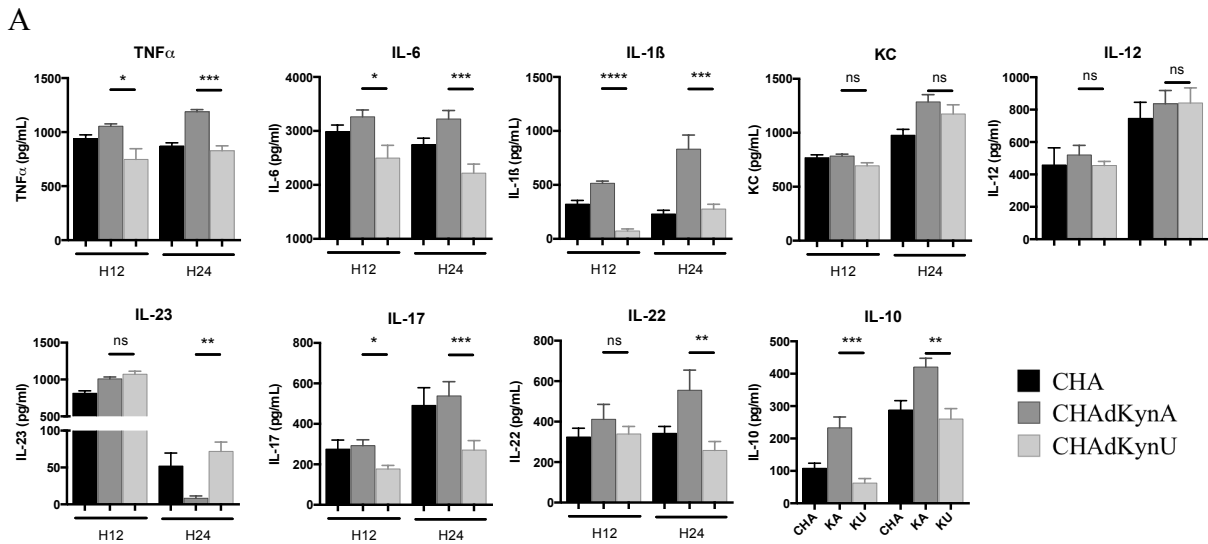
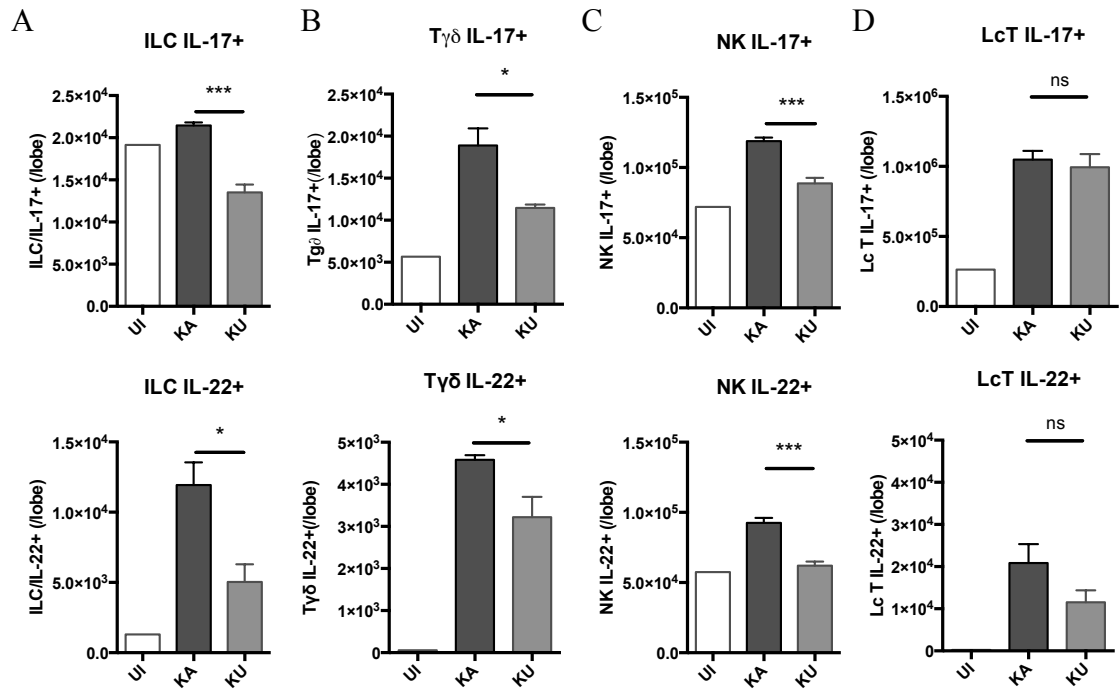


**Figure 12: Effets des kynurénines bactériennes sur la réponse immunitaire cellulaire pulmonaire et alvéolaire.** A, B populations cellulaires étudiées par cytométrie en flux à H12 de l'infection par les souches CHAΔkynA (gris foncé) et CHAΔkynU (gris clair) et les souris contrôles non infectées (blanc) présentées en valeur absolue (graphique supérieur) et en % des cellules CD45+ (graphique inférieur). PNN : polynucléaires neutrophiles, Mp : macrophages, DC : cellules dendritiques, NK : cellules natural killer A, étude des populations cellulaires du LBA B, étude des populations cellulaires des cellules pulmonaires totales (n=5 par groupe, une expérience effectuée) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne

### 3) La production de kynurénines par les bactéries diminue la réponse cytokinique pro-inflammatoire à H12 et H24

L'évaluation de la réponse inflammatoire de l'hôte par dosage des cytokines dans les surnageants des LBA par méthodes ELISA, ainsi que par mesure des transcrits de ces cytokines dans le tissu pulmonaire par RT-QPCR, retrouve deux profils de production cytokiniques distincts entre les souches. On constate une atténuation de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17) ainsi que de l'IL-10 et de l'IL-22 lors de l'infection par la souche CHAΔkynU par rapport à CHAΔkynA. Par contre, on note pour ce groupe une augmentation à H24 de IL-23 par rapport à l'infection par CHAΔkynA (Figure 13). Le recrutement des PNN ne semble donc pas médié par les chémokines classiquement impliquées dans le recrutement alvéolaire des PNN. D'autres hypothèses, notamment l'implication de l'AhR et de l'IDO, seront explorées dans la suite de ce travail.

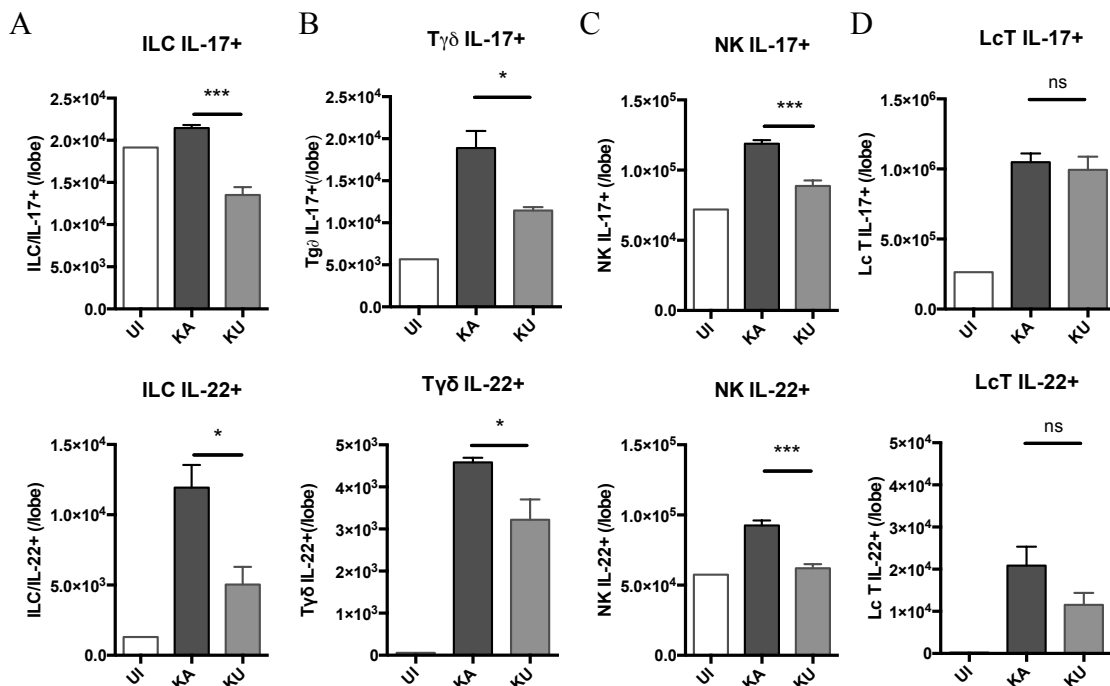




**Figure 13: Analyse de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë comparant des souris *Wt* infectées avec la souche CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU. A, B, comparaison des réponses cytokiniques entre les souches CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU à H12 et H24, la souche CHA est donnée comme contrôle. A, dosage du TNF $\alpha$ , de l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , KC, IL-23, IL-17A, IL-22, IL-10 dans les surnageants des LBA par méthode ELISA (n=5 par groupe, expériences représentatives de 3 effectuées) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne. B, analyse par QPCR des transcrits des cytokines TNF $\alpha$ , de l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , KC, IL-23, IL-17A, IL-22, IL-10 des cellules pulmonaires totales (n=5 par groupe, expériences représentatives de 3 effectuées) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.**

#### 4) La production de kynurénines bactériennes diminue la synthèse d'IL-17 et d'IL-22 à H24 par les cellules lymphocytaires

L'analyse par cytométrie en flux des cytokines IL-17 et IL-22 intracellulaires des cellules lymphocytaires ILC, T $\gamma\delta$ , NK et Lc T montre que le nombre de cellules pulmonaires productrices de ces deux cytokines est diminué à H24 de l'infection avec la souche CHA $\Delta$ kynU (**Figure 14**). Ce résultat est cohérent avec les mesures des niveaux cytokiniques d'IL-17 et d'IL-22 dans le LBA et ainsi que de leurs transcrits dans le tissu pulmonaire. Les kynurénines bactériennes permettent donc de moduler la réponse IL-17 et IL-22 dont le rôle dans le maintien de l'intégrité et la réparation épithéliale est connu (113).

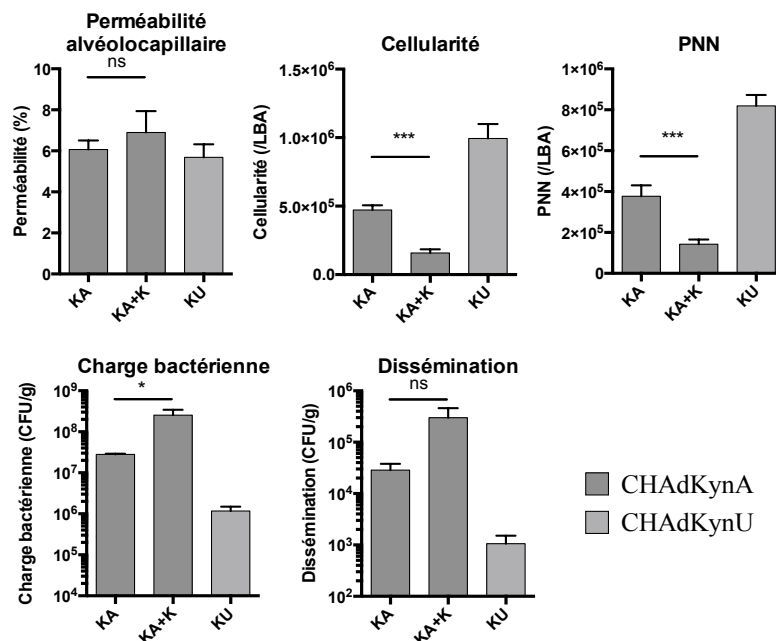


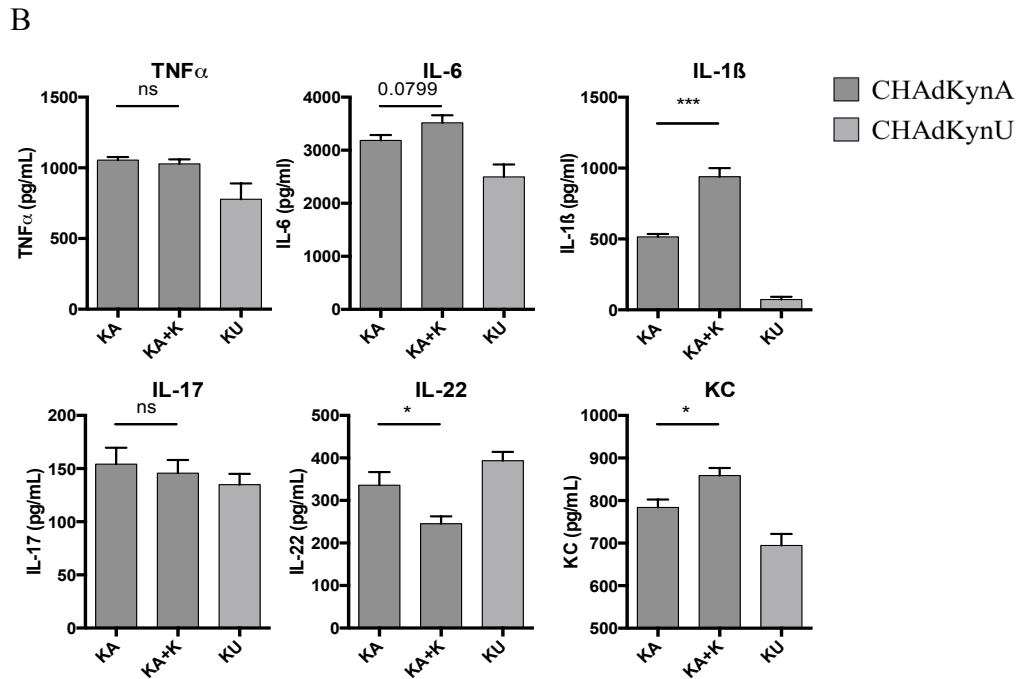
**Figure 14: Analyse des cellules pulmonaires productrices d'IL-17 et d'IL-22.** Mesure par cytométrie en flux du nombre de cellules pulmonaires productrices d'IL-17 (en haut) et d'IL-22 (en bas) A, Innate lymphoid cells B, Lymphocytes T $\gamma\delta$  C, Cellules Natural Killer D, Lymphocytes T totaux. Ns : non significatif \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

## 5) Effets de la supplémentation en L-kynurénine au cours de la pneumonie aigüe à *Pa*

Afin de confirmer l'implication des kynurénines dans la modulation de la réponse immune de l'hôte, nous avons tenté de reproduire le profil de réponse observé avec la souche CHAΔkynU en infectant les souris avec la souche CHAΔkynA (non productrice de kynurénine), avec une co-instillation unique initiale d'une dose de 2mM de L-kynurénine de synthèse par voie intranasale. L'évaluation de l'effet de cette instillation est réalisée à H12 de l'infection (**Figure 15**). On constate que la supplémentation administrée en dose unique de L-kynurénine ne permet pas de reproduire le phénotype observé lors de l'infection par la souche CHAΔkynU, mais entraîne au contraire une diminution du recrutement alvéolaire des PNN et de la clairance bactérienne pulmonaire, alors qu'elle s'associe à une majoration de la production d'IL-1β, de KC dans le surnageant des LBA. On note une diminution concomitante de l'IL-22. Les variations de dose et de durée d'exposition (entre une dose unique élevée et une production de plus faible intensité mais soutenue au cours du temps) des cellules immunes aux kynurénines, peuvent être responsables des différences observées entre l'infection à CHAΔkynU et CHAΔkynA+L-kynurénine de synthèse.

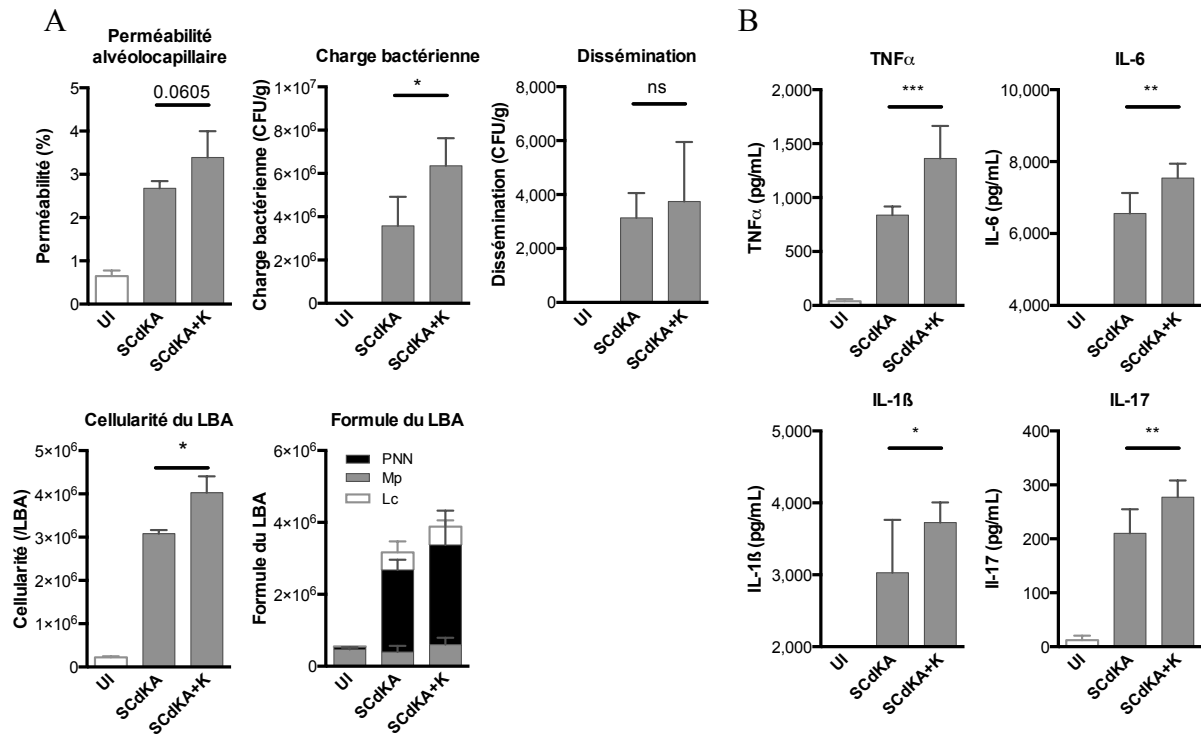
A





**Figure 15: Effets des kynurénines de synthèse sur l'évolution du processus infectieux et la réponse immune à H12. A,B** Comparaison de l'infection par les souches CHA $\Delta$ kynA (KA, gris foncé) CHA $\Delta$ kynA avec ajout de 2mM de L-kynurénine de synthèse au moment de l'instillation de la suspension bactérienne (KA+K, gris foncé), et CHA $\Delta$ kynU (KU, gris clair) à H12 de l'infection **A**, perméabilité alvéolo-capillaire (%), cellularité du LBA, recrutement alvéolaire des PNN, charge bactérienne pulmonaire en UFC par gramme de poumon, dissémination bactérienne en UFC par gramme de rate **B**, comparaison des réponses cytokiniques au cours de l'infection à CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynA + L-kynurénine de synthèse par dosage du TNF $\alpha$ , de l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-22 et KC dans les surnageants des LBA par méthode ELISA (n=5 par groupe, une expérience effectuée) \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne

La même expérience a été réalisée à H24 en infectant les souris avec la souche clinique (SC) SST3-, productrice à l'état sauvage de kynurénines (data C. Genestet *et al.* (154)), et la même souche délétée pour le gène kynA (SCA $\Delta$ kynA). On constate une exacerbation de la réponse inflammatoire lors de l'administration de L-kynurénine à H24, avec augmentation du recrutement des PNN alvéolaires et des taux de cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , de l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et IL-17A (**Figure 16**). Cette réponse semble inadaptée car elle ne permet pas de clarifier efficacement les pathogènes, comme le montre la diminution de la clairance bactérienne, et semble générer des dommages tissulaires vue la tendance à l'augmentation de la lésion alvéolo-capillaire dans ce groupe.



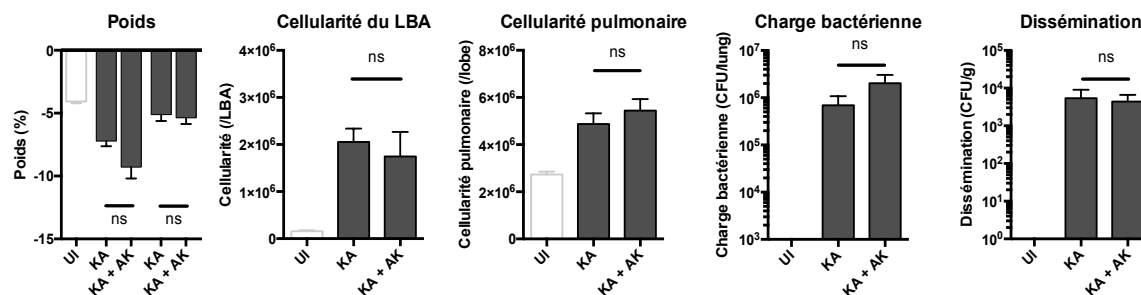
**Figure 16: Effets des kynurénines de synthèse sur l'évolution du processus infectieux et la réponse immune à H24.** A,B Comparaison à H24 de l'infection par les souches SCΔkynA (SCdKA) et SCΔkynA avec ajout de 2mM de L-kynurénine de synthèse au moment de l'instillation de la suspension bactérienne (SCdKA+K), et souris contrôles instillées au PBS (UI) A, perméabilité alvéolo-capillaire (%), cellularité du LBA, formule du LBA effectuée par coloration MGG sur lame, charge bactérienne pulmonaire en UFC par gramme de poumon, dissémination bactérienne en UFC par gramme de rate B, comparaison des réponses cytokiniques au cours de l'infection à SCΔkynA et SCΔkynA + L-kynurénine de synthèse par dosage du TNFα, de l'IL-6, l'IL-1β et IL-17A dans les surnageants des LBA par méthode ELISA (n=5 par groupe, une expérience effectuée) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

## 6) Effets de la supplémentation en acide kynurénique au cours de la pneumonie aiguë à *Pa*

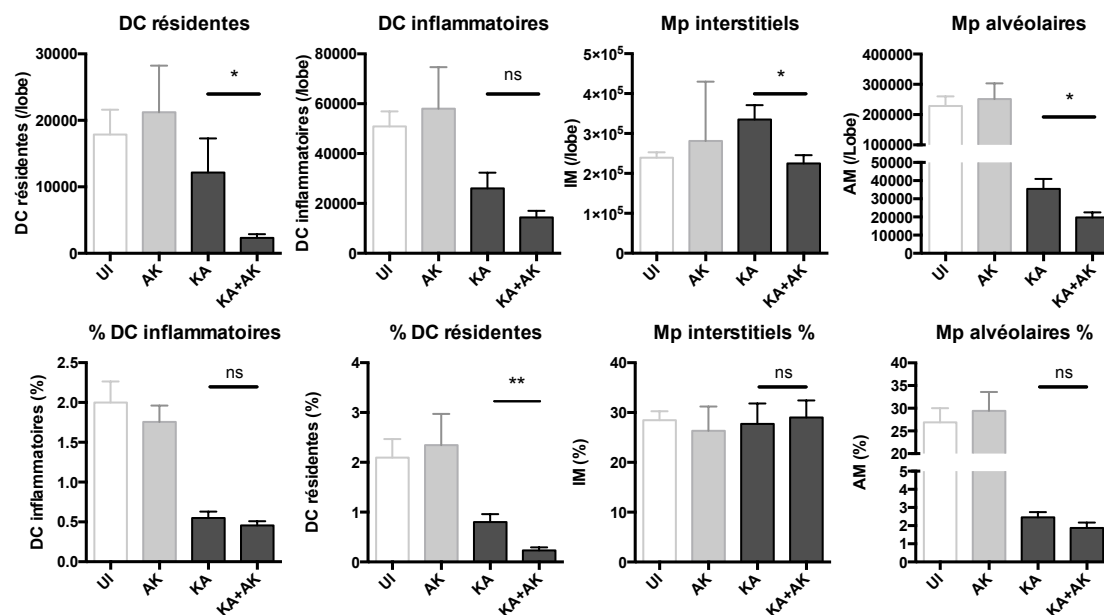
Au vu des résultats des dosages des métabolites de la voie des kynurénines effectués dans le LBA et le tissu pulmonaire qui retrouvent une augmentation de l'acide kynurénique lors de l'infection avec la souche CHAΔkynU par rapport à CHAΔkynA (cf chapitre 1, Figure 6), nous avons ensuite testé l'effet de la co-instillation d'une dose unique initiale de 2mM d'acide kynurénique de synthèse au moment de l'infection par la souche CHAΔkynA. Comme pour la L-kynurénine, l'administration en dose unique d'acide kynurénique ne permet pas de reproduire à H24 le phénotype de l'infection entraînée par la souche CHAΔkynU. Il n'y a pas de différence dans l'évolution pondérale, le recrutement cellulaire pulmonaire et alvéolaire, la charge bactérienne pulmonaire ou la dissémination extra-pulmonaire entre les deux groupes (Figure 17A). L'analyse des populations cellulaires par cytométrie en flux retrouve une diminution du nombre des APC puisque les DC résidentes et les macrophages sont diminués dans le groupe CHAΔkynU (Figure 17B). En revanche, comme lors de

l'administration de L-kynurénine, on constate une augmentation des transcrits des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 $\beta$  et KC (**Figure 17C**), ainsi qu'une augmentation globale des concentrations cytokiniques dosées par ELISA dans les surnageants des tissus pulmonaires (**Figure 17B**). Les dosages cytokiniques dans le LBA ne sont pas disponibles pour cette expérience.

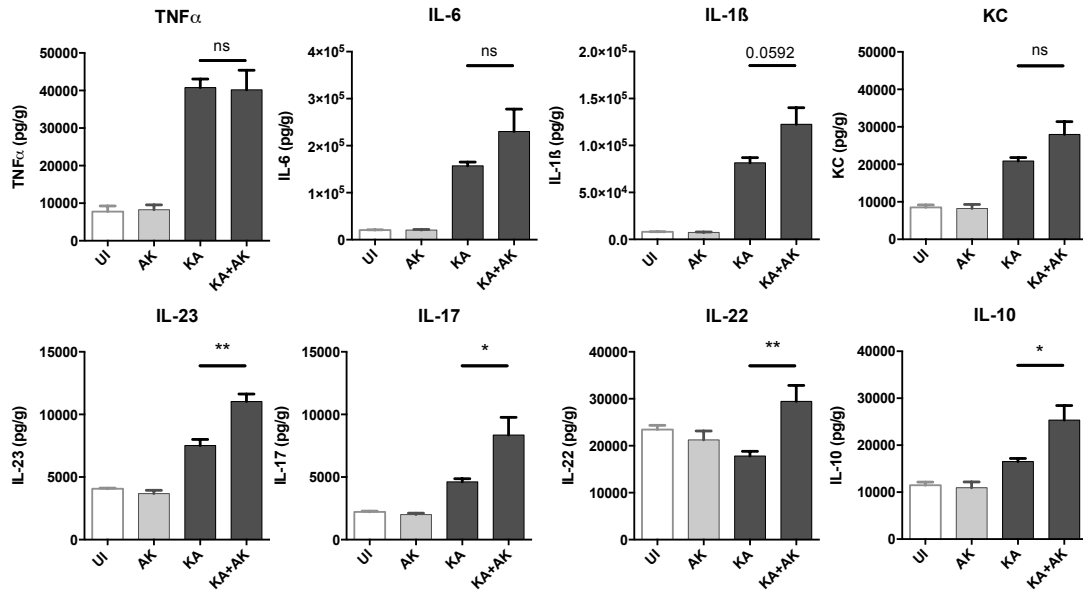
A



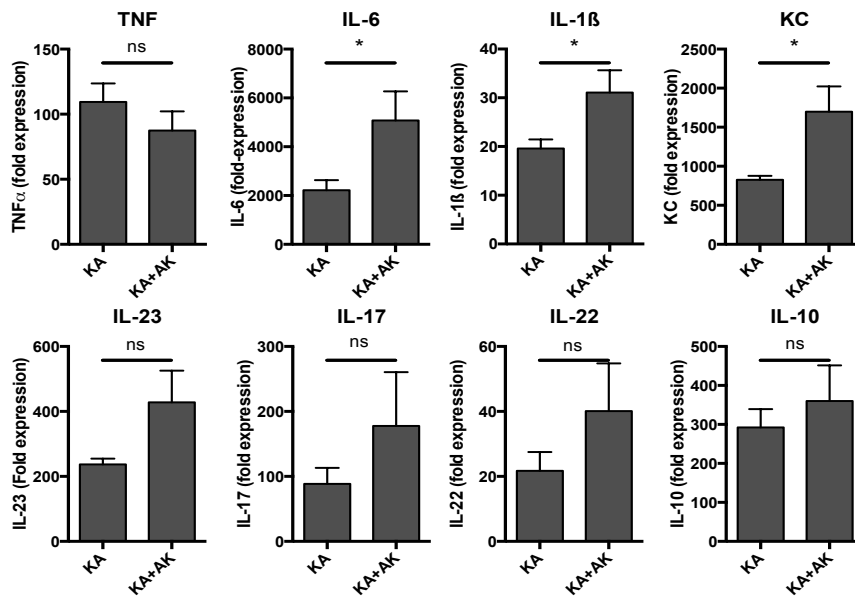
B



C



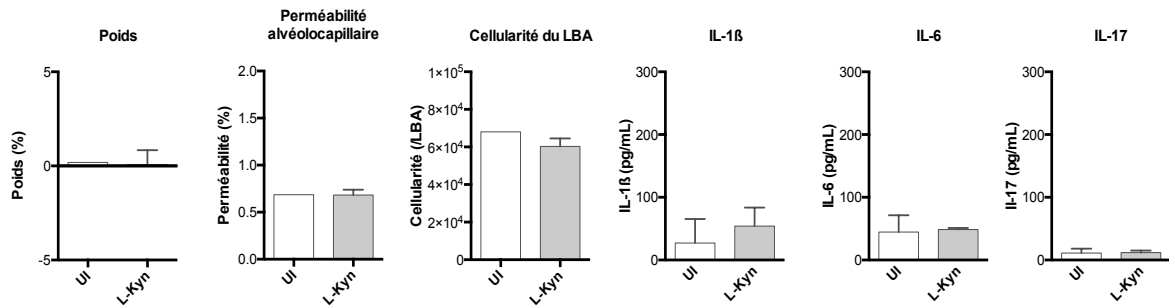
D



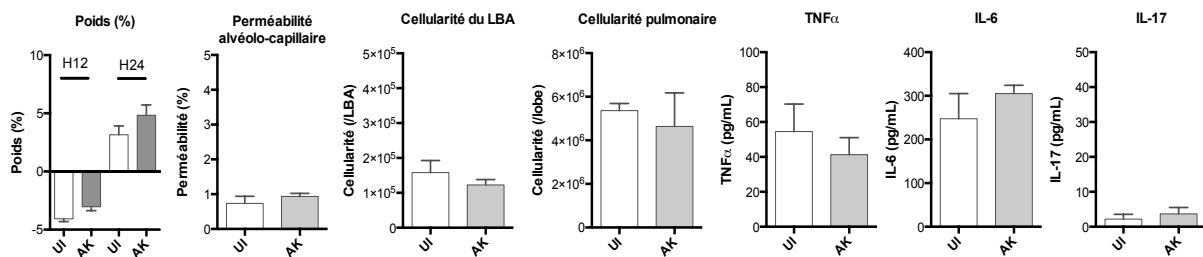
**Figure 17: Effets de l'acide kynurénique de synthèse sur l'évolution du processus infectieux et la réponse immunitaire à H24.** A,B,C,D Comparaison de l'évolution du processus infectieux et de la réponse immunitaire à H24 de l'infection par les souches CHA $\Delta$ kynA (KA) et CHA $\Delta$ kynA avec ajout de 2mM d'acide kynurénique de synthèse au moment de l'instillation de la suspension bactérienne (KA+AK) **A**, évolution de la variation du poids par rapport au poids initial en fonction du temps, cellularité du tissu pulmonaire et du LBA, charge bactérienne pulmonaire en UFC par lobe pulmonaire, dissémination bactérienne en UFC par gramme de rate **B**, analyse des DC et macrophages pulmonaires par cytométrie en flux chez les souris infectées avec la souche CHA $\Delta$ kynA (KA, gris foncé), CHA $\Delta$ kynA et ajout d'acide kynurénique (KA+AK, gris foncé), souris contrôles instillées avec du PBS (blanc) ou de l'acide kynurénique seul (AK, gris clair) **C**, comparaison des réponses cytokiniques entre les groupes par dosage du TNF $\alpha$ , de l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , KC, IL-23, IL-17A, IL-22 et IL-10 dans les surnageants de broyat de tissu pulmonaire par méthode ELISA. Les souris contrôles sont instillées avec du PBS (UI) ou de l'acide kynurénique seul (AK) **D**, analyse par RT-QPCR des transcrits des cytokines TNF $\alpha$ , de l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , KC, IL-23, IL-17A, IL-22 et IL-10 des cellules pulmonaires totales (n=5 par groupe, une expérience effectuée) \*p<0,05 \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne sauf pour les QPCR ou elle représente l'écart standard à la moyenne.

Ci-dessous sont présentées les souris contrôles instillées avec de la L-kynurénine (**Figure 18A**) ou de l'acide kynurénique (**Figure 18B**) seuls, comparées aux souris instillées avec du PBS seul, sans qu'on retrouve de différence sur les paramètres étudiés.

A



B



**Figure 18: Contrôle de l'absence de toxicité directe de l'instillation pulmonaire de L-kynurénine et d'acide kynurénique de synthèse.** A, B, Etude de l'effet de l'instillation pulmonaire d'une molécule de synthèse sur l'évolution du poids, de la perméabilité alvéolocapillaire, de la cellularité alvéolaire et de la concentration alvéolaire de cytokines pro-inflammatoires à H24. A, Comparaison de l'effet de l'instillation de 2 mM de L-kynurénine (L-kyn) de synthèse (gris clair) à l'instillation du même volume de PBS (UI, blanc). B, Comparaison de l'effet de l'instillation de 2 mM d'acide kynurénique (AK) de synthèse (gris clair) à l'instillation du même volume de PBS (UI, blanc).



## Chapitre 3 : Rôle des kynurénines bactériennes dans un modèle murin d'infection respiratoire aigue

### Partie 1-Rôle des kynurénines de *Pa* dans l'évolution du processus infectieux et la réponse immune

#### ➤ **Rationnel :**

*Pa* produit des métabolites de la voie des kynurénines en quantités physiologiquement « pertinentes »

Ces métabolites modulent la virulence bactérienne chez *C.elegans*

=> Impact de l'activation de cette voie dans le modèle murin d'infection respiratoire aiguë

#### ➤ **Hypothèses :**

Les kynurénines bactériennes (surtout acide kynurénique) influent sur l'évolution du processus infectieux

#### ➤ **Méthode:**

1- Modèle murin d'infection respiratoire aigue à CHAΔkynA vs CHAΔkynU

Etude de la survie et des divers paramètres infectieux et de réponse immune à H12 et H24

2- Infection à CHAΔkynA et ajout de L-kynurénine ou d'acide kynurénique de synthèse

#### ➤ **Principaux résultats:**

1- La production de kynurénines (acide kynurénique) par les bactéries:

. diminue la survie des souris

. augmente le recrutement alvéolaire des PNN sans augmentation des taux des chémokines

. diminue le recrutement des APC

. augmente la perméabilité alvéolo-capillaire

2- La co-instillation des molécules de synthèse (L-kynurénine et acide kynurénique) avec

CHAΔkynA ne permet pas de reproduire le phénotype observé avec CHAΔkynU

#### ➤ **Principales limites:**

Effets des kynurénines (non cytotoxiques) probablement en partie masqués par d'autres facteurs de virulence bactériens (SST3)

Pas de résultat histologique mettant en évidence une majoration des lésions chez CHAΔkynU

Administration des molécules de synthèse en dose unique peu comparable à la production continue de *Pa*

#### ➤ **Perspectives immédiates:**

Exploration mécanistique: rôle de l'AhR et de l'IDO

Intérêt d'évaluer le rôle des kynurénines lors de l'infection à *Pa* SST3- (non fait, mutant non disponible)

## 7) Implication de l'AhR dans la réponse immune innée pulmonaire

Les résultats précédents suggèrent que les kynurénines bactériennes modulent la réponse cellulaire et moléculaire de l'hôte aux temps précoces d'une infection respiratoire aigue à *Pa*. La co-administration de kynurénine ou d'acide kynurénique en dose unique initiale, bien que ne permettant pas de retrouver les mêmes caractéristiques que lors de

l'infection avec une souche productrice de kynurénines, perturbe également la réponse immune en amplifiant la réponse inflammatoire. La modulation conjointe du recrutement cellulaire et de l'inflammation en fonction de la capacité de production de kynurénines par la bactérie fait émettre l'hypothèse d'une implication de l'AhR dans la réponse immune. En effet ce récepteur est un ligand connu des kynurénines dont le rôle d'orchestration de la réponse immune innée cellulaire et moléculaire est démontré dans certaines pathologies pulmonaires infectieuses et inflammatoires. Pour étudier le lien entre AhR, kynurénines et modulation de la réponse immune, nous avons comparé la réponse à H12 de l'infection de souris AhR KO par rapport aux souris sauvages (WT) infectées avec les souches CHAΔkynA et CHAΔkynU. Nous avons étudié l'évolution de la pneumonie selon les mêmes paramètres que précédemment utilisés (évolution pondérale, charge bactérienne pulmonaire, dissémination extra-pulmonaire), ainsi que la réponse immune de l'hôte par étude sur lame et en cytométrie en flux de la cellularité pulmonaire et du LBA, et la production intra-alvéolaire de cytokines (**Figures 19, 20 et 21**). Dans un premier temps, nous avons évalué le rôle joué par l'AhR au cours du processus infectieux à *Pa* de manière indépendante du paramètre « kynurénine » car peu de données existent sur ce sujet. Dans un second temps nous avons voulu déterminer l'implication de l'AhR dans la modulation de la réponse immune pulmonaire médiée par les kynurénines bactériennes, en comparant l'évolution du processus infectieux en fonction des souches CHAΔkynA ou CHAΔkynU chez les souris AhR KO. Nous avons également évalué de manière indirecte l'activation de l'activité transcriptionnelle de l'AhR en fonction de la souche infectante par étude des transcrits des gènes cibles de l'AhR tels que le CYP1A1 ou l'IDO1.

**a. L'AhR atténue la réponse inflammatoire de l'hôte au temps précoce de l'infection respiratoire aigüe à *Pa***

La comparaison des paramètres de l'infection des souris AhR KO par rapport aux souris WT montre que l'AhR joue un rôle majeur dans l'orchestration de la réponse immune au cours de la pneumonie aigüe à *Pa*. Les souris AhR KO semblent présenter une dérégulation du recrutement alvéolaire des PNN qui est exacerbé à H12. La formule des cellules pulmonaires totales est semblable pour tous les groupes à H12. Les seules différences notables entre les groupes au niveau tissulaire sont une majoration du nombre de DC résidentes pulmonaires chez les souris AhR KO par rapport aux WT, ainsi qu'un nombre de cellules NK effondré à la fois dans les poumons et dans l'alvéole (data non présentées). De manière concomitante à l'augmentation des PNN intra-alvéolaires, la charge bactérienne

pulmonaire diminue, mais la perte de poids et la dissémination systémique augmentent, suggérant une majoration des lésions de la barrière alvéolo-capillaire chez ces souris (**Figure 19 et 20**).

Concernant la réponse cytokinique, on observe une augmentation des taux de cytokines IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-22 et IL-10 chez les souris AhR KO, alors que les concentrations de TNF $\alpha$  et de KC sont identiques entre les souris AhR KO et WT. L'absence de différence d'IL-23 semble difficilement interprétable au vu des valeurs des concentrations, proche du contrôle. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui montrent que l'AhR module la production des cytokines de l'inflammation, ainsi que l'activation des voies Th17 et Th22, de manière variable en fonction du ligand mis en jeu (**Figure 21**).

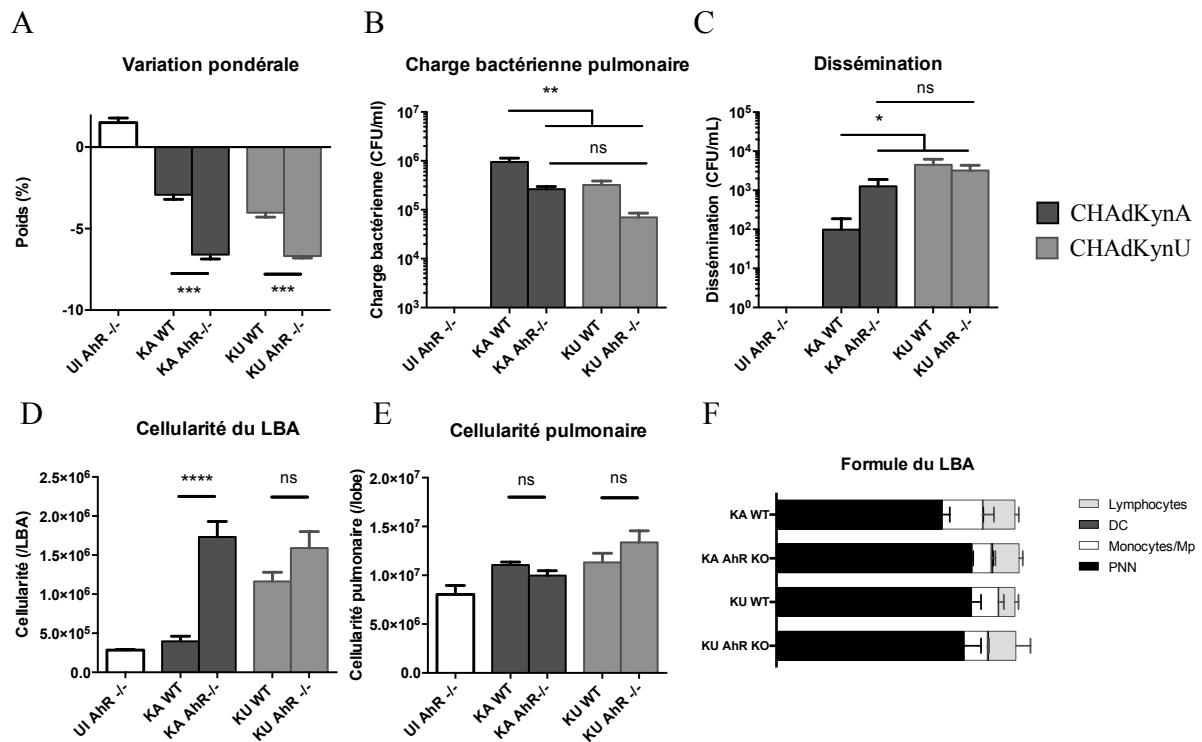
Au total, au cours de l'infection respiratoire aigüe à *Pa*, l'AhR semble limiter l'exacerbation de la réponse immune innée en limitant l'afflux massif alvéolaire de PNN ainsi qu'en atténuant la production des cytokines précoces de l'inflammation, ce qui est cohérent avec son rôle essentiel de préservation de l'intégrité des organes barrières face aux agressions du milieu extérieur.

#### **b. L'AhR est impliqué dans l'immunomodulation médiée par les kynurénines**

Plusieurs éléments suggèrent que les variations de réponse immune en présence de kynurénines bactériennes ou de synthèse implique en partie l'AhR. Tout d'abord, il n'existe plus de différence de réponse cellulaire ou cytokinique entre les souches CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU lorsque les souris infectées sont AhR KO (**Figures 19,20 et 21**). Ensuite, le recrutement alvéolaire de PNN est exacerbé lors de l'infection avec la souche CHA $\Delta$ kynU, comme ce qui est constaté pour les souris AhR KO, suggérant que les kynurénines bactériennes inhibent l'activité de l'AhR. Or, ce phénomène a été précédemment décrit dans la littérature pour des ligands comme le TCDD dont la stimulation d'intensité modérée mais persistante peut mimer une inhibition de l'AhR aboutissant à un profil de recrutement cellulaire pulmonaire proche de celui des souris AhR KO. De plus, l'expression pulmonaire des transcrits des gènes CYP1A1 et IDO1, qui sont des gènes cibles témoignant de l'activation de l'activité transcriptionnelle de l'AhR par un ligand, sont augmentés au cours de l'infection avec la souche CHA $\Delta$ kynU à H12 et H24, tout comme lors d'une stimulation par le TCDD (**Figure 22**). Ce résultat est également reproduit quand on administre en dose unique d'acide kynurénique au cours d'une infection à CHA $\Delta$ kynA (**Figure 23**). Enfin, l'atténuation des concentrations des cytokines inflammatoires, chez les souris WT infectées

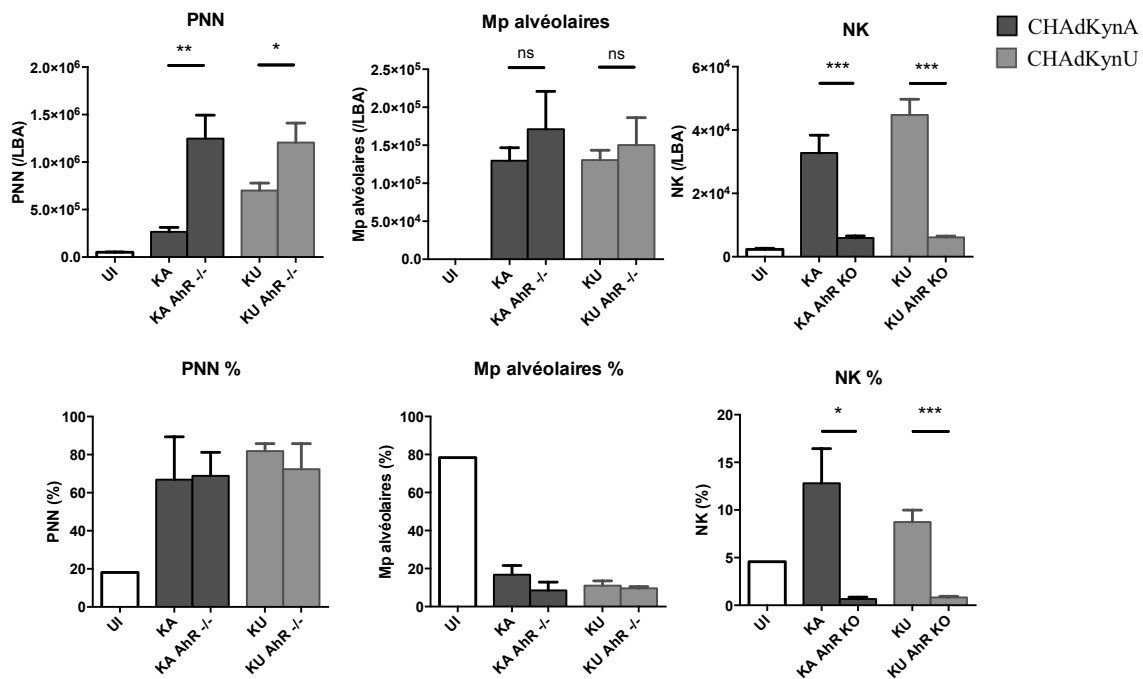
par CHAΔkynU par rapport à CHAΔkynA est cohérente avec l'hypothèse d'une activation de l'AhR par les kynurénines bactériennes, où l'AhR activé permet de limiter l'exacerbation de la réponse inflammatoire.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les kynurénines bactériennes pourraient être responsables de l'activation de l'AhR au cours de l'infection respiratoire aigue avec pour conséquence une modulation de la réponse inflammatoire précoce à l'infection.

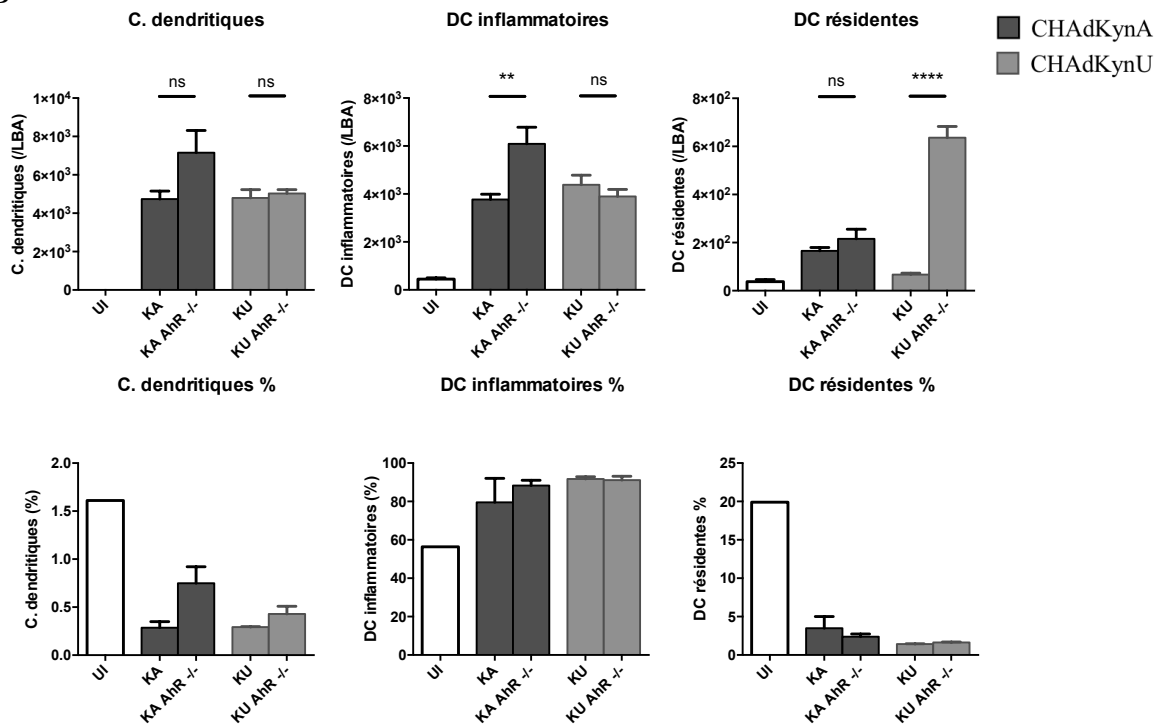


**Figure 19: Rôle de l'AhR sur l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte. A, B, C, D, E, F** Comparaison de l'évolution de la pneumonie à H12 d'infection respiratoire aigue induite par les souches CHAΔkynA et CHAΔkynU chez des souris WT et AhR KO **A**, évolution de la variation du poids par rapport au poids initial en fonction du temps **B**, charge bactérienne pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires **C**, dissémination bactérienne en UFC par gramme de rate estimée par étalement et dilution d'homogénats spléniques **D**, cellularité du LBA mesurée par compte à l'état frais du culot cellulaire sur lame de Malassez **E**, cellularité du tissu pulmonaire après extraction des cellules pulmonaires totales mesurée par compte à l'état frais sur lame de Malassez (n=5 par groupe pour les souris WT, 8 par groupe pour les souris AhR KO) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne **F**, formule du LBA réalisée par cytométrie en flux à H12 de l'infection, une expérience effectuée par cytométrie en flux à H12.

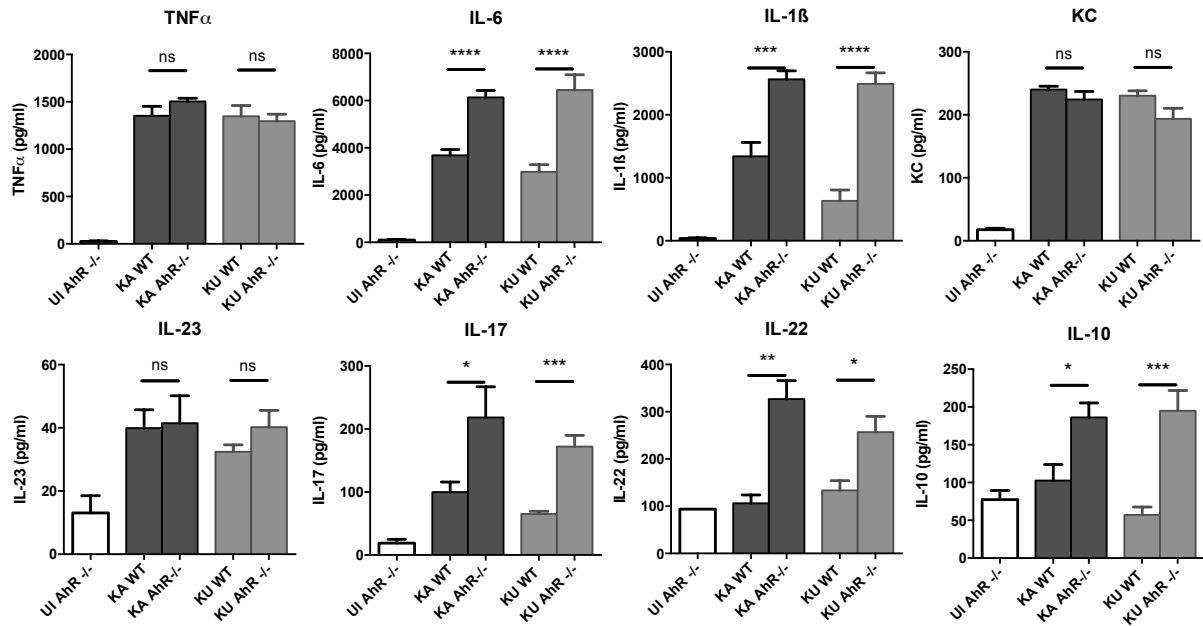
A



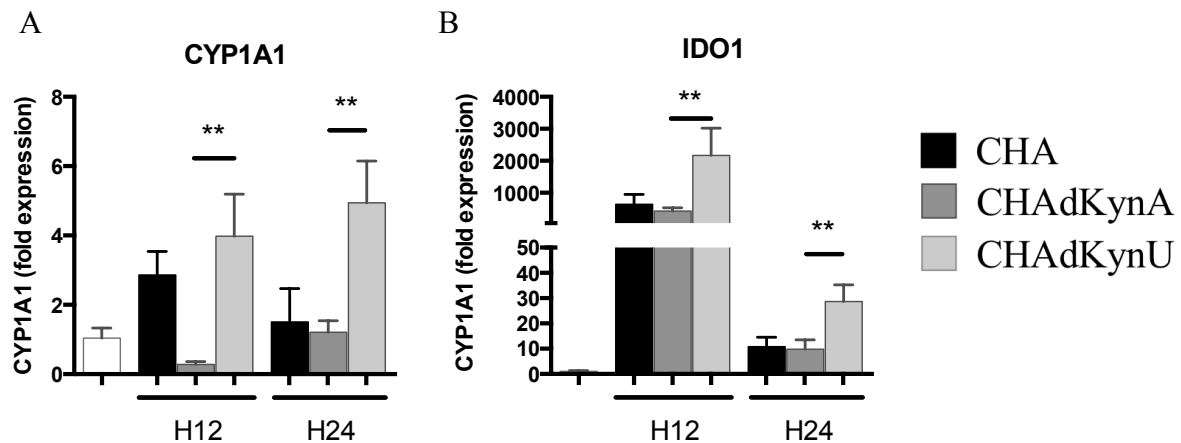
B



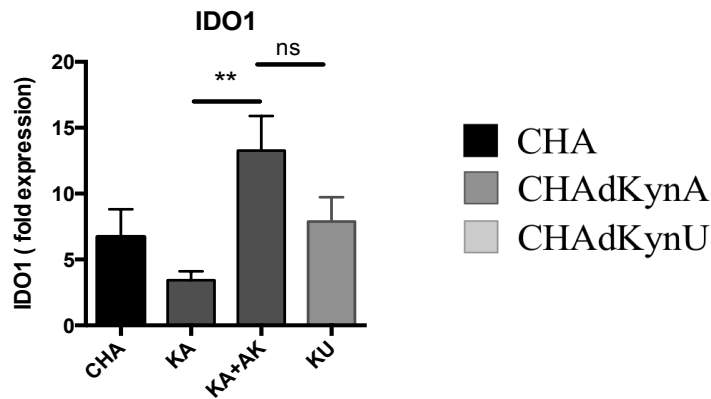
**Figure 20: Rôle de l'AhR dans la réponse cellulaire alvéolaire.** A,B populations cellulaires étudiées par cytométrie en flux à H12 de l'infection par les souches CHAΔkynA (gris foncé) et CHAΔkynU (gris clair) chez des souris WT et AhR KO et les souris contrôles non infectées (blanc) présentées en valeur absolue (graphique supérieur) et en % des cellules CD45+ (graphique inférieur). PNN : polynucléaires neutrophiles, Mp : macrophages, DC : cellules dendritiques, NK : cellules natural killer **A**, étude des PNN, macrophages alvéolaires et cellules NK **B**, étude des cellules dendritiques (n=5 par groupe pour les souris WT, 8 par groupe pour les souris AhR KO) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne



**Figure 21: Rôle de l'AhR dans la réponse cytokinique alvéolaire.** Comparaison des réponses cytokiniques alvéolaires à H12 de l'infection respiratoire aiguë induite par les souches CHAΔkynA (gris foncé) et CHAΔkynU (gris clair) chez des souris WT et AhR KO par dosage du TNFα, de l'IL-6, l'IL-1β, KC, IL-23, IL-17A, IL-22 et IL-10 dans les surnageants de LBA par méthode ELISA. Les souris contrôles sont instillées avec du PBS (UI, blanc) (n=5 par groupe pour les souris WT, 8 par groupe pour les souris AhR KO) \*p<0,05 \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

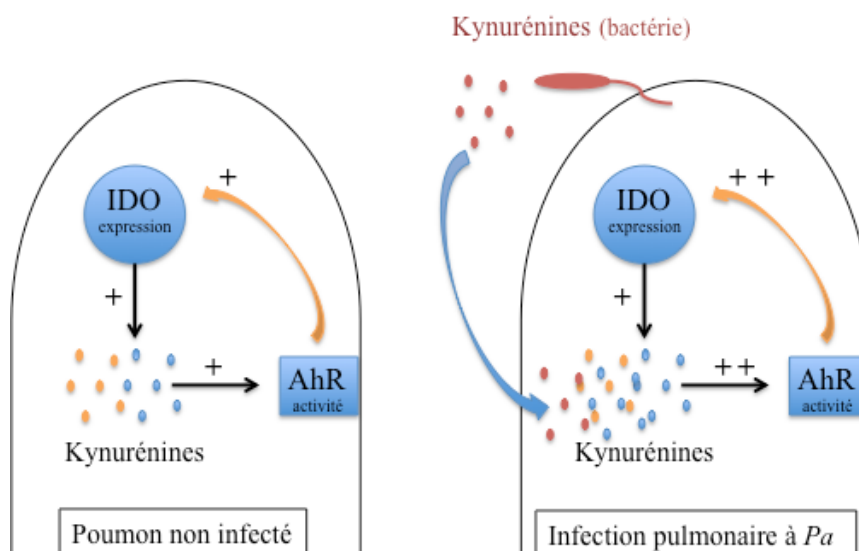


**Figure 22: Les kynurénines bactériennes augmentent l'activité transcriptionnelle de l'AhR.** Expression des transcrits des gènes cibles de l'AhR **A**, CYP1A1 et **B**, IDO1 à H12 et H24 chez les souris WT infectées avec les souches CHAΔkynA (gris foncé) et CHAΔkynU (gris clair). La souche CHA (noir) est donnée pour référence. (n=5 par groupe, expérience effectuée deux fois) \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.



**Figure 23: L'acide kynurénique active la transcription de l'IDO.** Expression des transcrits du gène cible de l'AhR IDO1 à H24 chez les souris WT infectées avec les souches CHAΔkynA (KA, gris foncé), CHAΔkynA avec ajout de 2mM d'acide kynurénique de synthèse au moment de l'instillation de la suspension bactérienne (KA+AK, gris foncé). Les souches CHA (noir) et CHAΔkynU (gris clair) sont données pour référence. (n=5 par groupe) \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

L'augmentation des transcrits de l'IDO1, première enzyme et étape limitante de la voie des kynurénines **de l'hôte**, qui est observée lors de l'infection avec CHAΔkynU suggère que les kynurénines produites par les bactéries interfèrent avec la voie des kynurénines de l'hôte. *In vitro*, l'existence d'une boucle activatrice kynurénines (de l'hôte) -> AhR -> IDO1 est clairement démontrée. Les enzymes bactériennes et humaines partageant les mêmes substrats, on peut émettre l'hypothèse qu'une telle boucle puisse être amplifiée par la production bactérienne de kynurénines (**Figure 24**). La suite des travaux est consacrée à l'étude du rôle de l'IDO1 dans la réponse immune pulmonaire au cours de l'infection respiratoire aigüe à *Pa*, et aux interactions potentielles avec la voie métabolique bactérienne.



**Figure 24: Hypothèse de travail sur l'interaction des voies métaboliques bactérienne et de l'hôte au cours de l'infection respiratoire aigüe à *Pa*.** IDO : indoléamine-2,3-dioxygénase, AhR : arylhydrocarbène receptor. Dans ce travail, nous testons l'hypothèse de l'implication d'une interaction entre la voie des kynurénines de l'hôte et celles de la bactérie, s'intégrant dans une boucle activatrice kynurénines -> AhR -> IDO.

## 8) Implication de l'IDO dans la réponse immune innée pulmonaire

Afin d'étudier le rôle joué par l'IDO au cours de l'infection respiratoire aigüe à *Pa*, nous avons inhibé cette enzyme chez la souris en traitant les animaux 12 heures avant infection avec le 1MT, inhibiteur sélectif de l'IDO murine. Nous avons tout d'abord comparé les réponses immunes des souris traitées et non traitées infectées par CHAΔkynA et SCΔkynA afin d'évaluer le rôle de l'IDO dans la pneumonie de manière indépendante des kynurénines bactériennes. Nous avons ensuite comparé l'évolution du processus infectieux chez les souris, traitées ou non par le 1MT, et infectées par CHAΔkynU, afin d'évaluer l'existence potentielle d'une interaction entre les voies procaryote et eucaryote des kynurénines.

### a. L'IDO est impliquée dans le recrutement cellulaire au cours de la pneumonie aigüe à *Pa*

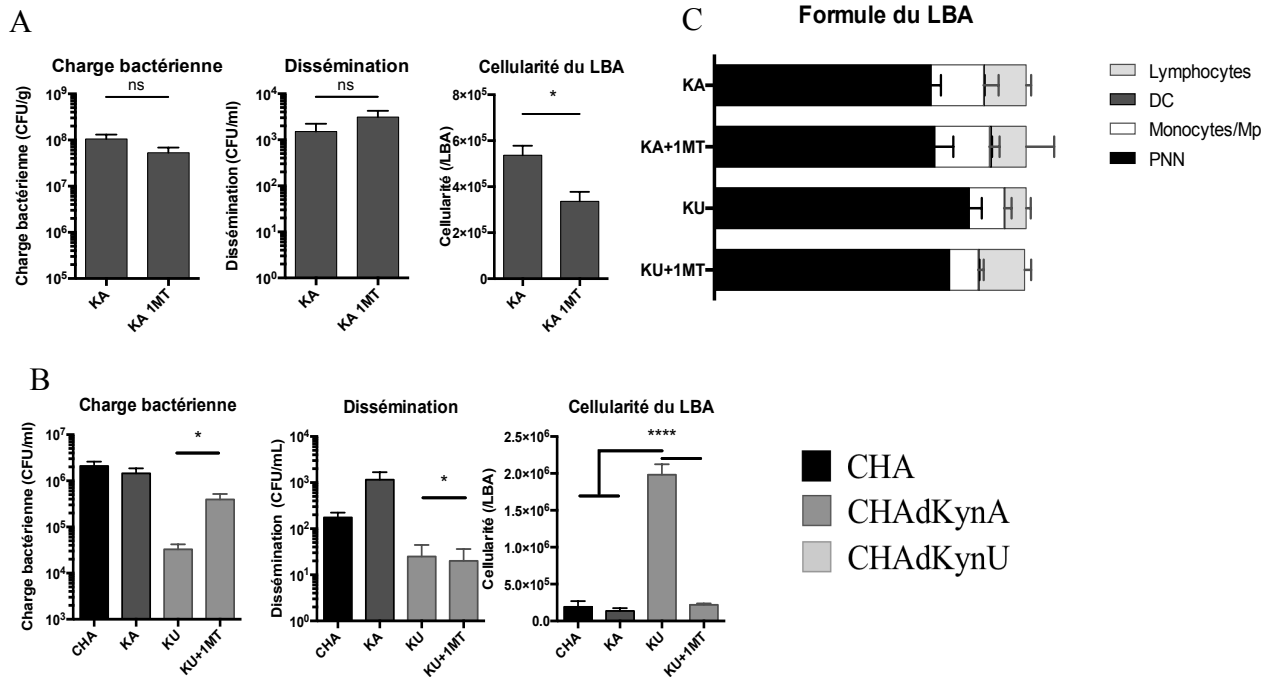
Au cours d'une pneumonie aigüe à CHAΔkynA, l'inhibition de l'IDO par le 1MT entraîne à H12 du début de l'infection une diminution du recrutement cellulaire intra-alvéolaire, sans retentissement sur la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire (data non présentée), la charge bactérienne pulmonaire ou la dissémination extra-pulmonaire en l'absence de production de kynurénine bactérienne (**Figure 25A**). La formule du LBA reste inchangée (**Figure 25C**). L'étude par cytométrie en flux de la formule cellulaire du LBA des souris infectées avec CHAΔkynA retrouve une diminution alvéolaire du nombre de PNN, de macrophages alvéolaires, et de cellules dendritiques, inflammatoires comme résidentes (**Figure 26A et B**). On n'observe pas de différence de concentrations cytokiniques dans le LBA entre les souris traitées et non traitées lors de l'infection à CHAΔkynA (**Figure 27**).

La même expérience a été effectuée avec la souche clinique mutée SCΔkynA à H24 (**Figure 29**). On retrouve à nouveau une diminution de la cellularité lors de l'inhibition de l'IDO par le 1MT. Cette fois, on note un impact sur la clairance bactérienne qui diminue, mais avec une moindre dissémination extra-pulmonaire.

Au total, l'IDO semble jouer un rôle dans le recrutement cellulaire alvéolaire aux temps précoces de l'infection à *Pa* sans que cela ne soit expliqué par un changement de l'environnement cytokinique pulmonaire.

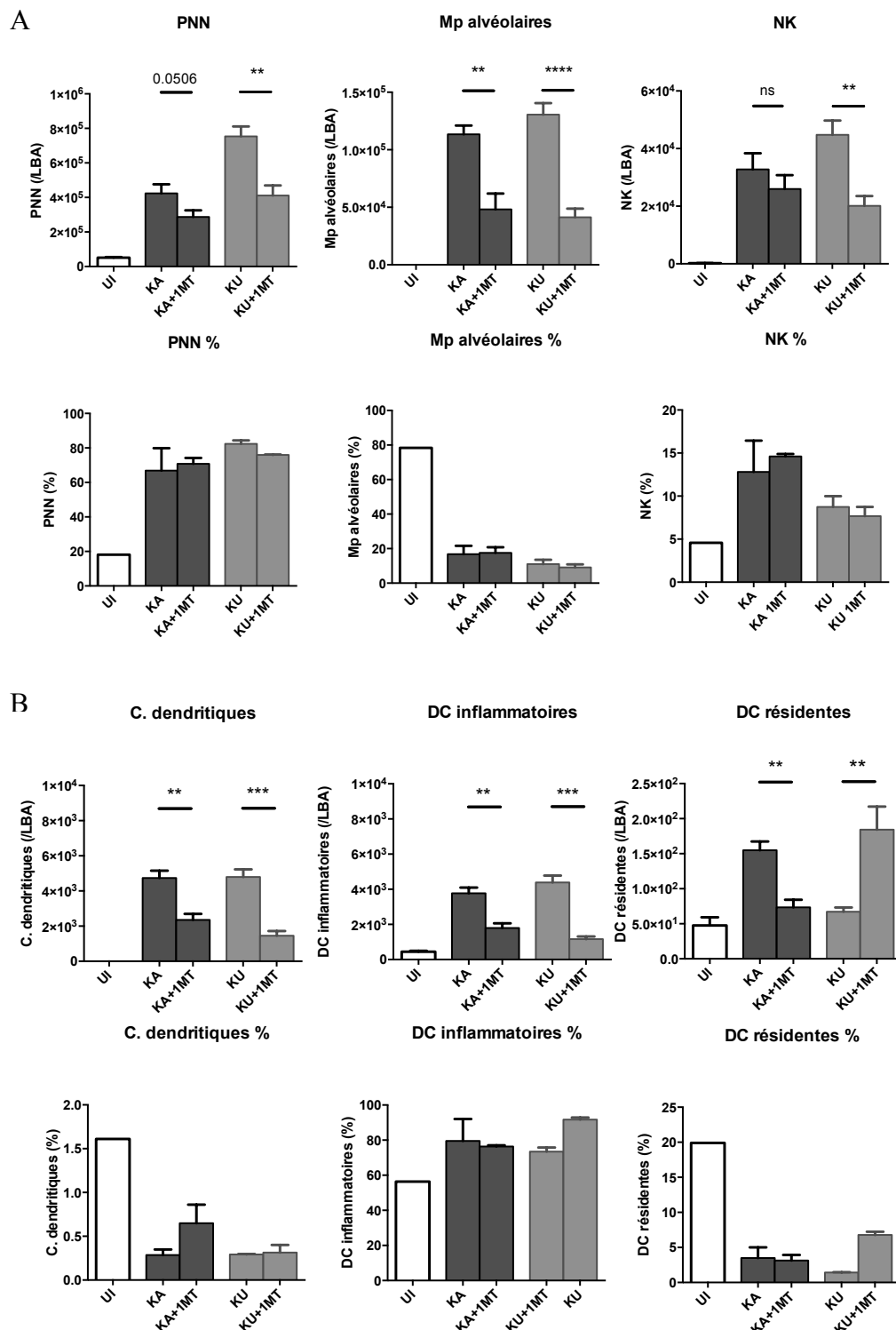


## Effets du 1MT *in vivo*



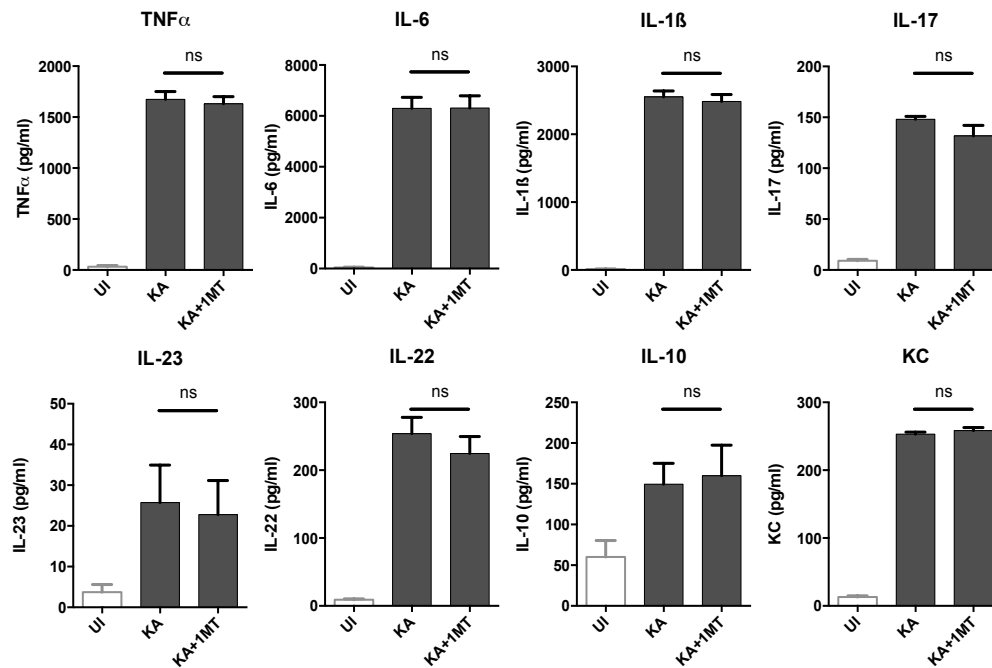
**Figure 25: Rôle de l'IDO dans l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte à H12.** A, B, comparaison de l'évolution de la pneumonie à H12 d'infection respiratoire aigue induite par les souches CHAΔkynA (KA, gris foncé) et CHAΔkynU (KU, gris clair) chez des souris WT non traitées ou traitées 12 heures avant infection par l'inhibiteur de l'IDO 1MT (+1MT). Etude de la charge bactérienne pulmonaire, dissémination bactérienne extra-pulmonaire et cellularité du LBA mesurée par compte à l'état frais du culot cellulaire sur lame de Malassez (n= 5 par groupe, une expérience représentative sur deux effectuées sauf pour la souche clinique, une seule expérience effectuée) Les résultats obtenus avec les souches CHA et CHAΔkynA sont donnés pour référence lors de l'infection avec CHAΔkynU (B) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne C, formule du LBA réalisée par cytométrie en flux à H12 de l'infection respiratoire aigue par CHAΔkynA et CHAΔkynU chez des souris non traitées (KA, KU) et des souris traitées (KA+1MT, KU+1MT) par le 1MT.

## Formules des LBA étudiée par cytométrie en flux

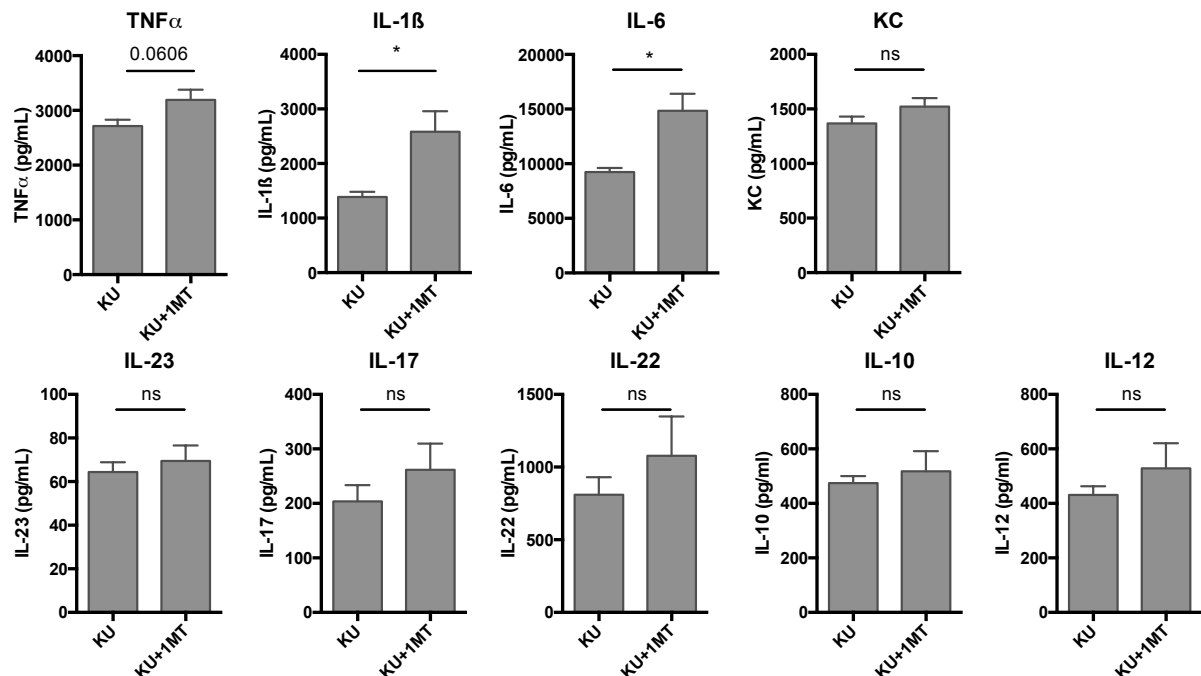


**Figure 26: Effets de l'inhibition de l'IDO sur la formule des cellules immunitaires du LBA A,B** populations cellulaires étudiées par cytométrie en flux à H12 de l'infection par les souches CHAΔkynA (gris foncé) et CHAΔkynU (gris clair) chez des souris WT et WT traitées 12 heures avant infection par le 1MT, et les souris contrôles non infectées (blanc) présentées en valeur absolue (graphique supérieur) et en % des cellules CD45+ (graphique inférieur). PNN : polynucléaires neutrophiles, Mp : macrophages, DC : cellules dendritiques, NK : cellules natural killer **A**, étude des PNN, macrophages alvéolaires et cellules NK **B**, étude des cellules dendritiques (n=5 par groupe) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

## Dosage des concentrations alvéolaires cytokiniques

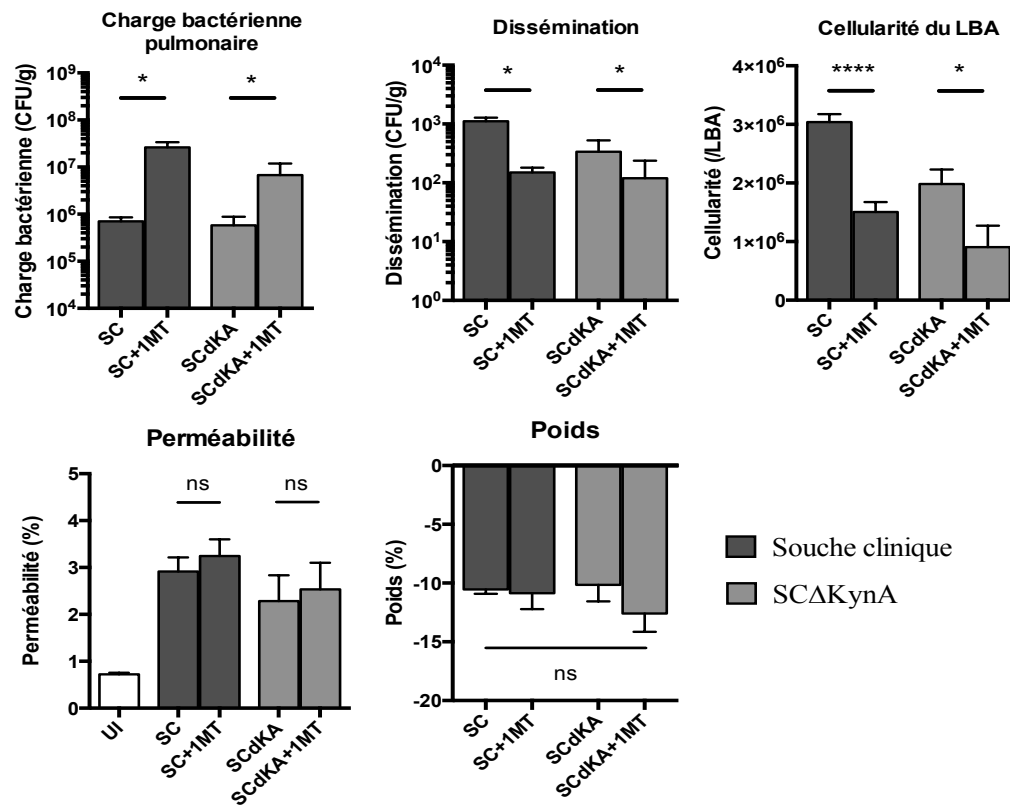


**Figure 27: Rôle de l'IDO sur la réponse cytokinique pulmonaire au cours de l'infection à CHA $\Delta$ kynA.** Comparaison des concentrations de cytokines alvéolaires chez les souris WT non traitées (KA, gris foncé) ou traitées par 1MT (KA+1MT, gris foncé) à H12 de l'infection respiratoire aigüe induite par la souche CHA $\Delta$ kynA par dosage du TNF $\alpha$ , de l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , KC, IL-23, IL-17A, IL-22 et IL-10 dans les surnageants de LBA par méthode ELISA. Les souris contrôles sont instillées avec du PBS (UI, blanc) (n=5 par groupe) ns : non significatif par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.



**Figure 28: Rôle de l'IDO dans la modulation de la réponse cytokinique observée au cours de l'infection à CHA $\Delta$ kynU.** Comparaison des concentrations de cytokines alvéolaires chez les souris WT non traitées (KU, gris clair) ou traitées par 1MT (KU+1MT, gris clair) à H12 de l'infection respiratoire aigüe induite par la souche CHA $\Delta$ kynU par dosage du TNF $\alpha$ , de l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , KC, IL-23, IL-17A, IL-22 et IL-10 dans les surnageants de LBA par méthode ELISA. Les souris contrôles sont instillées avec du PBS (UI, blanc) (n=5 par groupe) \* p<0,05, ns : non significatif par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

## Étude de la souche clinique



**Figure 29: Rôle de l'IDO dans l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte à H24.** Comparaison de l'évolution de la pneumonie à H24 d'infection respiratoire aigüe induite par la souche clinique (SC, gris foncé) et son mutant SCΔkynA (SCdKA, gris clair) chez des souris WT non traitées ou traitées 12 heures avant infection par l'inhibiteur de l'IDO 1MT (+1MT). Étude de la charge bactérienne pulmonaire, dissémination bactérienne extra-pulmonaire et cellularité du LBA mesurée par compte à l'état frais du culot cellulaire sur lame de Malassez, perméabilité alvéolo-capillaire, et évolution pondérale (n= 6 par groupe, une expérience effectuée) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne

### a. La voie des kynurénines bactériennes interagit avec la voie des kynurénines de l'hôte

Au cours de l'infection pulmonaire aigüe à CHAΔkynU, l'inhibition de l'IDO par le 1MT modifie l'évolution du processus infectieux, alors qu'elle n'a que peu d'effet lors d'une infection à CHAΔkynA. A H12 de l'infection par CHAΔkynU, l'inhibition de l'IDO entraîne une nette diminution de la cellularité alvéolaire, s'accompagnant d'une diminution de la clairance bactérienne pulmonaire (**Figure 25B**). Le même profil est observé lorsqu'on inhibe l'IDO au cours de l'infection avec la souche clinique productrice à haut niveau de kynurénines (**Figure 29**). L'étude de la formule cellulaire du LBA par cytométrie en flux retrouve une diminution alvéolaire du nombre de PNN, de macrophages alvéolaires, de

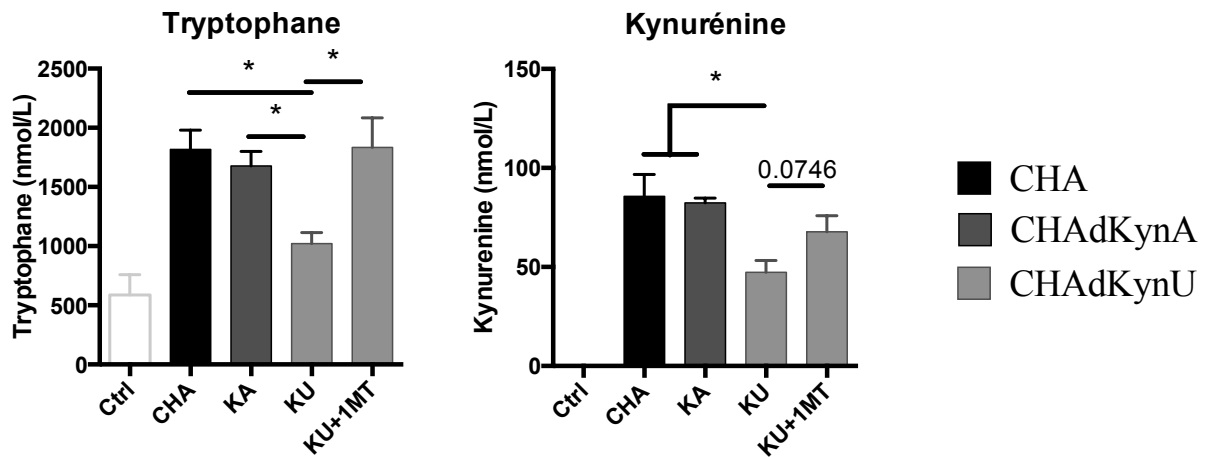
cellules NK, et de cellules dendritiques inflammatoires dans le groupe de souris traitées. En revanche, on constate une hausse des DC résidentes (**Figure 26A et B**).

Les dosages cytokiniques par ELISA dans le LBA montrent que les concentrations des cytokines IL-6 et IL-1 $\beta$  augmentent lors de l'inhibition de l'IDO (**Figure 28**), avec les mêmes tendances observées pour les transcrits pulmonaires des gènes de ces cytokines. On note également une augmentation des transcrits de l'IL-17 et une baisse des transcrits de l'IL-10 (data non présentées).

La même expérience a été effectuée avec la souche clinique SC à H24 (**Figure 29**). On retrouve le même profil de réponse que lors de l'infection avec la souche CHA $\Delta$ kynU, avec à nouveau une diminution franche de la cellularité lors de l'inhibition de l'IDO par le 1MT, entraînant une baisse de la clairance bactérienne, mais une moindre dissémination extra-pulmonaire.

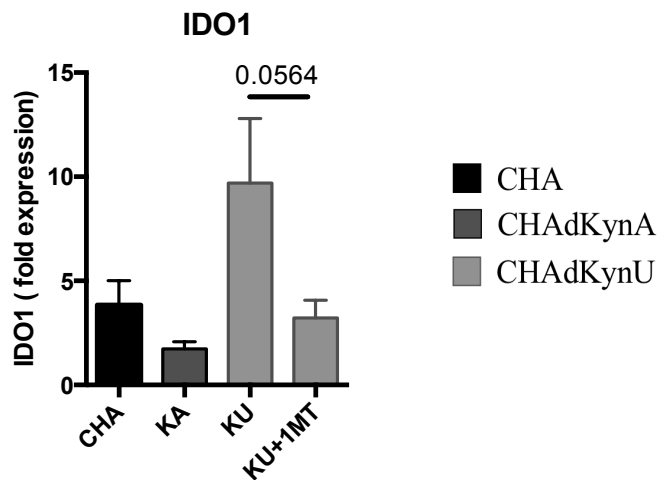
Au total, l'activité de l'IDO favorise le recrutement cellulaire alvéolaire, principalement des PNN, tout en diminuant la réponse inflammatoire cytokinique et la charge bactérienne pulmonaire lors d'une infection respiratoire aigue avec une souche de *Pa* productrice de kynurénines. Seule la baisse de cellularité est observée lors de l'expérience effectuée avec CHA $\Delta$ kynA, suggérant un rôle d'amplificateur des fonctions de l'IDO par les kynurénines bactériennes. On peut émettre l'hypothèse de l'existence d'une interaction type boucle de régulation positive entre les kynurénines bactériennes et l'IDO murine, possiblement via l'AhR.

Cette hypothèse est renforcée par les dosages HPLC-MS/MS du tryptophane et de la kynurénine dans les surnageants de LBA montrant que l'inhibition de l'IDO annule les différences de concentrations de ces métabolites observées entre les deux souches bactériennes. Ce résultat suggère une participation essentielle de la voie métabolique de l'hôte dans les variations d'environnement métabolique observées en fonction de la souche infectante (**Rappel figure 8**).



**Rappel Figure 8: Dosage des métabolites de la voie des kynurénines dans le LBA dans un modèle murin d'infection respiratoire aiguë avec les souches CHAΔkynU avec ou sans traitement par le 1-MT.** A,B, dosages effectués dans les surnageants de LBA de souris infectées avec les souches CHAΔkynU, avec ou sans traitement par le 1-MT (barre grise claire) collectés à H12 après l'instillation (souches CHA (barre noire) et CHAΔkynA (barre grise foncée) affichées pour comparaison) A, dosage de la tryptophane. B, dosage de la kynurénine. Chaque dosage est effectué en double. ns : non significatif \*  $p < 0,05$ .

Enfin, en étudiant la transcription pulmonaire de l'IDO à H12, on constate d'une part une augmentation transcriptionnelle de l'IDO au cours de l'infection à CHAΔkynU par rapport à CHAΔkynA. Cette différence disparaît en cas d'inhibition de l'activité de l'enzyme, bien que la transcription du gène soit indépendante du traitement par le 1MT (**Figure 30**). Cela suggère que les kynurénines bactériennes induisent en coopération avec la voie des kynurénines de l'hôte une augmentation de l'expression pulmonaire de l'IDO au cours de l'infection respiratoire aiguë, possiblement via l'activation de l'AhR.



**Figure 30 : Les kynurénines bactériennes induisent l'expression transcriptionnelle de l'IDO.** Expression des transcrits du gène IDO1 à H12 et H24 chez les souris WT infectées avec les souches CHAΔkynA (gris foncé) et CHAΔkynU (gris clair), et chez les souris wT traitées par le 1MT 12 heures avant infection puis infectées par la souche CHAΔkynU (gris clair, KU+1MT). La souche CHA (noir) est donnée pour référence. (n=5 par groupe, expérience effectuée deux fois) \*\* $p < 0,01$  par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

## **Chapitre 3 : Rôle des kynurénines bactériennes dans un modèle murin d'infection respiratoire aigue**

### **2-Rôle de l'AhR et de l'IDO dans la modulation de la réponse immune médiée par les kynurénines de *Pa* au cours de la pneumonie aigue**

#### ➤ **Rationnel :**

Kynurénines = ligands de l'AhR, régulateur de l'immunité pulmonaire

L'activation de l'AhR augmente l'expression de l'IDO, entraînant la production des kynurénines par l'hôte = boucle de rétrocontrôle positif

#### ➤ **Hypothèses :**

1- L'AhR et l'IDO sont impliqués dans la modulation de la réponse immune médiée par les kynurénines bactériennes (acide kynurénique)

2- Existence d'interactions entre les voies métaboliques bactériennes et de l'hôte

#### ➤ **Méthode:**

1- Modèle murin d'infection respiratoire aigue à CHAΔkynA vs CHAΔkynU:

. étude de la transcription des gènes cibles de l'AhR (CYP1A1, IDO)

. comparaison de souris WT et AhR KO

2- Infection par CHAΔkynA vs CHAΔkynU de souris traitées par le 1MT (inhibiteur de l'IDO de l'hôte)

. comparaison des principaux paramètres infectieux

. dosage des métabolites alvéolaires

. étude de la transcription de l'IDO

#### ➤ **Principaux résultats:**

1-Rôle de l'AhR:

. l'AhR limite le recrutement alvéolaire des PNN et la réponse cytokinique inflammatoire

. disparition des différences CHAΔkynA vs CHAΔkynU chez les souris AhR KO

. augmentation de la transcription des gènes cibles de l'AhR dans l'infection à CHAΔkynU

=> les kynurénines bactériennes activent possiblement l'AhR

2- Rôle de l'IDO de l'hôte:

. activée par les kynurénines bactériennes

(car 1MT => diminution de la transcription de l'IDO et de la consommation du tryptophane)

. Impliquée dans le recrutement cellulaire alvéolaire

=> interactions entre les voies métaboliques de *Pa* et de l'hôte modulant la réponse immune

#### ➤ **Principales limites:**

Pas de distinction possible entre métabolites murins et bactériens

Nécessité d'effectuer des épreuves de survie (souris AhR KO vs souris WT) et (souris traitées par 1MT vs souris non traitées)

Nécessité d'un groupe contrôle (AhR KO+ 1MT)

Pas d'évaluation directe de l'activité de l'AhR et de l'IDO

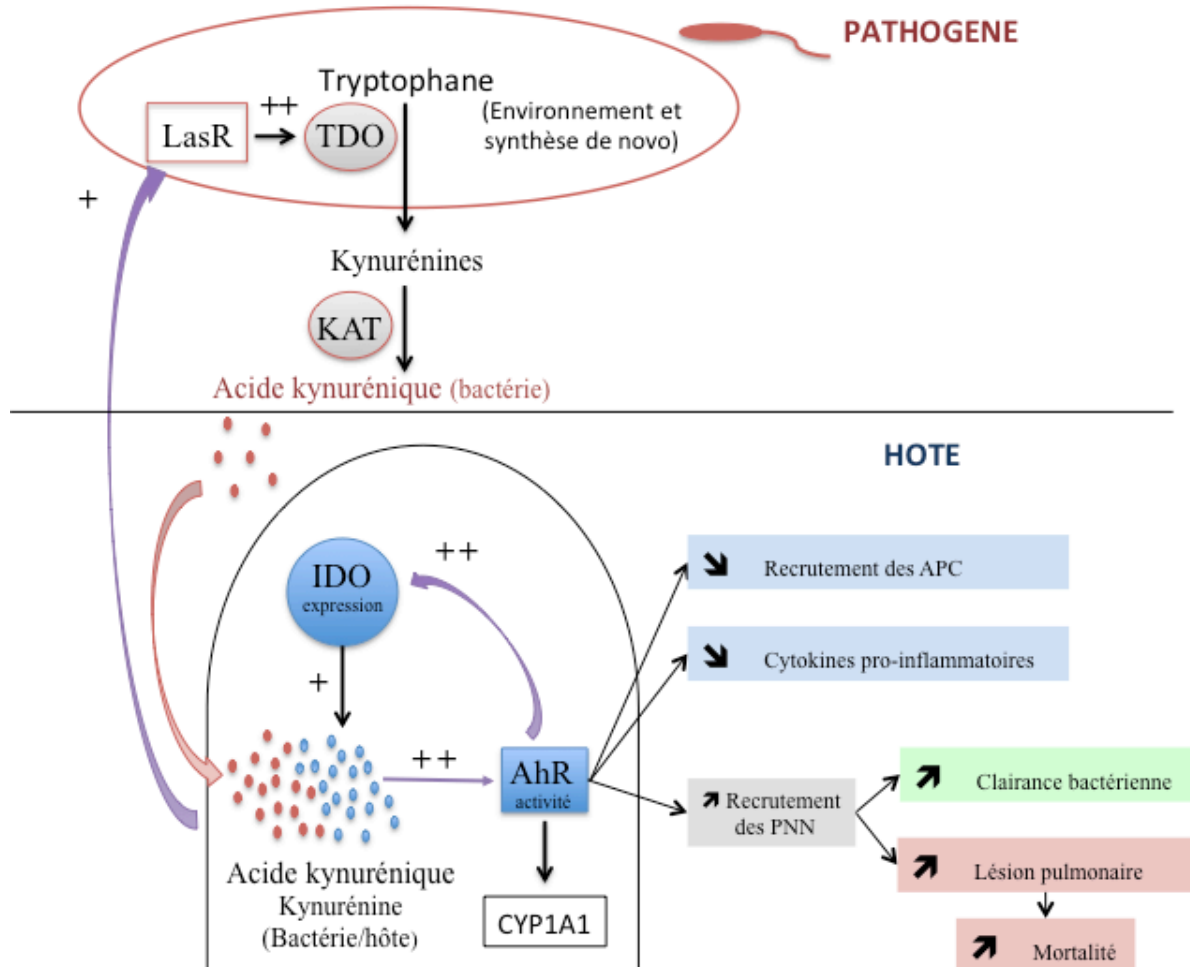
Variabilité du phénotype des souris KO et des effets de l'activation de l'AhR dans la littérature rendant difficile l'interprétation du rôle de l'AhR dans nos expérimentations

#### ➤ **Perspectives immédiates:**

Existence probable d'un dialogue hôte-pathogène médié par les voies eukaryotes et prokaryotes des kynurénines: implication de l'IDO et de l'AhR

Intérêt probable dans les infections respiratoires chroniques

Le modèle hypothétique d'interactions entre les voies de kynurénines bactériennes, murines et l'AhR ainsi que leur retentissement sur l'évolution du processus infectieux pulmonaire et la réponse immune innée de l'hôte est synthétisé dans la figure ci-dessous (Synthèse 3).



**Synthèse 3 : proposition de modèle d'interactions entre les kynurénines bactériennes , la voie des kynurénines de l'hôte et l'AhR, et impact sur l'évolution de la réponse immune et l'évolution du processus infectieux.** AhR, arylhydrocarbon receptor APC, cellules présentatrices d'antigènes IDO, Indoleamine 2,3 dioxygénase, KAT, kynurenine aminotransférase, LasR, régulateur transcriptionnel de Pa activant la TDO en présence de kynurénines TDO, tryptophane 2,3 dioxygénase. Lorsque la bactérie est productrice à haut niveau d'acide kynurénique, celui-ci promeut l'activation de l'AhR dont il est un ligand connu. L'AhR entraîne l'activation de la voie métabolique des kynurénines de l'hôte régulée par l'IDO, activant ainsi une boucle positive de production des kynurénines par l'hôte d'une part, et par la bactérie via le régulateur transcriptionnel de la TDO LasR activé par les kynurénines de son environnement d'autre part. La production d'acide kynurénique entraîne également, de manière hypothétique via l'AhR, une immunomodulation avec une diminution du recrutement et de l'activation des APC, une baisse de la production des cytokines pro-inflammatoires, mais une augmentation du recrutement alvéolaire des PNN, permettant une clairance bactérienne rapide au prix d'une majoration des lésions tissulaires aboutissant à une augmentation de mortalité.



## ***Discussion***

Cette partie du travail porte sur l'impact de la production des métabolites de la voie des kynurénines par le pathogène au cours de la pneumonie aigüe à *Pa*. Parmi ces métabolites, l'acide kynurénique semble tenir une place centrale au vu des résultats des dosages effectués à la fois *ex vivo* et *in vivo*. L'acide kynurénique est le métabolite le plus produit par la voie des kynurénines de *Pa* lorsque la voie de l'antranilate est inhibée. Le modèle d'infection par la souche mutante CHAΔkynU est certes artificiel, mais son utilisation pour preuve de concept reste pertinente car certaines souches cliniques produisent de l'acide kynurénique à haut niveau, comme le montrent les dosages réalisés avec la souche clinique de notre étude. La comparaison des profils d'infections entre les souches CHAΔkynA et CHAΔkynU permet d'approcher le rôle de la production d'acide kynurénique *in vivo*. Une des limites est que la souche CHAΔkynA possède une kynuréninase ainsi qu'une KAT, et pourrait donc être responsable de la synthèse d'antranilate et d'acide kynurénique à partir des métabolites de l'hôte, même si les résultats des dosages effectués *in vivo* ne sont pas en faveur.

L'infection pulmonaire aigüe avec une souche productrice d'acide kynurénique est associée à une majoration des lésions de la barrière alvéolo-capillaire, avec une tendance à la diminution de la survie des souris. L'altération de la barrière alvéolo-capillaire fait intervenir de multiples paramètres dépendant à la fois de la bactérie et de l'hôte. Au cours de l'infection avec la souche CHAΔkynU, le pathogène semble plus rapidement éliminé aux temps précoces de la pneumonie, probablement par le biais de l'augmentation du recrutement alvéolaire de PNN. Cependant, cela se fait au prix d'une majoration des lésions tissulaires aggravant le pronostic de l'hôte. Le rôle délétère de la réponse immune de l'hôte dans l'évolution de la pneumonie est maintenant bien démontré. L'afflux massif intra-alvéolaire des PNN et les nombreux facteurs antimicrobiens qu'ils sécrètent sont en grande partie responsables des lésions pulmonaires observées au cours de la pneumonie aigüe (320-322). La régulation du recrutement et de l'activation des PNN nécessite donc un contrôle étroit qui pourrait être perturbé par les kynurénines bactériennes.

Lors de l'infection par la souche CHAΔkynU, le recrutement des PNN est majoré bien qu'on n'observe pas d'augmentation concomitante des principales cytokines proinflammatoires chimio-attractantes (IL-6, IL-1β, IL-17 et KC, le CXCL2 n'a pas été dosé dans cette étude). Ce résultat suggère l'intervention d'un mécanisme de recrutement

additionnel ne dépendant pas de ces cytokines. Nous avons émis l'hypothèse de l'implication de l'Ahr car il est exprimé à haut niveau dans le poumon ainsi que dans de nombreuses cellules de l'immunité innée et adaptative, et il est le principal récepteur de l'acide kynurénique. Le rôle de l'Ahr dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire en réponse aux agressions extérieures toxiques ou infectieuses est connu, par modulation du recrutement des PNN, de l'intensité de la réponse inflammatoire, de l'activation des CPA et de la polarisation lymphocytaire.

La modulation de la réponse immune par l'Ahr stimulé par les kynurénines a été montrée dans un modèle de choc endotoxinique au LPS chez la souris. L'activation de l'Ahr par les kynurénines permet une décroissance rapide des taux de cytokines proinflammatoires, une augmentation de la synthèse de l'IL-10 et une diminution du recrutement des PNN et des lésions tissulaires associées (251). Dans ce modèle, l'Ahr possède des propriétés anti-inflammatoires prévenant une réponse immune excessive et potentiellement délétère. Lorsqu'on s'intéresse plus particulièrement à la régulation par l'Ahr de la réponse immune innée pulmonaire dans des modèles murins, la littérature fournit des données très variables voire opposées concernant les effets anti – ou pro-inflammatoires de l'Ahr en fonction du modèle et du ligand. La variabilité des résultats pourrait être expliquée par la complexité des interactions entre l'Ahr et ses multiples ligands d'une part, et par la variabilité de réponse des souris Ahr KO à un même stimulus en fonction de la lignée de souris utilisée d'autre part. En effet, certaines lignées de souris KO présentent un défaut de recrutement des PNN et une synthèse cytokinique altérée en cas d'agression, alors que d'autres (le plus fréquent) présentent un recrutement excessif et dérégulé des PNN et une exacerbation de la réponse cytokinique inflammatoire (323,324).

Une étude a montré que les effets de l'activation de l'Ahr sur le recrutement des PNN variaient en fonction de la nature et la durée du stimulus (256). La dégradation des divers ligands endogènes par les cytochromes activés par l'Ahr ajoute un niveau de complexité lorsque plusieurs ligands aux affinités variables sont impliqués (152). Les kynurénines bactériennes, qui sont produites de manière continue par les bactéries, sont associées à une majoration du recrutement alvéolaire des PNN. On observe le même effet lors de l'administration de TCDD dont l'activité est prolongée dans le temps, alors qu'aucune variation dans le recrutement de PNN n'est observée avec le FICZ dont la durée d'action est courte. Le caractère continu de la production de kynurénines pourrait donc expliquer les différences observées sur la réponse immune lors d'une administration unique à forte dose d'acide kynurénique (256,265).

Un travail récent explore la physiopathologie du recrutement des PNN AhR-dépendant au niveau pulmonaire dans un modèle de pneumonie grippale, sans pouvoir mettre en évidence de mécanisme dépendant de cytokines comme dans notre étude. Les auteurs soulignent en revanche le rôle essentiel des cellules épithéliales respiratoires dans le recrutement alvéolaire des PNN (255). Dans notre travail, nous constatons également que les principales modulations entraînées par les kynurénines bactériennes portent sur la réponse immune intra-alvéolaire alors que peu de variations sont observées au niveau tissulaire.

Une précédente étude s'est intéressée au rôle de l'AhR dans la pneumonie aigüe à *Pa* chez la souris, en comparant la réponse de souris WT à celle de souris AhR KO dans le cadre de l'étude du rôle des phénazines de *Pa* qui sont également des ligands de l'AhR. Dans ce travail, les souris AhR KO présentent une baisse du recrutement des PNN justifiée par une diminution des concentrations alvéolaires de chémokines, aboutissant à une diminution de l'élimination bactérienne et une surmortalité (254). La comparaison avec notre étude semble donc impossible étant données les différences de réponse immune existant entre les souris AhR KO. Des expériences menées dans notre travail (data non présentées) utilisant un antagoniste de l'AhR lors de la pneumonie aigüe à CHA $\Delta$ kynU reproduisent le phénotype observé avec les souris AhR KO (majoration du recrutement des PNN et des cytokines pro-inflammatoires) et semblent confirmer le rôle de l'AhR dans l'atténuation d'une réponse inflammatoire excessive.

Toutefois, la comparaison de souris WT à des souris AhR KO pour comprendre le rôle de l'AhR au cours de la pneumonie aigüe reste délicate car en plus des variations observées en fonction des lignées de souris KO viennent s'ajouter les effets très hétérogènes des ligands activateurs de l'AhR (325). C'est par exemple le cas du TCDD dont l'administration peut mimer une inhibition de l'AhR en ce qui concerne le recrutement cellulaire alvéolaire, avec un profil proche de celui observé le plus fréquemment avec les souris AhR KO (augmentation du recrutement des PNN). Par contre, la stimulation par le TCDD n'a pas d'impact sur les niveaux alvéolaires de chémokines et de cytokines pro-inflammatoires, voire entraîne leur diminution en fonction des expériences dans le modèle murin de pneumonie grippale (326). Ce profil est très proche de celui observé lors de l'infection pulmonaire aigüe à CHA $\Delta$ kynU. Ces résultats, ajoutés aux profils de transcription de l'IDO1 et du CYP1A1, suggèrent que les kynurénines bactériennes pourraient interagir avec l'AhR de l'hôte et ainsi moduler sa réponse immune.

De manière intéressante, les cellules productrices d'IL-17, comme les ILC du groupe 3, les Lc T  $\gamma$   $\delta$  et Th17, sont les cellules immunitaires qui expriment le plus fortement l'AhR (340). Au niveau digestif, l'AhR est impliqué dans la prévention de colites et gastrites en permettant la différenciation et l'activation des ILC3, des Lc Th17 et Th22, aboutissant à la synthèse d'IL-22 dont le rôle dans la protection épithéliale est majeur (246). En revanche, il n'y a pas de travail sur le rôle de l'AhR dans la balance Il-17/IL-22 au cours de l'infection pulmonaire. Dans notre étude, nous constatons que les principales cellules pulmonaires responsables de la production de ces cytokines sont diminuées dans le groupe de souris infectées par la souche CHA $\Delta$ kynU par rapport à CHA $\Delta$ kynA. Les concentrations de ces cytokines sont également diminuées dans le LBA. L'administration d'un antagoniste de l'AhR de manière concomitante à l'infection par la souche CHA $\Delta$ kynU permet de restaurer le profil observé avec la souche CHA $\Delta$ kynA (data non montrées), suggérant que l'AhR est impliqué dans la régulation de la modulation de ces cytokines par les kynurénines bactériennes au cours de la pneumonie aiguë à *Pa*.

Une deuxième hypothèse permettant d'expliquer les variations de réponse immune observées lors de l'infection avec la souche CHA $\Delta$ kynU est la mise en jeu du récepteur GPR35 dont l'acide kynurénique est un des principaux ligands connus (184). Le GPR35 est un récepteur couplé aux protéines G fortement exprimé dans le poumon (238) et par les cellules du système immunitaire dont les PNN et les APC (153,184,239). L'activation du GPR35 par l'acide kynurénique augmente l'expression des  $\beta$ 2-intégrines des PNN, impliquées dans leur recrutement sur le site infectieux et dans la régulation de leur apoptose (153,327). L'acide kynurénique entraîne également via le GPR35 une diminution des cytokines pro-inflammatoires lors d'une stimulation par du LPS (185). Des effets anti-inflammatoires similaires sont décrits *in vivo* au niveau intestinal lors de l'activation du GPR35 par l'acide kynurénique, mais il n'existe aucune donnée sur le rôle du GPR35 au cours de l'infection pulmonaire (243). Il n'existe pas à ce jour d'antagoniste pour le récepteur murin, rendant l'étude de l'implication du GPR35 difficile. Cependant, l'étude de l'expression des intégrines de membrane des cellules phagocytaires pourrait permettre d'explorer cette hypothèse de manière indirecte.

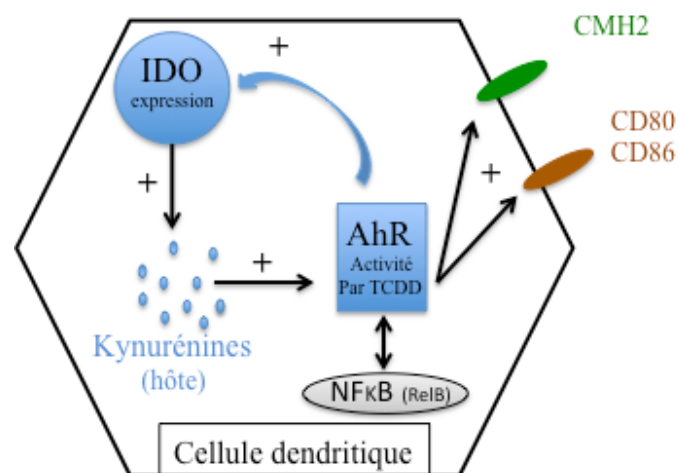
Dans ce travail, nous étudions également le rôle de la voie des kynurénines de l'hôte via l'inhibition de l'IDO et l'étude de sa transcription. Il n'existe actuellement pas de travail publié sur le rôle de l'IDO dans la réponse immune pulmonaire au cours d'une infection, alors que cette voie est très exprimée dans le tissu pulmonaire. Selon nos travaux, l'IDO est

impliquée dans le recrutement cellulaire alvéolaire qu'elle semble favoriser à la phase aigüe de l'infection. Encore une fois, l'hypothèse de l'implication de l'AhR peut être avancée, car l'activation de la transcription de l'IDO par l'AhR via les kynurénines est maintenant bien démontrée *in vitro* et *in vivo* au niveau pulmonaire (166,167,190). En revanche, l'IDO semble impliquée dans l'atténuation de la réponse cytokinique inflammatoire lors de l'infection avec CHAΔkynU, ce qui est cohérent avec son rôle de contre-régulation du processus inflammatoire déjà décrit dans la littérature (151,229). Dans ce travail, nous évoquons la possibilité d'une potentialisation de la voie des kynurénines de l'hôte par les kynurénines bactériennes via l'activation de l'AhR, devant les résultats des mesures des transcrits de l'IDO et des dosages métaboliques alvéolaires en présence de 1MT, en association avec le profil de réponse immune des souris infectées par CHAΔkynU dont le traitement par le 1MT inhibe le recrutement cellulaire et la transcription du CYP1A1. L'évaluation de l'activité de la voie des kynurénines de l'hôte au niveau pulmonaire en fonction de la souche infectante pourrait être estimée par mesure en western-blot de la concentration en IDO du tissu pulmonaire.

Enfin, la diminution des cytokines pro-inflammatoires observée avec la souche CHAΔkynU pourrait être reliée à l'activation de l'IDO murine par les kynurénines bactériennes, mais également à l'activation de l'AhR dont le rôle inhibiteur sur la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules de l'immunité innée est souvent décrit (152). La suite de ce travail est donc consacrée à explorer les effets des kynurénines bactériennes sur les CPA, principales cellules responsables de l'initiation de la réponse immune innée et de la production précoce des cytokines de l'inflammation.

## Chapitre 4 : Impact des kynurénines sur les APC *in vitro* et *in vivo*

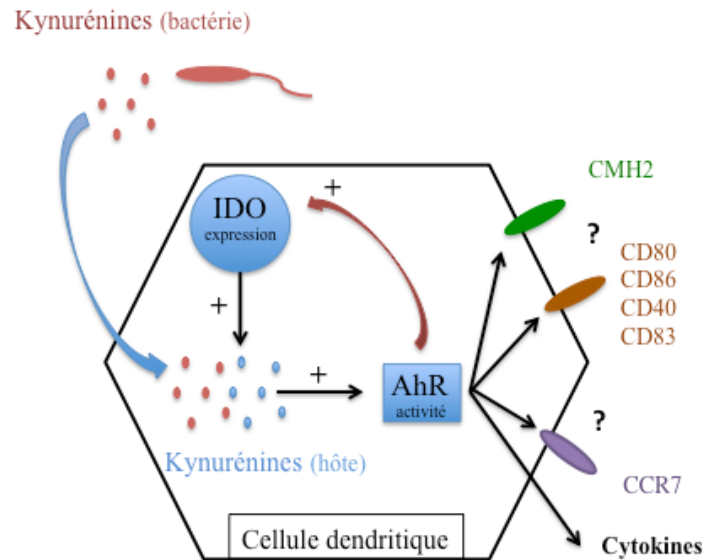
Ce chapitre est consacré à l'étude de l'action de la kynurénine et de l'acide kynurénique sur l'activation des APC. Les métabolites de la voie des kynurénines sont impliqués *in vivo* dans la modulation de la réponse innée et inflammatoire par des mécanismes peu connus à l'heure actuelle. Une des hypothèses serait une modulation de l'activité des APC dont le rôle dans l'initiation de la réponse immune est majeur par interaction de l'Ahr avec les kynurénines, qui sont des ligands connus de ce récepteur. Vogel *et. al.* démontrent que l'Ahr est impliqué dans la maturation et l'activation des DC, en modulant l'expression du CMHII, CD86 et CD80 à la membrane lorsqu'il est activé par le TCDD *in vitro*. L'activation de l'Ahr augmente également l'expression intracellulaire des enzymes IDO1 et 2 (257). *Pa* produit des métabolites de la voie des kynurénines à des niveaux variables selon les souches. La production de ces métabolites par la bactérie pourrait moduler la réponse immunitaire de l'hôte en modifiant l'immunogénicité des DC par la stimulation de l'Ahr et/ou de l'IDO (**Figure 31**).



**Figure 31: Rôles de l'Ahr dans la maturation et l'activation des DC.** L'activation de l'Ahr par le TCDD dans les DC induit l'expression à la membrane des molécules CMH2, CD80 et CD86 ainsi l'expression de l'IDO, entraînant une boucle d'activation de la production de kynurénines. L'Ahr activé peut se lier à la sous-unité RelB de NFκB, modulant ainsi son activité. (257,328) (329)

Nous étudions ici les effets *in vitro* de la kynurénine et de l'acide kynurénique sur l'expression à la membrane des molécules d'activation et de co-stimulation des DC, sur leurs profils de production cytokinique et l'impact sur leur capacité migratoire dans les relais

lymphatiques (**Figure 32**). Nous étudions ensuite l'effet des kynurénines sur l'activation des APC *in vivo*, et tentons d'explorer l'implication potentielle de l'AhR et de l'IDO dans cette activation.



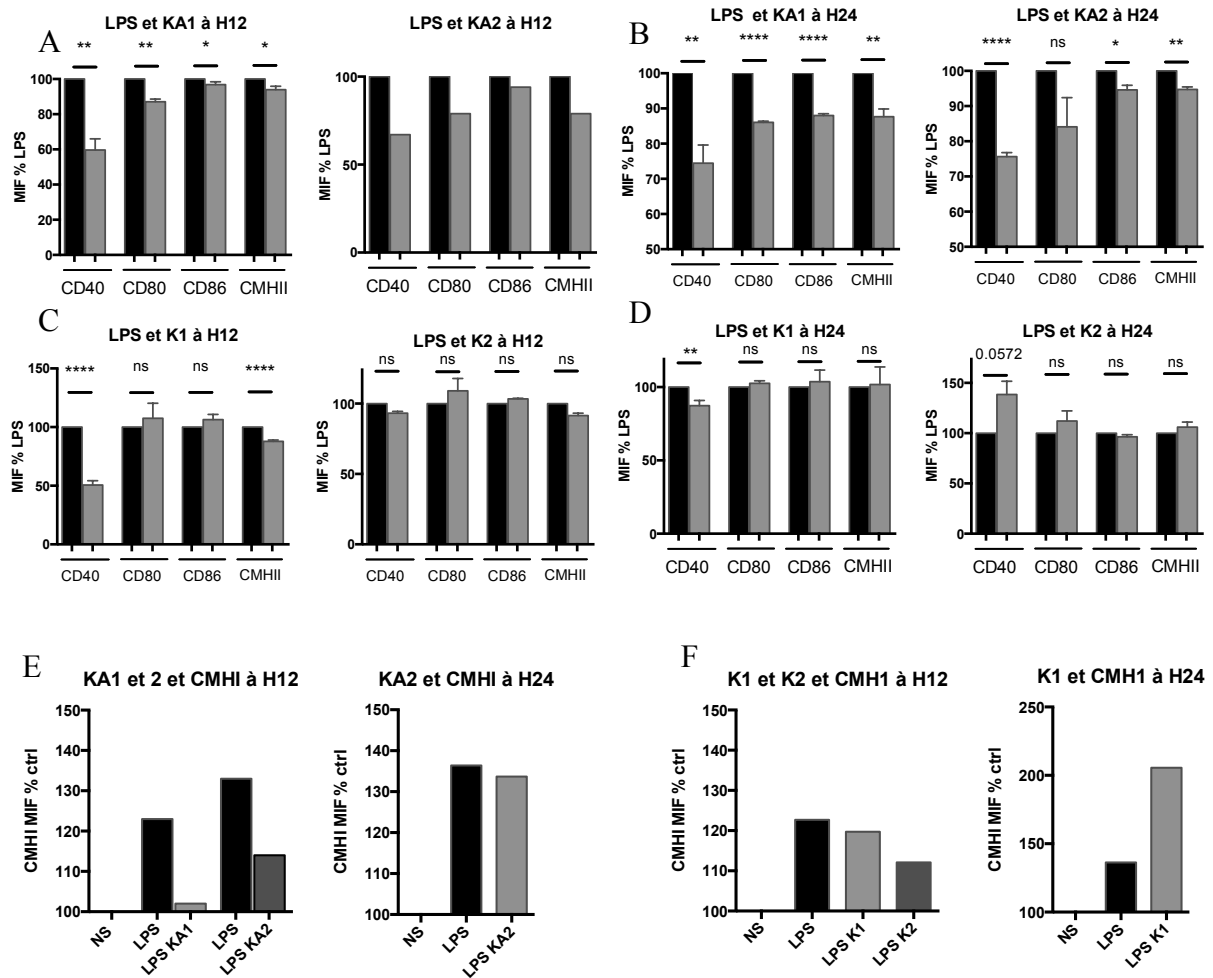
**Figure 32: Hypothèses de travail concernant le rôle des kynurénines sur l'immunogénicité des DC.** En activant l'AhR, les kynurénines bactériennes pourraient moduler l'immunogénicité des DC en modulant l'expression des molécules de membranes nécessaires à l'activation cellulaire et à la présentation antigénique, la production cytokinique et les capacités de migration dans les relais lymphatiques.

## 1) Kynurénines et DC *in vitro*

### a. Les kynurénines modulent l'immunogénicité des DC2.4

#### 1. L'acide kynurénique diminue l'expression des molécules de stimulation et de costimulation à la membrane

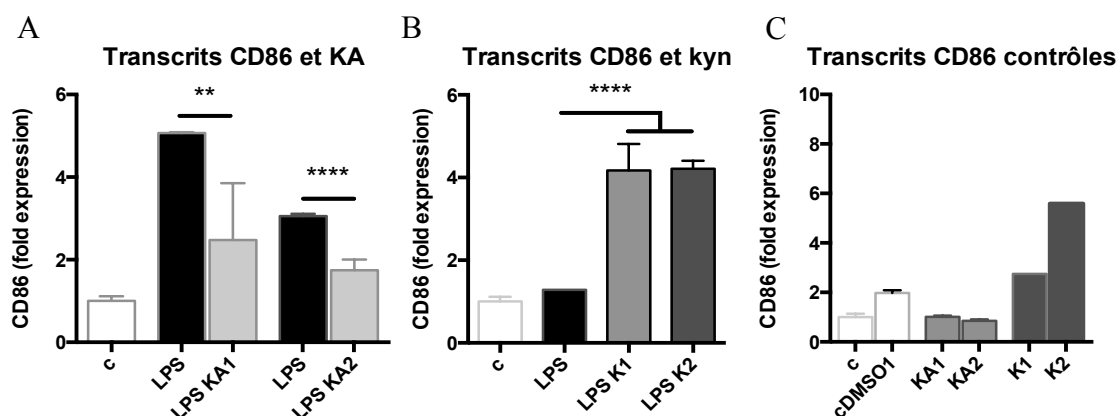
Lors de la stimulation par du LPS de DC2.4 *in vitro*, l'ajout dans le milieu de L-kynurénine de synthèse (K1= 5 mM et K2= 1 mM) ou d'acide kynurénique (KA1= 5mM, KA2= 1mM) modifie l'expression à la membrane de molécules témoignant de la maturation et de l'activation des DC, étudiées en cytométrie en flux à H12 et H24 de culture, en milieu DMEM. L'administration d'acide kynurénique à 5 et 1 mM diminue l'expression à la membrane des molécules CD40, CD80, CD86 et CMHII à H12 et H24 lors d'une stimulation des DC par le LPS (**Figure 33A et B**). On observe également une diminution du CMHI à H12 (**Figure 33E**). L'effet n'est pas retrouvé avec la L-kynurénine, qui entraîne uniquement une diminution du CD40 et du CMHII à la concentration de 5 mM à H12, et une augmentation du CMHI à H24 (**Figure 33C, D et F**). **Au total, l'acide kynurénique diminue l'expression des molécules d'activation à la membrane des DC.**



**Figure 33: Effet des kynurénines sur l'expression à la membrane des molécules de maturation et d'activation des DC. A,B,C,D,E,F** Moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) relative de la molécule étudiée à la membrane des DC stimulées avec du LPS (en noir) et de la L-kynurénine ou de l'acide kynurénique (en gris) par rapport à la stimulation par LPS à H12 et H24. **A, B**, MIF du CD40, CD80, CD86 et CMHII à H12 lors d'une stimulation pendant 12 heures et 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS et 5 mM (KA1) ou 1 mM (KA2) d'acide kynurénique. **C,D** MIF du CD40, CD80, CD86 et CMHII à H12 lors d'une stimulation pendant 12 heures et 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS et 5 mM (K1) ou 1 mM (K2) de L-kynurénine. Trois expériences à H24, deux expériences à H12, sauf pour KA2, une seule expérience à H12, ns : non significatif \*\* $p < 0,01$  \*\*\*\* $p < 0,0001$  par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne **E**, MIF du CMHII après stimulation par LPS et KA1 ou KA2 par rapport à la stimulation par LPS à H12 et H24. **F**, MIF du CMHII après stimulation par LPS et K1 ou K2 par rapport à la stimulation par LPS à H12 et H24. Une expérience réalisée.

Par ailleurs, l'ajout d'acide kynurénique diminue la transcription du CD86, alors que l'ajout de L-kynurénine l'augmente (**Figure 34**).

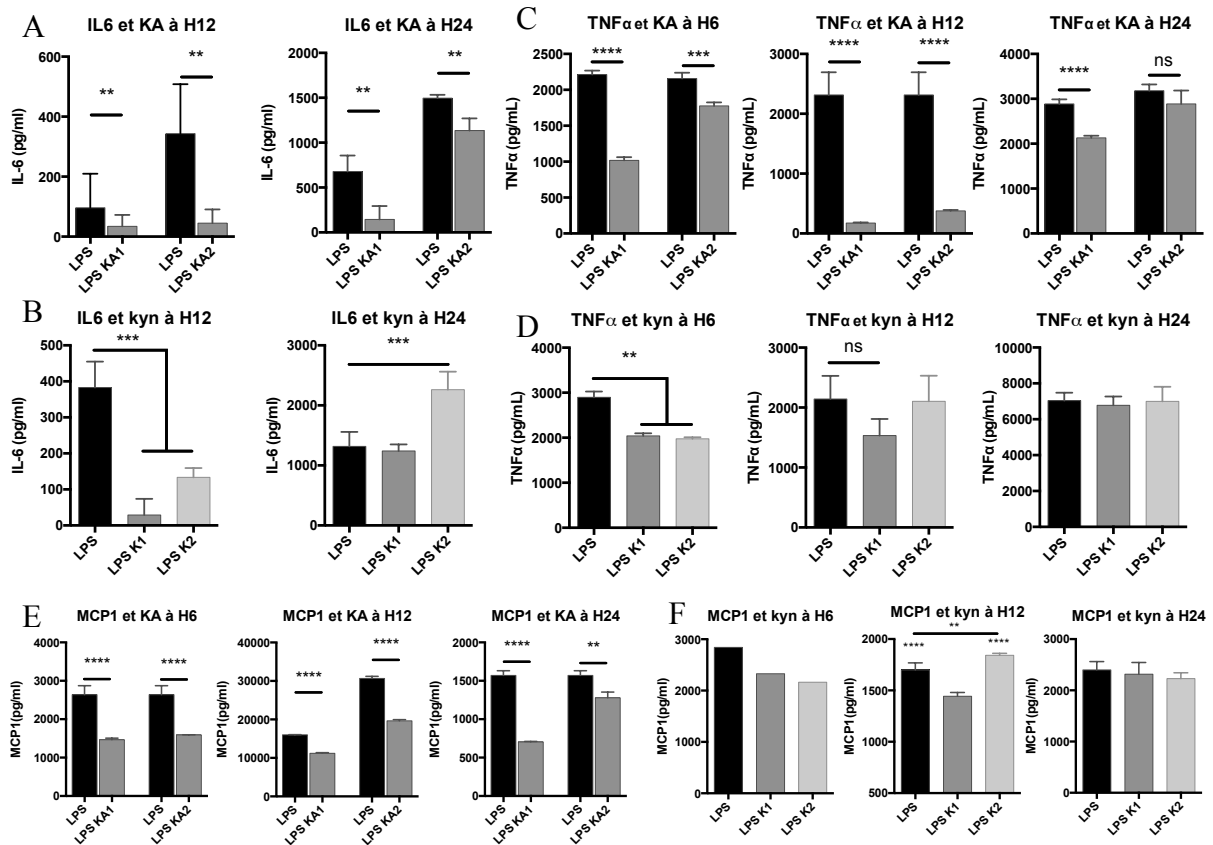




**Figure 34: Effets des kynurénines sur la transcription de CD86.** A, analyse par QPCR des transcrits de CD86 après une stimulation de 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS (noir) et 5 mM (KA1) ou 1 mM (KA2) d'acide kynurénique (gris) B, analyse par QPCR des transcrits de CD86 après une stimulation de 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS (noir) et 5mM (K1, gris clair) ou 1 mM (K2, gris foncé) de L-kynurénine. C, Groupe contrôle analysant les transcrits de CD86 des DC non stimulées (c), non stimulées avec DMSO (cDMSO), non stimulées avec KA1, KA2, K1 et K2. Deux expériences réalisées H24 en double. Ns : non significatif \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$  par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

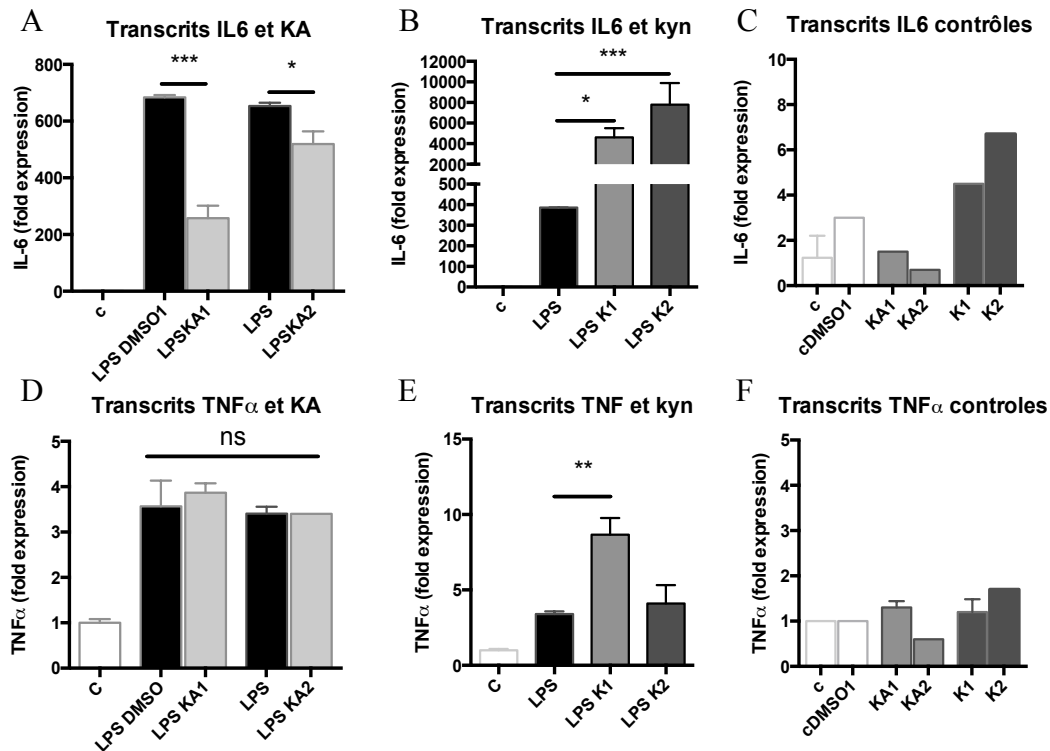
## 2. L'acide kynurénique diminue la sécrétion d'IL-6, de TNF $\alpha$ , et de MCP-1 et des transcrits de l'IL-6.

Lors de la stimulation par du LPS de DC2.4 *in vitro*, l'ajout dans le milieu de L-kynurénine de synthèse ou d'acide kynurénique modifie la production cytokinique mesurée par ELISA dans le surnageant du milieu de culture à H6, H12 et H24. Parmi les cytokines testées (IL-6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-12, IL-10, KC, MCP1), on ne retrouve qu'une production d'IL-6, TNF $\alpha$  et MCP1 dans cette lignée cellulaire. L'ajout d'acide kynurénique dans le milieu de culture diminue la production d'IL-6 à H12 et H24, ainsi que la production du TNF $\alpha$  et de la chémokine MCP1 à H6, H12 et H24 (**Figure 35A, C et E**). Lors de l'ajout de L-kynurénine, on note essentiellement une diminution d'IL-6 à H12 et une baisse de TNF $\alpha$  et de MCP1 à H6 (**Figure 35B, D et F**). L'ajout d'acide kynurénique diminue donc la production par les DC de cytokines proinflammatoires et de chémokines.



**Figure 35: Effet des kynurénines sur la production de cytokines par les DC.** A,B,C,D,E,F Dosages des cytokines par ELISA dans les surnageants des milieux de culture des DC2.4 stimulées par LPS (noir) avec ou sans L-kynurénine ou acide kynurénique à H6, H12 et H24. **A**, Dosage de l'IL-6 à H12 et H24 avec et sans KA. **B**, Dosage de l'IL-6 à H12 et H24 avec et sans L-kynurénine. **C**, Dosage du TNFα à H6, H12 et H24 avec et sans KA. **D**, Dosage du TNFα à H6, H12 et H24 avec et sans L-kynurénine. **E**, Dosage de MCP1 à H6, H12 et H24 avec et sans KA. **F**, Dosage de MCP1 à H6, H12 et H24 avec et sans L-kynurénine. Trois expériences réalisées à H12 et H24, deux expériences à H6, en triple. Ns : non significatif \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne

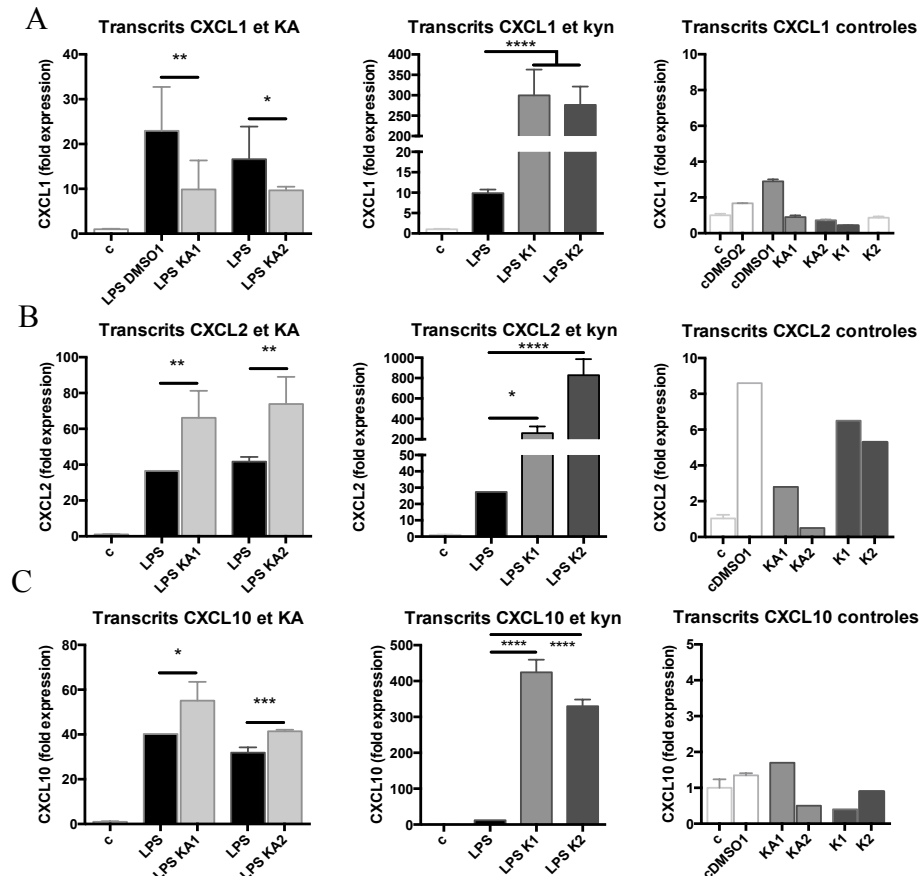
A H24, on retrouve une diminution de l'expression des ARNm de l'IL-6 lors de la stimulation des DC par le LPS et ajout d'acide kynurénique dans le milieu de culture. Il n'y a pas de variation des transcrits de TNFα à H24. En revanche, l'ajout de L-kynurénine augmente à H24 la transcription de l'IL-6, et du TNFα dans une moindre mesure (**Figure 36**).



**Figure 36: Effets des kynurénines sur la transcription de l'IL-6 et du TNF $\alpha$  par les DC2.4.** **A**, analyse par QPCR des transcrits de l'IL-6 après une stimulation de 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS et 5 mM (KA1) ou 1 mM (KA2) d'acide kynurénique. **B**, analyse par QPCR des transcrits de l'IL-6 après une stimulation de 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS et 5 mM (K1) ou 1 mM (K2) de L-kynurénine. **C**, groupe contrôle analysant les transcrits de l'IL6 des DC non stimulées (c), non stimulées avec DMSO (cDMSO), non stimulées avec KA1, KA2, K1 et K2. **D**, analyse par QPCR des transcrits du TNF $\alpha$  après une stimulation de 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS et 5 mM (KA1) ou 1 mM (KA2) d'acide kynurénique. **E**, analyse par QPCR des transcrits du TNF $\alpha$  après une stimulation de 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS et 5 mM (K1) ou 1 mM (K2) de L-kynurénine. **F**, groupe contrôle analysant les transcrits du TNF $\alpha$  des DC non stimulées (c), non stimulées avec DMSO (cDMSO), non stimulées avec KA1, KA2, K1 et K2. Trois expériences réalisées H24 en double. Ns : non significatif \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

### 3. Les kynurénines modulent la transcription des chémokines CXCL1, CXCL2 et CXCL10

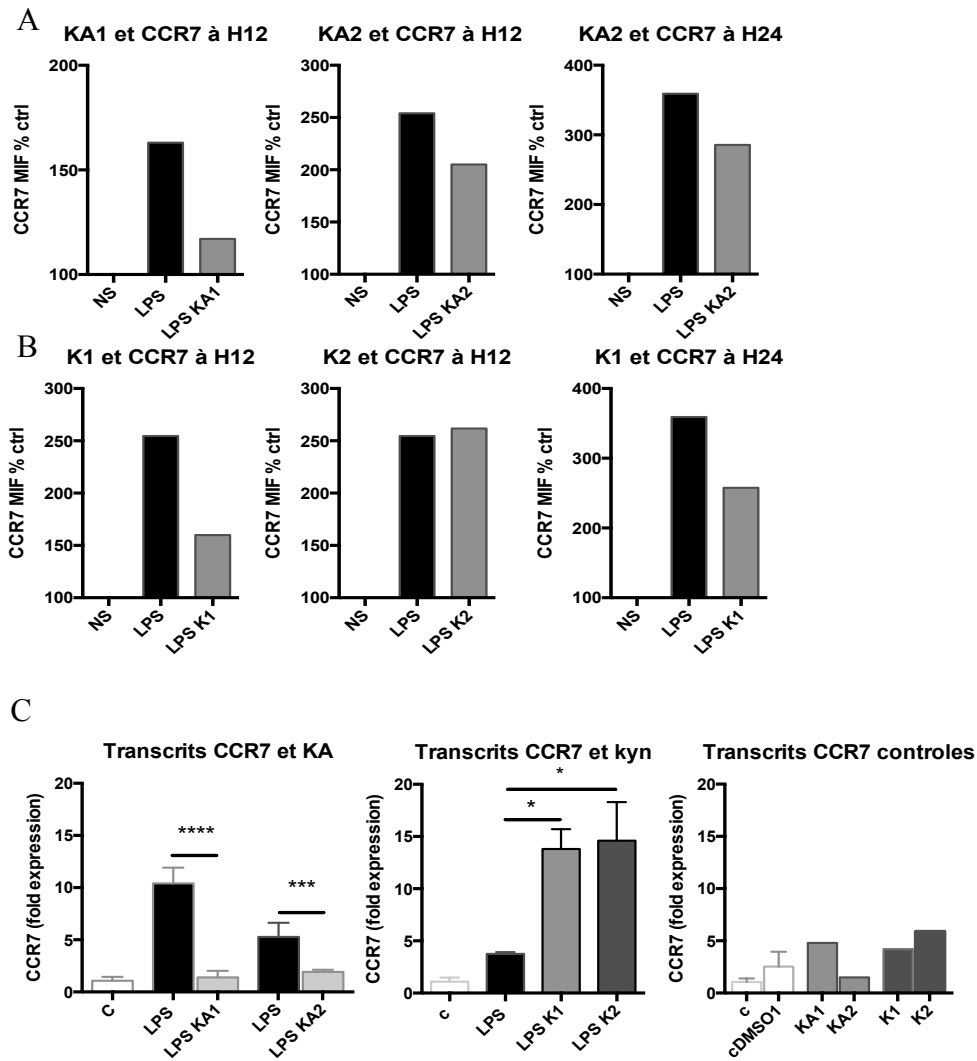
L'ajout d'acide kynurénique dans le milieu de culture lors de la stimulation des DC par le LPS entraîne une diminution de la transcription de CXCL1, mais une augmentation des transcrits de CXCL2 et CXCL10 à H24. L'ajout de L-kynurénine augmente la transcription de CXCL1, CXCL2 et CXCL10 à H24 (**Figure 37**). Dans cette lignée cellulaire, nous n'avons pas réussi à amplifier les transcrits de l'IDO, l'AHR ou ses gènes cibles CYP1A1 et AHR.



**Figure 37: Effets des kynurénines sur la transcription des iines CXCL1, CXCL2 et CXCL10.** A, B, C analyse par QPCR des transcrits des chémokines après une stimulation de 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS et 5 mM (KA1) ou 1 mM (KA2) d'acide kynurénique, ou 5 mM (K1) ou 1 mM (K2) de L-kynurénine. Groupe contrôle analysant les transcrits des DC non stimulées (c), non stimulées avec DMSO (cDMSO), non stimulées avec KA1, KA2, K1 et K2. A, analyse des transcrits de CXCL1 B, analyse des transcrits de CXCL2. C, analyse des transcrits de CXCL10. Trois expériences réalisées à H24 en double. Ns : non significatif \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$  par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

#### 4. Diminution de l'expression à la membrane et de la transcription de CCR7

L'ajout de kynurénines (L-kynurénine et acide kynurénique) dans le milieu de culture au cours de la stimulation des DC2.4 par du LPS diminue à H12 et H24 l'expression à la membrane du récepteur CCR7 responsable de la migration des DC dans les ganglions lymphatiques. L'acide kynurénique entraîne également une diminution de la transcription de CCR7, alors que la L-kynurénine l'augmente (Figure 38). **L'acide kynurénique inhibe donc la transcription et l'expression membranaire du CCR7.**



**Figure 38: Effets des kynurénines sur l'expression à la membrane et la transcription de CCR7.** **A, B** Moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) relative de CCR7 par rapport aux cellules contrôles analysée en cytométrie en flux après une stimulation de 12 et 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS et 5 mM (KA1) ou 1 mM (KA2) d'acide kynurénique. Une expérience représentative de deux effectuées. **B**, analyse en cytométrie en flux de l'expression à la membrane de CCR7 après une stimulation de 12 et 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS et 5 mM (K1) ou 1 mM (K2) de L-kynurénine. Une expérience représentative de deux effectuées. **C**, analyse par QPCR des transcrits de CCR7 après une stimulation de 24 heures des DC avec 1  $\mu$ M de LPS et 5 mM (KA1) ou 1 mM (KA2) d'acide kynurénique, 5mM (K1) ou 1 mM (K2) de L-kynurénine. Groupe contrôle analysant les transcrits de CCR7 des DC non stimulées (c), non stimulées avec DMSO (cDMSO), non stimulées avec KA1, KA2, K1 et K2. Trois expériences réalisées H24 en double. Ns: non significatif \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$  par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

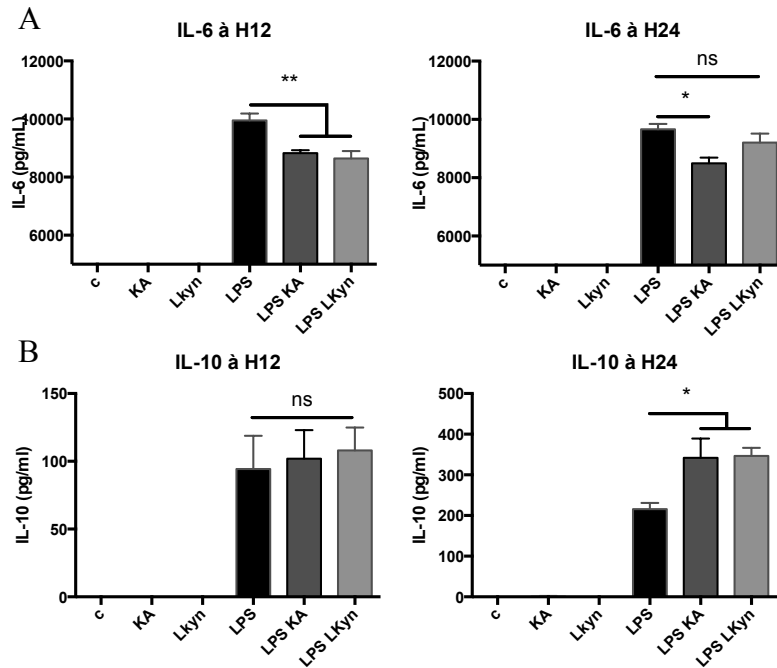
Les principaux effets de l'acide kynurénique et de la L-kynurénine sur les DC2.4 sont résumés dans le **tableau 2**.

DC2.4	Acide kynurénique		L-kynurénine	
	H12	H24	H12	H24
Expression CD40, CD80, CD86, CMHII	↘	↘	↗	→
Cytokines pro-inflammatoires	↘	↘	↘ ou →	→ ou ↗
Chimiokines	↘	↘ MCP1 et CXCL1 ↗ CXCL2 et CXCL10	→	→ ou ↗
CCR7	↘	↘	→	↗ transcription ↘ expression membranaire

**Tableau 2: Principaux effets des kynurénines sur les paramètres d'activation et de maturation des cellules dendritiques.** Résumé des principales actions de l'acide kynurénique et de la L-kynurénine sur les DC2.4, relevées à H12 et H24 d'exposition aux molécules. Les paramètres étudiés sont l'expression à la membrane des molécules CD40, CD80, CD86, CMHII en cytométrie de flux, les dosages par ELISA des cytokines proinflammatoires IL-6 et TNF et de la chémokine MCP1, ainsi que la mesure de la transcription des gènes correspondants par QPCR et des gènes CXCL1, CXCL2 et CXCL10. Enfin, nous avons évalué la transcription et l'expression à la membrane du CCR7.

### **b. Les kynurénines interfèrent avec la maturation et l'activation des BMDC**

Devant les limites d'utilisation de la lignée cellulaire DC2.4, l'effet des kynurénines a été étudié succinctement sur BMDC murines. Lors de la stimulation des BMDC avec du LPS, l'enrichissement du milieu par 1 mM d'acide kynurénique entraîne à H12 une diminution significative de l'expression du CMH2 et de CD86 à la membrane en cytométrie en flux. Le même effet est retrouvé de manière moins marquée avec la L-kynurénine. L'administration du surnageant de la souche CHAΔkynU conjointement au LPS entraîne également une baisse de l'expression de ces marqueurs à la membrane à H12 (data non présentées). L'analyse de la production dans les surnageants des milieux de culture d'un panel de cytokines montre que les kynurénines modulent les productions cytokiniques des BMDC (**Figure 39**). L'acide kynurénique diminue la production d'IL-6 par les BMDC, mais augmente la production d'IL-10.



**Figure 39: Effets des kynurénines sur la production cytokinique des BMDC.** Dosages des cytokines par ELISA dans les surnageants des milieux de culture des BMDC stimulées par LPS avec ou sans 1 mM de L-kynurénine ou d'acide kynurénique à H12 et H24 de stimulation. **A**, IL-6 à H12 et H24 de stimulation, **B**, IL-10 à H12 et H24 de stimulation. Ns : non significatif \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

Au total, nous montrons que les kynurénines, principalement l'acide kynurénique, diminuent l'activation des DC *in vitro* et leur capacité de synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Dans la suite du travail, nous avons explorés le rôle des kynurénines dans l'activation des APC *in vivo* dans notre modèle murin de pneumonie aigüe à *Pa*.

## Chapitre 4 : Impact des kynurénines sur les APC *in vitro* et *in vivo*

### 1-*In vitro*

➤ **Rationnel :**

APC= cellules clés de l'initiation et orchestration de la réponse immunitaire innée  
AhR et IDO exprimés à haut niveau, rôle connu dans l'activation cellulaire  
Modulation des fonctions des APC par acide kynurénique/kynurénine de *Pa* via IDO et AhR?

➤ **Hypothèses :**

Les métabolites bactériens interfèrent avec l'activation des APC :  
modulation de la réponse immunitaire innée à l'infection

➤ **Méthode:**

Stimulation de DC par du LPS +/- kynurénine ou acide kynurénique de synthèse  
Etude: Ag de membrane, production cytokinique, CCR7

➤ **Principaux résultats:**

Acide kynurénique: diminue l'activation des DC.  
Rôle moins tranché de la kynurénine

➤ **Principales limites:**

Utilisation de molécules de synthèse, pas de modèle d'infection  
Expérimentations complémentaires nécessaires pour démontrer l'implication de l'IDO/l'AhR (Utilisation d'inhibiteur, cellules KO)

➤ **Perspectives immédiates:**

Reproductibilité du phénotype *in vivo* avec *CHAΔkynU* (productrice d'acide kynurénique)?

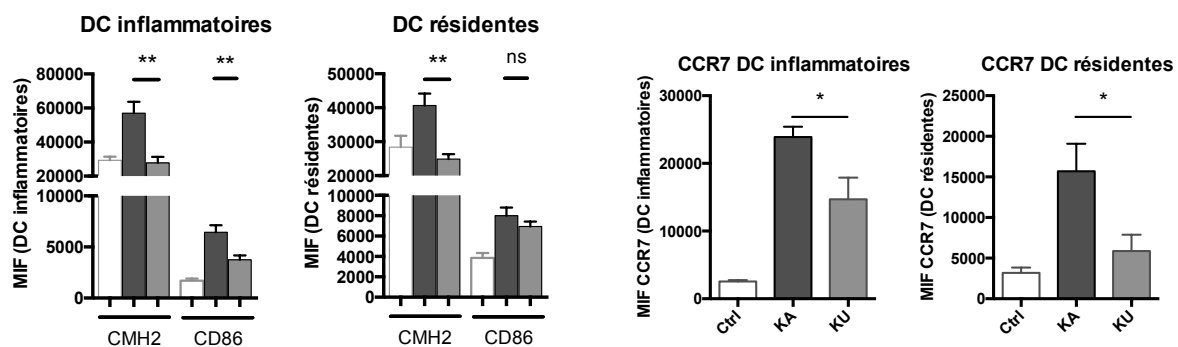


## 2) Kynurénines et APC *in vivo*

Afin d'étudier l'effet des kynurénines bactériennes sur l'activation des APC (DC et macrophages), les souris sont infectées avec les souches CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU. A H12 et H24, les animaux sont sacrifiés et les poumons sont prélevés. Les cellules pulmonaires totales sont isolées puis étudiées en cytométrie en flux. Les DC correspondent aux cellules (CD45+, Ly6G-, F4/80-, CD11c+), les DC résidentes sont marquées (CD103+, CD11b-), les DC inflammatoires sont (CD103-, CD11b+). Les macrophages alvéolaires sont marqués (CD45+, Ly6G-, F4/80+, CD11c+) dans le LBA, les macrophages interstitiels sont marqués (CD45+, Ly6G-, F4/80+, CD11c-) dans le tissu pulmonaire. Au temps H12, les données sur les cellules du LBA sont également disponibles en plus des données tissulaires. L'activation des DC et des macrophages est évaluée par l'expression des marqueurs membranaires CMHII et CD86. L'expression membranaire du récepteur de chémokines CCR7, permettant le homing des DC vers les ganglions lymphatiques, est également évaluée.

### a. Les kynurénines bactériennes diminuent l'activation des DC *in vivo*

L'infection des souris par une souche productrice de kynurénines CHA $\Delta$ kynU est associée à une diminution de l'activation des DC pulmonaires à H24, où l'expression membranaire du CMHII, du CD86 et du CCR7 est diminuée par rapport à CHA $\Delta$ kynA (Figure 40). Il n'y a pas de différence de recrutement cellulaire à ce temps entre les groupes.

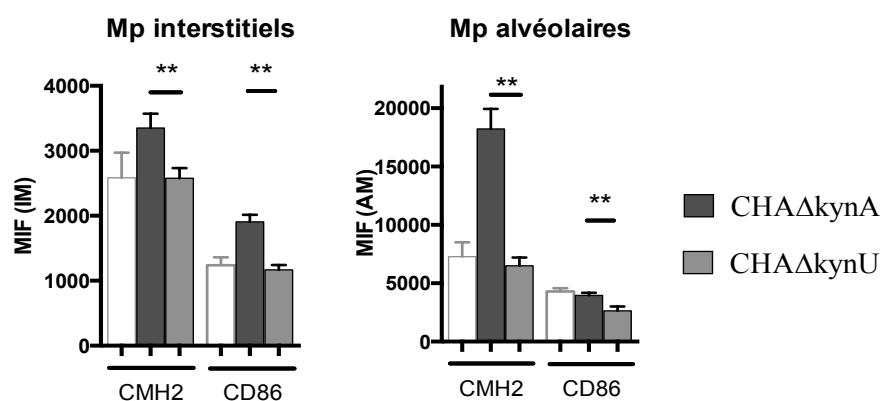


**Figure 40: Effets des kynurénines bactériennes sur l'activation des DC pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aiguë à *Pa*.** Mesure de la moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) par cytométrie en flux des protéines membranaires CMHII, CD86 et CCR7 à la surface des DC inflammatoires et résidentes isolées dans le tissu pulmonaire de souris infectées par les souches CHA $\Delta$ kynA (gris foncé) ou CHA $\Delta$ kynU (gris clair) à H24 de l'infection pulmonaire aiguë. Les souris contrôles (blanc) sont instillées avec du PBS. N= 5 par groupe, ns : non significatif \*p<0,05 \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

Aucune différence n'est observée à H12 entre les MIF des CMHII, CD86 et CCR7 des DC des souris WT infectées par la souche CHA $\Delta$ kynA par rapport à CHA $\Delta$ kynU, que ce soit pour les cellules isolées dans le LBA ou dans le tissu pulmonaire.

### **b. Les kynurénines bactériennes diminuent l'activation des macrophages pulmonaires *in vivo***

A H24, on observe comme pour les DC une atténuation de l'expression du CMH2 et CD86 à la membrane des macrophages interstitiels et alvéolaires (Figure 41). Il n'y a pas de différence de recrutement cellulaire à ce temps entre les groupes.



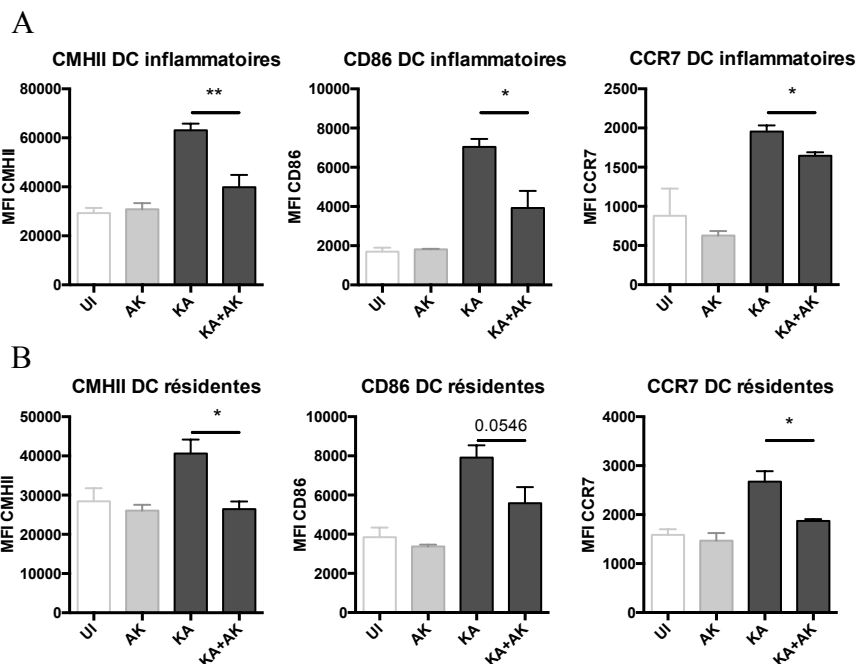
**Figure 41: Effets des kynurénines bactériennes sur l'activation des macrophages pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aiguë à *Pa*.** Mesure de la moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) par cytométrie en flux des protéines membranaires CMHII et CD86 à la surface des macrophages interstitiels et alvéolaires isolés respectivement dans le tissu pulmonaire et le LBA de souris infectées par les souches CHAΔkynA (gris foncé) ou CHAΔkynU (gris clair) à H24 de l'infection pulmonaire aiguë. Les souris contrôles (blanc) sont instillées avec du PBS. N= 5 par groupe, \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

Comme pour les DC, aucune différence n'est observée à H12 entre les MIF des CMHII et CD86 des macrophages alvéolaires et interstitiels chez les souris WT infectées par la souche CHAΔkynA par rapport à CHAΔkynU, que ce soit pour les cellules isolées dans le LBA ou dans le tissu pulmonaire.

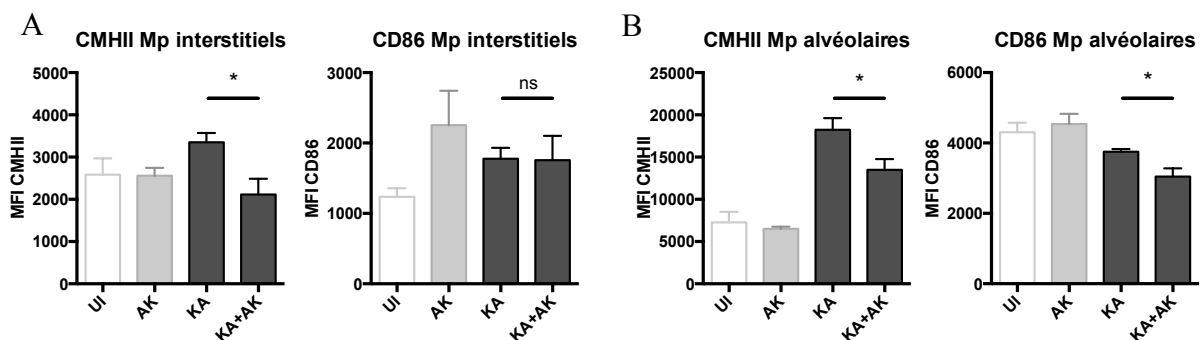
### **c. L'acide kynurénique diminue l'activation des APC *in vivo***

Nous avons ensuite étudié les effets de l'acide kynurénique sur l'activité des APC *in vivo* au cours de la pneumonie aiguë à *Pa*, afin d'évaluer si cela permettait de reproduire le phénotype observé avec la souche CHAΔkynU. Nous avons donc comparé l'activation des APC du tissu pulmonaire à H24 de l'infection avec la souche CHAΔkynA chez des souris supplémentées ou non par une dose unique de 2 mM d'acide kynurénique administrée par voie intra-nasale au moment de l'instillation bactérienne. Nous retrouvons une diminution de l'expression à la membrane des DC du CMHII, CD86 et CCR7 chez les souris supplémentées en acide kynurénique. De même, l'acide kynurénique entraîne une diminution de l'expression

membranaire des macrophages du CMHII et du CD86, **suggérant que l'acide kynurénique diminue l'activité des APC également *in vivo*** (Figures 42 et 43).

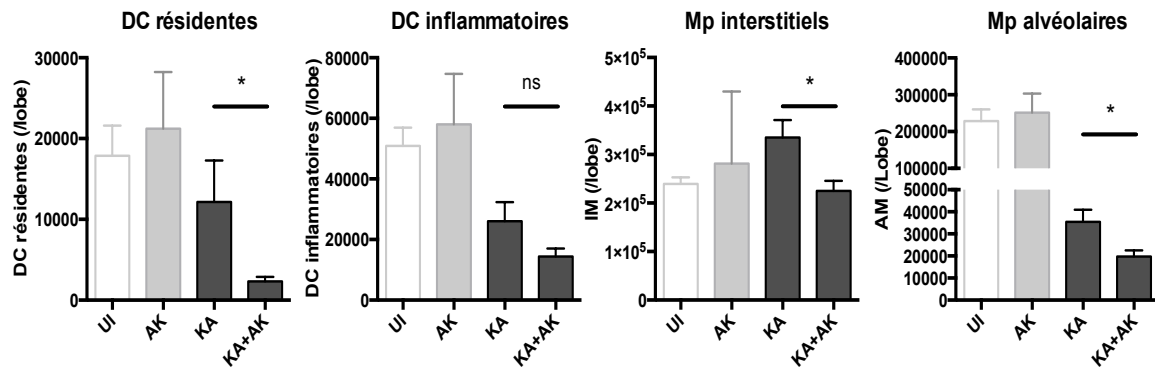


**Figure 42: Effets de l'acide kynurénique sur l'activation des DC pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aiguë à *Pa*.** Mesure de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) par cytométrie en flux des protéines membranaires CMHII, CD86 et CCR7 à la surface **A**, des DC inflammatoires et **B**, des DC résidentes isolées dans le tissu pulmonaire de souris infectées par les souches CHAΔkynA (KA, gris foncé), ou CHAΔkynA avec ajout de 2mM d'acide kynurénique de synthèse au moment de l'instillation de la suspension bactérienne (KA+AK, gris foncé) à H24 de l'infection pulmonaire aiguë. Les souris contrôles sont instillées avec du PBS (blanc) ou de l'acide kynurénique seul (gris clair). N= 5 par groupe, \*p<0,05 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.



**Figure 43: Effets de l'acide kynurénique sur l'activation des macrophages pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aiguë à *Pa*.** Mesure de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) par cytométrie en flux des protéines membranaires CMHII et CD86 à la surface **A**, des macrophages interstitiels et **B**, des macrophages alvéolaires isolés respectivement dans le tissu pulmonaire et le LBA de souris infectées par les souches CHAΔkynA (KA, gris foncé), ou CHAΔkynA avec ajout de 2mM d'acide kynurénique de synthèse au moment de l'instillation de la suspension bactérienne (KA+AK, gris foncé) à H24 de l'infection pulmonaire aiguë. Les souris contrôles sont instillées avec du PBS (blanc) ou de l'acide kynurénique seul (gris clair). N= 5 par groupe, \*p<0,05 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

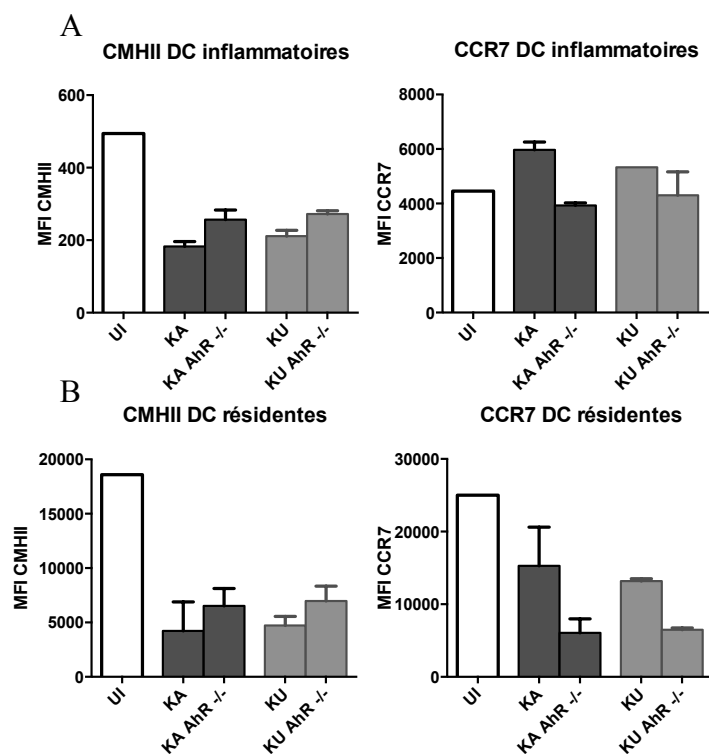
Le recrutement des APC est présenté ci-dessous en rappel :



#### d. Rôle de l'AhR et de l'IDO dans l'activation des APC *in vivo*

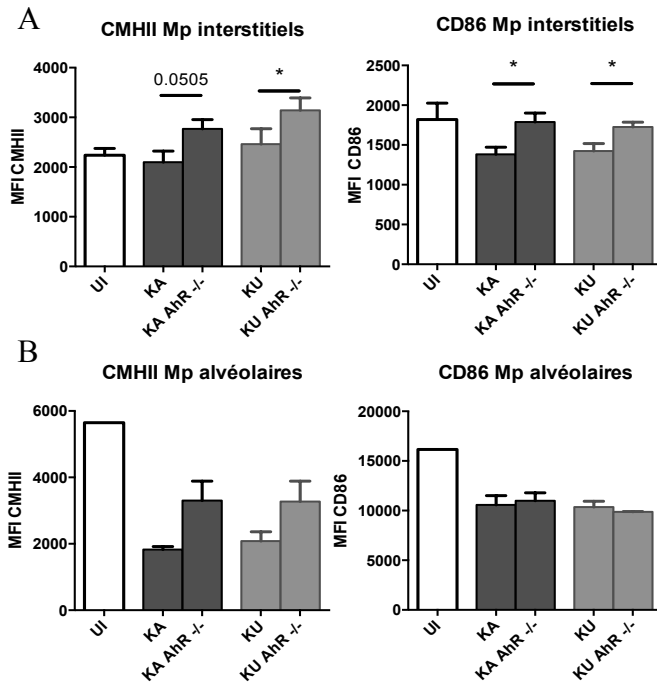
Le rôle de l'AhR dans l'activation des APC est approché *in vivo* en comparant l'expression membranaire des molécules CMHII, CD86 et CCR7 entre des souris WT et des souris AhR KO infectées par les souches CHAΔkynA et CHAΔkynU à H12 de l'infection pulmonaire aigue.

On observe dans le groupe de souris AhR KO une augmentation de l'expression du CMHII à la surface des DC alvéolaires, mais une diminution de l'expression du CCR7. Il n'y a pas de différence d'expression du CD86 (**Figure 44**). Il n'y a pas de données disponibles au temps H24. Ainsi, l'AhR semble responsable d'une diminution de l'expression du CMHII des DC alvéolaires, mais d'une augmentation de l'expression de CCR7 dans notre modèle.



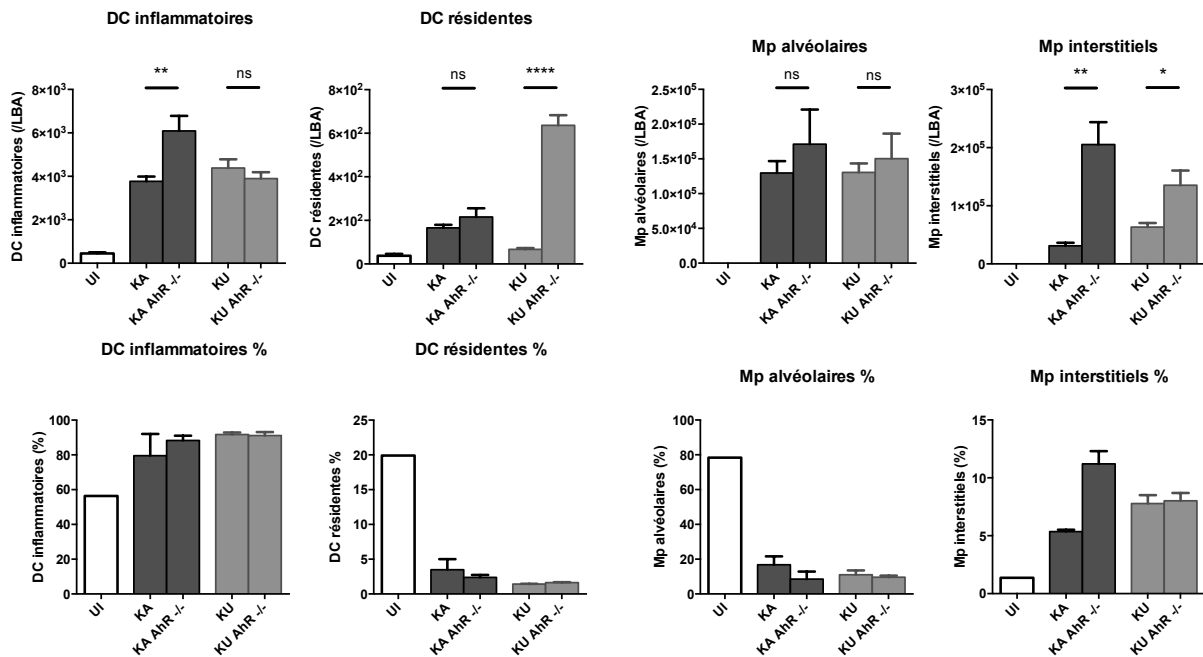
**Figure 44: Rôle de l'AhR dans l'activation des DC pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aiguë à *Pa*** Mesure de la moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) par cytométrie en flux des protéines membranaires CMHII, CD86 et CCR7 à la surface des DC inflammatoires et résidentes de souris WT et AhR KO (AhR <sup>-/-</sup>) infectées par les souches CHAΔkynA (gris foncé) ou CHAΔkynU (gris clair) à H12 de l'infection pulmonaire aiguë. Les souris contrôles (blanc) sont instillées avec du PBS. **A**, Mesure de la MFI du CMHII et de CCR7 à la surface des DC inflammatoires isolées dans le LBA **B**, Mesure de la MFI du CMHII et de CCR7 à la surface des DC résidentes isolées dans le LBA (N= 2 par groupe) Pas de test statistique réalisable car nécessité de pooler les LBA (n=2 par groupe).

Le rôle de l'AhR dans l'activation des macrophages est étudié *in vivo* en comparant l'expression membranaire des molécules CMHII et CD86 entre des souris WT et des souris AhR KO infectées par les souches CHAΔkynA et CHAΔkynU à H12 de l'infection pulmonaire aiguë. On observe une augmentation de l'expression du CMHII des macrophages alvéolaires, ainsi qu'une augmentation du CMHII et CD86 des macrophages interstitiels chez les souris AhR KO par rapport aux souris WT (**Figure 45**). Il n'y a pas de donnée disponible au temps H24. **L'AhR est donc responsable d'une diminution de l'activité des macrophages pulmonaires au cours de la pneumonie aiguë à *Pa*.**



**Figure 45: Rôle de l'AhR dans l'activation des macrophages pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aiguë à *Pa*.** Mesure de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) par cytométrie en flux des protéines membranaires CMHII et CD86 à la surface des macrophages interstitiels et alvéolaires de souris WT et AhR KO (AhR <sup>-/-</sup>) infectées par les souches CHAΔkynA (gris foncé) ou CHAΔkynU (gris clair) à H12 de l'infection pulmonaire aiguë. Les souris contrôles (blanc) sont instillées avec du PBS. **A**, Mesure de la MFI du CMHII et du CD86 à la surface des macrophages interstitiels **B**, Mesure de la MFI du CMHII et du CD86 à la surface des macrophages alvéolaires isolés dans le LBA (N= 2 par groupe) Pas de test statistique réalisable car nécessité de pooler les LBA.

Le recrutement des APC est présenté ci-dessous en rappel :

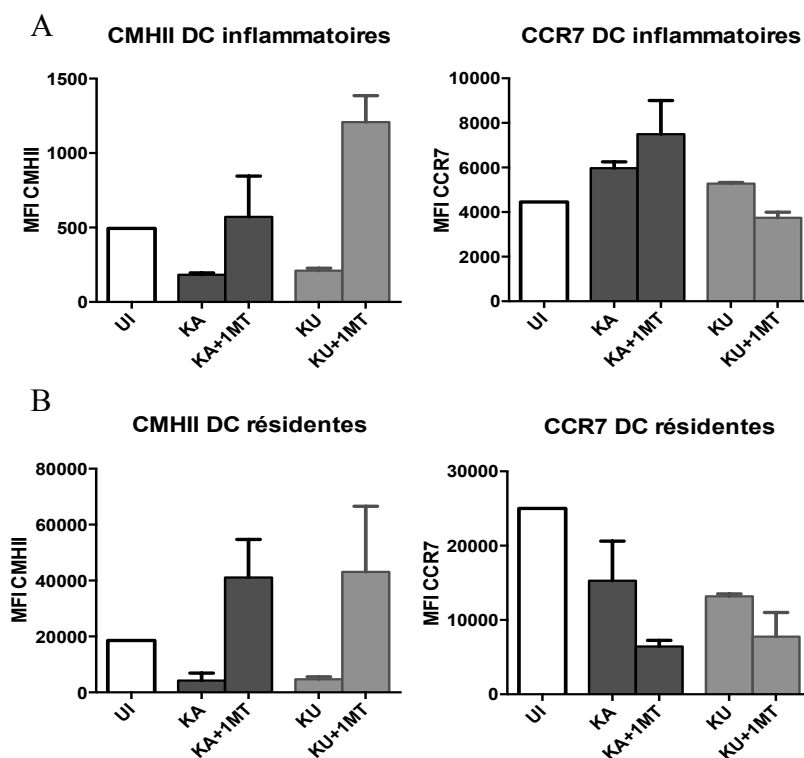


### e. Rôle de l'IDO dans l'activation des APC *in vivo*

Le rôle de l'IDO dans l'activation des APC est étudié *in vivo* en traitant 12 heures avant infection les souris par le 1MT, inhibiteur de l'IDO, puis en comparant ensuite l'expression membranaire à la surface des APC des molécules CMHII, CD86 et CCR7 entre les souris traitées et non traitées à H12 de l'infection. On observe dans le groupe des souris traitées par le 1MT une augmentation du CMHII des DC du LBA sans modification de l'expression du CD86, et une tendance à la diminution de l'expression du CCR7 (**Figure 46**).

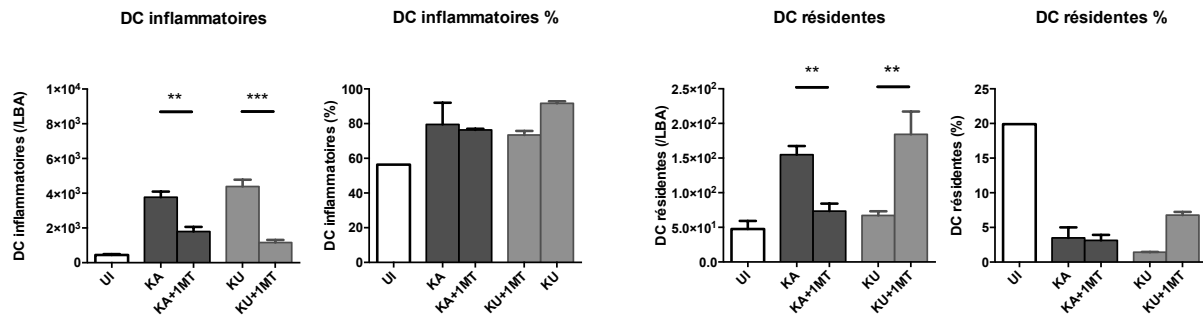
Dans cette même expérience, on n'observe pas de différence d'activation des macrophages pulmonaires et alvéolaires entre les souris traitées et non traitées.

**L'IDO comme l'AhR semblent favoriser la diminution de l'expression du CMHII des DC alvéolaires, mais l'augmentation de l'expression de CCR7 dans notre modèle.**



**Figure 46: Rôle de l'IDO dans l'activation des DC pulmonaires dans un modèle murin de pneumonie aigüe à *Pa*.** Mesure de la moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) par cytométrie en flux des protéines membranaires CMHII et CCR7 à la surface des DC isolées dans le LBA de souris WT infectées par les souches CHAΔkynA (gris foncé) ou CHAΔkynU (gris clair) comparées à des souris WT traitées par 1MT (+1MT), à H12 de l'infection pulmonaire aigüe. Les souris contrôles (blanc) sont instillées avec du PBS. **A**, Mesure des MIF des DC inflammatoires isolées dans le LBA **B**, Mesure des MIF des DC résidentes isolées dans le LBA (N= 2 par groupe) Pas de test statistique réalisable car nécessité de pooler les LBA.

Le recrutement des DC est présenté ci-dessous en rappel :



## Chapitre 4 : Impact des kynurénines sur les APC *in vitro* et *in vivo*

### 2-*In vivo*

#### ➤ **Rationnel :**

Acide kynurénique: altère les fonctions des DC *in vitro*

Impact *in vivo* de la production d'acide kynurénique par *Pa* (CHAΔkynU)?

Rôle AhR/ IDO (exprimés à haut niveau dans le tissu pulmonaire)?

#### ➤ **Hypothèses :**

L'acide kynurénique bactérien interfère avec l'activation des APC *in vivo*

#### ➤ **Méthode:**

Etude de l'activation des DC et Mp dans le modèle d'infection respiratoire aigüe (CHAΔkynU vs CHAΔkynA): expression du CMHII, CD86, CCR7 par FACS

Comparaison CHAΔkynA vs CHAΔkynA avec instillation d'acide kynurénique

Souris AhR KO

Souris traitées par le 1 MT

#### ➤ **Principaux résultats:**

CHAΔkynU: diminution du recrutement et l'activation des DC et Mp (Ag de membrane, cytokines proinflammatoires)

Ajout d'acide kynurénique: diminue l'activation des DC et Mp (Ag de membrane)

AhR: impliqué dans la diminution du CMHII et CD86

IDO: impliqué dans la diminution du CMHII

#### ➤ **Principales limites:**

Pas d'étude chez les souris (AhR KO + 1MT)

Discordance CMHII/CCR7

Temps d'analyse à compléter (H12 et H24)

#### ➤ **Perspectives immédiates:**

La voie des kynurénines bactériennes module la réponse immune de l'hôte:

. enzymes bactériennes comme cibles thérapeutiques potentielles à visée anti-lésionnelle?

. rôle dans le passage à la chronicité et dans la pneumonie chronique?



## ***Discussion***

La production de métabolites de la voie des kynurénines par les bactéries est associée à une diminution du nombre et de l'activation des APC, principalement au niveau du secteur alvéolaire. De la même manière, l'adjonction d'acide kynurénique diminue le nombre et l'activation des APC au cours de la pneumonie aiguë à *Pa*. Les données recueillies *in vitro* montrent également le rôle inhibiteur de l'acide kynurénique sur les APC, ainsi que la diminution de leur capacité de synthèse des cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats suggèrent que la production de ce métabolite par la bactérie pourrait limiter l'activation des cellules sentinelles de l'hôte responsables de la mise en place et de l'orchestration des réponses immunes innée et adaptative. Ce mécanisme pourrait être en partie responsable de l'atténuation de la réponse cytokinique inflammatoire alvéolaire observée au cours de l'infection avec la souche CHAΔkynU, les macrophages et DC étant les principales cellules responsables de l'initiation de la réponse immune innée.

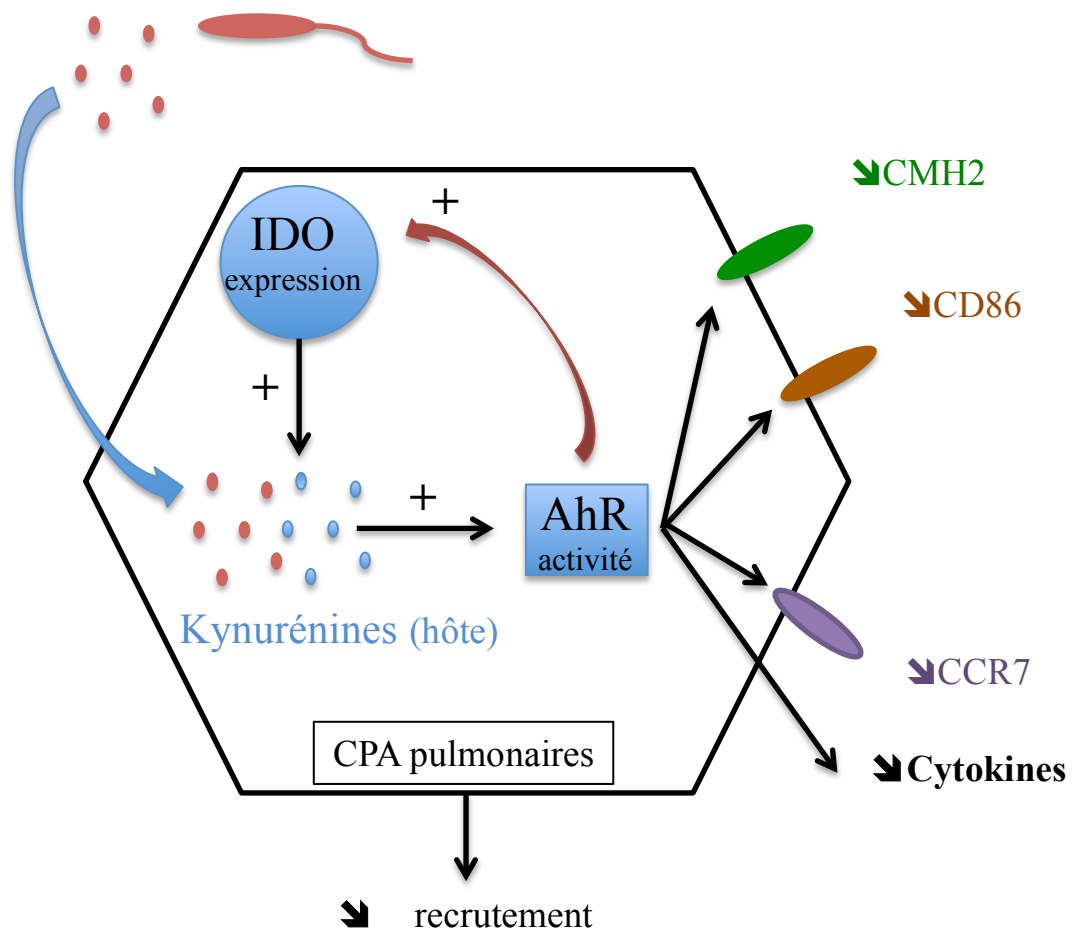
L'AhR comme l'IDO semblent impliqués *in vivo* dans la modulation de l'activité des APC médiée par les kynurénines, comme déjà montré *in vitro* par Vogel *et al.* (166). L'exploration *in vitro* des interactions entre les kynurénines bactériennes, l'IDO et l'AhR nécessiterait l'utilisation de souches bactériennes n'exprimant pas le SST3 afin de pouvoir prolonger les temps d'infection et d'éviter de « masquer » les variations de réponse cellulaire dépendante des kynurénines par une réponse inflammatoire majeure et une cytolysse intense. La démonstration de l'existence d'une boucle d'activation positive *in vitro* entre IDO, kynurénines bactériennes et AhR nécessiterait de réaliser les dosages des kynurénines dans le milieu de culture de cellules infectées par des souches *Pa*ΔkynA et *Pa*ΔkynU, en comparant des DC issues de souris sauvages à des DC issues de souris AhR KO, avec ou sans traitement par le 1MT.

L'IDO et l'AhR, qui représentent deux acteurs essentiels de la réponse immune pulmonaire, semblent tous deux contribuer à la limitation de l'activation des APC aux temps précoces de la pneumonie aiguë à *Pa*. Ces résultats sont cohérents avec de précédentes études démontrant que l'activation de l'AhR altère le recrutement et les fonctions des DC au cours de l'infection respiratoire aiguë (253,330,331). Par ailleurs, en atténuant l'expression du CCR7 des DC, les kynurénines pourraient être responsables d'une altération de la mise en place de la réponse immune transitionnelle et adaptative. Une étude rapporte que l'activation de l'AhR au cours de la pneumonie grippale réduit le nombre de DC résidentes et

inflammatoires dans les relais lymphatiques et altère leur activation (330). D'autres travaux seront nécessaires pour étudier le rôle des kynurénines bactériennes dans la mise en place de la réponse immune adaptative, notamment dans les modèles de pneumonie chronique.

Dans la figure ci-dessous est résumé l'effet des kynurénines bactériennes sur le recrutement et l'activation des CPA lors de la pneumonie aigue à *Pa* selon les résultats obtenus dans ce travail :

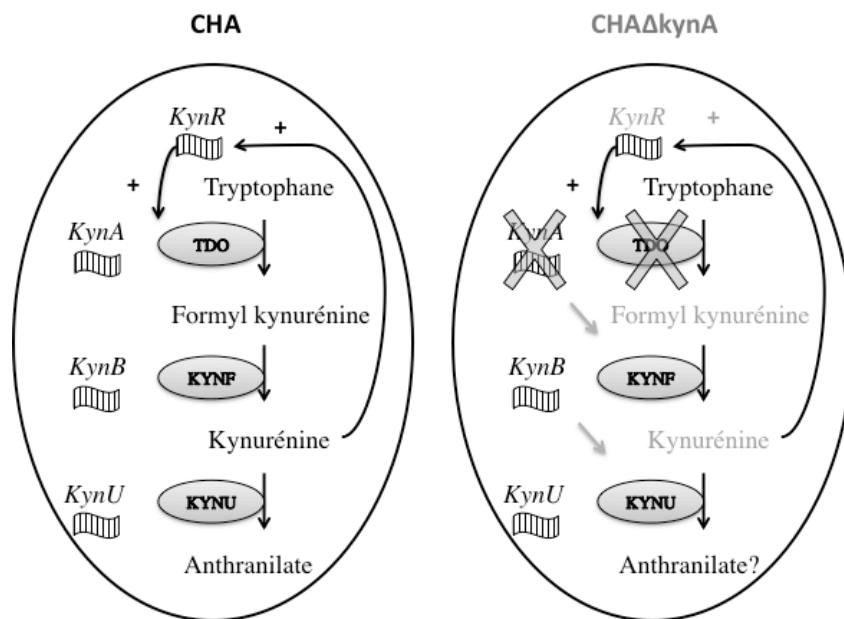
### Kynurénines (bactérie)



**Synthèse 4: Impact des kynurénines bactériennes sur le recrutement et les fonctions des APC au cours de la pneumonie aigue à *Pa*.**

## Chapitre 5. Rôle de la voie métabolique de l'antranilate au cours de l'infection respiratoire aigüe à *Pa*

Dans cette partie, nous traitons maintenant du rôle de la voie des kynurénines de *Pa* au cours de l'infection pulmonaire aigüe, en comparant les infections provoquées par la souche CHA par rapport à la souche CHA $\Delta$ kynA. Les expériences ont également été réalisées avec la souche clinique (SC) et son mutant SC $\Delta$ kynA.

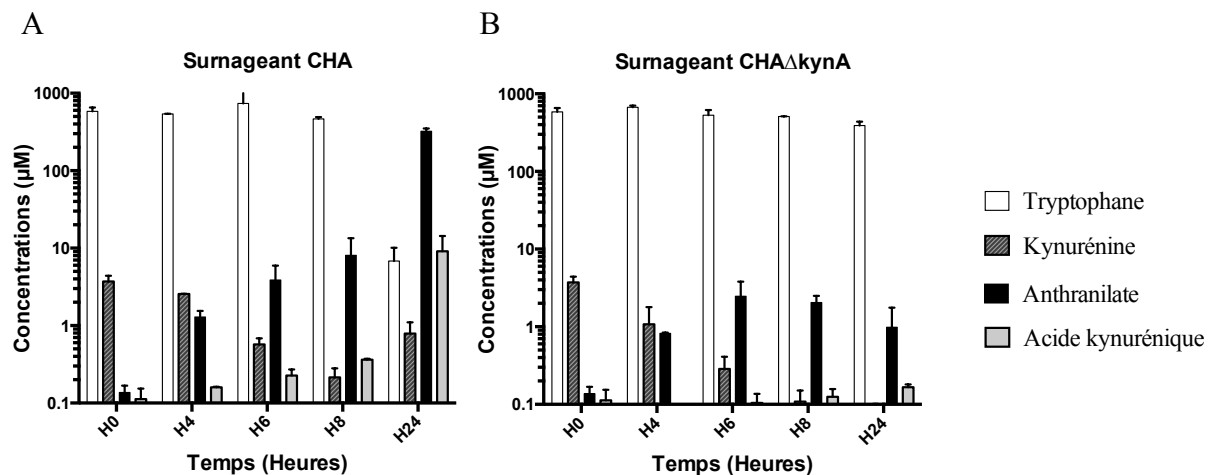


### Rappel des voies métaboliques

TDO : Tryptophane 2,3 dioxygénase, KYNF : kynurénine formamidase, KYNU : kynuréninase, *kynR* : régulateur transcriptionnel activant la transcription de la TDO lors d'une stimulation par la kynurénine.

Il s'agit ici essentiellement d'étudier le rôle de la production par la bactérie d'une part des divers métabolites intermédiaires de la voie des kynurénines (kynurénine, 3-OHkynurénine et acide kynurénique) mais surtout de l'antranilate et par extension du PQS dont l'antranilate est le précurseur direct. En effet, les résultats des dosages métaboliques présentés au chapitre 1 montrent que même si les concentrations de kynurénine et d'acide kynurénique (de l'ordre du microM) ne sont pas négligeables, la souche sauvage de *Pa* produit entre 10 à 30 fois plus d'antranilate que d'acide kynurénique et entre 10 à 100 fois plus d'antranilate que de kynurénine à H24 au cours de sa multiplication *ex vivo* (**Rappel Figure 4**). Par ailleurs, même si nous ne dosons pas le PQS dans ce travail, une étude récente

démontre que l'inhibition de la kynuréninase, qui catalyse la transformation de la kynurénine en anthranilate, diminue drastiquement la synthèse de PQS et des facteurs de virulence qui en dépendent (332). On peut donc émettre l'hypothèse que l'inhibition de la voie des kynurénines diminue la synthèse de PQS, bien que nous ne l'ayons pas prouvé.

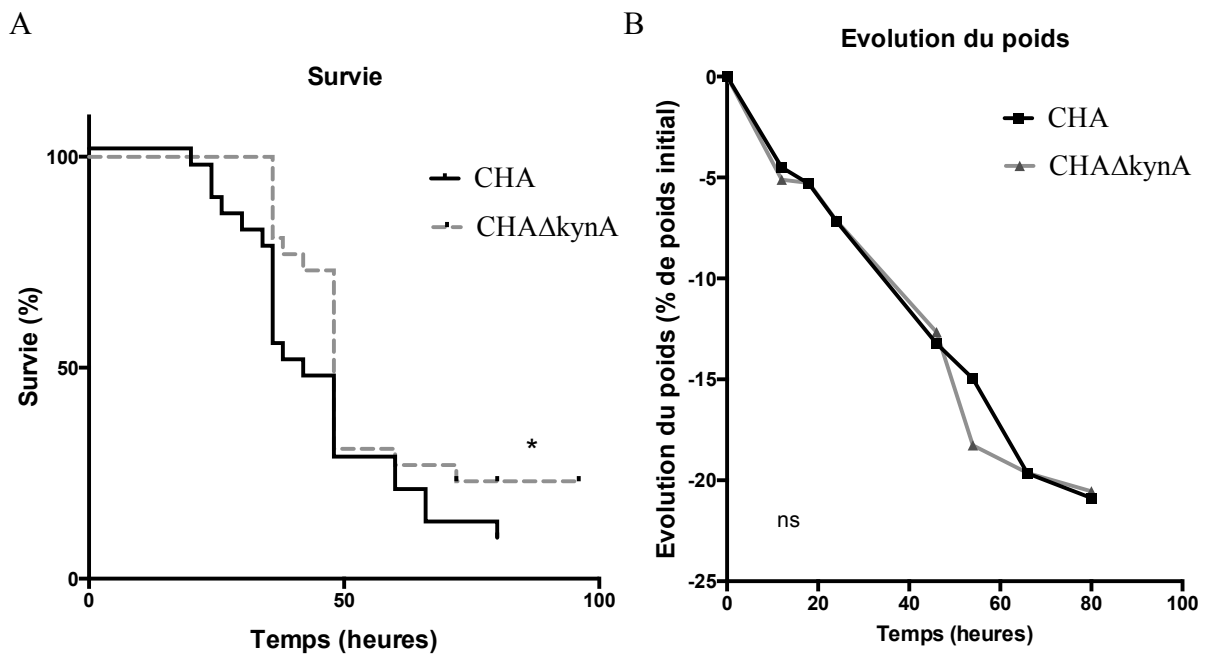


**Rappel Figure 4: Profil de sécrétion des différents métabolites de la voie des kynurénines des souches CHA et CHAΔkynA au cours du temps *ex vivo*.** A, B, Profils de sécrétion du tryptophane (blanc), de la kynurénine (gris foncé), de l'acide kynurénique (gris clair) et de l'anthranilate (noir) *ex vivo* en milieu LB non renouvelé à 37°C au cours du temps. A, profil de sécrétion de la souche CHA. B, profil de sécrétion de la souche CHAΔkynA. Dosages effectués deux fois, en double, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

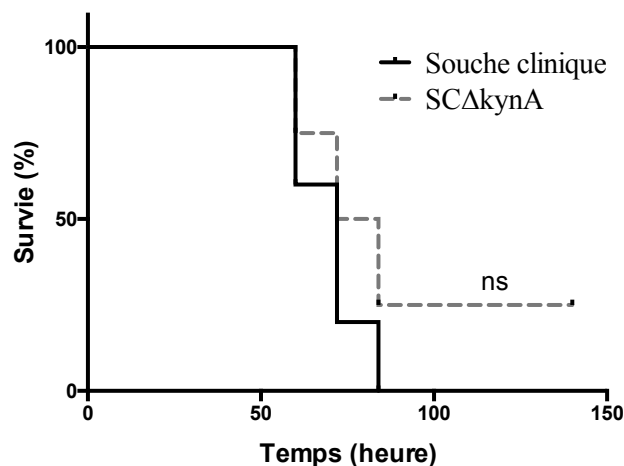
### 1) L'inhibition de la voie des kynurénines de *Pa* diminue la mortalité des souris

La survie des souris infectées par la souche CHAΔkynA est augmentée par rapport à celles infectées par la souche CHA ( $p=0,05$ , test du log-rank) (Figure 47). Ce résultat suggère que la voie des kynurénines, responsable d'une part de la synthèse de divers métabolites intermédiaires (kynurénine, 3-OHkynurénine et acide kynurénique) et d'autre part de la synthèse d'anthranilate, pourrait être impliquée dans la virulence de la souche et la pathogénèse de l'infection respiratoire aigue. La nécessité d'un grand nombre d'individus pour mettre en évidence une différence significative de survie atteste de la difficulté à évaluer l'impact de l'expression de cette voie par *Pa*. La même expérience a été réalisée avec la souche clinique. Elle ne retrouve pas de différence significative entre les deux groupes, mais manque probablement de puissance car elle ne compte que 6 individus par groupe (Figure 48). Comme pour l'étude du rôle des kynurénines, la mise en jeu au cours de l'infection des nombreux autres facteurs de virulence de *Pa* peut « masquer » l'action de la voie des kynurénines.

Il n'y a pas de différence dans l'évolution du poids entre les deux groupes.



**Figure 47: Rôle de la voie de l'anthranilate dans un modèle de survie à 96 heures et sur l'évolution du poids.** **A.** Survie des souris en fonction du temps pour les souches CHA $\Delta$ kynA (ligne noire) et CHA $\Delta$ kynA (ligne grise). La survie des souris infectées par la souche CHA $\Delta$ kynA est augmentée par rapport à la souche CHA ( $p < 0,05$ ). Analyse statistique réalisée par le test du log-rank. (N = 20 souris par groupe). **B.** Evolution du poids. Il n'y a pas de différence d'évolution du poids entre les souris infectées par les différentes souches. N= 5 souris par groupe, une expérience représentative de 3 effectuées.



**Figure 48: Rôle de la voie de l'anthranilate dans un modèle de survie à 96 heures lors d'une infection avec une souche clinique** Survie des souris en fonction du temps pour les souches clinique non mutée (ligne noire) et SCA $\Delta$ kynA (ligne grise). Analyse statistique réalisée par le test du log-rank. (N = 6 souris par groupe).

## 2) La voie des kynurénines bactériennes entraîne une exacerbation de la réponse neutrophilique de l'hôte

Au cours de l'infection pulmonaire aiguë provoquée par la souche CHA, on observe une majoration du recrutement alvéolaire des PNN. Cela est associé à une meilleure clairance bactérienne, mais au prix d'une majoration des lésions tissulaires comme le laisse supposer l'augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire et la diminution de la survie (Figure 49).

L'étude des populations cellulaires alvéolaires et tissulaires par cytométrie en flux retrouve l'augmentation de PNN dans les deux compartiments lors de l'infection avec la souche CHA. On n'observe pas de différence de cellularité concernant les macrophages alvéolaires et interstitiels, les cellules NK et les cellules T (TCD4, TCD8, NKT) entre les deux groupes (data non présentées). En revanche, on constate que le nombre de cellules dendritiques résidentes et inflammatoires est augmenté dans les deux compartiments au cours de l'infection avec la souche CHA (Figure 50).

L'analyse de la réponse cytokinique de l'hôte par dosage ELISA des cytokines dans le LBA, le tissu pulmonaire ainsi que l'étude de l'expression des transcrits des gènes de ces cytokines dans le tissu pulmonaire montre qu'étonnamment, la production globale de cytokines pro-inflammatoires est augmentée à H12 et H24 lorsque la voie des kynurénines est inhibée. De manière intéressante, on observe une majoration importante des transcrits de l'IL-22 et de l'IL-10 à H24 chez les souris infectées avec CHA $\Delta$ kynA.

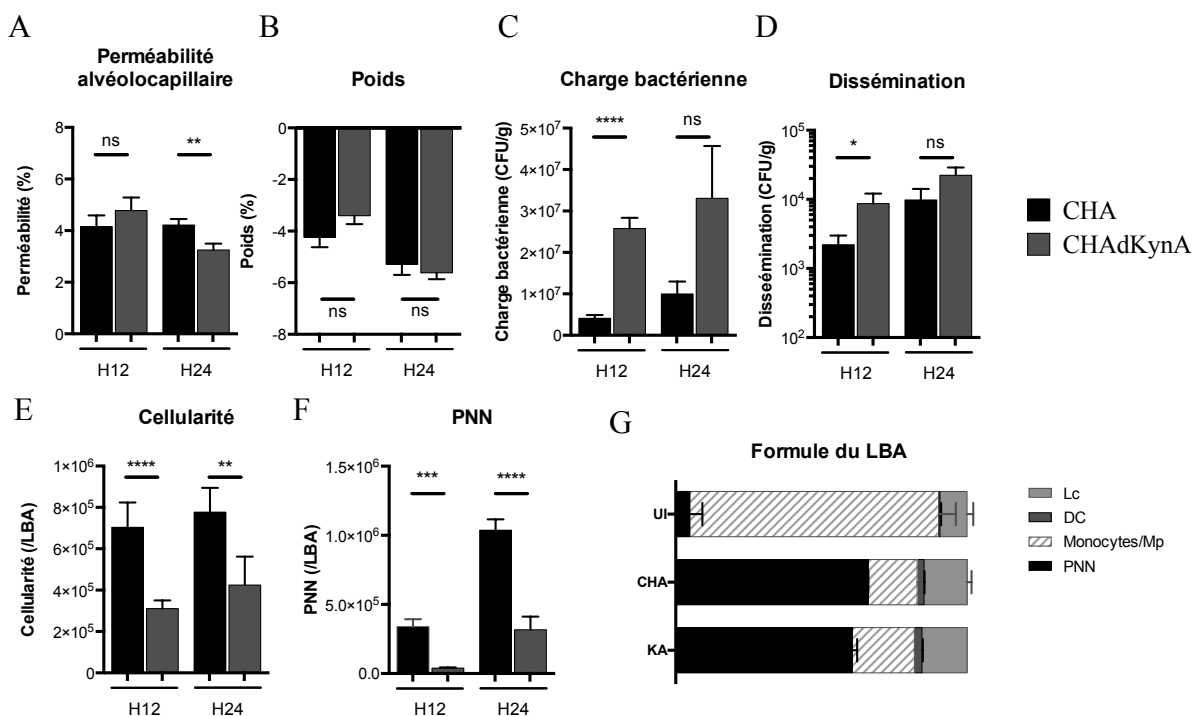
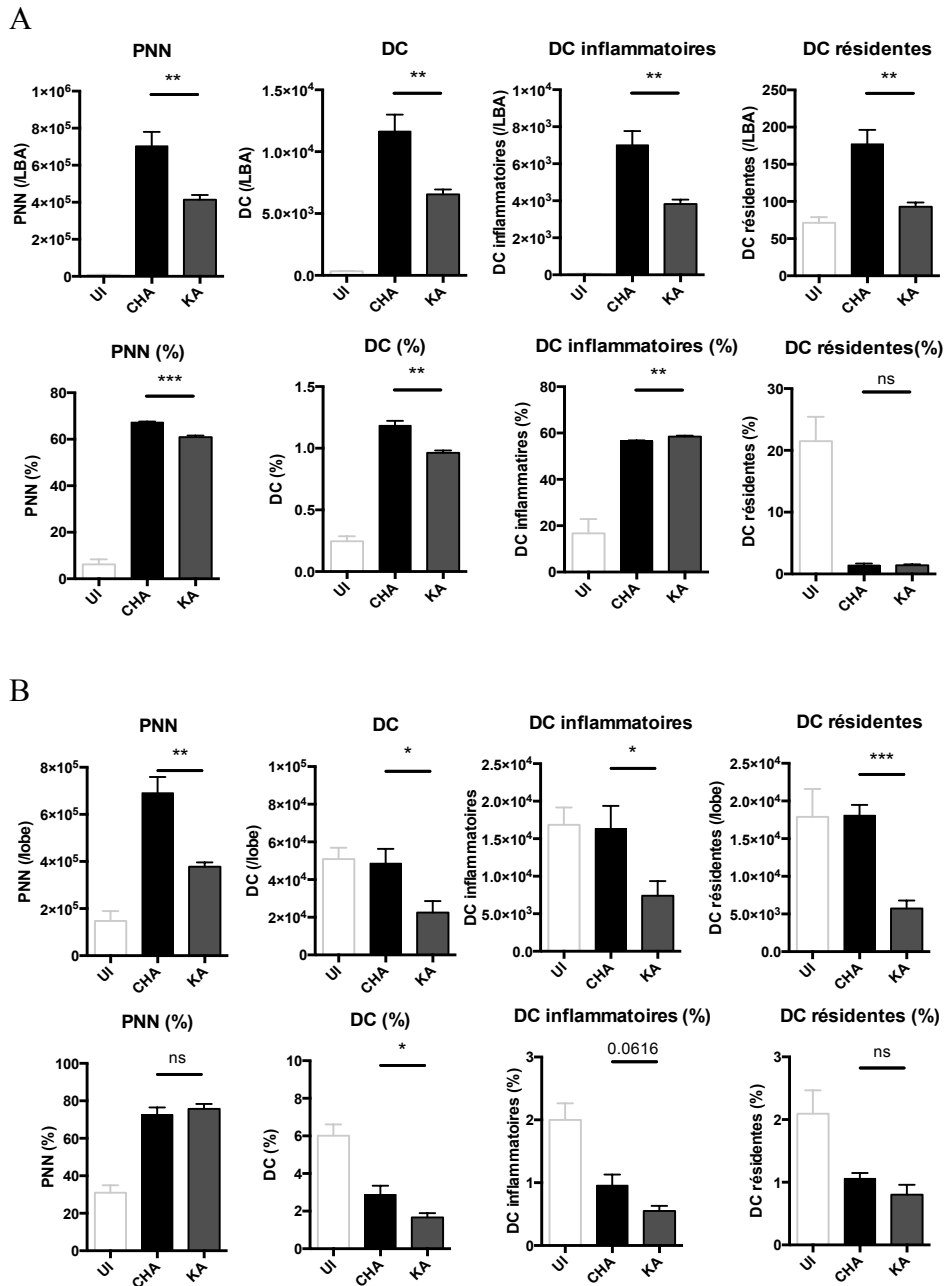


Figure 49: Impact de l'activation de la voie de l'anthranilate sur l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte au cours de la pneumonie aiguë à *Pa* (souche CHA). A, B, C, D, E, F Comparaison de l'évolution de la pneumonie à H12 et H24 d'infection respiratoire aiguë induite par les souches CHA (noir) et

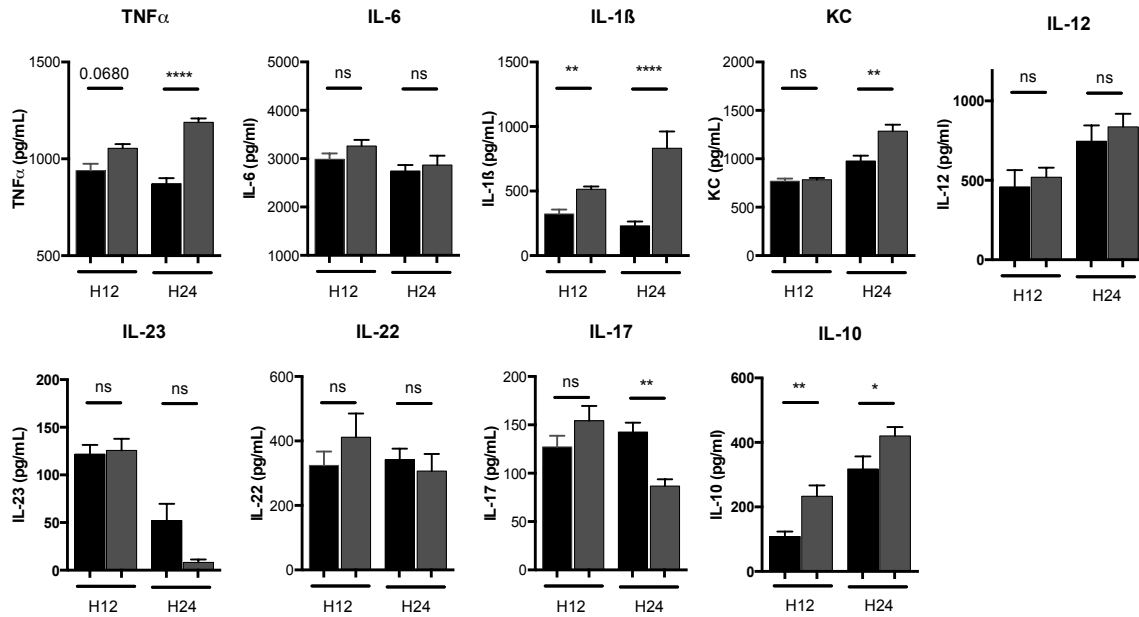
CHAΔkynA (gris foncé) **A**, perméabilité alvéolo-capillaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC **B**, Evolution pondérale exprimée en pourcentage du poids de départ **C**, charge bactérienne pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires **D**, dissémination bactérienne en UFC par gramme de rate estimée par étalement et dilution d'homogénats spléniques **E**, cellularité du LBA mesurée par compte à l'état frais du culot cellulaire sur lame de Malassez **F**, recrutement alvéolaire des PNN mesuré par numération sur lame après coloration au MGG du culot cellulaire (n=5 par groupe, expériences représentatives de 3 effectuées) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne **G**, formule du LBA réalisée par cytométrie en flux à H24 de l'infection, une expérience effectuée par cytométrie en flux.



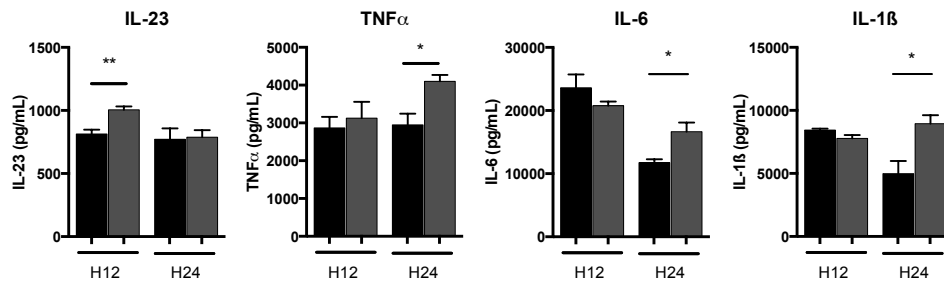
**Figure 50: Impact de l'activation de la voie de l'antranilate sur le recrutement cellulaire au cours de la pneumonie aiguë à *Pa* (souche CHA) A,B populations cellulaires étudiées par cytométrie en flux à H24 de l'infection par les souches CHA (noir) et CHAΔkynA (gris foncé) chez des souris WT et souris contrôles non infectées (blanc) présentées en valeur absolue (graphique supérieur) et en % des cellules CD45+ (graphique inférieur). PNN : polynucléaires neutrophiles, DC : cellules dendritiques, A, étude des PNN et DC dans le LBA**

**B**, étude des PNN et DC dans le tissu pulmonaire (n=6 par groupe) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

**A**

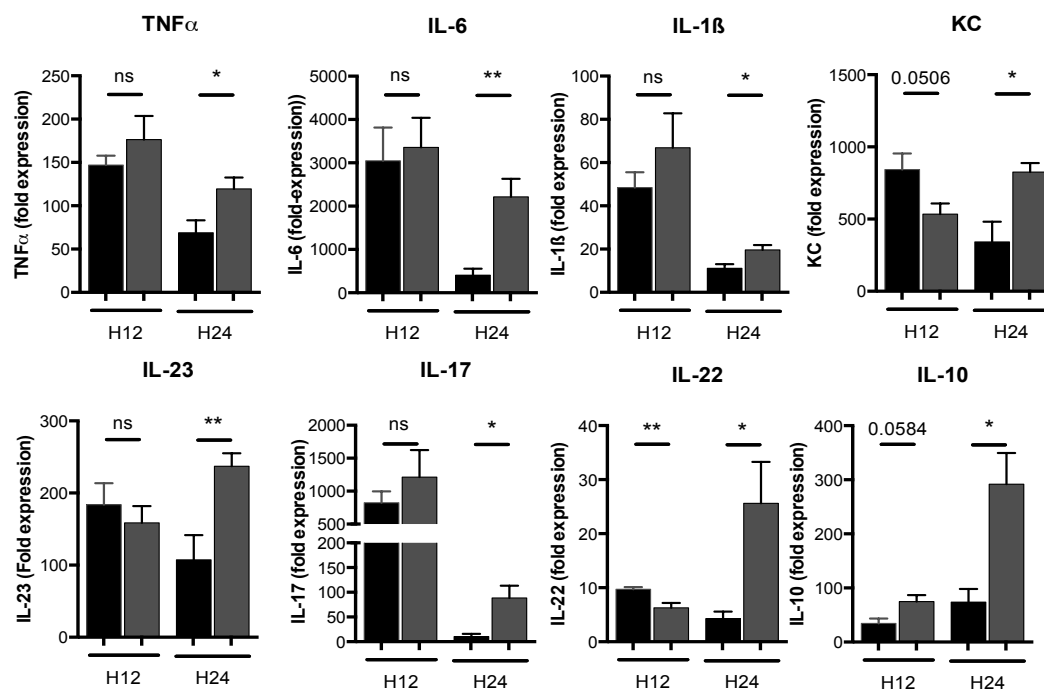


**B**



**C**

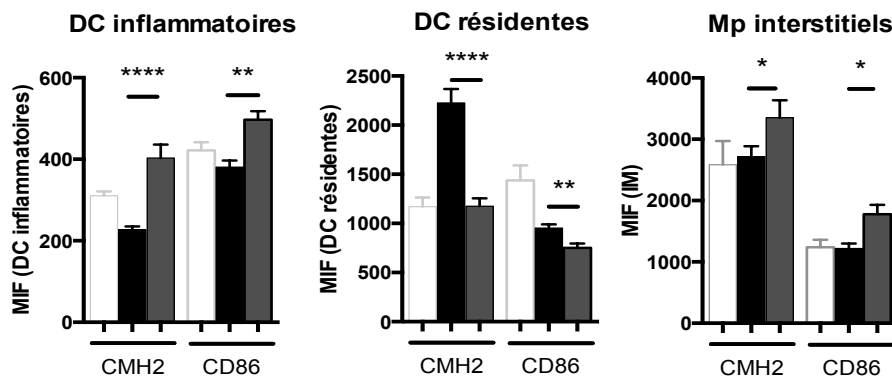




**Figure 51: Impact de l'activation de la voie de l'antranilate sur la réponse cytokinique de l'hôte au cours de la pneumonie aiguë à *Pa* (souche CHA) A,B,C, Analyse de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë comparant des souris *Wt* infectées avec les souches CHA (noir) et CHAΔkynA (gris foncé). Comparaison des réponses cytokiniques dans les surnageants des LBA (A) et dans le tissu pulmonaire (B) entre les souches CHA et CHAΔkynA à H12 et H24 par dosage du TNF $\alpha$ , de l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , KC, IL-23, IL-17A, IL-22, IL-10 par méthode ELISA (n=6 par groupe, expériences représentatives de 3 effectuées) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne C, analyse par RT-QPCR des transcrits des cytokines TNF $\alpha$ , de l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , KC, IL-23, IL-17A, IL-22, IL-10 des cellules pulmonaires totales (n=6 par groupe, expériences représentatives de 3 effectuées) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.**

### 3) La voie des kynurénines bactériennes module l'activation des cellules présentatrices d'antigènes

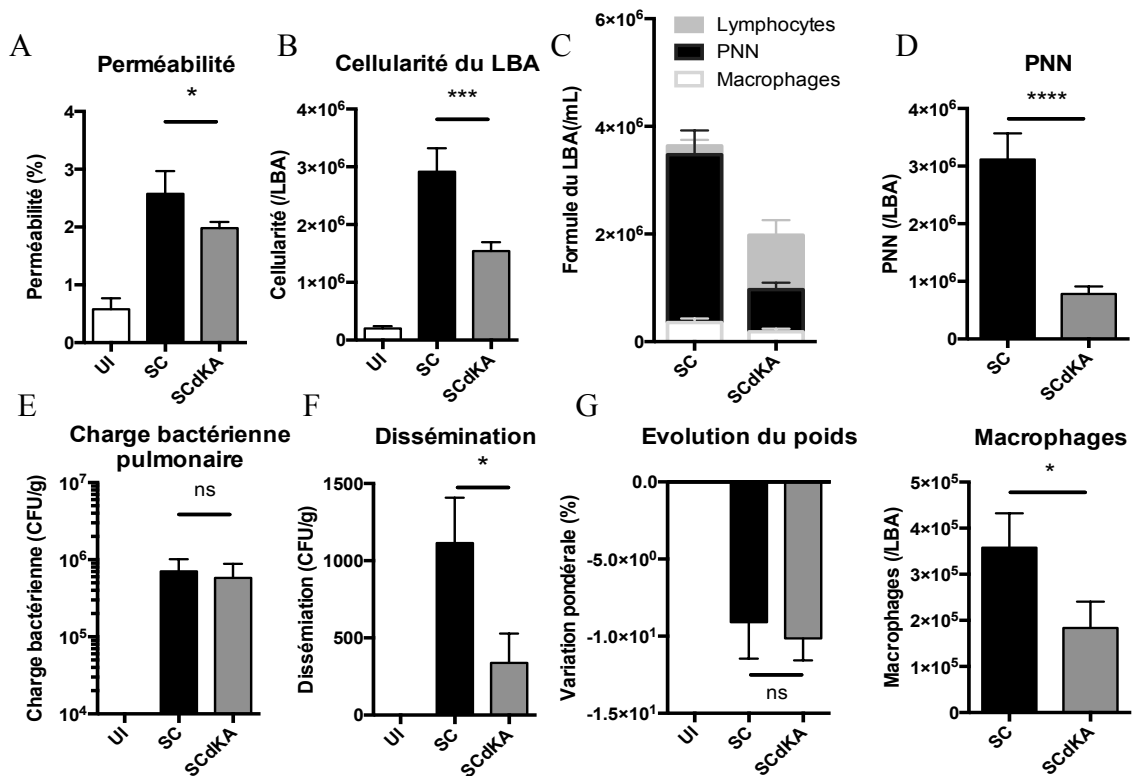
Afin d'essayer d'expliquer les variations de réponse immunitaire observées entre les deux groupes, nous avons ensuite étudié l'activation des DC et des macrophages interstitiels du tissu pulmonaire par mesure en cytométrie en flux à H24 de la moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) des marqueurs membranaires CMHII et CD86. On observe que la voie des kynurénines bactériennes module l'activation de ces cellules, qui est diminuée pour les DC inflammatoires et les macrophages, alors qu'elle est augmentée pour les DC résidentes (Figure 52).



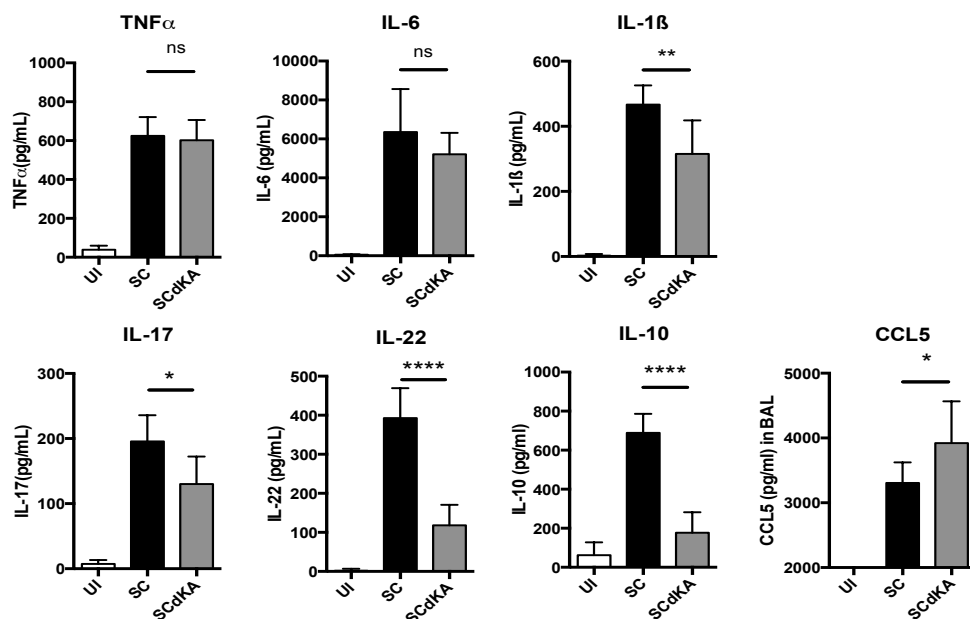
**Figure 52: Effet de la voie des kynurénines sur l'activation des CPA au cours de l'infection à *Pa* (souche CHA).** Moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) des molécules CMH2 et CD86 exprimées à la membrane des CPA, mesurée par cytométrie en flux sur cellules pulmonaires totales à H24 d'infection par les souches CHA (noir) ou CHAΔkynA (gris foncé) et souris contrôles (blanc). Deux expériences effectuées. \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,0001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

#### 4) La voie des kynurénines bactériennes exacerbe la réponse inflammatoire au cours de l'infection avec une souche clinique SST3 –

Lorsque l'on reproduit la même expérience avec une souche clinique SST3-, on constate que la présence d'une voie des kynurénines fonctionnelle exacerbe la réponse inflammatoire de l'hôte, avec une majoration du recrutement alvéolaire des PNN, une augmentation des concentrations alvéolaires de l'IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-22 et IL-10. On observe une augmentation de CCL5 pour la souche SCAΔkynA, associée à une augmentation du recrutement alvéolaire de lymphocytes (**Figures 53 et 54**). Le recrutement neutrophilique ne semble pas être efficace sur la clairance bactérienne, mais est associé à une augmentation de la lésion de la barrière alvéolo-capillaire.

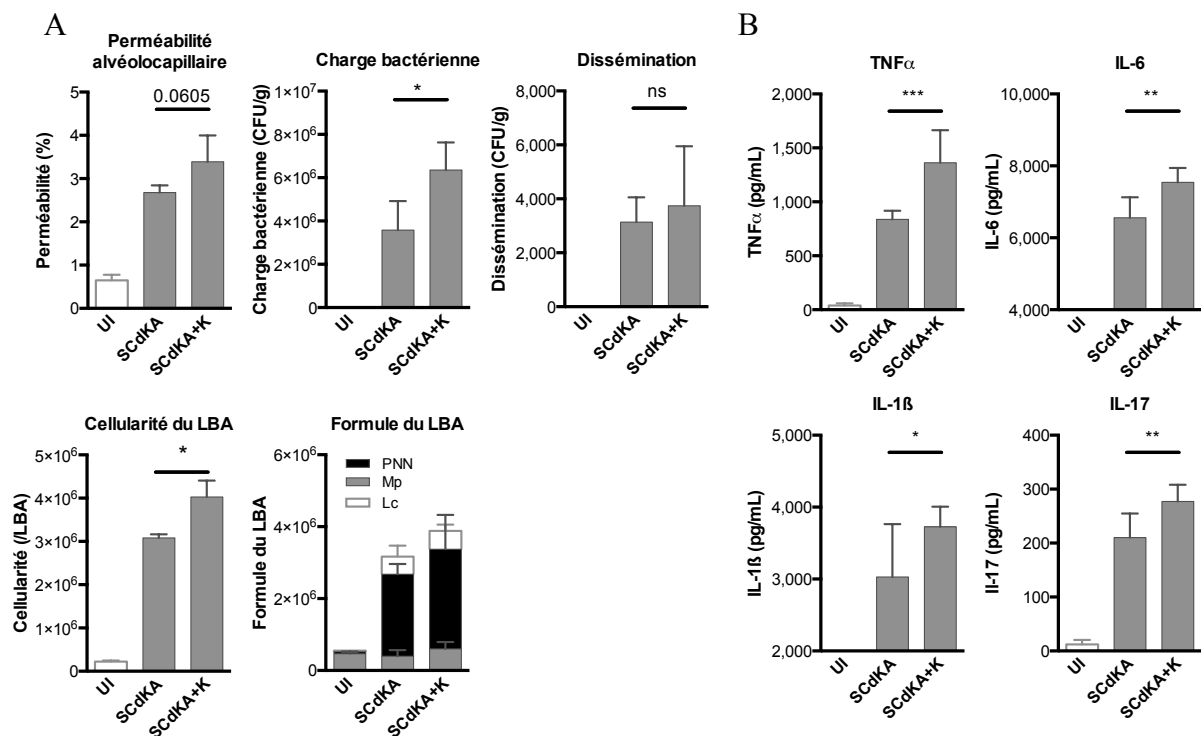


**Figure 53: Impact de l'activation de la voie de l'anthranilate sur l'évolution du processus infectieux et la réponse de l'hôte au cours de la pneumonie aigüe à *Pa* (Souche clinique).** A, B, C, D, E, F Comparaison de l'évolution de la pneumonie à H24 d'infection respiratoire aigüe induite par une souche clinique de *Pa* (noir) et son mutant SCA<sub>kynA</sub> (gris) A, perméabilité alvéolo-capillaire (%) calculée par le ratio de concentration de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC B, cellularité du LBA mesurée par compte à l'état frais du culot cellulaire sur lame de Malassez C, formule du LBA par numération sur lame après coloration au MGG du culot cellulaire D, recrutement alvéolaire des PNN et macrophages mesuré par numération sur lame après coloration au MGG du culot cellulaire E, charge bactérienne pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires F, dissémination bactérienne en UFC par gramme de rate estimée par étalement et dilution d'homogénats spléniques G, Evolution pondérale exprimée en pourcentage du poids de départ (n=5 par groupe, une expérience représentative de 2 effectuées) ns : non significatif \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001 par t-test, la barre d'erreur représente la déviation standard.



**Figure 54: Impact de l'activation de la voie des kynurénines bactériennes sur la réponse cytokinique de l'hôte au cours de la pneumonie aiguë à *Pa* (souche clinique)** Analyse de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'infection respiratoire aiguë comparant à H24 des souris *Wt* infectées avec la souche clinique (noir) et SCΔkynA (gris). Comparaison des réponses cytokiniques dans les surnageants des LBA par dosage du TNFα, de l'IL-6, l'IL-1β, IL-17A, IL-22, IL-10 et CCL5 par méthode ELISA (n=6 par groupe, expériences représentatives de 2 effectuées) ns : non significatif \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*\*p<0,0001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

Le profil de réponse observé avec la souche clinique est proche de celui observé avec SCΔkynA + ajout de kynurénines, où on observe une exacerbation de la réponse inflammatoire, avec augmentation du recrutement des PNN alvéolaires et des taux de cytokines pro-inflammatoires TNFα, de l'IL-6, l'IL-1β et IL-17A (**Rappel Figure 16**). Cette fois encore, la réponse semble inadaptée car elle ne permet pas de clairer efficacement les pathogènes, comme le montre la diminution de la clairance bactérienne, et semble générer des dommages tissulaires vue la tendance à l'augmentation de la lésion alvéolo-capillaire. Ce résultat suggère que *Pa* pourrait utiliser les kynurénines de son environnement (exogènes ou kynurénines de l'hôte) pour synthétiser l'anthranilate et le PQS.



**Rappel Figure 16: Effets des kynurénines de synthèse sur l'évolution du processus infectieux et la réponse immune à H24.** A,B Comparaison à H24 de l'infection par les souches SCΔkynA (SCdKA) et SCΔkynA avec ajout de 2mM de L-kynurénine de synthèse au moment de l'instillation de la suspension bactérienne (SCdKA+K), et souris contrôles instillées au PBS (UI) A, perméabilité alvéolo-capillaire (%), cellularité du LBA, formule du LBA effectuée par coloration MGG sur lame, charge bactérienne pulmonaire en UFC par gramme de poumon, dissémination bactérienne en UFC par gramme de rate B, comparaison des réponses cytokiniques au cours de l'infection à SCΔkynA et SCΔkynA + L-kynurénine de synthèse par dosage du TNFα, de l'IL-6, l'IL-1β et IL-17A dans les surnageants des LBA par méthode ELISA (n=5 par groupe, une expérience effectuée) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

## ***Discussion***

Bien que le PQS n'ait pas été dosé dans notre étude, l'étude de Kasper *et al.* montre que l'inhibition par administration d'un antagoniste de la kynuréninase entraîne une réduction de plus de 70% de la production de PQS *in vitro*, ainsi qu'une diminution de la transcription des gènes régulés par le système du quorum-sensing. Ces effets sont reversés par la supplémentation du milieu en anthranilate (332). On peut donc déduire de cela que la production de PQS est directement liée à la production d'anthranilate. Dans nos dosages, nous ne détectons pas l'anthranilate dans le LBA lors de l'infection avec les souches CHA $\Delta$ kynA et CHA $\Delta$ kynU, alors que ce métabolite est détecté lors de l'infection avec une souche sauvage CHA. On peut donc extrapoler que la comparaison de l'infection pulmonaire aigue avec la souche CHA comparée à la souche CHA $\Delta$ kynA permet d'étudier l'impact de la production de PQS au cours de l'infection pulmonaire aigue, en s'affranchissant de la production de kynurénines par la bactérie. La limite de cette extrapolation est la possibilité *in vivo* de synthèse de PQS par *Pa* à partir de l'anthranilate de l'hôte, bien que les dosages alvéolaires ne soient pas en faveur de cette hypothèse. L'utilisation d'une mutant  $\Delta$ kynA $\Delta$ kynU aurait été plus rigoureuse pour ce travail, qui consiste à explorer le rôle du PQS produit par *Pa* au cours de la pneumonie aigue, car son implication dans la virulence à la phase aigue de l'infection n'est à ce jour pas formellement démontrée.

Dans notre étude, la voie de l'anthranilate est responsable d'une exacerbation du recrutement neutrophilique alvéolaire. Ce résultat est cohérent avec un précédent travail qui montre que le PQS augmente le chimiotactisme des PNN *in vitro*, sans moduler leur capacité de bactéricidie (333). Les effets de ce recrutement cellulaire alvéolaire sont variables sur la clairance bactérienne mais aboutissent constamment à une majoration des lésions de la barrière alvéolo-capillaire. Ces lésions pourraient expliquer la diminution de la survie des souris.

La réponse cytokinique varie en fonction de la souche infectante (possédant ou non le SST3, facteur de virulence majeur dans la pneumonie aigue à *Pa*). La diminution des cytokines pro-inflammatoires NF $\kappa$ B-dépendantes observées lors de l'infection avec la souche CHA par rapport à CHA $\Delta$ kynA est cohérente avec un précédent travail mené avec la souche SST3+ PA14 retrouvant un rôle inhibiteur du PQS sur la synthèse alvéolaires des cytokines NF $\kappa$ B- dépendantes (334). Les différences observées entre les deux souches CHA et SC

peuvent s'expliquer d'une part par l'incertitude d'utilisation d'une souche clinique dont le profil de virulence n'est pas entièrement connu, mais surtout par la différence de statut vis à vis du SST3. En effet, la souche CHA est SST3+ alors que la souche clinique est SST3-. L'utilisation d'une souche SST3- permet de s'affranchir de l'inflammation intense médiée par le SST3 qui peut potentiellement masquer le rôle des facteurs de virulence secondaires tels que ceux régulés par le QS.

Enfin, l'ajout de kynurénines exogènes au cours de l'infection avec la souche SC $\Delta$ kynA donne un profil d'infection et de réponse immune proches de ceux de la souche SC sauvage. Cela suggère que *Pa* pourrait utiliser les kynurénines de son environnement (exogènes ou kynurénines de l'hôte) pour synthétiser l'antranilate et le PQS.

L'ensemble de ces données montrent que la voie des kynurénines de *Pa* menant à la production d'antranilate et de PQS constitue un probable facteur de virulence bactérien majorant les lésions pulmonaires dans un modèle murin d'agression respiratoire aigue, mais les mécanismes qui s'y rapportent ne sont pas connus à ce jour.

### ***Chapitre 5 : Rôle de la voie métabolique de l'antranilate au cours de l'infection respiratoire aigue à Pa***

➤ **Rationnel :**

Rôle de l'antranilate et du PQS peu connu dans la virulence de *Pa* au cours de la pneumonie aigue

➤ **Hypothèses :**

Le PQS est un facteur de virulence bactérien dans la pneumonie aigue

➤ **Méthode :**

Modèle murin d'infection respiratoire aigue.

Comparaison infection CHA vs CHA $\Delta$ kynA (T3SS+) et SC vs SC $\Delta$ kynA (T3SS-)

Comparaison SC $\Delta$ kynA vs SC $\Delta$ kynA + L-kynurénine de synthèse

➤ **Principaux résultats:**

PQS: diminue la survie des souris

Augmente la lésion pulmonaire par augmentation du recrutement cellulaire (PNN)

Mécanisme: non connu (T3SS+), diminution des chémokines (T3SS-)?

SC $\Delta$ kynA + L-kynurénine = SC, utilisation des kynurénines exogènes par *Pa* pour la production de PQS?

➤ **Principales limites:**

Pas de dosage du PQS

Mutant *Pa* $\Delta$ kynA $\Delta$ kynU: contrôle intéressant

Survie: nécessité d'un grand effectif pour obtenir une significativité

➤ **Perspectives immédiates:**

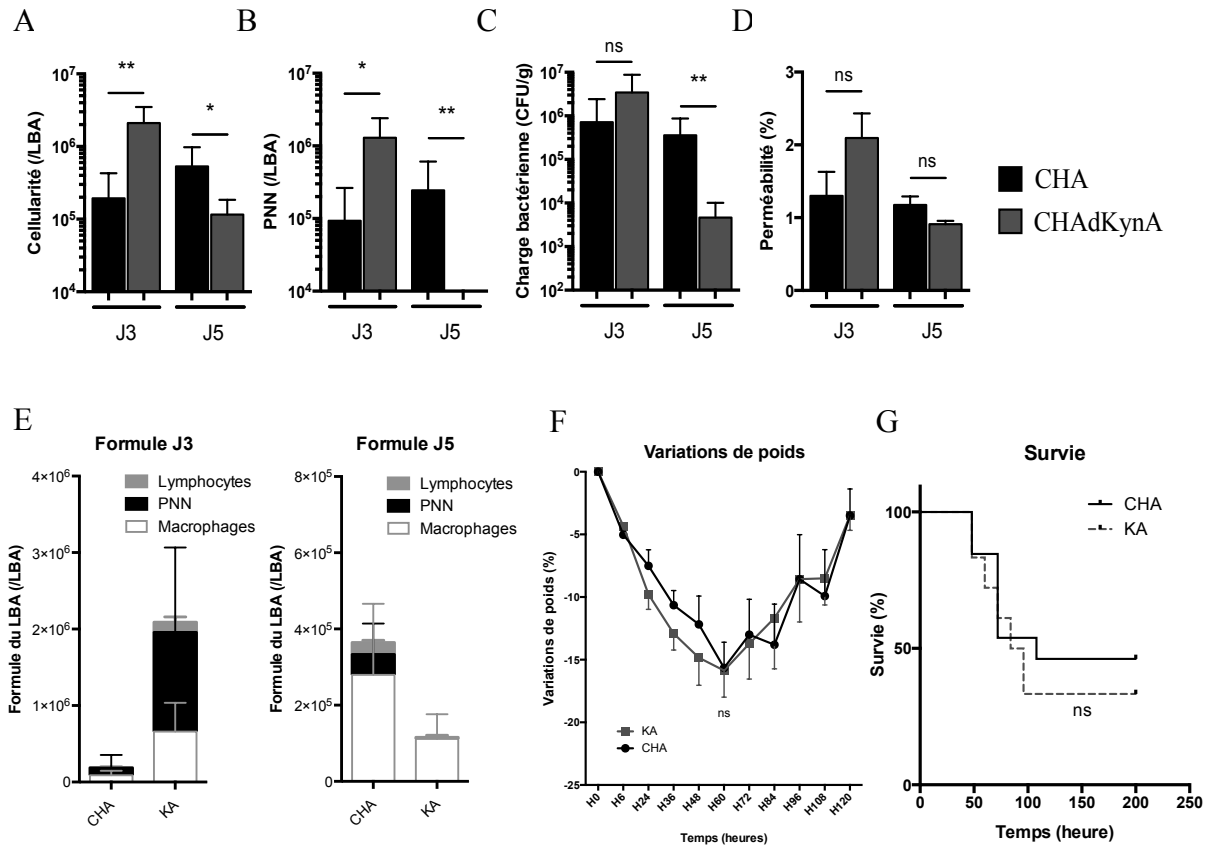
Enzymes bactériennes comme cibles thérapeutiques potentielles à visée anti-lésionnelle?

## ***Chapitre 6 : Rôle de la voie des kynurénines dans un modèle d'infection respiratoire chronique***

Nous avons ensuite voulu étudier le rôle de la voie des kynurénines bactériennes dans un modèle murin d'infection respiratoire chronique. En effet, les kynurénines sont impliquées dans la modulation des réponses Treg et Th17 médiées par l'AhR, ainsi que dans le recrutement des PNN, constituant donc des molécules d'intérêt dans la physiopathologie de la pneumonie chronique.

### **1) La voie des kynurénines de *Pa* module le recrutement cellulaire alvéolaire au cours de l'infection respiratoire chronique**

Dans un modèle murin d'infection respiratoire chronique, la présence d'une voie métabolique bactérienne fonctionnelle des kynurénines (infection avec la souche CHA) module le recrutement cellulaire intra-alvéolaire au cours du temps. Lors de l'infection avec la souche CHA, le recrutement cellulaire intra-alvéolaire et notamment des PNN est diminué à J3 mais persiste à J5, comparé aux souris infectées avec la souche CHA $\Delta$ kynA, où le recrutement des PNN est augmenté à J3 mais décroît rapidement à J5. La clairance bactérienne pulmonaire est augmentée à J5 chez les souris infectées par la souche CHA $\Delta$ kynA. Il n'y a pas de différence significative entre les groupes sur la perte de poids ou la perméabilité alvéolo-capillaire. Il n'y a pas de différence significative de survie entre les groupes, mais ce paramètre reste difficilement interprétable dans ce modèle (**Figure 55**).

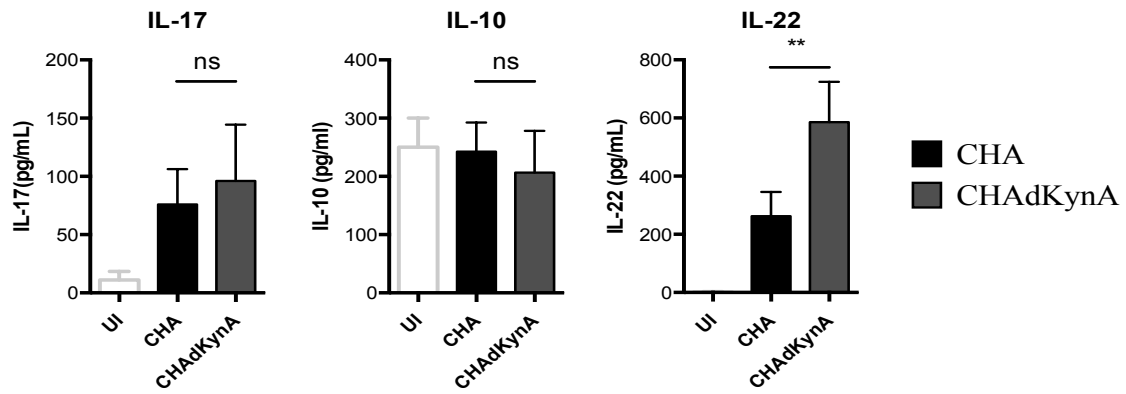


**Figure 55: Analyse de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'agression pulmonaire chronique comparant souris *Wt* infectées avec la souche CHA par rapport à la souche CHAΔkynA A, B, C, D, E, F, G** Analyse des souris infectées par la souche CHA et CHAΔkynA, modèle d'infection respiratoire chronique. **A**, Cellularité du LBA à J3 et J5. **B**, Recrutement de PNN intra-alvéolaire à J3 et J5. **C**, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires à J3 et J5. **D**, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. **E**, Formule cellulaire dans les lavages broncho-alvéolaires (n = 6 souris / groupe) ns : non significatif \*p<0,05 \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne. **F**, Evolution de la variation du poids par rapport au poids initial en fonction du temps, (n= 12 souris/groupe à J3, n=6 souris/groupe à J5) ns : non significatif par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne. **G**, Survie à 200 heures, analyse statistique réalisée par le test du log-rank (CHA n=13, CHAΔkynA n= 16 par groupe) ns : non significatif.

## 2) La voie des kynurénines de *Pa* altère la sécrétion d'IL-22 au cours de l'infection respiratoire chronique

Dans le modèle d'infection respiratoire chronique, la présence d'une voie métabolique bactérienne fonctionnelle des kynurénines est associée à une diminution de la sécrétion d'IL-22 dans le LBA par rapport aux souris infectées avec la souche CHAΔkynA. Il n'y a pas de différence significative sur les concentrations d'IL-10 et d'IL-17 (**Figure 56**).





**Figure 56: Impact de la voie des kynurénines bactériennes sur la production intra-alvéolaire d'IL-10, 17 et 22 dans un modèle murin d'infection respiratoire chronique à J5.** Dosages à J5 des cytokines IL-10, IL-17 et IL-22 dans les surnageants de LBA des souris infectées par la souche CHA (noir), CHA $\Delta$ kynA (gris) et souris contrôles instillées avec des billes stériles (blanc) (n = 6 souris / groupe) ns : non significatif \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart standard à la moyenne.

## ***Discussion***

Les expérimentations menées dans le modèle de pneumonie chronique montrent que la voie des kynurénines de *Pa* joue un rôle dans la cinétique du recrutement cellulaire au cours du temps, ainsi que dans la balance cytokinique. En l'absence de cette voie métabolique, on observe une augmentation précoce mais rapidement résolutive dans le temps du recrutement alvéolaire des PNN, associé à une augmentation des concentrations intra-alvéolaires d'IL-22 dont l'implication dans le maintien de l'intégrité des barrières épithéliales par le contrôle des processus infectieux et l'activation de la réparation tissulaire est connue (113). Ces résultats peuvent correspondre à la diminution de production de PQS et des facteurs de virulence qu'ils régulent. On peut également évoquer le rôle de la production de kynurénines par *Pa* et la possible implication de l'AhR, dont le rôle dans la régulation du recrutement cellulaire alvéolaire au cours du temps ainsi que dans la synthèse lymphocytaire d'IL-22 est connu (152,265,335). Par analogie avec la réponse immune de l'épithélium digestif, l'AhR pourrait réguler la différenciation lymphocytaire vers un phénotype Th22 au niveau pulmonaire lorsqu'il est soumis à certains stimuli (336,337). Par cette voie, il pourrait être impliqué dans l'équilibre de la balance inflammatoire pulmonaire au cours de l'infection chronique à *Pa*. L'exploration de l'implication de cette voie dans la pneumonie chronique revêt un intérêt particulier pour les patients atteints de mucoviscidose. Au cours de cette maladie, les infections chroniques à *Pa* sont fréquentes et l'altération de la fonction respiratoire qui en découle est essentiellement liée à une dérégulation de la réponse immune à l'infection. Chez ces patients, les lésions de destruction tissulaire sont la conséquence d'une réponse neutrophilique excessive et prolongée, mais incapable de clairer les pathogènes (88,338). Ces désordres immunitaires seraient en partie expliqués par un déséquilibre de la balance cytokinique avec une majoration des taux d'IL-23 et d'IL-17, responsables de l'entretien de l'inflammation chronique et pérennisant le recrutement des PNN dans les voies aériennes, et une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-10(338). Or, il a été montré *in vitro* que l'activation de l'AhR par les kynurénines module la polarisation Treg/Th17. La majorité des publications rapportent une polarisation préférentielle vers la voie des Treg mais parfois, notamment avec l'acide kynurénique, en faveur de la voie Th17. Cela semble dépendre de la nature de la stimulation mais également des conditions expérimentales (151,196,197,339). L'unique papier traitant du rôle de l'IDO *in vivo* chez des souris CFTR<sup>-/-</sup> rapporte un effet bénéfique de l'activation de l'enzyme par la promotion d'une immunité Treg et l'inhibition de

la polarisation lymphocytaire Th17 associée à une diminution de l'inflammation pulmonaire (234).

A l'heure actuelle, il n'y a pas de donnée sur l'implication des voies bactériennes ou humaines des kynurénines dans la physiopathologie de l'infection pulmonaire chronique dans la littérature. Cette thématique sera abordée dans de futurs travaux.

### ***Chapitre 6 : Rôle de la voie des kynurénines dans un modèle d'infection respiratoire chronique***

➤ **Rationnel :**

Kynurénines et AhR impliqués dans:

- la réponse inflammatoire
- le recrutement des PNN
- la polarisation lymphocytaire Treg/Th17/Th22

=>Rôle possible dans les lésions tissulaires

➤ **Hypothèses :**

La voie des kynurénines bactériennes module la réponse immune au cours de la pneumonie chronique

➤ **Méthode :**

Modèle de pneumonie chronique à *Pa*, infection à CHA vs CHAΔkynA

Etude du recrutement cellulaire alvéolaire et de la réponse cytokinique

➤ **Principaux résultats:**

Voie des kynurénines bactériennes associée à:

- Recrutement persistant des PNN
- Diminution de la clairance bactérienne
- Altération de la réponse IL-22

➤ **Principales limites:**

Pas d'évaluation des lésions tissulaires

Pas d'exploration mécanistique

Limites du modèle chronique (billes d'agar)

➤ **Perspectives immédiates:**

Intérêt dans les pathologies pulmonaires chroniques (mucoviscidose, BPCO)

Enzymes bactériennes: cibles thérapeutiques potentielles (stratégie anti-lésionnelle)

Poursuite des explorations par:

- Evaluation des lésions tissulaires et des populations lymphocytaires
- Exploration du rôle de l'AhR
- Modèle de souris CFTR KO

## ***Conclusion – Perspectives***

En conclusion, nous montrons dans ce travail que *Pa* est capable de synthétiser de nombreux métabolites de la voie des kynurénines *ex vivo* ainsi qu'*in vivo* au cours d'une infection respiratoire aigue, interférant avec le métabolisme global des kynurénines au niveau pulmonaire. La voie bactérienne des kynurénines semble plus particulièrement modifier les productions d'acide kynurénique et d'antranilate. L'acide kynurénique semble moduler la réponse immune innée de l'hôte en diminuant l'activation des CPA, la réponse cytokinique alvéolaire et en interférant avec le recrutement des cellules phagocytaires. L'acide kynurénique pourrait également être impliqué dans la modulation de la balance Th17/Th22. Cette modulation semble faire intervenir l'AhR et l'IDO, deux acteurs essentiels de l'immunité pulmonaire. Ces interactions sont associées, comme pressenti lors des expériences conduites sur *C. elegans*, à une tendance à la diminution de la survie au cours de la pneumonie aigue chez la souris. De même, la production par *Pa* d'antranilate menant à la synthèse du PQS au cours de l'infection respiratoire aigue semble augmenter la virulence bactérienne sans que les mécanismes sous-jacents soient connus. L'inhibition de la voie des kynurénines bactériennes pourrait donc constituer à ce titre une cible thérapeutique dans une stratégie d'immunomodulation visant à limiter les lésions tissulaires au cours de la pneumonie aigue à *Pa*.

Enfin, la voie des kynurénines bactériennes semble impliquée dans la modulation de la réponse immune au cours de la pneumonie chronique en interférant avec la cinétique du recrutement alvéolaire des PNN et avec la balance Th17/Th22. De futurs travaux seront nécessaires pour déterminer l'impact des kynurénines bactériennes et humaines en pathologie respiratoire chronique et les mécanismes exacts mis en jeu.

## **Travaux et Publications**

### **1) Articles Scientifiques**

**Bortolotti P**, Hennart B, Thieffry C, Jausions G, Faure E, Grandjean T, *et al.* Tryptophan catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and potential for inter-kingdom relationship. *BMC Microbiol.* 2016;16(1):137.

Faure E, **Bortolotti P** Inflammasome-triggered pyroptosis is mainly dependent of caspase-1 activation *Sous presse NEJM* 07-2016

Faure E, **Bortolotti P**, Kipnis E, Mear JB, Faure K, Guery B. Studying microbial community *in vivo*: Modelizing interaction between *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* in airways. 2016 Feb, Journal of visualized experiment. JoVE;:e53218.

Thepaut M, Grandjean T, Hober D, Lobert P-E, **Bortolotti P**, Faure K, *et al.* Protective role of murine norovirus against *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia. *Vet Res.* 2015;46:91.

Faure E, Poissy J, Goffard A, Fournier C, Kipnis E, Titecat M, **Bortolotti P**, Martinez L, Dubucquoi S, Dessein R, Gosset P, Mathieu D, and Guery B. Distinct Immune Response in Two MERS-CoV-Infected Patients: Can We Go from Bench to Bedside? *PLoS ONE.*2014;9(2).

T. Clamens, T. Rosay, A. Crépin, T. Grandjean, T. Kentache, J. Hardouin, **P. Bortolotti**, A. Neidig, *et al.* The aliphatic amidase AmiE is involved in regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Plos one. Soumis*

### **2) Communications orales congrès nationaux**

**Bortolotti P**, Thieffry C, Faure K, Grandjean T, Thepaut M, Guery BP, Kipnis E. Impact of bacterial kynurenines on host response in *Pseudomonas*-induced acute lung injury Journée André Verbert, Lille, 2015, 14 septembre.

**Bortolotti P**, Guery B P, Faure K, Kipnis E.  
Title: Host response to hyphae or yeasts in *Candida albicans* airways and peritoneal infection  
*Host Pathogen interaction translational research group, Lille 2 University, France*  
Congrès medico-scientifique de mycologie, Novembre 2015 – Lyon – France

**Bortolotti P**, Faure E, Thieffry C, Dessein R, Guery B P, Faure K, Kipnis E, Toussaint B, Le Gouellec A.  
Title: Role of bacterial kynurenine in *Pa*-induced acute pneumonia  
*Host Pathogen interaction translational research group, Lille 2 University, France*  
Présentation scientifique au laboratoire TheREx, Decembre 2014 – Grenoble - France

**Bortolotti P**, Grandjean T, Thepaut M, Dessein R, Faure E, Guery B P, Faure K, Kipnis E, Toussaint B, Le Gouellec A.

Titre: Role of kynurénine production by *Pseudomonas aeruginosa* in acute pneumonia  
*Host Pathogen interaction translational research group, Lille 2 University, France*  
Groupe de recherche *Pseudomonas aeruginosa*, Octobre 2014 - Carry le rouet

**Bortolotti P**, Guery B P, Faure K, Kipnis E.

Titre: Candidiasis: discrimination between colonization or invasive disease.  
*Host Pathogen interaction translational research group, Lille 2 University, France*  
Congrès medico-scientifique de mycologie, Juin 2013 – Annecy

### 3) Communications orales congrès internationaux

**Bortolotti P**, Faure K, Grandjean T, Faure E, Thepaut M, Dessein R, Guery BP, Kipnis E.

*Candida albicans* hyphae: Friends or Foes?

ICAAC, Washington, 5-9 septembre 2014

**Award: ASM student travel Grant**

Faure E, Kipnis E, **Bortolotti P**, Faure K, Subtil D, Dessein R.

Bacterial vaginosis: a protective role for the mucosal immune host response.

ICAAC, Washington, 5-9 septembre 2014

Faure E, **Bortolotti P**, Clapies A, Lachâtre M, Martinez L, Mear JB, Dessein R, Guery BP, Faure K, Kipnis E.

Immunosuppressive IL-18 Binding Protein (IL-18BP) therapy: a new target in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung infection. [Poster B-060]

ICAAC 2013 ; Denver, 2013, 10 au 13 Septembre.

Faure E, **Bortolotti P**, Clapies A, Faure K, Guery BP, Dessein R, Kipnis E.

New Therapeutics to target inflammasome during *P. aeruginosa* acute lung infection

Groupe de recherche *Pseudomonas aeruginosa* ; Loulans 2013, 11 et 12 octobre

# Références bibliographiques

---

1. Fujitani S, Sun H-Y, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011 Apr;139(4):909–19.
2. Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Hancock REW, Martínez JL. The intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to  $\beta$ -lactams. *Virulence*. Landes Bioscience; 2011 Mar 1;2(2):144–6.
3. Solh El AA, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Aug;64(2):229–38.
4. François B, Luyt C-E, Dugard A, Wolff M, Diehl J-L, Jaber S, et al. Safety and pharmacokinetics of an anti-PcrV PEGylated monoclonal antibody fragment in mechanically ventilated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Critical Care Medicine*. 2012 Aug;40(8):2320–6.
5. Chemani C, Imberty A, de Bentzmann S, Pierre M, Wimmerova M, Guery BP, et al. Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Lung Injury and Effect of Carbohydrate Ligands. *Infection and Immunity*. 2009 Apr 17;77(5):2065–75.
6. Shen D-K, Filopon D, Chaker H, Boullanger S, Derouazi M, Polack B, et al. High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: implications for tryptophan catabolites. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2008 Aug;154(Pt 8):2195–208.
7. Phillips RS. Structure, mechanism, and substrate specificity of kynureninase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2011 Nov;1814(11):1481–8.
8. Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr*. 1986 May;108(5 Pt 2):800–5.
9. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000 Aug 31;406(6799):959–64.
10. Schweizer HP, Choi K-H. *Pseudomonas aeruginosa* aerobic fatty acid desaturase DesB is important for virulence factor production. 2011 Mar;193(3):227–34.
11. Green SK, Schroth MN, Cho JJ, Kominos SK, Vitanza-jack VB. Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol*. 1974 Dec;28(6):987–91.
12. Berthelot PP, Grattard FF, Mahul PP, Pain PP, Jospé RR, Venet CC, et al. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med*. 2001 Feb 28;27(3):503–12.
13. Kamei A, Koh AY, Gadjeva M, Priebe GP, Lory S, Pier GB. Analysis of acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* gastrointestinal mucosal colonization and horizontal transmission in a murine model. 2010 Jan 1;201(1):71–80.
14. Auboyer C. [*Pseudomonas aeruginosa*: from colonisation to infection]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2003 Jun;22(6):531–3.
15. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. Springer US; 2013 Oct 6;:1–12.
16. Huang X. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Corneal Infection Using an Oligonucleotide Microarray. 2003 Aug 1;44(8):3409–16.

17. Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology*. 2010 Oct;15(7):1037–56.
18. Hauser AR. Ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Care Medicine*. 2012 Aug;40(8):2503–4.
19. Bajmoczy M, Gadjeva M, Alper SL, Pier GB, Golan DE. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and caveolin-1 regulate epithelial cell internalization of *Pseudomonas aeruginosa*. 2009 Aug;297(2):C263–77.
20. West JB. *Respiratory Physiology: The Essentials*. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
21. Alcón A, Fàbregas N, Torres A. Pathophysiology of pneumonia. *Clin Chest Med*. 2005 Mar;26(1):39–46.
22. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax*. 2012 Jan;67(1):71–9.
23. Postma DF, van Werkhoven CH, van Elden LJR, Thijsen SFT, Hoepelman AIM, Kluytmans JAJW, et al. Antibiotic Treatment Strategies for Community-Acquired Pneumonia in Adults. *N Engl J Med*. 2015 Apr 2;372(14):1312–23.
24. Flume PA, Mogayzel PJ Jr., Robinson KA, Goss CH, Rosenblatt RL, Kuhn RJ, et al. Cystic Fibrosis Pulmonary Guidelines. *Am J Respir Crit Care Med*. American Thoracic Society; 2009 Nov;180(9):802–8.
25. Berra L, Sampson J, Wiener-Kronish J. *Pseudomonas aeruginosa*: acute lung injury or ventilator-associated pneumonia? *Minerva anesthesiologica*. 2010 Oct;76(10):824–32.
26. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study\*. *Critical Care Medicine*. 2006 Feb;34(2):344–53.
27. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013 Apr;67(3):159–73.
28. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Publishing Group*. 2009 Sep;7(9):654–65.
29. Taktikos J, Stark H, Zaburdaev V. How the motility pattern of bacteria affects their dispersal and chemotaxis. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e81936.
30. Sawa T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. *J Intensive Care*. 2014;2(1):10.
31. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jun 1;171(11):1209–23.
32. Le Berre R, Faure K, Nguyen S, Pierre M, Ader F, Guery B. Quorum sensing : une nouvelle cible thérapeutique pour *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2006 Jul;36(7):349–57.
33. Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP, et al. Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2005 Jul;187(13):4372–80.
34. Hodgkinson J, Bowden SD, Galloway WRJD, Spring DR, Welch M. Structure-activity analysis of the *Pseudomonas* quinolone signal molecule. *Journal of Bacteriology*. 2010 Jul;192(14):3833–7.
35. Longo DL, Stoltz DA, Meyerholz DK, Welsh MJ. Origins of Cystic Fibrosis Lung Disease. *N Engl J Med*. 2015 Jan 22;372(4):351–62.



36. Cullen L, Weiser R, Olszak T, Maldonado RF, Moreira AS, Slachmuylders L, et al. Phenotypic characterization of an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel: strains of cystic fibrosis (CF) origin show less in vivo virulence than non-CF strains. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2015 Oct;161(10):1961–77.
37. McCaslin CA, Petrusca DN, Poirier C, Serban KA, Anderson GG, Petrache I. Impact of alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* on alveolar macrophage apoptotic cell clearance. *J Cyst Fibros*. 2015 Jan;14(1):70–7.
38. Lovewell RR, Patankar YR, Berwin B. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2014 Apr 1;306(7):L591–603.
39. Pawar V, Komor U, Kasnitz N, Bielecki P, Pils MC, Gocht B, et al. In Vivo Efficacy of Antimicrobials against Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015 Aug;59(8):4974–81.
40. Taylor PK, Yeung ATY, Hancock REW. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J Biotechnol*. 2014 Dec 10;191:121–30.
41. Gloag ES, Turnbull L, Huang A, Vallotton P, Wang H, Nolan LM, et al. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Jul 9;110(28):11541–6.
42. Toussaint B, Delic-Attree I, Vignais PM. *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Oct 15;196(1):416–21.
43. De Soyza A, Hall AJ, Mahenthalingam E, Drevinek P, Kaca W, Drulis-Kawa Z, et al. Developing an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel. *Microbiologyopen*. 2013 Dec;2(6):1010–23.
44. Delic-Attree I, Toussaint B, Froger A, Willison JC, Vignais PM. Isolation of an IHF-deficient mutant of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in algD gene expression. *Microbiology (Reading, Engl)*. 1996 Oct;142 ( Pt 10):2785–93.
45. Ader F, Le Berre R, Faure K, Gosset P, Epaulard O, Toussaint B, et al. Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. *Infection and Immunity*. 2005 Jul;73(7):4263–71.
46. Hancock REW, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. Nature Publishing Group; 2006 Dec;24(12):1551–7.
47. Whitsett JA. Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(5):565–9.
48. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(5):571–7.
49. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):27–35.
50. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Jul 6;343(1):37–49.
51. Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect*. 2011 Dec;13(14-15):1133–45.
52. Eddens T, Kolls JK. Host defenses against bacterial lower respiratory tract infection. *Curr Opin Immunol [Internet]*. 2012 Aug;24(4):424–30.
53. Martin TR, Frevert CW. Innate Immunity in the Lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society*. American Thoracic Society; 2005 Dec 1;2(5):403–11.

54. Misharin AV, Scott Budinger GR, Perlman H. The Lung Macrophage: A Jack of All Trades. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Sep;184(5):497–8.
55. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000 Aug 3;343(5):338–44.
56. Tsai KS, Grayson MH. Pulmonary defense mechanisms against pneumonia and sepsis. 2008 May;14(3):260–5.
57. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science*. 2010 Jan 14;327(5963):291–5.
58. Ramphal R, Balloy V, Jyot J, Verma A, Si-Tahar M, Chignard M. Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. 2008 Jul 1;181(1):586–92.
59. McIsaac SM, Stadnyk AW, Lin T-J. Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. *J Leukoc Biol*. 2012 Aug 14;92(5):977–85.
60. O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jun;13(6):453–60.
61. Kufer TA, Sansonetti PJ. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2011 Feb 1;12(2):121–8.
62. Faure E, Mear JB, Faure K, Normand S, Couturier-Maillard A, Grandjean T, et al. *Pseudomonas aeruginosa* type-3 secretion system dampens host defense by exploiting the NLRC4-coupled inflammasome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Apr 1;189(7):799–811.
63. Rayamajhi M, Zak DE, Chavarria-Smith J, Vance RE, Miao EA. Cutting edge: Mouse NAIP1 detects the type III secretion system needle protein. *The Journal of Immunology*. 2013 Oct 15;191(8):3986–9.
64. Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunological Reviews*. 2015 May;265(1):130–42.
65. Chen C-Y, Chen C-P, Lin K-H. Biological functions of thyroid hormone in placenta. *Int J Mol Sci*. 2015;16(2):4161–79.
66. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttrop N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res*. 2006;7:97.
67. Mijares LA, Wangdi T, Sokol C, Homer R, Medzhitov R, Kazmierczak BI. Airway epithelial MyD88 restores control of *Pseudomonas aeruginosa* murine infection via an IL-1-dependent pathway. *The Journal of Immunology*. 2011 Jun 15;186(12):7080–8.
68. Amano H, Morimoto K, Senba M, Wang H, Ishida Y, Kumatori A, 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*. 2004 Jan 1;172(1):398–409.
69. Kannan S, Huang H, Seeger D, Audet A, Chen Y, Huang C, et al. Alveolar epithelial type II cells activate alveolar macrophages and mitigate *P. Aeruginosa* infection. *PLoS ONE*. 2009;4(3):e4891.
70. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med*. 2011 Mar;17(3-4):293–307.
71. Koh AY, Priebe GP, Ray C, Van Rooijen N, Pier GB. Inescapable Need for Neutrophils as Mediators of Cellular Innate Immunity to Acute *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Infection and Immunity*. 2009 Nov 13;77(12):5300–10.
72. Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *Journal of Experimental Medicine*. 2013 Jul 1;210(7):1283–99.

73. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159–75.
74. Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med*. 2008 358:716-27.
75. Qin L, Quinlan WM, Doyle NA, Graham L, Sligh JE, Takei F, et al. The roles of CD11/CD18 and ICAM-1 in acute *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in mice. *J Immunol*. 1996 Dec 1;157(11):5016–21.
76. Zemans RL, Colgan SP, Downey GP. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 May;40(5):519–35.
77. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:459–89.
78. Liu Y, Merlin D, Burst SL, Pochet M, Madara JL, Parkos CA. The role of CD47 in neutrophil transmigration. Increased rate of migration correlates with increased cell surface expression of CD47. *J Biol Chem*. 2001 Oct 26;276(43):40156–66.
79. Tsai WC, Strieter RM, Mehrad B, Newstead MW, Zeng X, Standiford TJ. CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infection and Immunity*. 2000 Jul;68(7):4289–96.
80. Drusano GL, Vanscoy B, Liu W, Fikes S, Brown D, Louie A. Saturability of granulocyte kill of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011 Jun;55(6):2693–5.
81. Diaz MH, Shaver CM, King JD, Musunuri S, Kazzaz JA, Hauser AR. *Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia. *Infection and Immunity*. 2008 Oct;76(10):4414–21.
82. Hickey MJ, Kubes P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol*. 2009 May;9(5):364–75.
83. Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Jul;150(1):113–22.
84. Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. American Physiological Society; 2000 Dec 1;279(6):L1137–45.
85. Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA, Broaddus VC. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):107–16.
86. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jun;10(6):427–39.
87. Droemann D, Aries SP, Hansen F, Moellers M, Braun J, Katus HA, et al. Decreased apoptosis and increased activation of alveolar neutrophils in bacterial pneumonia. *Chest*. 2000 Jun;117(6):1679–84.
88. Laval J, Ralhan A, Hartl D. Neutrophils in cystic fibrosis. *Biol Chem*. 2016 Jun 1;397(6):485–96.
89. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, Bernuth von H, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*. 2015 Mar;11(3):e1004651.
90. Sallenave J-M. Phagocytic and signaling innate immune receptors: are they dysregulated in cystic fibrosis in the fight against *Pseudomonas aeruginosa*? *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Jul;52:103–7.

91. Koller B, Bals R, Roos D, Korting HC, Griese M, Hartl D. Innate immune receptors on neutrophils and their role in chronic lung disease. *Eur J Clin Invest*. 2009 Jul;39(7):535–47.
92. Förster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):362–71.
93. Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jan;4(1):24–34.
94. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2004 Dec 23;351(26):2715–29.
95. Dustin ML, Tseng S-Y, Varma R, Campi G. T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr Opin Immunol*. 2006 Aug;18(4):512–6.
96. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4<sup>+</sup> T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2012 Feb;12(2):136–48.
97. Rudd CE. The reverse stop-signal model for CTLA4 function. *Nat Rev Immunol*. 2008 Feb;8(2):153–60.
98. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677–704.
99. Kopf M, Schneider C, Nobs SP. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):36–44.
100. Mukae H, Urabe K, Yanagihara K, Ishimoto H, Sakamoto N, Ishii H, et al. Low expression of T-cell co-stimulatory molecules in bone marrow-derived dendritic cells in a mouse model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Tohoku J Exp Med*. 2010 Jan;220(1):59–65.
101. Pembroke TPI, Gallimore AM, Godkin A. Rapid innate control of antigen abrogates adaptive immunity. 2013 Apr;138(4):293–7.
102. Moser C, Johansen HK, Song Z, Hougen HP, Rygaard J, Høiby N. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is more severe in Th2 responding BALB/c mice compared to Th1 responding C3H/HeN mice. *APMIS*. 1997 Nov;105(11):838–42.
103. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Jul 13;343(2):108–17.
104. Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2010 Dec;21(6):413–23.
105. Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunological Reviews*. 2008 Dec;226:160–71.
106. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol*. 2007 Dec;19(6):377–82.
107. Henry T, Kirimanjeswara GS, Ruby T, Jones JW, Peng K, Perret M, et al. Type I IFN signaling constrains IL-17A/F secretion by gammadelta T cells during bacterial infections. *The Journal of Immunology*. 2010 Apr 1;184(7):3755–67.
108. Middendorp S, Nieuwenhuis EES. NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunol*. 2009 Sep;2(5):393–402.
109. Walker JA, McKenzie A. Innate lymphoid cells in the airways. *Eur J Immunol*. 2012 Jun;42(6):1368–74.

110. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2010 Oct;21(5):315–24.
111. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol*. 2011 May;12(5):383–90.
112. Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of Experimental Medicine*, 2006 October, 203(10): 2271–2279
113. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2008 Feb 10;14(3):275–81.
114. Marit Hansson, Elin Silverpil, Anders Lindén, Pernilla Glader. Interleukin-22 produced by alveolar macrophages during activation of the innate immune response. *Inflamm Res*. 2013 Jun;62(6):561-9.
115. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med*. 2005 Sep 19;202(6):761–9.
116. Traves SL, Donnelly LE. Th17 cells in airway diseases. *Curr Mol Med*. 2008 Aug;8(5):416–26.
117. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. 2009 Apr 17;30(4):576–87.
118. Kappes DJ. Developing intestinal fortitude. *Nat Immunol*. 2011 Apr;12(4):281–2.
119. Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Zhang S, Chen Y, Young L, et al. The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. 2006 May;74(5):2578–86.
120. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):503–10.
121. Cortez VS, Robinette ML, Colonna M. Innate lymphoid cells: new insights into function and development. *Curr Opin Immunol*. 2015 Feb;32C:71–7.
122. McKenzie ANJ, Spits H, Eberl G. Innate lymphoid cells in inflammation and immunity. *Immunity*. 2014 Sep 18;41(3):366–74.
123. Choi S, Park YS, Koga T, Treloar A, Kim KC. TNF- $\alpha$  is a key regulator of MUC1, an anti-inflammatory molecule, during airway *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Feb;44(2):255–60.
124. Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Immunol*. 1996 Jul 1;157(1):12–20.
125. Revillard J-P. *Immunologie*. 4ème édition. De Boeck Supérieur; 2001.
126. Lee J-H, Del Sorbo L, Khine AA, de Azavedo J, Low DE, Bell D, et al. Modulation of bacterial growth by tumor necrosis factor- $\alpha$  in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Dec 15;168(12):1462–70.
127. Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Accurso FJ, Kronmal RA, Konstan MW, Burns JL, et al. Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Apr 15;175(8):822–8.
128. Cohen TS, Prince AS. Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest*. 2013 Mar 8;123(4):1630–7.

129. Wölbeling F, Munder A, Kerber-Momot T, Neumann D, Hennig C, Hansen G, et al. Lung function and inflammation during murine *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Immunobiology*. 2011 Aug;216(8):901–8.
130. Chmiel JF, Konstan MW, Saadane A, Krenicky JE, Lester Kirchner H, Berger M. Prolonged Inflammatory Response to Acute *Pseudomonas* Challenge in Interleukin-10 Knockout Mice. *Am J Respir Crit Care Med*. American Thoracic Society New York, NY; 2002 Apr 15;165(8):1176–81.
131. Sawa T, Corry DB, Gropper MA, Ohara M, Kurahashi K, Wiener-Kronish JP. IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Immunol*. 1997 Sep 15;159(6):2858–66.
132. Sun L, Guo R-F, Newstead MW, Standiford TJ, Macariola DR, Shanley TP. Effect of IL-10 on neutrophil recruitment and survival after *Pseudomonas aeruginosa* challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Jul;41(1):76–84.
133. Casadevall A, Pirofski L-A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nature Publishing Group*. 2003 Oct;1(1):17–24.
134. Savoia D. New perspectives in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Future Microbiol*. 2014;9(7):917–28.
135. Song Y, Baer M, Srinivasan R, Lima J, Yarranton G, Bebbington C, et al. PcrV antibody-antibiotic combination improves survival in *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Aug;31(8):1837–45.
136. Milla CE, Chmiel JF, Accurso FJ, VanDevanter DR, Konstan MW, Yarranton G, et al. Anti-PcrV antibody in cystic fibrosis: a novel approach targeting *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Pediatr Pulmonol*. 2014 Jul;49(7):650–8.
137. Worgall S. 40 years on: have we finally got a vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*? *Future Microbiol*. 2012 Dec;7(12):1333–5.
138. Zaman M, Good MF, Toth I. Nanovaccines and their mode of action. *Methods*. 2013 May 1;60(3):226–31.
139. Rodrigues NF, van Tilburg Bernardes E, Rocha RP, da Costa LCF, Coutinho ACA, Santos Muniz dos M, et al. Bovine serum albumin nanoparticle vaccine reduces lung pathology induced by live *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Vaccine*. 2013 Oct 17;31(44):5062–6.
140. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbio*. 2014;4:422.
141. Vernatter J, Pirofski L-A. Current concepts in host-microbe interaction leading to pneumococcal pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*. 2013 Jun;26(3):277–83.
142. Veessenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Critical Care Medicine*. 2009 May;37(5):1777–86.
143. Holder IA. *Pseudomonas* immunotherapy: a historical overview. *Vaccine*. 2004 Feb 17;22(7):831–9.
144. Imperi F, Leoni L, Visca P. Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbio*. 2014;5:178.
145. Martínez JA, Horcajada JP, Almela M, Marco F, Soriano A, García E, et al. Addition of a macrolide to a beta-lactam-based empirical antibiotic regimen is associated with lower in-hospital mortality for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2003 Feb 15;36(4):389–95.
146. Kurnasov OO, Jablonski LL, Polanuyer BB, Dorrestein PP, Begley TT, Osterman AA. Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Oct 23;227(2):9–9.

147. Schwarcz R. The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target. *Current Opinion in Pharmacology*. 2004 Feb;4(1):12–7.
148. Mándi Y, Vécsei L. The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm*. 2011 Jul 9;119(2):197–209.
149. Pucchio TD, Danese S, Cristofaro RD, Rutella S. Inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase: a review of novel patented lead compounds. *Expert Opin Ther Patents*. 2010 Feb;20(2):229–50.
150. Murakami Y, Hoshi M, Imamura Y, Arioka Y, Yamamoto Y, Saito K. Remarkable Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tryptophan Metabolites in Infectious Diseases: Potential Role in Macrophage-Mediated Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation*. Hindawi Publishing Corporation; 2013;2013(11):1–9.
151. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol*. 2013 Mar;34(3):137–43.
152. Esser C, Rannug A. The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology. *Pharmacological Reviews*. 2015 Apr;67(2):259–79.
153. Barth MC, Ahluwalia N, Anderson TJT, Hardy GJ, Sinha S, Alvarez-Cardona JA, et al. Kynurenic acid triggers firm arrest of leukocytes to vascular endothelium under flow conditions. *J Biol Chem*. 2009 Jul 17;284(29):19189–95.
154. Genestet C, Le Gouellec A, Chaker H, Polack B, Guery B, Toussaint B, et al. Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing. *Free Radic Biol Med*. 2014 Aug;73:400–10.
155. Löb S, Königsrainer A, Rammensee H-G, Opelz G, Terness P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer*. 2009 Jun;9(6):445–52.
156. González A, Varo N, Alegre E, Díaz A, Melero I. Immunosuppression routed via the kynurenine pathway: a biochemical and pathophysiological approach. *Adv Clin Chem*. 2008;45:155–97.
157. Dick R, Murray BP, Reid MJ, Correia MA. Structure–function relationships of rat hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase: identification of the putative heme-ligating histidine residues. *Arch Biochem Biophys*. 2001 Aug 1;392(1):71–8.
158. Capece L, Lewis-Ballester A, Marti MA, Estrin DA, Yeh S-R. Molecular basis for the substrate stereoselectivity in tryptophan dioxygenase. *Biochemistry*. 2011 Dec 20;50(50):10910–8.
159. Knox WE, Auerbach VH. The hormonal control of tryptophan peroxidase in the rat. *J Biol Chem*. 1955 May;214(1):307–13.
160. Badawy AA. Possible involvement of the enhanced tryptophan pyrrolase activity in the corticosterone- and starvation-induced increases in concentrations of nicotinamide-adenine dinucleotides (phosphates) in rat liver. *Biochem J*. 1981 Apr 15;196(1):217–24.
161. Yuasa HJ, Ball HJ, Ho YF, Austin CJD, Whittington CM, Belov K, et al. Characterization and evolution of vertebrate indoleamine 2, 3-dioxygenases IDOs from monotremes and marsupials. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol*. 2009 Jun;153(2):137–44.
162. Yuasa HJ, Mizuno K, Ball HJ. Low efficiency IDO2 enzymes are conserved in lower vertebrates, whereas higher efficiency IDO1 enzymes are dispensable. *FEBS J*. 2015 Jul;282(14):2735–45.
163. Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJD, Astelbauer F, Miu J, et al. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*. 2007 Jul 1;396(1):203–13.
164. Fukunaga M, Yamamoto Y, Kawasoe M, Arioka Y, Murakami Y, Hoshi M, et al. Studies on tissue and

- cellular distribution of indoleamine 2,3-dioxygenase 2: the absence of IDO1 upregulates IDO2 expression in the epididymis. *J Histochem Cytochem*. 2012 Nov;60(11):854–60.
165. Löb S, Königsrainer A, Zieker D, Brücher B. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunology*. 2009 Jan;58(1):153-7.
  166. Vogel CFA, Goth SR, Dong B, Pessah IN, Matsumura F. Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Oct 24;375(3):331–5.
  167. Bankoti J, Rase B, Simones T, Shepherd DM. Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Jul;246(1-2):18–28.
  168. Fatokun AA, Hunt NH, Ball HJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and the kynurenine pathway: characteristics and potential roles in health and disease. *Amino Acids*. 2013 Dec;45(6):1319–29.
  169. Prendergast GC, Metz R, Muller AJ, Merlo LMF, Mandik-Nayak L. IDO2 in Immunomodulation and Autoimmune Disease. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:585.
  170. Mellor AL, Munn DH. Ido expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2004 Oct;4(10):762–74.
  171. Fujigaki H, Saito K, Fujigaki S, Takemura M, Sudo K, Ishiguro H, et al. The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. *J Biochem*. 2006 Apr;139(4):655–62.
  172. Litzemberger UM, Opitz CA, Sahm F, Rauschenbach KJ, Trump S, Winter M, et al. Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget*. 2014 Feb 28;5(4):1038–51.
  173. Thomas SR, Mohr D, Stocker R. Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem*. 1994 May 20;269(20):14457–64.
  174. Hayaishi O. Utilization of superoxide anion by indoleamine oxygenase-catalyzed tryptophan and indoleamine oxidation. *Adv Exp Med Biol*. 1996;398:285–9.
  175. Samelson-Jones BJ, Yeh S-R. Interactions between Nitric Oxide and Indoleamine 2,3-Dioxygenase †. *Biochemistry*. 2006 Jul;45(28):8527–38.
  176. Orabona C, Pallotta MT, Volpi C, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, et al. SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Dec 30;105(52):20828–33.
  177. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 1998 Aug 21;281(5380):1191–3.
  178. Xie FT, Cao JS, Zhao J, Yu Y, Qi F, Dai XC. IDO expressing dendritic cells suppress allograft rejection of small bowel transplantation in mice by expansion of Foxp3+ regulatory T cells. *Transpl Immunol*. 2015 Oct;33(2):69–77.
  179. Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-κB activation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Oct;7(10):817–23.
  180. Bozza S, Fallarino F, Pitzurra L, Zelante T, Montagnoli C, Bellocchio S, et al. A crucial role for tryptophan catabolism at the host/*Candida albicans* interface. *J Immunol*. 2005 Mar 1;174(5):2910–8.
  181. El-Zaatari M, Chang Y-M, Zhang M, Franz M, Shreiner A, McDermott AJ, et al. Tryptophan



- catabolism restricts IFN- $\gamma$ -expressing neutrophils and *Clostridium difficile* immunopathology. *The Journal of Immunology*. 2014 Jul 15;193(2):807–16.
182. Lugo-Huitrón R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muñiz P, Carrillo-Mora P, Pedraza-Chaverri J, Silva-Adaya D, et al. On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol*. 2011 Sep;33(5):538–47.
183. Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, et al. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *Journal of Experimental Medicine*. 2009 Aug 31;206(9):2027–35.
184. Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H, et al. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J Biol Chem*. 2006 Aug 4;281(31):22021–8.
185. Tiszlavicz Z, Németh B, Fülöp F, Vécsei L, Tápai K, Ocsovszky I, et al. Different inhibitory effects of kynurenic acid and a novel kynurenic acid analogue on tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production by mononuclear cells, HMGB1 production by monocytes and HNP1-3 secretion by neutrophils. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. Springer-Verlag; 2011 Feb 19;383(5):447–55.
186. Hsieh Y-C, Chen R-F, Yeh Y-S, Lin M-T, Hsieh J-H, Chen S-H. Kynurenic acid attenuates multiorgan dysfunction in rats after heatstroke. *Acta Pharmacol Sin*. 2011 Feb;32(2):167–74.
187. Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2375–81.
188. Hwang SL, Chung NP-Y, Chan JK-Y, Lin C-LS. Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) is essential for dendritic cell activation and chemotactic responsiveness to chemokines. *Cell Res*. 2005 Mar;15(3):167–75.
189. Belladonna ML, Grohmann U, Guidetti P, Volpi C, Bianchi R, Fioretti MC, et al. Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *J Immunol*. 2006 Jul 1;177(1):130–7.
190. Nguyen NT, Kimura A, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, et al. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Nov 16;107(46):19961–6.
191. Chen W. IDO: more than an enzyme. *Nat Immunol*. 2011 Sep;12(9):809–11.
192. Jaspersen LK, Bucher C, Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, Mellor AL, Munn DH, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3257–65.
193. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011 Sep;12(9):870–8.
194. Baban B, Chandler PR, Sharma MD, Pihkala J, Koni PA, Munn DH, et al. IDO Activates Regulatory T Cells and Blocks Their Conversion into Th17-Like T Cells. *The Journal of Immunology*. 2009 Aug 6;183(4):2475–83.
195. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):6752–61.
196. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *The Journal of Immunology*. 2010 Sep 15;185(6):3190–8.
197. Stephens GL, Wang Q, Swerdlow B, Bhat G, Kolbeck R, Fung M. Kynurenine 3-monooxygenase

- mediates inhibition of Th17 differentiation via catabolism of endogenous aryl hydrocarbon receptor ligands. *Eur J Immunol*. 2013 Jul;43(7):1727–34.
198. Sundrud MS, Koralov SB, Feuerer M, Calado DP, Kozhaya AE, Rhule-Smith A, et al. Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. *Science*. 2009 Jun 5;324(5932):1334–8.
  199. Sharma MD, Hou D-Y, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3<sup>+</sup> Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6102–11.
  200. Sucher R, Fischler K, Oberhuber R, Kronberger I, Margreiter C, Ollinger R, et al. IDO and regulatory T cell support are critical for cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4 Ig-mediated long-term solid organ allograft survival. *The Journal of Immunology*. 2012 Jan 1;188(1):37–46.
  201. Baban B, Chandler PR, Johnson BA, Huang L, Li M, Sharpe ML, et al. Physiologic control of IDO competence in splenic dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2011 Sep 1;187(5):2329–35.
  202. Bandeira LG, Bortolot BS, Cecatto MJ, Monte-Alto-Costa A, Romana-Souza B. Exogenous Tryptophan Promotes Cutaneous Wound Healing of Chronically Stressed Mice through Inhibition of TNF- $\alpha$  and IDO Activation. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0128439.
  203. Schmidt SK, Siepmann S, Kuhlmann K, Meyer HE, Metzger S, Pudelko S, et al. Influence of Tryptophan Contained in 1-Methyl-Tryptophan on Antimicrobial and Immunoregulatory Functions of Indoleamine 2,3-Dioxygenase. Guillemin GJ, editor. *PLoS ONE*. 2012 Sep 13;7(9):e44797.
  204. Yuasa HJ, Ball HJ, Austin CJD, Hunt NH. 1-L-methyltryptophan is a more effective inhibitor of vertebrate IDO2 enzymes than 1-D-methyltryptophan. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol*. 2010 Sep;157(1):10–5.
  205. Qian F, Liao J, Vilella J, Edwards R, Kalinski P, Lele S, et al. Effects of 1-methyltryptophan stereoisomers on IDO2 enzyme activity and IDO2-mediated arrest of human T cell proliferation. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Nov;61(11):2013–20.
  206. Stone TW, Stoy N, Darlington LG. An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan. *Trends Pharmacol Sci*. 2013 Feb;34(2):136–43.
  207. Smith JR, Jamie JF, Guillemin GJ. Kynurenine-3-monooxygenase: a review of structure, mechanism, and inhibitors. *Drug Discovery Today*. American Society for Microbiology (ASM); 2015 Nov;62(4):367.
  208. Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati PJ, et al. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *Journal of Neurochemistry*. 2001 Aug;78(4):842–53.
  209. Moroni F, Cozzi A, Sili M, Mannaioni G. Kynurenic acid: a metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery. *J Neural Transm*. 2012 Feb;119(2):133–9.
  210. Mizutani K-I, Sugimoto K, Okuda T, Katsuya T, Miyata T, Tanabe T, et al. Kynureninase is a novel candidate gene for hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2002 Jan;25(1):135–40.
  211. Krause R, Zollner-Schwetz I, Salzer HJF, Valentin T, Rabensteiner J, Prüller F, et al. Elevated levels of interleukin 17A and kynurenine in candidemic patients, compared with levels in noncandidemic patients in the intensive care unit and those in healthy controls. *Journal of Infectious Diseases*. 2015 Feb 1;211(3):445–51.
  212. Pawlak D, Tankiewicz A, Matys T, Buczek W. Peripheral distribution of kynurenine metabolites and activity of kynurenine pathway enzymes in renal failure. *J Physiol Pharmacol*. 2003 Jun;54(2):175–89.

213. Ohtaki H, Ito H, Ando K, Ishikawa T, Hoshi M. Kynurenine production mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase aggravates liver injury in HBV-specific CTL-induced fulminant hepatitis. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Sep;1842(9):1464–71.
214. Lögters TT, Laryea MD, Altrichter J, Sokolowski J, Cinatl J, Reipen J, et al. Increased plasma kynurenine values and kynurenine-tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. *Shock*. 2009 Jul;32(1):29–34.
215. Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *Int J Tryptophan Res*. 2009;2:1–19.
216. Kuc D, Zgrajka W, Parada-Turska J, Urbanik-Sypniewska T, Turski WA. Micromolar concentration of kynurenic acid in rat small intestine. *Amino Acids*. 2008 Aug;35(2):503–5.
217. Patterson AD, Bonzo JA, Li F, Krausz KW, Eichler GS, Aslam S, et al. Metabolomics reveals attenuation of the SLC6A20 kidney transporter in nonhuman primate and mouse models of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Jun 3;286(22):19511–22.
218. Zhao Q, Cao Y, Wang Y, Hu C, Hu A, Ruan L, et al. Plasma and tissue free amino acid profiles and their concentration correlation in patients with lung cancer. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2014;23(3):429–36.
219. Thomas SR, Ray A, Hodson ME, Pitt TL. Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy of *Pseudomonas aeruginosa* in severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax*. 2000 Sep;55(9):795–7.
220. Barth AL, Pitt TL. The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 1996 Aug;45(2):110–9.
221. Knoten CA, Hudson LL, Coleman JP, Farrow JM, Pesci EC. KynR, a Lrp/AsnC-Type Transcriptional Regulator, Directly Controls the Kynurenine Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2011 Nov 9;193(23):6567–75.
222. Farrow JM, Pesci EC. Two Distinct Pathways Supply Anthranilate as a Precursor of the *Pseudomonas* Quinolone Signal. *Journal of Bacteriology*. 2007 Apr 17;189(9):3425–33.
223. Kurnasov O, Goral V, Colabroy K, Gerdes S, Anantha S, Osterman A, et al. NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria. *Chem Biol*. 2003 Dec;10(12):1195–204.
224. Tanaka T, Behrman EJ. The quinoline pathway of tryptophan oxidation in *Pseudomonas*: Synthesis of 7,8-dihydroxykynurenic acid and kynurenic acid-C14. *Analytical Biochemistry*. 1960 Nov;1(3):181–6.
225. Stanier RY, Hayaishi O, Tsuchida M. The bacterial oxidation of tryptophan I. *Journal of Bacteriology*. 1951 Oct;62(4):355–66.
226. Miller IL, Tsuchida M, Adelberg EA. The transamination of kynurenine. *J Biol Chem*. 1953 Jul;203(1):205–11.
227. Palmer GC, Jorth PA, Whiteley M. The role of two *Pseudomonas aeruginosa* anthranilate synthases in tryptophan and quorum signal production. *Microbiology*. 2013 May;159(Pt 5):959–69.
228. Hoshi M, Osawa Y, Ito H, Ohtaki H, Ando T, Takamatsu M, et al. Blockade of indoleamine 2,3-dioxygenase reduces mortality from peritonitis and sepsis in mice by regulating functions of CD11b+ peritoneal cells. *Infection and Immunity*. 2014 Nov;82(11):4487–95.
229. Fox JM, Sage LK, Huang L, Barber J, Klonowski KD, Mellor AL, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances the T-cell response to influenza virus infection. *J Gen Virol*. 2013 Jul;94(Pt 7):1451–61.
230. Peng K, Monack DM. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is a lung-specific innate immune defense mechanism that inhibits growth of *Francisella tularensis* tryptophan auxotrophs. *Infection and*

- Immunity. 2010 Jun;78(6):2723–33.
231. Silva NM, Rodrigues CV, Santoro MM, Reis LFL, Alvarez-Leite JI, Gazzinelli RT. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infection and Immunity*. 2002 Feb;70(2):859–68.
  232. Romani L, Zelante T, De Luca A, Fallarino F, Puccetti P. IL-17 and therapeutic kynurenines in pathogenic inflammation to fungi. *J Immunol*. 2008 Apr 15;180(8):5157–62.
  233. Desvignes L, Ernst JD. Interferon-gamma-responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*. 2009 Dec 18;31(6):974–85.
  234. Iannitti RG, Carvalho A, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Casagrande A, et al. Th17/Treg Imbalance in Murine Cystic Fibrosis Is Linked to Indoleamine 2,3-Dioxygenase Deficiency but Corrected by Kynurenines. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Mar 15;187(6):609–20.
  235. Barth H, Raghuraman S. Persistent infectious diseases say - IDO. Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in disease pathogenesis and implications for therapy. *Crit Rev Microbiol*. 2014 Nov;40(4):360–8.
  236. Bayes HK, Bicknell S, MacGregor G, Evans TJ. T helper cell subsets specific for *Pseudomonas aeruginosa* in healthy individuals and patients with cystic fibrosis. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e90263.
  237. Brandenburg KS, Rodriguez KJ, McAnulty JF, Murphy CJ, Abbott NL, Schurr MJ, et al. Tryptophan inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013 Apr;57(4):1921–5.
  238. Shore DM, Reggio PH. The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. *Front Pharmacol*. 2015;6:69.
  239. Fallarini S, Magliulo L, Paoletti T, de Lalla C, Lombardi G. Expression of functional GPR35 in human iNKT cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jul 30;398(3):420–5.
  240. Divorty N, Mackenzie AE, Nicklin SA, Milligan G. G protein-coupled receptor 35: an emerging target in inflammatory and cardiovascular disease. *Front Pharmacol*. 2015;6:1–13.
  241. Jenkins L, Alvarez-Curto E, Campbell K, de Munnik S, Canals M, Schlyer S, et al. Agonist activation of the G protein-coupled receptor GPR35 involves transmembrane domain III and is transduced via  $G\alpha_{13}$  and  $\beta$ -arrestin-2. *Br J Pharmacol*. 2011 Feb;162(3):733–48.
  242. Deng H, Hu H, Fang Y. Multiple tyrosine metabolites are GPR35 agonists. *Sci Rep*. 2012;2:373.
  243. MacKenzie AE, Lappin JE, Taylor DL, Nicklin SA, Milligan G. GPR35 as a Novel Therapeutic Target. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:68.
  244. Nguyen LP, Bradfield CA. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol*. 2008 Jan;21(1):102–16.
  245. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011 Oct 13;478(7368):197–203.
  246. Qiu J, Zhou L. Aryl hydrocarbon receptor promotes ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> group 3 ILCs and controls intestinal immunity and inflammation. *Semin Immunopathol*. 2013 Nov;35(6):657–70.
  247. Memari B, Bouttier M, Dimitrov V, Ouellette M, Behr MA, Fritz JH, et al. Engagement of the Aryl Hydrocarbon Receptor in *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Macrophages Has Pleiotropic Effects on Innate Immune Signaling. *The Journal of Immunology*. 2015 Nov 1;195(9):4479–91.
  248. Kimura A, Abe H, Tsuruta S, Chiba S, Fujii-Kuriyama Y, Sekiya T, et al. Aryl hydrocarbon receptor

- protects against bacterial infection by promoting macrophage survival and reactive oxygen species production. *International Immunology*. 2014 Apr;26(4):209–20.
249. Vogel CFA, Sciallo E, Li W, Wong P, Lazennec G, Matsumura F. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol*. 2007 Dec;21(12):2941–55.
250. Thatcher TH, Maggirwar SB, Baglolle CJ, Lakatos HF, Gasiewicz TA, Phipps RP, et al. Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice develop heightened inflammatory responses to cigarette smoke and endotoxin associated with rapid loss of the nuclear factor-kappaB component RelB. *Am J Pathol*. 2007 Mar;170(3):855–64.
251. Bessede A, Gargaro M, Pallotta MT, Matino D, Servillo G, Brunacci C, et al. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature*. 2014 Jul 10;511(7508):184–90.
252. Lawrence BP, Roberts AD, Neumiller JJ, Cundiff JA, Woodland DL. Aryl hydrocarbon receptor activation impairs the priming but not the recall of influenza virus-specific CD8+ T cells in the lung. *J Immunol*. 2006 Nov 1;177(9):5819–28.
253. Jin G-B, Moore AJ, Head JL, Neumiller JJ, Lawrence BP. Aryl hydrocarbon receptor activation reduces dendritic cell function during influenza virus infection. *Toxicol Sci*. 2010 Aug;116(2):514–22.
254. Moura-Alves P, Faé K, Houthuys E, Dorhoi A, Kreuchwig A, Furkert J, et al. AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. *Nature*. 2014 Aug 28;512(7515):387–92.
255. Wheeler JLH, Martin KC, Lawrence BP. Novel cellular targets of AhR underlie alterations in neutrophilic inflammation and inducible nitric oxide synthase expression during influenza virus infection. *The Journal of Immunology*. 2013 Jan 15;190(2):659–68.
256. Wheeler JLH, Martin KC, Resseguie E, Lawrence BP. Differential consequences of two distinct AhR ligands on innate and adaptive immune responses to influenza A virus. *Toxicol Sci*. 2014 Feb;137(2):324–34.
257. Vogel CFA, Wu D, Goth SR, Baek J, Lollies A, Domhardt R, et al. Aryl hydrocarbon receptor signaling regulates NF. *Nature Publishing Group*; 2013 Sep 21;:1–8.
258. Lawrence BP, Denison MS, Novak H, Vorderstrasse BA, Harrer N, Neruda W, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1158–65.
259. Jaronen M, Quintana FJ. Immunological Relevance of the Coevolution of IDO1 and AHR. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:521.
260. Pallotta MT, Fallarino F, Matino D, Macchiarulo A, Orabona C. AhR-Mediated, Non-Genomic Modulation of IDO1 Function. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:497.
261. Quintana FJ, Sherr DH. Aryl Hydrocarbon Receptor Control of Adaptive Immunity. *Pharmacological Reviews*. 2013 Jul 26;65(4):1148–61.
262. Wagage S, John B, Krock BL, Hall AO, Randall LM, Karp CL, et al. The aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 production by NK cells. *The Journal of Immunology*. 2014 Feb 15;192(4):1661–70.
263. Beamer CA, Shepherd DM. Role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in lung inflammation. *Semin Immunopathol*. 2013 Nov;35(6):693–704.
264. Van Voorhis M, Knopp S, Julliard W, Fechner JH, Zhang X, Schauer JJ, et al. Exposure to atmospheric particulate matter enhances Th17 polarization through the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e82545.
265. Veldhoen M, Duarte JH. The aryl hydrocarbon receptor: fine-tuning the immune-response. *Curr Opin Immunol*. 2010 Dec;22(6):747–52.

266. Julliard W, Fechner JH, Mezrich JD. The aryl hydrocarbon receptor meets immunology: friend or foe? A little of both. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:458.
267. Del Donno M, Verduri A, Olivieri D. Air pollution and reversible chronic respiratory diseases. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2002 Jun;57(3-4):164–6.
268. Dougherty EC, Calhoun HG. Possible significance of free-living nematodes in genetic research. *Nature*. 1948 Jan 3;161(4079):29.
269. Nigon V, Dougherty EC. Reproductive patterns and attempts at reciprocal crossing of *Rhabditis elegans* Maupas, 1900, and *Rhabditis briggsae* Dougherty and Nigon, 1949 (Nematoda: Rhabditidae). *J Exp Zool*. 1949 Dec;112(3):485–503.
270. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. *Genetics*; 1974 May 1;77(1):71–94.
271. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 1986 Mar 28;44(6):817–29.
272. Bargmann CI. Genetic and Cellular Analysis of Behavior in *C. Elegans*. *Annu Rev Neurosci*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 1993 Mar;16(1):47–71.
273. Vanfleteren JR. Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J*. 1993 Jun 1;292 ( Pt 2):605–8.
274. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806–11.
275. Wolkow CA. Regulation of *C. elegans* Life-Span by Insulinlike Signaling in the Nervous System. *Science*. 2000 Oct 6;290(5489):147–50.
276. Driscoll M, Gerstbrein B. Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nat Rev Genet*. 2003 Mar;4(3):181–94.
277. Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell*. 1999 Jan 8;96(1):47–56.
278. Irazoqui JE, Urbach JM, Ausubel FM. Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jan;10(1):47–58.
279. Ermolaeva MA, Schumacher B. Insights from the worm: the *C. elegans* model for innate immunity. *Semin Immunol*. 2014 Aug;26(4):303–9.
280. Aballay A, Ausubel FM. *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host–pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 2002 vol. 5 (1) pp. 97-101.
281. Luallen RJ, Troemel ER. Breaking barriers: a GPCR triggers immunity in nematodes. *Nat Immunol*. 2014 Sep;15(9):826–8.
282. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR. *C. elegans* II. *The Quarterly Review of Biology* 1998 73:1, 81-81.
283. Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 1983 Nov;100(1):64–119.
284. Garvis S, Munder A, Ball G, de Bentzmann S, Wiehlmann L, Ewbank JJ, et al. *Caenorhabditis elegans* semi-automated liquid screen reveals a specialized role for the chemotaxis gene *cheB2* in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *PLoS Pathog*. 2009 Aug;5(8):e1000540.

285. Blier A-S, Véron W, Bazire A, Gerault E, Taupin L, Vieillard J, et al. C-type natriuretic peptide modulates quorum sensing molecule and toxin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2011 Jul;157(Pt 7):1929–44.
286. Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel FM. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Jan 19;96(2):715–20.
287. Engelmann I, Pujol N. Innate immunity in *C. elegans*. *Invertebrate Immunity*. Volume 708 of the series *Advances in Experimental Medicine and Biology* pp 105-121, 2010.
288. Kim DH. A Conserved p38 MAP Kinase Pathway in *Caenorhabditis elegans* Innate Immunity. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2002 Jul 26;297(5581):623–6.
289. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):641–52.
290. Styer KL, Hopkins GW, Bartra SS, Plano GV, Frothingham R, Aballay A. *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. *EMBO Rep*. 2005 Oct;6(10):992–7.
291. Tenor JL, McCormick BA, Ausubel FM, Aballay A. *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. *Curr Biol*. 2004 Jun 8;14(11):1018–24.
292. Vaitkevicius K, Lindmark B, Ou G, Song T, Toma C, Iwanaga M, et al. A *Vibrio cholerae* protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator grazing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jun 13;103(24):9280–5.
293. Osuchowski MF, Remick DG, Lederer JA, Lang CH, Aasen AO, Aibiki M, et al. Abandon the mouse research ship? Not just yet! *Shock*. 2014 Jun;41(6):463–75.
294. Chen W, Ware LB. Prognostic factors in the acute respiratory distress syndrome. *Clin Transl Med*. 2015 Dec;4(1):65.
295. Boutoille D, Marechal X, Pichenot M, Chemani C, Guery B, Faure K. FITC-albumin as a marker for assessment of endothelial permeability in mice: comparison with 125I-albumin. *Exp Lung Res*. 2009 May;35(4):263–71.
296. Ariffin JK, Sweet MJ. Differences in the repertoire, regulation and function of Toll-like Receptors and inflammasome-forming Nod-like Receptors between human and mouse. *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2013 Mar 26;:1–8.
297. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med*. 2004 May;10(5):487–93.
298. Quenee L, Lamotte D, Polack B. Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques*. 2005 Jan;38(1):63–7.
299. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012 Jul 21;13:1–11.
300. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D662–9.
301. Pharmacodynamic Evaluation of the Intracellular Activity of Antibiotics towards *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a Model of THP-1 Human Monocytes. 2013 Apr 11;57(5):2310–8.
302. Favennec M, Hennart B, Caiazza R, Leloire A, Yengo L, Verbanck M, et al. The kynurenine pathway

- is activated in human obesity and shifted toward kynurenine monooxygenase activation. *Obesity* (Silver Spring). 2015 Oct;23(10):2066–74.
303. Yanofsky C. RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria. *RNA*. 2007 Aug;13(8):1141–54.
  304. Stanier RY, Hayaishi O. The Bacterial Oxidation of Tryptophan: A Study in Comparative Biochemistry. *Science*. 1951 Sep 28;114(2961):326–30.
  305. Bredenbruch F, Nimtz M, Wray V, Morr M, Müller R, Häussler S. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *Journal of Bacteriology*. 2005 Jun;187(11):3630–5.
  306. Okada K, Angkawidjaja C, Koga Y, Takano K, Kanaya S. Characteristic features of kynurenine aminotransferase allosterically regulated by (alpha)-ketoglutarate in cooperation with kynurenine. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e40307.
  307. Han Q, Fang J, Li J. Kynurenine aminotransferase and glutamine transaminase K of *Escherichia coli*: identity with aspartate aminotransferase. *Biochem J*. 2001 Dec 15;360(Pt 3):617–23.
  308. Han Q, Cai T, Tagle DA, Robinson H, Li J. Substrate specificity and structure of human amino adipate aminotransferase/kynurenine aminotransferase II. *Biosci Rep*. 2008 Aug;28(4):205–15.
  309. Crozier KR, Moran GR. Heterologous expression and purification of kynurenine-3-monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens* strain 17400. *Protein Expr Purif*. 2007 Feb;51(2):324–33.
  310. Austin CJD, Rendina LM. Targeting key dioxygenases in tryptophan-kynurenine metabolism for immunomodulation and cancer chemotherapy. *Drug Discovery Today*. 2015 May;20(5):609–17.
  311. Yeung AWS, Terentis AC, King NJC, Thomas SR. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. *Clin Sci*. 2015 Oct;129(7):601–72.
  312. Lee W-S, Lee S-M, Kim M-K, Park S-G, Choi I-W, Choi I, et al. The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid suppresses T cell responses by inhibiting dendritic cell activation. *Int Immunopharmacol*. 2013 Nov;17(3):721–6.
  313. Lee S-M, Lee Y-S, Choi J-H, Park S-G, Choi I-W, Joo Y-D, et al. Tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid selectively induces activated T cell death via intracellular GSH depletion. *Immunol Lett*. 2010 Aug 16;132(1-2):53–60.
  314. Ruiz-Díez B, Sánchez P, Baquero F, Martínez JL, Navas A. Differential interactions within the *Caenorhabditis elegans*—*Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis model. *Journal of Theoretical Biology*. 2003 Dec;225(4):469–76.
  315. Estes KA, Dunbar TL, Powell JR, Ausubel FM, Troemel ER. bZIP transcription factor zip-2 mediates an early response to *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Feb 2;107(5):2153–8.
  316. Evans EA, Kawli T, Tan M-W. *Pseudomonas aeruginosa* Suppresses Host Immunity by Activating the DAF-2 Insulin-Like Signaling Pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog*. *Public Library of Science*; 2008;4(10):e1000175.
  317. Lorè NI, Cigana C, De Fino I, Riva C, Juhas M, Schwager S, et al. Cystic fibrosis-niche adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* reduces virulence in multiple infection hosts. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35648.
  318. Kirienko NV, Cezairliyan BO, Ausubel FM, Powell JR. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 pathogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol*. 2014;1149:653–69.
  319. Tan MW, Ausubel FM. *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 2000 Feb;3(1):29–34.



320. Bdeir K, Higazi AA-R, Kulikovskaya I, Christofidou-Solomidou M, Vinogradov SA, Allen TC, et al. Neutrophil  $\alpha$ -Defensins Cause Lung Injury by Disrupting the Capillary–Epithelial Barrier. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 May;181(9):935–46.
321. Bhattacharya J, Matthay MA. Regulation and Repair of the Alveolar–Capillary Barrier in Acute Lung Injury. *Annu Rev Physiol*. 2013 Feb 10;75(1):593–615.
322. Singh NRP, Johnson A, Peters AM, Babar J, Chilvers ER, Summers C. Acute lung injury results from failure of neutrophil de-priming: a new hypothesis. *Eur J Clin Invest*. 2012 Sep 18;42(12):1342–9.
323. Esser C. The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. *Biochem Pharmacol*. 2009 Feb 15;77(4):597–607.
324. Head J, Begy B, Lawrence BP. Insight into AhR-mediated increases in neutrophilia during infection: iNOS as a potentially new AhR target gene. *The Journal of Immunology*. *Am Assoc Immunol*; 2010 Apr 1;184(Meeting Abstracts 1):37.26.
325. Lawrence BP, Vorderstrasse BA. New insights into the aryl hydrocarbon receptor as a modulator of host responses to infection. *Semin Immunopathol*. 2013 Nov;35(6):615–26.
326. Teske S, Bohn AA, Regal JF, Neumiller JJ, Lawrence BP. Activation of the aryl hydrocarbon receptor increases pulmonary neutrophilia and diminishes host resistance to influenza A virus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Jul;289(1):L111–24.
327. Mayadas TN, Cullere X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol*. 2005 Jul;26(7):388–95.
328. Vogel CFA, Khan EM, Leung PSC, Gershwin ME, Chang WLW, Wu D, et al. Cross-talk between Aryl Hydrocarbon Receptor and the Inflammatory Response: a role for nuclear factor- $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Jan 17;289(3):1866–75.
329. de Souza AR, Zago M, Eidelman DH, Hamid Q, Baglole CJ. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) attenuation of subchronic cigarette smoke-induced pulmonary neutrophilia is associated with retention of nuclear RelB and suppression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Toxicol Sci*. 2014 Jul;140(1):204–23.
330. Jin G-B, Winans B, Martin KC, Lawrence BP. New insights into the role of the aryl hydrocarbon receptor in the function of CD11c<sup>+</sup> cells during respiratory viral infection. *Eur J Immunol*. 2014 Jun;44(6):1685–98.
331. Thatcher TH, Williams MA, Pollock SJ, McCarthy CE, Lacy SH, Phipps RP, et al. Endogenous ligands of the aryl hydrocarbon receptor regulate lung dendritic cell function. *Immunology*. 2016 Jan;147(1):41–54.
332. Kasper SH, Bonocora RP, Wade JT, Musah RA, Cady NC. Chemical Inhibition of Kynureninase Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing and Virulence Factor Expression. *ACS Chem Biol*. 2016 Feb 10.
333. Häscher GM, Prior B, Brenner-Weiss G, Obst U, Overhage J. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) stimulates chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2014;12(1):21–6.
334. Kim K, Kim YU, Koh BH, Hwang SS, Kim S-H, Lepine F, et al. HHQ and PQS, two *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor- $\kappa$ B pathway. *Immunology*. 2010 Apr;129(4):578–88.
335. Lee JS, Cella M, McDonald KG, Garlanda C, Kennedy GD, Nukaya M, et al. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nat Immunol*. 2011 Nov 20;13(2):144–51.

336. Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, Sica G, Sileri P, Biancone L, et al. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2011 Jul;141(1):237–48–248.e1.
337. Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*. 2013 Aug 22;39(2):372–85.
338. Hartl D, Gaggar A, Bruscia E, Hector A, Marcos V, Jung A, et al. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros*. 2012 Sep;11(5):363–82.
339. Nakahama T, Hanieh H, Nguyen NT, Chinen I, Ripley B, Millrine D, et al. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the microRNA-132/212 cluster promotes interleukin-17-producing T-helper cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Jul 16;110(29):11964–9.
340. Kiss EA, Vonarbourg C, Kopfmann S, Hobeika E, Finke D, Esser C, et al. Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science*. 2011 Dec 16;334(6062):1561–5.
341. Stockinger B, Hirota K, Duarte J, Veldhoen M. External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Semin Immunol*. 2011 Apr;23(2):99–105.
342. Cheng D-S, Han W, Chen SM, Sherrill TP, Chont M, Park G-Y, et al. Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the NF-kappa B pathway. *J Immunol*. 2007 May 15;178(10):6504–13.
343. Freewan M, Rees MD, Plaza TSS, Glaros E, Lim YJ, Wang XS, et al. Human indoleamine 2,3-dioxygenase is a catalyst of physiological heme peroxidase reactions: implications for the inhibition of dioxygenase activity by hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 Jan 18;288(3):1548–67.
344. Poljak A, Grant R, Austin CJD, Jamie JF, Willows RD, Takikawa O, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Arch Biochem Biophys*. 2006 Jun 1;450(1):9–19.
345. Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *Journal of Bacteriology*. 2003 Apr;185(7):2080–95.
346. Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*. 2003 Apr;185(7):2066–79.
347. Gilbert KB, Kim TH, Gupta R, Greenberg EP, Schuster M. Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Mol Microbiol*. 2009 Sep;73(6):1072–85.
348. Planès R, Bahraoui E. HIV-1 Tat protein induces the production of IDO in human monocyte derived-dendritic cells through a direct mechanism: effect on T cells proliferation. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74551.
349. Boasso A, Herbeuval J-P, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Fuchs D, et al. HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3351–9.
350. Loughman JA, Hunstad DA. Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase by Uropathogenic Bacteria Attenuates Innate Responses to Epithelial Infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2012. Jun 15;205(12):1830–9.

## RESUMÉ

*Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) est un pathogène opportuniste responsable d'infections pulmonaires aiguës graves chez les malades prédisposés. Devant l'émergence croissante de la résistance aux antibiotiques, le développement de thérapeutiques alternatives adjuvantes est indispensable et nécessite la compréhension des interactions hôte-pathogènes au cours de l'infection. La voie métabolique de dégradation du tryptophane appelée voie des kynurénines produit chez l'hôte des métabolites aux propriétés immunomodulatrices connues. Récemment, l'existence de cette voie a été mise en évidence chez *Pa*, bien que la nature et la quantité de métabolites produits ne soient pas parfaitement connus. La production bactérienne de kynurénines pourrait interférer avec la mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte et sa régulation au cours des différentes phases de l'infection, altérant la balance immunitaire pulmonaire au profit du pathogène. A ce titre, la voie des kynurénines de *Pa* constituerait une cible thérapeutique potentielle. L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier l'implication de la voie des kynurénines de *Pa* dans la virulence bactérienne et la réponse immune de l'hôte dans un modèle murin d'agression respiratoire aiguë. Pour cela, les souris sont infectées avec des souches sauvages de *Pa*, avec des souches mutantes  $\Delta$ kynA, non productrices de kynurénines, et des souches  $\Delta$ kynU, surproductrices de kynurénines. Les interactions potentielles avec la voie des kynurénines de l'hôte sont explorées en inhibant la première enzyme de la voie métabolique, l'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO). Enfin, le rôle du récepteur arylhydrocarbène (AhR), récepteur connu des kynurénines et impliqué dans l'immunité pulmonaire, est exploré en comparant la réponse à l'infection de souris AhR KO à celle des souris sauvages. Dans ce travail, nous décrivons tout d'abord la production des différents métabolites de la voie des kynurénines de *Pa* *in vitro* et *in vivo* dans le modèle d'infection respiratoire aiguë, en décrivant pour la première fois la production d'acide kynurénique et de 3-hydroxy-kynurénine pour cette bactérie. Ensuite, nous montrons que les kynurénines bactériennes interfèrent avec la réponse immune de l'hôte, en majorant le recrutement cellulaire alvéolaire, tout en atténuant le niveau d'inflammation et l'activation des cellules présentatrices d'antigènes. Enfin, nous rapportons que l'IDO et l'AhR sont impliqués dans cette immunomodulation, faisant des kynurénines bactériennes des agents du dialogue hôte-pathogène au cours de l'infection respiratoire aiguë. A la lumière de ces résultats, la voie des kynurénines pourrait constituer une cible thérapeutique d'intérêt dans les infections respiratoires à *P. aeruginosa*.

**Mots-clés** : *Pseudomonas aeruginosa*, Kynurénine, pneumonie, IDO, AhR, immunité

Unité de recherche: EA7366

Faculté de médecine de Lille, pôle Recherche, 1place de Verdun, 5ème étage aile ouest, 59000 Lille, France. laboinfectiolille@gmail.com